

論 文 要 旨

Tacrolimus-eluting Stent Inhibits Neointimal Hyperplasia via Calcineurin/NFAT Signaling in Porcine Coronary Artery Model

〔 タクロリムス溶出ステントは、ブタ冠動脈モデルにおいて、Calcineurin/NFAT シグナル伝達系を介して新生内膜肥厚を抑制する。 〕

濱田 成郷

【序論および目的】

経皮的冠動脈形成術 (PCI) は、薬剤溶出性ステントの出現で、再狭窄を飛躍的に抑制することに成功した。しかし、シロリムス溶出性ステントやパクリタキセル溶出性ステントでは、遅発性のステント内血栓症など解決すべき問題がある。

タクロリムス溶出性ステント (TES) は、薬剤に免疫抑制剤であるタクロリムスを使用しており、タクロリムスは培養実験において、血管平滑筋の増殖は抑制するが、血管内皮細胞の増殖抑制作用はシロリムスより弱いという特徴を持っている。

本研究の目的は、ブタの冠動脈モデルを用いて、TES のステント内再狭窄に対する有用性を検討し、培養血管平滑筋細胞を用いてその機序を検討することである。

【材料および方法】

メスの仔ブタに対して、バルーンによる過拡張後に、TESと金属ステント (BMS) を冠動脈に留置し、ステント留置12週後に、定量的冠動脈造影による内腔狭窄率を測定した。屠殺後に冠動脈を回収し、組織学的に新生内膜肥厚部面積、面積狭窄率を評価した。その切片に対してcalcineurin及びvon Willebrand factor (vWF)、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) に対する免疫組織化学染色を施行した。また、冠動脈から蛋白を抽出し、Western blot法でcalcineurin、nuclear factor of activated T cell (NFATc4) 及びinterleukin-2 (IL-2) の発現を比較検討した。

更に、ラットの培養血管平滑筋細胞を用いて機序を検討した。5000 個の平滑筋細胞を培養皿に蒔き、12.5 μ M の tacrolimus を加えた群と control 群とに分けた。薬物処置 48 時間後に細胞数の測定及び抽出した蛋白を使用して Western blot 法で calcineurin、NFATc4 及び IL-2 の蛋白発現を比較検討した。また、calcineurin の血管平滑筋への作用を検討するため、calcineurin の small-interfering RNA (siRNA) あるいは control (control-siRNA) をラット VSMC に transfect した後、増殖能や calcineurin、NFATc4 及び IL-2 の発現を比較検討した。

【結 果】

BMS 群に比べ TES 群では、内腔狭窄率 (TES: $48.4 \pm 13.6\%$ 、BMS: $82.5 \pm 16.2\%$, $P < 0.005$)、新生内膜肥厚部面積 (TES: $3.87 \pm 1.18 \text{ mm}^2$ 、BMS: $5.81 \pm 0.70 \text{ mm}^2$, $P < 0.05$)、面積狭窄率 (TES: $45.3 \pm 7.2\%$ 、BMS: $64.4 \pm 14.7\%$, $P < 0.05$) ともに有意に抑制されていた。

免疫組織化学染色において、BMS 群で中膜及び新生内膜の血管平滑筋細胞に calcineurin の発現が認められた。それに比べ、TES 群では、中膜及び新生内膜の平滑筋細胞において calcineurin の発現の低下が認められた。vWF、eNOS の発現は両群で差がなく、再内皮化に関しては同等だった。

Western blot 法でも calcineurin、NFATc4 及び IL-2 の発現は BMS と比較して TES では抑制されていた。

血管平滑筋細胞を用いた培養実験では、control 群と比べ、tacrolimus 群では、有意に細胞数が少なく tacrolimus による増殖抑制作用が示された (tacrolimus 群: 12533 ± 176 cells, control 群: 15833 ± 384 cells $p < 0.005$)。Western blot 法でも calcineurin、NFATc4 及び IL-2 の発現は control 群と比較して tacrolimus 群では抑制されていた。

siRNA で血管平滑筋細胞の calcineurin 発現を抑制したところ、血管平滑筋細胞の増殖が抑制され、calcineurin、NFATc4 及び IL-2 の発現は control と比較して抑制されていた。

【結論及び考察】

本研究において、タクロリムス溶出性ステントが、calcineurin / NFAT pathway を阻害することで血管平滑筋細胞の増殖を抑制し、ステント内再狭窄を抑制することが示された。

活性化型 T 細胞においては、タクロリムスは FK binding protein (FKBP) と複合体を作り、calcineurin と結合する。そして、NFAT を阻害し、IL-2 の活性化を抑制する。また、タクロリムスには血管平滑筋の増殖を抑制するという報告もあり、我々の細胞培養実験でも同様に増殖が抑制され、同様の機序で calcineurin / NFAT pathway を阻害することが示された。更に、calcineurin の発現を siRNA で抑制すると血管平滑筋細胞の増殖が抑制されることから、calcineurin はステント再狭窄抑制に対しての重要な標的分子になると考えられた。

タクロリムスは、培養内皮細胞ではシロリムスと比較して増殖抑制効果が弱いとの報告があり、再内皮化を促進し、再狭窄や遅発性のステント内血栓症を予防する効果が期待される。我々の実験では、シロリムスとの比較はできなかったが、ブタの冠動脈で BMS と TES の間に再内皮化は有意差を認めず、TES の再内皮化が確認された。

ブタや培養細胞実験において、TES はステント再狭窄抑制や再内皮化が示されたが、臨床試験では異なる場合もある。今後は、臨床試験により TES の有用性を検証することが必要である。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 147 号	学位申請者	濱田 成郷
審査委員	主査	松山 隆美	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	井本 浩	副査 谷本 昭英
	副査	竹中 俊宏	副査 新村 英士

Tacrolimus-eluting Stent Inhibits Neointimal Hyperplasia via Calcineurin/NFAT Signaling in Porcine Coronary Artery Model

(タクロリムス溶出ステントは、ブタ冠動脈モデルにおいて、Calcineurin/NFAT シグナル伝達系を介して新生内膜肥厚を抑制する。)

薬剤溶出性ステントの出現は、経皮的冠動脈形成術 (PCI) の再狭窄を抑制することに成功したが、遅発性のステント内血栓症など解決すべき問題がある。タクロリムス溶出性ステント (TES) は、薬剤に免疫抑制剤であるタクロリムスを使用しており、培養実験において血管平滑筋の増殖は抑制するが、血管内皮細胞の増殖抑制作用はシロリムス (mTOR 阻害剤) より弱いという特徴を持っている。本研究では、タクロリムス溶出ステント (TES) の有効性や作用機序をブタの冠動脈モデルや培養血管平滑筋細胞 (VSMC) を用いて検討している。

メスの仔ブタを用いて、TESと金属ステント (BMS) 留置後の再狭窄を、定量的冠動脈造影による内腔狭窄率や組織学的に新生内膜肥厚部面積、面積狭窄率で評価している。また、calcineurin及びvon Willebrand factor (vWF)、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) に対する免疫組織化学染色を施行し、Western blot法でcalcineurin、nuclear factor of activated T cell (NFATc4) 及びinterleukin-2 (IL-2) の発現を比較検討している。次に、ラットのVSMCを用いてタクロリムスを加えた群とコントロール群とに分け、細胞数の測定及びWestern blot法でcalcineurin、NFATc4及びIL-2の蛋白発現を比較検討し、さらにcalcineurinのsmall-interfering RNA (siRNA) あるいはcontrol (control-siRNA) をラットVSMCにtransfectした後、増殖能やcalcineurin、NFATc4及びIL-2の発現を比較検討している。

本研究で得られた新知見は以下の6点である。

1. ブタにおいて、TES は BMS に比べ再狭窄を有意に抑制していた。
2. 免疫組織学染色では、TES は BMS に比べ calcineurin の発現が低下していた。
3. Western blot 法でも calcineurin、NFATc4 及び IL-2 の発現は TES は BMS に比べ抑制されていた。
4. VSMC を用いた培養実験では、タクロリムスの VSMC 抑制作用が示された。
5. VSMC を用いた培養実験では、Western blot 法で、calcineurin、NFATc4 及び IL-2 の発現はタクロリムス投与により抑制されていた。
6. siRNA で calcineurin 発現を抑制することにより、VSMC の増殖が抑制された。

以上により、タクロリムス溶出性ステントはブタの冠動脈モデルで再狭窄を抑制し、*in vitro* の実験で、タクロリムスの VSMC に対する抗増殖作用が示された。いずれの実験系でも calcineurin/NFAT/IL-2 の発現の抑制が示された。従って、タクロリムス溶出性ステントの作用機序として、calcineurin / NFAT pathway を阻害することで血管平滑筋細胞の増殖を抑制し、ステント内再狭窄を抑制することが示唆された。

よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 1 4 7 号		学位申請者	濱田 成郷
審査委員	主査	松山 隆美	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	井本 浩	副査	谷本 昭英
	副査	竹中 俊宏	副査	新村 英士

主査および副査の5名は、平成23年9月14日、学位申請者 濱田 成郷君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 実験に使用したブタの種類や系統は何ですか？

(回答) 普通の食用ブタですが、系統はわかりません。

質問2) オスではなくメスの仔豚を使用した理由は何ですか？

(回答) ブタの実験は外部施設で行っており、その施設の方針です。

質問3) 実験に使用したブタは何匹ですか？

(回答) 4匹使用し、合計12血管にステントを植え込みました。

質問4) 細胞培養実験でブタ由来の平滑筋細胞を使わず、ラットの平滑筋細胞を使用したのはなぜですか？

(回答) 当実験室で血管平滑筋細胞の実験にはラットの大動脈由来の平滑筋細胞を汎用していたため用いました。また、人の冠動脈由来の血管平滑筋細胞でも実験は行っています。

質問5) 中膜由来の培養血管平滑筋細胞で内膜増殖の評価をしてもいいのですか？

(回答) 新生内膜肥厚部の平滑筋細胞はほとんどが中膜由来のため、中膜由来の培養細胞でも問題ないと考えています。また、培養系では平滑筋細胞が収縮型から形質転換している為問題ないと思います。

質問6) 内膜の平滑筋細胞は中膜由来と考えてよいのですか、骨髄由来細胞の関与はないのですか？

(回答) 骨髄由来の細胞も関与していると思いますが、再狭窄病変では中膜由来の平滑筋細胞が重要であると考えています。

質問7) NFAT のタンパク発現そのものが減っていますが、脱リン酸化に関与しているだけではないのですか？

(回答) *in vivo* でも *in vitro* でも NFAT の発現が抑制されており、カルシニューリンは脱リン酸化だけではなく、その発現にも関与していると考えます。

質問8) タクロリムスは増殖抑制濃度で使用されており、細胞増殖抑制による二次的なカルシニューリンのタンパク減少ではないですか？

(回答) Western blot ではタンパク量を両群で合わせているため、細胞増殖抑制による二次的な効果ではなく、タクロリムスによる効果だと考えております。

質問9) カルシニューリンは NFAT 以外にも脱リン酸化する物質があり、平滑筋細胞増殖抑制には、他にもメカニズムがあるのではないですか？

(回答) 他の経路もあると考えられ、今回示した機序はタクロリムスによる再狭窄機序の一つにすぎないと考えております。

質問10) タクロリムスにより P27 が overexpression しているという報告もあるが、その検討はしていますか？

(回答) 我々は検討していませんがタクロリムス溶出性ステントの増殖抑制機序の一つに、P27 を介した細胞周期の抑制も報告されております。それに加えてカルシニューリンを抑制することがプラスアルファの効果をもたらすのではないかと考えています。

質問11) 対照の金属ステントは、タクロリムス溶出性ステントのタクロリムス以外は一緒ですか？ポリマーの影響はどうですか？

(回答) 本研究では同じステントを使い、ポリマーは含有しておりません。しかし、ポリマーのみを含んだステントによる実験も別途行っており、ポリマーの再狭窄への影響はほとんどありませんでした。

質問12) additional figure1 のスケールバーの表記に間違いはありませんか？

(回答) 5mmではなく0.5mmの間違いでした。

最終試験の結果の要旨

質問 1 3) Fig. 3 のアスタリスクはステントですが、TES の方が大きく見えますが、いかがですか？

(回答) TES の方が再狭窄が少なく、ステント部分を新生内膜が覆ってないため大きく見えますが、サイズは一緒です。

質問 1 4) 内皮の評価は具体的にどうやって測ったのですか、eNOS の評価はどうですか？

(回答) 血管内周及び、染色陽性細胞の数を計測し比率にしました。eNOS も同様に評価し、論文にはデータは出しておりませんが、両群に差はありませんでした。

質問 1 5) 臨床試験では TES は何と比較しましたか？Cypher ですか？うまくいかなかった理由は何ですか？

(回答) Cypher ではなくベアメタルステントとの比較です。薬剤溶出スピードや濃度に問題があったと考えています。

質問 1 6) 理想的な溶出曲線にするアイデアはありますか？

(回答) ポリマーを二層性にして、早期に溶出させる部分と、長期に溶出させる部分を作ることです。

質問 1 7) ブタは合計 4 匹使ったとのことですが、免疫組織学染色などに使ったブタは 2、4 週にサクリフェイスしていますが、詳しく教えてください。

(回答) 再狭窄評価には 4 匹用いています。ただし、免疫組織化学染色用には別のブタにステントを植え込み、実験に使用しています。

質問 1 8) ステント植込みは LAD、LCx、RCA に行っているが、通常は同じ血管を使うのではないのでしょうか。問題はありますか？

(回答) 効率性やコストの関係もありすべての血管を用いましたが、結果をみると血管による差は認めなかったため、問題なかったと考えています。

質問 1 9) 免疫組織学染色などに使用した抗体は抗ヒト抗体だが、抗ブタ抗体の使用はできなかったのか？または、使用していたら違った結果になっていた可能性はありますか？

(回答) 抗ブタ抗体がなく、抗ヒト抗体で問題なく染まっていたので使用しました。抗ブタ抗体を使用したら違う結果になった可能性もあります。

質問 2 0) introduction の最後の human は rat で、Fig.4 の 4W は 12W ではないですか？

(回答) ご指摘の通りです。

質問 2 1) どうして human の平滑筋細胞を使用しなかったのですか？

(回答) human の冠動脈由来の平滑筋細胞でも実験しましたが、高濃度のタクロリムスを添加しないと増殖は抑制されず、より効果のあるラットの結果を論文には記載しました。

質問 2 2) そうであれば臨床応用を考えると negative data も出すべきではないですか？

(回答) はい、negative data にも意味があると思います。

質問 2 3) Fig.4 ではカルシニューリン、NFAT、IL-2 が発現しているが、傷害していない血管には発現していないですか？

(回答) 検討はしていませんが、培養細胞の実験結果からある程度は発現しているかもしれません。

質問 2 4) 培養実験でのタクロリムス濃度はどうやって決めましたか？

(回答) 100 μ M から順に 50、25、12.5、6.25 と濃度を低くしていき、細胞増殖を抑制した一番低い濃度である 12.5 μ M を採用しました。

質問 2 5) Fig.3 のカルシニューリンの発現がステント周辺で多く見えるが、異物による反応ですか？

(回答) 異物による反応の可能性もありますが、ステント周囲に傷害を与えているので、傷害に伴う反応と考えられます。

質問 2 6) 傷害の影響はそんなに長く続くのか？内皮ができればおさまると考えるが、如何ですか？

(回答) 予備実験で行ったラビットの頸動脈バルーン傷害モデルでは 1 6 週まで内膜増殖は続き、またカルシニューリンの発現も持続していました。内膜の増殖が続く限りカルシニューリンは発現し続けると考えられます。それゆえ薬剤溶出ステントでは長期わたって薬剤を溶出することが大切だと考えます。

質問 2 7) IL-2 が *in vivo* でも *in vitro* でも発現しているが平滑筋細胞に出るのは珍しい。普通は T リンパ球で発現すると思うが如何ですか？

(回答) 本研究の Western blot では、冠動脈由来のタンパクには平滑筋細胞以外の細胞由来のものが混ざりますが、平滑筋細胞のみの培養系でも発現していますので、IL-2 は平滑筋細胞でも発現すると思えます。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。