



Xenogenic smooth muscle cell immunization reduces neointimal formation in balloon-injured rabbit carotid arteries.

篠原, 正和

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3490

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003490>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 7 4 】

氏 名・（本 籍） 篠原 正和 （ 愛媛県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1696号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年1月31日

【 学位論文題目 】

Xenogenic smooth muscle cell immunization reduces neointimal
formation in balloon-injured rabbit carotid arteries.

（異種血管平滑筋細胞を用いた免疫誘導によるウサギ頸動脈
バルーン障害後の新生内膜形成の抑制）

審 査 委 員

主 査 教 授 林 祥剛

教 授 大北 裕

教 授 八木 直人

新生内膜の形成は様々な血管リモデリング、特に血管障害後の内腔狭窄病変において重要な役割を果たしている。新生内膜の形成には血管中膜からの血管平滑筋細胞の増殖と遊走が関わっている。これまで様々なアプローチにより新生内膜の形成を抑制する治療が検討されてきた。

近年、動脈硬化病変に対する免疫誘導療法の可能性が実験的に証明されつつある。しかし、新生内膜の形成を伴う血管リモデリングに対する免疫誘導療法に関しては、わずかな報告があるのみであり、どのような抗原を免疫系の認識対象にすれば良いか、ほとんど報告がない。

新生内膜内に存在する血管平滑筋細胞は合成型血管平滑筋細胞であり正常の中膜に存在する収縮型血管平滑筋細胞とは抗原性が異なる。従って、免疫系を用いて合成型血管平滑筋細胞を認識させることは可能と考える。新生内膜の形成に合成型血管平滑筋細胞が重要な働きを果たしていることから、合成型血管平滑筋細胞に関連した表面抗原を認識し、その増殖・遊走を抑制させるような免疫誘導を行えば、新生内膜形成を抑制できるかもしれないと考えた。この仮説を実証するために、今回我々は、ウサギに対して異種であるラット合成型血管平滑筋細胞による免疫誘導を行い、その後総頸動脈に対してバルーン障害を加え、新生内膜形成の程度を評価した。

方法

ラット血管平滑筋細胞並びにラット肝細胞を免疫誘導のための抗原として培養系にて準備した。約 1×10^8 個の細胞をホルマリンにて固定し、その後十分に細胞をリン酸緩衝液（PBS）にて洗浄し、フロイント免疫アジュバンドと混合したものを抗原として用いた。実験動物としてJapanese White Rabbit（♂）を用いた。免疫誘導は抗原とする細胞を2週間おきに3回皮下注射することによって行った。実験群としては以下の3群を設定した。

1. ラット血管平滑筋細胞による免疫誘導群
2. ラット肝細胞による対照免疫誘導群
3. リン酸緩衝液とフロイント免疫アジュバンドのみによる非免疫誘導群

3回目の抗原注射1週間後、Fogartyカテーテルを用いて左総頸動脈のバルーン血管障害モデルの作成を行った。バルーン障害後、2並びに4週間後にウサギを安楽死させ、総頸動脈における新生内膜形成を評価した。

組織学的評価のため総頸動脈全長を6等分し、各群より $5\mu\text{m}$ 厚の切片を作成した。HE染色標本を用いて新生内膜面積並びに新生内膜面積/中膜面積比を求めた。また新生内膜における細胞増殖を評価するため抗PCNA抗体を用いた免疫染色を行い、新生内膜内に存在する血管平滑筋細胞のうちPCNA陽性を示す割合を定量的に評価した。新生内膜におけるアポトーシスの評価はTUNNEL染色を用いて行った。

ラット血管平滑筋細胞による免疫誘導群のウサギ血漿中に、ウサギの合成型血管平滑筋細胞に対する免疫グロブリンが誘導されているか評価するためウェスタンブロット法を行った。培養系のウサギ血管平滑筋細胞をホモジネートして作成した蛋白を電気泳動にて展開し、一次抗体として上記3群のウサギの血漿を用い、ウサギ血管平滑筋細胞の構成蛋白に対する免疫グロブリンの結合を評価した。

3回目の抗原注射1週間後、免疫誘導群・対照免疫誘導群のウサギより採血し、Protein Gカラムを用いて免疫グロブリンを抽出した。抽出された免疫グロブリンによるウサギ血管平滑筋細胞の増殖・遊走に与える影響をin vitro実験で検討した。細胞に対する刺激としては10% ウシ血清刺激・ $1\mu\text{M}$ アンジオテンシンII刺激・ 10ng/ml PDGF刺激・ 10ng/ml FGF刺激・ $1\mu\text{M}$ PMA刺激を行い、培養液中に $20\mu\text{g/ml}$ の濃度でそれぞれの免疫グロブリンを添加した。

免疫グロブリンを加えた培養環境における細胞のviabilityへの影響を検討するため、培養ウサギ血管平滑筋細胞に免疫誘導群・対照免疫誘導群それぞれの免疫グロブリンを $20\mu\text{g/ml}$ 濃度にて添加し、24時間後の細胞viabilityをWST-1アッセイを用いて評価した。

ラット血管平滑筋細胞による免疫誘導群において何に対する免疫グロブリンが誘導されているかを検討するにあたり、ウサギのアンジオテンシン受容体（AT1aレセプター）に着目した。ウサギのAT1aレセプター受容体のcDNAをpcDNA3ベクターに組み込み、COS7細胞への強制発現を行い、細胞をホモジネートして蛋白を回収した。対照群としてはemptyベクターを組み込んだ。

だCOS7細胞の蛋白を用いた。これら2種類のCOS7細胞蛋白を電気泳動にて展開し、3群それぞれのウサギの血漿を一次抗体としてウェスタンブロット法を行い、ウサギ血漿中にAT1aレセプター受容体へ結合する免疫グロブリンが誘導されているかを検討した。

結果

1. ラット血管平滑筋細胞による免疫誘導では肝機能・腎機能・脂質代謝・体重などに異常は認めなかった。また血漿中の総IgG量は非免疫誘導群に比べても有意な増加は認めなかった。
2. 非免疫誘導群と対照免疫誘導群における新生内膜面積には有意な差が認められなかった ($0.339 \pm 0.036 \text{ mm}^2$ 対 $0.350 \pm 0.041 \text{ mm}^2$)。ラット血管平滑筋細胞注射による免疫誘導群では有意に新生内膜面積が抑制された ($0.219 \pm 0.0286 \text{ mm}^2$ $P < 0.05$)。
3. ラット血管平滑筋細胞によるウサギへの免疫誘導によって、血漿中にウサギ血管平滑筋細胞に強く結合する免疫グロブリンの出現を認めた。
4. 新生内膜内の全平滑筋細胞のうちPCNA免疫染色陽性となる割合は、ラット血管平滑筋細胞注射による免疫誘導群では $1.34 \pm 0.49\%$ 、非免疫誘導群では $5.78 \pm 0.47\%$ となり、免疫誘導により有意な抑制が認められた。
5. 新生内膜内の血管平滑筋細胞に見られるアポトーシスには非免疫誘導群・免疫誘導群間での差は認められなかった。
6. 免疫誘導群の免疫グロブリンによるウサギ血管平滑筋細胞の増殖・遊走能への影響を観察した。5種類の刺激因子を用いたが、いずれの刺激に対しても増殖・遊走能の有意な抑制が認められた。中でもアンジオテンシンII刺激に対する抑制が最も高かった。
7. ウサギ血管平滑筋細胞のviabilityは対照免疫誘導群・免疫誘導群間での有意な差は認めなかった。
8. COS7細胞に発現させたウサギAT1aレセプター蛋白に対する免疫グロブリンの結合は、非免疫誘導群・対照免疫誘導ではほとんど認められず、ラット血管平滑筋細胞による免疫誘導群においてのみ強い結合が認められた。

考察

異種のラット血管平滑筋細胞を用いてウサギに免疫誘導を行うことにより、血漿中にウサギ血管平滑筋細胞へ交差反応する免疫グロブリンが誘導され、バルーン障害後の新生内膜の形成が抑制された。今回の実験ではラット合成型血管平滑筋細胞を抗原としてウサギに投与したため、合成型血管平滑筋細胞に対する様々な免疫グロブリンがウサギの血漿中に誘導され、その中の幾つかの免疫グロブリンが交差反応してウサギ合成型血管平滑筋細胞にも結合したものと考えられる。

免疫グロブリンはそれ自体細胞障害性であるという報告もされているため、免疫誘導群における新生内膜内での血管平滑筋細胞のアポトーシスを評価したが非免疫誘導群と同程度であり、細胞のviabilityをWST-1 assayにて評価した実験でも免疫誘導群においてviabilityの低下は認めなかった。一方でPCNA免疫染色による血管平滑筋細胞の増殖の評価では、免疫誘導群にて有意な抑制が認められた。

ウサギ血管平滑筋細胞を用いたin vitroの増殖・遊走能の実験において、我々は血漿中のサイトカインの影響を除外するためにProtein Gカラムにて免疫グロブリンのみを抽出して実験を行った。この実験では免疫誘導群において、様々な増殖・遊走刺激に対する抑制効果が確認された。従って、免疫誘導群の免疫グロブリンには血管平滑筋細胞の機能を広範に抑制する効果が認められたが、何に対する免疫グロブリンがこのような広範な機能抑制を生じるのか、明らかにすることは出来なかった。免疫グロブリンの増殖・遊走抑制効果は、アンジオテンシンII刺激に対する抑制が最も強く認められたため、機序の一つとしては誘導された免疫グロブリンがアンジオテンシン受容体(AT1a)に結合し、中和抗体として作用して機能抑制に働いている可能性が考えられた。そこで、ウサギAT1aレセプターを強制発現させたCOS7細胞の蛋白を回収し、この蛋白のうち分子量約50KDaのアンジオテンシン受容体蛋白に対する、免疫誘導群の免疫グロブリンの結合能力をウェスタンブロット法にて検出すると、非免疫誘導群・対照免疫誘導の免疫グロブリン

に比べて著明に結合が増えていた。このことより、免疫誘導群の免疫グロブリンのアンジオテンシン受容体への結合が血管平滑筋細胞の機能抑制を説明する一つの機序と考えられたが、血管平滑筋細胞の機能を広範に抑制する機序としては適切なものではなく、今後のさらなる検討が必要である。

まとめ

今回の我々の実験によって、合成型血管平滑筋細胞に対する免疫グロブリンを誘導することが、新生内膜形成を伴う血管リモデリングに対する免疫療法という新たな治療戦略となる可能性が示された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1697 号	氏 名	篠原 正和
論文題目 Title of Dissertation	Xenogenic smooth muscle cell immunization reduces neointimal formation in balloon-injured rabbit carotid arteries. 異種血管平滑筋細胞を用いた免疫誘導によるウサギ頸動脈 バルーン障害後の新生内膜形成の抑制		
審査委員 Examiner	主 査 林 祥剛 印 Chief Examiner 副 査 大 塚 裕 印 Vice-examiner 副 査 ハ 不 直 人 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 12 月 21 日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

(要旨)

新生内膜の形成は様々な血管リモデリング、特に血管障害後の内腔狭窄病変において重要な役割を果たしている。新生内膜の形成には血管中膜からの血管平滑筋細胞の増殖と遊走に関わっている。近年、動脈硬化病変に対する免疫誘導療法の可能性が実験的に証明されつつあるが、新生内膜の形成を伴う血管リモデリングに対する免疫誘導療法に関しては、わずかな報告があるのみであり、どのような抗原を免疫系の認識対象にすれば良いか、ほとんど報告がない。新生内膜内に存在する血管平滑筋細胞は合成型血管平滑筋細胞であり正常の中膜に存在する収縮型血管平滑筋細胞とは抗原性が異なる。新生内膜の形成に合成型血管平滑筋細胞が重要な働きを果たしていることから、合成型血管平滑筋細胞に関連した表面抗原を認識し、その増殖・遊走を抑制させるような免疫誘導を行えば、新生内膜形成を抑制できるかもしれないと考えられた。本研究では、ウサギに対して異種であるラット合成型血管平滑筋細胞による免疫誘導を行い、その後総頸動脈に対してバルーン障害を加え、新生内膜形成の程度を評価された。ラット血管平滑筋細胞を免疫誘導のための抗原として培養系にて準備し、実験動物としてオスのJapanese White Rabbitに抗原と2週間おきに3回皮下注射することによって行われた。

ラット血管平滑筋細胞による免疫誘導群において、いかなる免疫グロブリンが誘導されているかを検討した。ウサギのAT1aレセプター受容体のcDNAをpcDNA3ベクターに組み込み、COST細胞への強制発現を行い、細胞をホモジネートして蛋白を回収した。対照群としてはemptyベクターを組み込んだCOST細胞の蛋白を用いられた。これら2種類のCOST細胞蛋白を電気泳動にて展開し、3群それぞれのウサギの血漿を一次抗体としてウェスタンブロット法を行い、ウサギ血漿中にAT1aレセプター受容体へ結合する免疫グロブリンが誘導されているかをみられた。異種のラット血管平滑筋細胞を用いてウサギに免疫誘導を行うことにより、血漿中にウサギ血管平滑筋細胞へ交差反応する免疫グロブリンが誘導され、バルーン障害後の新生内膜の形成が抑制された。今回の実験ではラット合成型血管平滑筋細胞を抗原としてウサギに投与したため、合成型血管平滑筋細胞に対する様々な免疫グロブリンがウサギの血漿中に誘導され、その中の幾つかの免疫グロブリンが交差反応してウサギ合成型血管平滑筋細胞にも結合したのと考えられる。

免疫グロブリンはそれ自体細胞障害性であるという報告もされているため、免疫誘導群における新生内膜内の血管平滑筋細胞のアポトーシスをTUNEL染色で評価されたが非免疫誘導群と有意差はなく、細胞のviabilityをWST-1 assayにて評価した実験でも免疫誘導群においてviabilityの低下は認めなかった。一方でPCNA免疫染色による血管平滑筋細胞の増殖の評価では、免疫誘導群にて有意な抑制が認められた。

ウサギ血管平滑筋細胞を用いたin vitroの増殖・遊走能の実験において、血漿中のサイトカインの影響を除外するためにProtein Gカラムにて免疫グロブリンのみを抽出して行われた実

験では免疫誘導群において、様々な増殖・遊走刺激に対する抑制効果が確認された。免疫グロブリンの増殖・遊走抑制効果は、アンジオテンシンII刺激に対する抑制が最も強く認められたため、機序の一つとしては誘導された免疫グロブリンがアンジオテンシン受容体(AT1a)に結合し、中和抗体として作用して機能抑制に働いている可能性が考えられた。そこで、ウサギAT1aレセプターを強制発現させたCOST細胞の蛋白を回収し、この蛋白のうち分子量約50KDaのアンジオテンシン受容体蛋白に対する、免疫誘導群の免疫グロブリンの結合能力をウェスタンブロット法にて検出すると、非免疫誘導群・対照免疫誘導の免疫グロブリンに比べて著明に結合が増えていた。このことより、免疫誘導群の免疫グロブリンのアンジオテンシン受容体への結合が血管平滑筋細胞の機能抑制を説明する一つの機序と考えられたが、血管平滑筋細胞の機能を広範に抑制する機序としては適切なものではなく、今後のさらなる検討が必要である。本研究は、合成型血管平滑筋細胞を認識する免疫グロブリンの誘導について、その血管内膜新生の抑制効果をもたらすことを研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった新生内膜形成による血管リモデリングに対する免疫療法という新たな治療戦略となる可能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。