

学 位 論 文 題 名

# Induction of Apoptosis After Stent Implantation in Canine Portal Vein

(犬の門脈へのステント留置後のアポトーシス誘導)

## 学位論文内容の要旨

背景: 近年、血管疾患の治療法として多くの endovascular surgery (血管内治療) が導入され、急速に普及しつつある。Endovascular surgery は低侵襲的で高齢者やハイリスク患者にも適応になる。Expandable metallic stent (ステント) は経皮的血管拡張術 (percutaneous transluminal angioplasty: PTA) の発達の中からは生まれてきたものであり、冠動脈や頸動脈、末梢動脈、上下大静脈、門脈などの閉塞性血管疾患の治療に広く使用されている。ステントは動脈系においては閉塞性動脈硬化症、静脈系においては Budd-Chiari 症候群や悪性腫瘍による狭窄、門脈圧亢進症などで使用されている。ステント挿入後の血管リモデリングについて、動脈における基礎的検討は数多く行われているが、静脈では極めて少ない。そこで、われわれはステント挿入後の門脈の血管リモデリングを調べ、とくに内膜肥厚におけるプログラム細胞死 (アポトーシス) の関与について検討した。

材料と方法: 実験は10キロ前後のビーグル犬11頭を使用し、その門脈に Gianturco Z stent を留置した。ステントは直径8mm、長さ15mm のものを使用した。6頭は4週で、5頭は12週でステントを含んだ門脈を摘出した。また他の6頭の犬の正常門脈を摘出し対照とした。摘出標本はホルマリンで48時間固定した後ステントを摘出し、パラフィンブロックにした。形態的变化を観察するため H.E. 染色を行った。血管平滑筋細胞及び膠原繊維はアルファアクチン染色、アニリンブルー染色で観察した。アポトーシスはタネル染色で観察した。アポトーシス陽性細胞の確認は Hoechst 33342 染色で行った。細胞増殖に関与する P21 の染色、及び組織計量学的検討も行った。

結果: ステントの開存率は4週、12週ともに100%であり、ステントの移動や穿孔はなかった。組織学的に観察すると4週でステントワイヤーは中膜にあり、外膜を圧迫していた。ステントワイヤー上の中膜は厚く、部分的に膠原繊維に置換されて、ステントワイヤーの周辺の血管平滑筋細胞の配列は乱れていた。12週ではステントワイヤーは中膜にとどまっていた、ステントワイヤー上の中膜はさらに厚くなり、完全に膠原繊維に置換されていた。ステントワイヤー周辺の血管平滑筋細胞は消失していた。計量組織学的には内・中膜の厚さはコントロールで  $65 \pm 15 \mu\text{m}$ 、4週で  $110 \pm 31 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ , control vs 4 weeks)、12週で  $169 \pm 48 \mu\text{m}$  と有意に増加した ( $p < 0.05$ , 4 weeks vs 12 weeks)。内・中膜の面積もコントロールで  $1.4 \pm 0.$

29mm<sup>2</sup>、4週で3.27±0.66mm<sup>2</sup> (p<0.05, control vs 4 weeks)12週で4.5±1.21mm<sup>2</sup>と有意に増加した(p<0.05, 4 weeks vs 12 weeks)。血管平滑筋の密度はコントロールで72.2±12.5%、4週で46.6±5.7%、12週で36.6±5.2%で4週後には有意に減少したが(p<0.05)、4週と12週間では差は認めなかった。膠原繊維の密度はコントロールで21.4±8%、4週で27.7±05.2、12週で38.8±5.5%で有意に4週後より増加していた(p<0.05)。タネル染色でアポトーシス陽性細胞を調べたところコントロールで0.829±0.4%、4週で50.5±4.6%、12週で44.7±6.2と有意にアポトーシス陽性細胞の増加が認められた(p<0.05)。Hoechst 33342 蛍光染色を行い染色質体の圧縮を認め、タネル陽性細胞の確認ができた。p21の免疫染色はコントロールでは陽性細胞は認められず4週、12週ではステントワイヤー周辺で陽性細胞を確認できた。

考察及びまとめ:1976年 Ross と Glomset は platelet derived growth factor (PDGF) 発見を基として動脈硬化の発生・進展に関し Response to injury hypothesis を提唱した。即ち barrier を形成している内皮細胞が傷害されると血小板が血管壁に粘着し、凝集し、PDGF を放出して内膜下に中膜平滑筋細胞を遊走・増殖させる。そのため傷害をうけた血管は多量の脂質の浸潤と遊走した平滑筋細胞の増殖から、内膜下層に増殖病変を主体とする動脈硬化巣が出現してくると報告した。それを期に血管リモデリングの研究が盛んに行われ、近年動脈硬化病変及び損傷血管などでアポトーシスの関与が報告されている。血管傷害を受けた動脈は血管平滑筋細胞の増殖及びアポトーシスにより血管リモデリングが修飾される。アポトーシスは形態形成や恒常性の維持など、生体にとって必要な生命現象である。アポトーシスの誘因となるシグナルの多くは細胞膜上のレスレプターを介して伝達される。アポトーシスを引き起こすシグナルとしては、増殖因子や神経栄養因子の除去、活性酸素、DNA 傷害、サイトカイン、薬物などによるストレスなどが主要因となっている。アポトーシスシグナルのレスレプターの直下にはさまざまなアダプター分子や PI3K-Akt、MAP キナーゼ系などによるリン酸化カスケードがある。そしてその下流で、核内において p53 などの細胞の生と死の選択に重要な転写因子による抑制が行われることにより、細胞の運命が決定されると考えられている。p53 は代表的な癌抑制因子であり、DNA 損傷などのさまざまなストレスに応答してアポトーシスを誘導する。さらに、p53 によって直接発現誘導される p21 はサイクリン依存性キナーゼ抑制因子及び、増殖細胞核抗原 (PCNA) に結合して DNA ポリメラーゼによる DNA 複製を傷害することにより、細胞周期の G1 期から S 期への進行を抑制すると知られている。今回、我々のデータで血管平滑筋細胞の密度が4週、12週と低くなっていく現象がみられ、これはアポトーシスによるものと考えられた。細胞増殖は p21 の発現により抑制されたが内、中膜は4週、12週と肥厚する傾向にあった。だが、これは細胞増殖に伴うものではなく膠原繊維の増加により肥厚したものであった。静脈内にステントを挿入することにより長引くアポトーシス反応及び p21 発現による細胞増殖の抑制が確認され双方の正負バランスが重要と考えられた。今後、内膜肥厚の発生の予防や進展阻止の方法を考えるうえで、さらに詳しい静脈損傷後の血管リモデリングの機序の解明が必要である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之  
副 査 教 授 安 田 慶 秀  
副 査 教 授 北 島 顯

学 位 論 文 題 名

## Induction of Apoptosis After Stent Implantation in Canine Portal Vein

(犬の門脈へのステント留置後のアポトーシス誘導)

本研究ではステント挿入後の門脈の血管リモデリングを調べ、とくに内膜肥厚におけるプログラム細胞死（アポトーシス）の関与について検討した。実験は10キロ前後のビーグル犬11頭を使用し、その門脈にGianturco Z stent を留置した。ステントは直径8mm、長さ15mm のものを使用した。6頭は4週で、5頭は12週でステントを含んだ門脈を摘出した。また他の6頭の犬の正常門脈を摘出し対照とした。摘出標本はホルマリンで48時間固定した後ステントを摘出し、パラフィンブロックにした。形態的变化を観察するためH.E.染色を行った。血管平滑筋細胞及び膠原繊維はアルファアクチン染色、アニリンブルー染色で観察した。アポトーシスはタネル染色で観察した。アポトーシス陽性細胞の確認はHoechst 33342 染色で行った。細胞増殖に関与するP21 の染色、及び組織計量学的検討も行った。

ステントの開存率は4週、12週ともに100%であり、ステントの移動や穿孔はなかった。組織学的に観察すると4週でステントワイヤーは中膜にあり、外膜を圧迫していた。ステントワイヤー上の中膜は厚く、部分的に膠原繊維に置換されて、ステントワイヤーの周辺血管平滑筋細胞の配列は乱れていた。12週ではステントワイヤーは中膜にとどまっていた、ステントワイヤー上の中膜はさらに厚くなり、完全に膠原繊維に置換されていた。ステントワイヤー周辺の血管平滑筋細胞は消失していた。計量組織学的には内・中膜の厚さはコントロールで $65 \pm 15 \cdot \mu\text{m}$ 、4週で $110 \pm 31 \cdot \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ , control vs 4 weeks)、12週で $169 \pm 48 \cdot \mu\text{m}$  と有意に増加した ( $p < 0.05$ , 4 weeks vs 12 weeks)。内・中膜の面積もコントロールで $1.4 \pm 0.29 \text{ mm}^2$ 、4週で $3.27 \pm 0.66 \text{ mm}^2$  ( $p < 0.05$ , control vs

4 weeks) 12週で $4.5 \pm 1.2 \text{ mm}^2$ と有意に増加した( $p < 0.05$ , 4 weeks vs 12 weeks)。血管平滑筋の密度はコントロールで $72.2 \pm 12.5\%$ 、4週で $46.6 \pm 5.7\%$ 、12週で $36.6 \pm 5.2\%$ で4週後には有意に減少したが( $p < 0.05$ )、4週と12週間では差は認めなかった。膠原繊維の密度はコントロールで $21.4 \pm 8\%$ 、4週で $27.7 \pm 0.5$ 、12週で $38.8 \pm 5.5\%$ で有意に4週後より増加していた( $p < 0.05$ )。タネル染色でアポトーシス陽性細胞を調べたところコントロールで $0.829 \pm 0.4\%$ 、4週で $50.5 \pm 4.6\%$ 、12週で $44.7 \pm 6.2$ と有意にアポトーシス陽性細胞の増加が認められた( $p < 0.05$ )。Hoechst 33342 蛍光染色を行い染色質体の圧縮を認め、タネル陽性細胞の確認ができた。p21の免疫染色はコントロールでは陽性細胞は認められず4週、12週ではステントワイヤー周辺で陽性細胞を確認できた。

今回、我々のデータで血管平滑筋細胞の密度が4週、12週と低くなっていく現象がみられ、これはアポトーシスによるものと考えられた。細胞増殖はp21の発現により抑制されたが内、中膜は4週、12週と肥厚する傾向にあった。だが、これは細胞増殖に伴うものではなく膠原繊維の増加により肥厚したものであった。静脈内にステントを挿入することにより長引くアポトーシス反応及びp21発現による細胞増殖の抑制が確認され双方の正負バランスが重要と考えられた。

公開発表に際して、副査の北畠教授からこの実験モデルは臨床ではどのような疾患に適用できるか、さらにアポトーシスが異常に多く発現しているのはなぜかという質問があった。次いで加藤教授からステントのサイズの選択についての質問があった。安田教授から低・高圧系による細胞増殖の違いについての質問があったいずれの質問に対しても、申請者は臨床応用例、今までの実験報告に基づいて的確に回答を行い実験の意義についても十分に理解している様子であった。

この論文は静脈内にステントを挿入し血管リモデリングを調べ、とくに内膜肥厚におけるプログラム細胞死、アポトーシス、の関与について検討した。審査一同は、この研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。