◆ 総 説 ◆

移植自家静脈グラフト内膜肥厚の成因と予防について

—Nitric Oxide と遺伝子治療—

古 森 公 浩*

Mechanisms and Prevention of Intimal Thickening of the Autogenous
Vein Grafts. —Nitric Oxide and Gene Therapy—

Kimihiro KOMORI*

Key words: vein graft, intimal thickening, nitric oxide, gene therapy

はじめに

腹部大動脈より腸骨動脈の閉塞性病変に対するバイパス術については5年開存率は95%以上と良好な開存率が得られるのに対し、鼠径部以下の下肢中小動脈の慢性動脈閉塞症に対するバイパス術については約20~30%の晩期閉塞がみられ、未だ血管外科医の解決すべき問題点である¹⁾。晩期閉塞の要因としては中枢側病変の進行、中枢側吻合部狭窄、末梢側吻合部内膜肥厚による狭窄、末梢病変の進行が言われているが、グラフト末梢側吻合部の内膜肥厚が主要因と考えられている。その機序についてはさまざまな因子が関与しており、当然の事ながら、一元的に論じる事は不可能であると思われるが、今回は、移植自家静脈グラフト内膜肥厚の発生機序について、Nitric Oxide (NO)に注目して、我々のこれまでに得た実験的知見とともに、今後の展望を加えて述べる。

1. 自家静脈グラフト内膜肥厚病理組織像の経時的变化²⁾

犬移植自家静脈グラフト移植後3日目のグラフト内腔表面は内皮細胞の高度脱落を認め、残存した内皮細胞も変形し、血小板の付着を認めた。術後1週目には内皮細胞の表面は回復しているが、細胞接合は不完全であった。2週後には内膜は正常内皮と区別が付かない内皮細胞で覆われた。つまり、静脈グラフトでは、一旦内皮細胞が脱落し、再生内皮細胞で覆われる事が明らかになった(図1)。

2. 移植自家静脈グラフト血管内皮細胞機能

Furchgottが1980年に内皮由来弛緩因子(EDRF)の存在を初めて報告し³⁾、その後EDRFはNOであり、L-アルギニンからNO合成酵素によって生成されることが明らかになると、さまざまな病態とNOの関連について注目が集められるようになった。NOは血管の収

* 名古屋大学大学院血管外科〔〒466-8560 名古屋市昭和区鶴舞町65〕

Division of Vascular Surgery, Department of Surgery, [Nagoya University Graduate School of Medicine 65, Tsurumaicho, Showa-ku Nagoya 466-8550, JAPAN]

Tel: 81-52-744-2215 Fax: 81-52-744-2230

図1 自家静脈及び自家動脈グラフト移植後の電顕像²⁾¹²⁾¹³⁾

自家静脈 (I) は移植後一旦内皮細胞がほとんど脱落し、移植 14, 28 日目に再生内皮細胞で覆われてくる。一方、移植自家動脈グラフト (II) はほとんど内皮細胞の脱落はみられず、移植 7 日目には正常と同様であった。

A: 3 日目, B: 7 日目, C: 14 日目, D: 28 日目

縮弛緩反応の調節および血小板凝集抑制作用、平滑筋増殖抑制作用、さらには最近ではアポトーシスの誘導など重要な生理学的役割が知られている。

a) 正常静脈と静脈グラフトでの NO 産生能⁴⁾⁵⁾⁶⁾

ウサギ外頸静脈を総頸動脈に顕微鏡下に移植。移植 4 週後にグラフトと外頸静脈をコントロール (非手術群) として摘出し両群間で比較した。コントロール群では、ACh により濃度依存性に内皮依存性弛緩反応がみられるのに対し、静脈グラフトではほとんど弛緩反応は認められず有意に障害された (図 2)。次に、直接平滑筋に作用し、NO と同様の作用が知られている SIN-I の効果を比較検討すると、両群ともに同様の内皮非依存性の弛緩反応がみられ、グラフト平滑筋の弛緩作用は保たれていた。

NO は血管平滑筋の c-GMP を上昇させて作用する事が知られているため、次に c-GMP 産生能について radio immuno-assay 法にて検討した。何も薬液を投与しない状態でも正常静脈では内皮が存在すると、内皮を剥離した標本にくらべ、有意に c-GMP が上昇していた。この c-GMP の上昇は、ヘモグロビンおよびメチレン

ブルーで抑制される事から、内皮がある場合には正常静脈では basal release が認められる事が明らかになった。一方、静脈グラフトでは内皮があるにもかかわらず c-GMP の有意な上昇は認められず、内皮からの basal release が障害されていた。また、ACh 投与により正常静脈では内皮依存性に c-GMP が増加するのに対し、静脈グラフトでは、内皮があるにもかかわらず、その増加は有意に低値を示した。一方、SIN-I 投与により両群ともに同様に c-GMP は増加し、平滑筋の特性は保たれていた。以上の結果より、静脈グラフトの内皮依存性弛緩反応の障害は、平滑筋自体の障害ではなく、内皮細胞の NO 産性能の低下が主要因と思われた。

b) グラフト移植後の NO 産生能の経時的変化²⁾

犬自家静脈内膜肥厚は、移植後 2 週で有意な内膜肥厚が認められ、3, 4 週と安定化した。犬大腿動脈に大腿静脈を移植後、3 日, 1, 2, 3, 4, 6 週目にグラフトを採取した。左大腿静脈 (非手術群) をコントロールとしてグラフトと比較検討した。コントロールは、ACh により内皮依存性弛緩反応を生じるが、グラフト群では、ACh による弛緩反応は術後 3 日目より消失し、

図2 AChに対する弛緩反応

プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ で前収縮後、AChを投与するとウサギ正常静脈(頸静脈)は内皮依存性弛緩反応がみられるのに対し、静脈グラフトでは内皮依存性弛緩反応はほとんどみられない。

以後どの時期においても、同様の内皮非依存性の収縮反応のみが観察された。一方、平滑筋に直接作用する Sodium nitroprusside (SNP)の反応を比較すると、どの時期においても同様の内皮非依存性弛緩反応が観察され、平滑筋の特性の変化は認められなかった。以上より、移植後早期、つまり内膜肥厚が認められる以前より、静脈グラフト内皮の NO 産生能が障害されている可能性が示唆された。

c)術式の比較⁷⁾

犬総頸動脈に外頸静脈を移植して検討した。reversed graft および静脈弁破壊を伴う in situ graft では、ACh により内皮非依存性収縮反応を示したが、静脈弁破壊を伴わない in situ graft では正常静脈で認められる ACh による内皮依存性弛緩反応が保たれていた。また、in situ graft では ADP に対して静脈弁の破壊に関わらず内皮依存性弛緩反応がみられるのに対し、reversed vein graft では有意に障害されていた。以上より、in situ graft においては、reversed vein graft と比較して、NO 産生能からみた内皮細胞機能が保持されていた。

d) 移植グラフト NO 産生能に対する血流条件の影響⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾

犬後肢に末梢 run-off 不良のモデルを作成後、4週目に正常血流条件下の正常動脈と異常血流条件下の動脈で内皮機能を比較すると、ADP による内皮依存性弛緩反応が異常血流条件下の動脈で有意に障害される事がわかった⁷⁾。ヒトにおいても、血流量の低い閉塞性動脈硬化症の大腿動脈血中の NOx を測定すると、血流量の多い正常人に比べ低値を示し、バイパス術後に血流量が良好になると NOx は増加し、ヒトにおいても NOx は flow dependency があるが明らかになった⁹⁾。

次に異常血流条件下に自家静脈を移植し、4週後に標本を摘出し正常血流群のグラフトと比較した。組織学的に異常血流条件下の内膜肥厚は正常血流に移植したグラフトより有意に内膜肥厚が著明であった(図3)。異常血流グラフトの ACh に対する反応は正常血流に移植したグラフトと同様で、内皮非依存性収縮反応がみられ、血流による差はみられなかったが、ADP や トロンビンによる内皮依存性弛緩反応を比較すると、異常血流群では、正常血流群に比べ有意に障害されていた。SNP に対しては、両群間ともに同様の内皮非依存性弛緩反応が認められ平滑筋の特性には変化はなかった。以上より、内

図3 血流と内膜肥厚¹⁴⁾

静脈グラフトでは正常血流でも生理学的な軽度内膜肥厚が見られ、異常血流ではさらに著明になった。一方、動脈グラフトでは正常、異常血流どちらも内膜肥厚は認めなかった。

膜肥厚が著明な異常血流群は正常血流群に比べ、さらに血管内皮細胞の NO 産生能が低下している可能性が示唆された。

e) 腰部交感神経切除の影響¹¹⁾

両側に異常血流モデルを作製し、片側に腰部交感神経切除術を施行した後、両側に自家静脈グラフトを移植した。流量は神経切除群で有意に増加したにもかかわらず、両群間で内膜肥厚、および NO 産生能に有意差はみられなかった。この事より、NO は flow dependency があるといわれているが、血管壁の tonus の制御という観点からは、交感神経切除による持続的血管拡張は NO による生理学的調節に対し優位に働いていると思われた。

f) 自家動脈グラフトの内皮機能及び組織像¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾

犬移植自家動脈グラフトの電顕所見は自家静脈グラフトと異なり、移植後1日目でも内皮細胞の脱落はほとんどみられず、7日目には正常動脈と同じ形態を示していた(図1)。内皮機能についても、ACh による内皮依存性弛緩反応は術後1日目より認められ、3日目には軽度障害を認めるが、1週間には非手術群の動脈と同様の弛緩反応が観察された。

また、異常血流条件下に移植した自家動脈グラフトは静脈グラフトと異なり、NO 産生能は保持されており、内膜肥厚は認められなかった(図3)。以上のように、動脈グラフトと静脈グラフトとの生理学的、組織学的な特性に相違があることが明らかになり、この事が aorto-coronary バイパスの動脈グラフトの開存率が高い機序の一つと考えられた¹⁴⁾。

g) アルギニンの自家静脈内膜肥厚に対する効果¹⁵⁾

NO は、アルギニンから NO synthase により分解され、シトルリンとともに産生されることが知られている。そこで、コレステロール群(1%コレステロール食)とアルギニン群(1%コレステロール食および2.25%L-アルギニン含有飲料水)の2群間でウサギ頸静脈を頸動脈に移植後4週に標本を摘出し、内膜肥厚を比較検討した。

アルギニンは血清コレステロール値には影響は与えなかったが、内膜肥厚はアルギニン群で有意に抑制された。コントロール群では ACh により内皮依存性弛緩反応は全くみられないのに対し、アルギニン群では濃度依存性に内皮依存性弛緩反応が観察された。また、この弛緩反

NOと自家静脈グラフト内膜肥厚

図4 ecNOS 遺伝子導入による自家静脈グラフト内膜肥厚抑制効果図¹⁷⁾

A) eNOS 遺伝子導入によりコントロールにくらべ自家静脈グラフト内膜肥厚が抑制された。

B) 内膜肥厚は eNOS 遺伝子導入群でコントロールにくらべ有意に内膜肥厚が抑制された。

応は L-NMMA 存在下で抑制される事から、アルギニン投与により内皮細胞の NO 産生能が亢進している事が示唆された。この他に、動脈硬化を抑制するといわれている EPA 製剤の慢性投与で自家静脈内膜肥厚が抑制され、NO 産生能が増強することを報告しており¹⁶⁾、この事からも、何らかの方法で内皮機能を保持あるいは増強させる事が、ひいては内膜肥厚の抑制につながると考えられた。

h) 遺伝子治療¹⁷⁾

HVJ-liposome 法による ecNOS 遺伝子導入の内膜肥厚抑制効果を検討した。Poor runoff モデルを作成し血流の安定した 4 週後に、イヌ大腿静脈を剥離後、in situ にて HVJ-liposome 液を内腔に満たし 100 mmHg の定圧下 10 分間 incubation した。この静脈を採取し同側の大腿動脈に移植した。

ecNOS 蛋白発現を検討すると、正常ウサギ血清をのせた ecNOS 導入群、抗ウシ ecNOS 抗体をのせた pUC 導入群では全く活性が認められないのに対し抗ウシ ecNOS 抗体をのせた ecNOS 導入群では中膜および外膜の一部に ecNOS 蛋白発現を認めた。次に、NOS 活性を

観察すると、無処理イヌ大腿静脈、バッファー処理自家静脈グラフトでは、内腔側と外膜の一部に残存内皮細胞および外膜の vasa vasorum 由来と考えられる NOS の活性を認めるのみだが、ecNOS 遺伝子導入した自家静脈グラフトでは、中膜にも強い NOS の活性を認めた。自家静脈グラフト移植後 4 週目の内膜肥厚を比較すると NOS 群では PUC 群、BSS 群に比べ有意に抑制された (図 4)。

まとめ

静脈グラフト血管内皮細胞の NO 産性能の低下が移植早期よりみられ、内膜肥厚著明な異常血流条件下ではさらに助長された。この事より自家静脈内皮細胞の NO 産性能の低下が血小板凝集、平滑筋増殖を促進し、晩期閉塞を助長すると考えられた。一方、NO の前駆物質であるアルギニンは自家静脈内膜肥厚を抑制し、その機序として NO 産性能の亢進が示唆された。また、実際に ecNOS 遺伝子導入にて内膜肥厚が抑制された事より、その予防のためには移植自家静脈内皮細胞機能の保持が重要であり、NO

をターゲットとした今後の遺伝子治療の臨床応用が期待される。

今後の展望

最近、骨髄細胞が流血中に前駆細胞として動員されたのち傷害血管に定着し、平滑筋に分化し増殖するとの報告もあるが¹⁸⁾、従来、血管内膜肥厚は中膜平滑筋が内膜に遊走して増殖すると考えられている¹⁴⁾。一方、内膜構成細胞の多くが、術直後に盛んに分裂している外膜線維芽細胞である可能性の報告もあり¹⁹⁾²⁰⁾、内膜肥厚の構成成分は平滑筋細胞以外の外膜線維芽細胞の関与も考えられる。また最近我々は、細胞周期に関連する転写制御因子 AP-1 のデコイ導入や²¹⁾、変異型 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 遺伝子 7 ND 導入により、バルーン傷害後の内膜肥厚及び陰性リモデリングの抑制を報告した²²⁾。その他にも内膜肥厚に関与するものとして、細胞増殖に関与するサイトカインや、接着因子、細胞外マトリックスなど、さまざまな因子の関与が考えられ、何をターゲットにして内膜肥厚の制御を行うのが最善であるか、まだ明らかでない。また遺伝子導入にしても、我々は最近ウイルスを用いない方法としてエレクトロポレーションを用いて血管壁への遺伝子導入に成功する一方²³⁾、ウイルスを用いる方法としてセンダイウイルスの高い導入効率を明らかにしたが²⁴⁾²⁵⁾、導入効率、human への応用など、まだまだ解明すべき問題点は山積みである。今後、血管内膜肥厚の病態生理を明らかにすることは、治療のターゲットを明確にし、その戦略を立てる上で極めて重要である。今後さらなる、内膜肥厚の成因の解明が必要であると考えらる。

文 献

- 1) Mori E, Komori K, Kume M, Yamaoka T, Shoji T, Furuyama T, Inoguchi H. Comparison of the long-term results between surgical and conservative treatment in patients with intermittent claudication. *Surgery* **131**: S268-274, 2002.
- 2) Ishii T, Okadome K, Komori K, Odashiro T, Sugimachi K. Natural course of endothelium-dependent and -independent responses in autogenous femoral veins grafted into the arterial circulation of the dog. *Circ. Res.*, 1004-1010, 1993.
- 3) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-376, 1980.
- 4) Komori K, Gloviczki P, Bouchier RG, Miller VM, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxations in response to aggregating platelets are impaired in reversed vein grafts. *J Vasc Surg* **12**: 138-147, 1990.
- 5) Komori K, Schini VB, Gloviczki P, Bouchier RG, Vanhoutte PM. The impairment of endothelium-dependent relaxations in reversed vein grafts is associated with a reduced production of cyclic GMP. *J Vasc Surg*, **14**: 67-75, 1991.
- 6) Komori K, Okadome K, Sugimachi. Endothelium-derived relaxing factor and vein grafts. *Br J Surg* **78**: 1027-1030, 1991.
- 7) Odashiro T, Komori K, Ishii T et al. Comparison of endothelial function between in situ and reversed vein graft - Differences in endothelium-dependent responses-. *Surgery* **117**: S179-18, 1995.
- 8) Komori K, Ishii T, Mawatari K, Odashiro T, Itoh H, Okadome K, Sugimachi K. Endothelium-dependent relaxations to adenosine diphosphate is impaired under poor runoff conditions in the canine femoral artery. *J Surg Res* **58**: 302-306, 1995.
- 9) Komori K, Matsumoto T, Ishida M, Kuma S, Yonemitsu Y, Eguchi D, Sugimachi K. Enhancement of nitric oxide production after arterial reconstruction in patients with arteriosclerosis obliterans. *J Vasc Surg*, **26**: 657-662, 1997.
- 10) Komori K, Yamamura S, Ishida M, Matsumoto T, Kuma S, Eguchi D, Yonemitsu Y, Onohara T, Sugimachi K. Acceleration of impairment of endothelium-dependent responses under poor runoff conditions in canine autogenous vein grafts. *Eur J Vasc Endvasc Surg*, **14**: 475-481, 1997.
- 11) Funahashi S, Komori K, Itoh H, Okadome K, Sugimachi K. Effects of lumbar sympathectomy on the properties of both endothelium and smooth muscle cells of the canine femoral artery and autogenous vein grafts under poor runoff conditions. *J Surg Res* **64**: 184-189, 1996.
- 12) Wei CG, Komori K, Mawatari K, Yonemitsu Y, Sugimachi K. Preserved endothelial function and morphology in canine arterial grafts under conditions of poor distal runoff. *J Surg Res* **117**: 117-122, 1997.
- 13) Wei CG, Komori K, Mori E, Kume M, Yamaoka T, Matsumoto T, Sugimachi K: Natural course of the functional and morphological changes in canine autogenous arterial graft. *Eur Surg Res*, **33**: 21-27, 2001.
- 14) Komori K, Inoguchi H, Kume M, Shoji T, Furuyama T, Sugimachi K. Differences in the endothelial function and morphological modulation between the canine autogenous vein and arterial grafts. *Surgery*, **131**, S249-255, 2002.
- 15) Okazaki J, Komori K, Kawasaki K, Eguchi D, Ishida

1) Mori E, Komori K, Kume M, Yamaoka T, Shoji T, Furuyama T, Inoguchi H. Comparison of the long-

- M, Sugimachi K. L-arginine inhibits smooth muscle cell proliferation of vein graft intimal thickness in hypercholesterolemic rabbits. *Cardiovasc Res*, **36**: 428-436, 1997.
- 16) Komori K, Ishii T, Odashiro T, Itoh H, Mawatari K, Okadome K, Sugimachi K. Eicosapentanoic acid reduces the intimal thickening of autogenous vein grafts and enhances endothelium-derived relaxing factor. *J Surg Res* **58**: 747-753, 1995
- 17) Matsumoto T, Komori K, Yonemitsu Y, Morishita R, Sueishi K, Kaneda Y, Sugimachi K. Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene transfer of endothelial cell nitric oxide synthase inhibits intimal hyperplasia of canine vein grafts under conditions of poor runoff. *J Vasc Surg*, **27**: 135-144, 1998.
- 18) Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhiisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. **8**: 403-408, 2002.
- 19) Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* **94**: 1655-1664, 1996.
- 20) Ishida M, Komori K, Yonemitsu Y, Matsumoto T, Onohara T, Sugimachi K: Immunohistochemical phenotypic alterations of rabbit autologous vein grafts implanted under arterial circulation with or without poor distal runoff-implications of vein graft remodeling-. *Atherosclerosis*, **154**: 345-354, 2001.
- 21) Kume M, Komori K, Matsumoto T, Onohara T, Takeuchi K, Yonemitsu Y, Sugimachi K. Administration of a decoy against the AP-1 binding site suppresses neointimal thickening in rabbit balloon injured arteries. *Circulation*, **105**: 1226-1232, 2002.
- 22) Mori E, Komori K, Yamaoka T, Tani M, Kataoka C, Takeshita A, Usui M, Egashira K, Sugimachi K. Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constructive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* **105**: 2805-2810, 2002.
- 23) Matsumoto T, Komori K, Shoji T, Kuma S, Kume M, Yamaoka T, Mori E, Furuyama T, Yonemitsu Y, Sugimachi K. Successful and optimized in vivo gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse. *Gene Therapy*, **8**: 1174-1178, 2001.
- 24) Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, Ueno H, Nakashima Y, Nakagawa K, Fukumura M, Kato A, Hasan MK, Nagai Y, Sugimachi K, Hasegawa M, Sueishi K. Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB Journal*, **15**: 1284-1286, 2001.
- 25) Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tani M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K. Angiogenic Gene Therapy for Experimental Limb Ischemia: acceleration of limb loss by over expression of VEGF165, but not of FGF2. *Circulation Research*, **80**: 866-873, 2002.