

学位論文（要約）

Smooth Muscle Cells of Human Veins Show An Increased Response  
to Injury at Valve Sites

（弁部由来のヒト静脈平滑筋細胞は組織障害関連因子に対する  
反応性が亢進している）

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

菊地 信介

（Lihua Chen、Kevin Xiong、齊藤 幸裕、東 信良、Gale Tang、  
Michael Sobel、Thomas N Wight、Richard D Kenagy と共著）

## 学 位 論 文 題 目

### Smooth Muscle Cells of Human Veins Show An Increased Response to Injury at Valve Sites

(弁部由来のヒト静脈平滑筋細胞は組織障害関連因子に対する反応性が亢進している)

著者名

菊地 信介

共 著 者 名

Lihua Chen, Kevin Xiong, 齊藤幸裕, 東 信良, Gale Tang, Michael Sobel, Thomas N Wight, Richard D Kenagyと共著

Available online (Journal of Vascular Surgery 2017)

## 研 究 目 的

自家静脈グラフトは、閉塞性動脈硬化症をはじめとする末梢動脈疾患 (PAD) に対する血行再建術に使用する第一選択のグラフトである。その耐久性は良好であるが自家静脈グラフト症例の20-30%に発生する進行性内膜肥厚によるグラフト閉塞が临床上問題となっている。これは静脈が動脈環境に置かれることで生じる生理的反応であるが、これが過度となると進行性内膜肥厚 (IH) を惹起し術後中長期のグラフト開存成績に大きな影響を及ぼす。IH好発部位の一つは静脈弁部で約20%に発生することが知られている。我々は手術で得られた移植前の余剰大伏在静脈を用いて、同一患者の弁部と非弁部の組織及び細胞の機能を比較検討した。

## 材 料 ・ 方 法

ヒト大伏在静脈は冠動脈バイパスもしくは下肢動脈バイパス手術時にその残余片を獲得し実験に用いた。大伏在静脈は外膜周囲組織及び内皮を除去した後、肉眼的に弁部と非弁部を同定し分離した後に、解剖顕微鏡下で組織学的に構造が疎な部分で用手的に外膜側と内膜側に解離させた。各組織は等大の組織片に切り分け、20% Fetal bovine serum (FBS) /DMEMで培養した。Ex-vivo実験として、組織片より遊走、増殖した合計細胞数を、Cells/explantとして細胞遊走の指標とした。また、組織免疫染色の評価のため弁部および非弁部を含む大伏在静脈を上記の様に解離させずに最大4日間同条件で培養し、各部位での細胞増殖 (Ki67染色)、細胞死 (TUNEL染色) を評価した。In-vitro実験のため上記弁部及び非弁部組織片から遊走した細胞を培養し、細胞遊走評価にはMicrochemotaxis chamber、細胞増殖評価には細胞カウントを用いた。

## 成 績

弁部および非弁部の組織細胞遊走を検討したところ、内側層では弁部が有意に高かったが ( $18.2 \pm 2.7$  vs.  $7.5 \pm 3.0$ ;  $P < 0.001$ )、外側層では差がなかった。内側層の弁部 Ki67 核陽性率は非弁部に比べ有意に高かった ( $19.3 \pm 5.4\%$  vs.  $6.8 \pm 2.0\%$ ;  $P < 0.05$ )。遊走した細胞

は蛍光免疫染色で smooth muscle  $\alpha$ -actin 及び smooth muscle myosin heavy chain 陽性で、血管平滑筋細胞(SMC)であった。弁部 SMC は非弁部 SMC に比較して PDGF-BB、FBS 刺激による遊走能が有意に亢進しており、特に PDGF-BB の効果が高かった。また PDGF-BB 刺激により弁部 SMC は非弁部 SMC に比べ有意に増殖した。以上の結果から弁部 SMC における増殖能、遊走能の表現型の違いは、主に PDGF-BB に対する反応性の差から生じていると考えられた。

ヒト動脈由来 SMC を PDGF-BB で刺激すると、FGF2 の分泌を認め増殖能が上昇したことから<sup>1</sup>、両群 SMC における PDGF-BB 刺激後の FGF2 分泌量を測定したが、細胞外へパリン結合性、培養液内、細胞周囲に有意差は認められなかった。しかし弁部 SMC の細胞遊走及び増殖は FGF2 抗体によって有意に抑制され、外因性 FGF2 刺激により弁部 SMC の遊走能が有意に増加した。一方で非弁部 SMC では無効であった。以上より、細胞培養において PDGF-BB/FGF2 システムは弁部 SMC で特徴的であることが示唆された。

弁部 SMC に特徴的な PDGF-BB/FGF2 システム解明において、PDGF-BB に対する受容体である PDGFR  $\beta$  受容体及び  $\alpha$  受容体に対する反応性を確認するため、初めに PDGFR  $\beta$  受容体抗体を用いて PDGF-BB 刺激を阻害したところ、遊走能は非弁部 SMC では完全に抑制されたが、弁部 SMC では部分的抑制に留まった。PDGFR  $\alpha$  受容体抗体も同時に阻害したが、その効果に変化は認められなかった。続いて、FGF2 抗体と PDGFR  $\beta$  受容体抗体による同時阻害では、非弁部 SMC では PDGFR  $\beta$  受容体阻害時と同様の結果で、FGF2 抗体による追加阻害能は認められなかったが、弁部 SMC では PDGF-BB 刺激による遊走能の 90%以上が抑制された。弁部 SMC において、PDGF-BB 刺激による遊走には PDGFR  $\beta$  及び FGF2 が必要条件であることが示された。一方で非弁部 SMC では FGF2 は不要であった。

これまでの細胞培養の結果を改めて組織培養で検証した。弁部及び非弁部組織培養で FGF2 抗体を用いて組織からの細胞遊走能を阻害したところ、両群ともに阻害効果が認められなかった。しかし PDGFR  $\alpha$ 、 $\beta$  抗体は弁部及び非弁部双方を有意に阻害した。以上より弁部組織の細胞遊走能への FGF2 の関与は否定された。弁部組織の遊走に関与する因子を同定するために、弁部、非弁部の内側層組織を用いて RNA シークエンス解析を施行したところ、31 遺伝子が弁部内側組織に有意に異発現していた。その一遺伝子である SEMA3A は神経軸索遊走に関与する遺伝子であり、SEMA3A に対する阻害剤 SEMA ペプチドを作用させたところ、弁内側組織から細胞遊走を有意に促進させ、非弁部内側組織には効果を示さなかった。以上より SEMA3A が弁部内側組織に特徴的な遊走阻害因子であることを同定した。

## 考 案

内膜肥厚研究のデータは膨大にも関わらず 30 年間で全く未解決の問題である。我々は本研究で静脈グラフトにおける IH に関して、その好発部位である弁部の組織障害関連因子に対する細胞及び組織応答に着目した。

### 1) 弁部細胞遊走/増殖のメカニズム

弁部 SMC の特徴として PDGF-BB 刺激に対する FGF2 の関与が認められた。これは PDGF-BB 刺激に対する PDGFR を介する古典的シグナル経路以外の活性化経路が存在することを示唆し、PDGF-BB、FGF2 に関与し得る分子として、NRP1 (SEMA3A に対する受容体) の可能性が挙げられる。PDGF-BB は NRP1 に結合し SMC の遊走に関与する報告や、FGF2 が NRP1 に結合することで FGF2 成長因子の活性化を高める報告もなされている。

### 2) 組織培養と細胞培養における関連性

細胞培養結果から弁部 SMC と非弁部 SMC の明らかな違いは FGF2 の関与である。FGF2 は重要な SMC 遊走因子であることが報告されているが、これは静脈と動脈の違い、種による違いが関与している可能性がある。また組織培養は細胞培養と異なり、より複雑な細胞応答であることが考えられ、必ずしも細胞培養の結果が組織培養に適応できないことを示唆してい

る。弁部SMCにおける特徴的なFGF2の関与は、組織培養において何らかの因子により阻害されている可能性もある。

### 3) 弁部組織の遺伝子発現

30以上の弁部特異的な遺伝子発現を確認した。その一つであるSEMA3Aは、SEMAドメインと呼ばれる特徴的なアミノ酸配列を持つ分泌型タンパク質であり、Nrp1を介してPlexin-Aを活性化することで細胞内に情報を伝達することが知られている。リンパ管の弁部造成への関与や細胞遊走への関与が報告されている。SEMA3AのSMC遊走への関与は組織依存的と考えられ、気道由来あるいは臍動脈由来のSMCでその効果が報告されている。今後さらなる検討が必要と考える。

## 結 論

ヒト大伏在静脈の弁部由来のSMCは、非弁部由来のSMCに比べ組織障害関連因子に対する反応性が亢進している。この反応は動脈バイパスに用いられた静脈グラフトにおける弁部肥厚の原因である可能性がある。

## 引 用 文 献

1. Millette E, Rauch BH, Defawe O, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW. Platelet-derived growth factor-BB-induced human smooth muscle cell proliferation depends on basic FGF release and FGFR-1 activation. *Circ Res.* 2005;96(2):172-9.