

博士(医学) 社 謙 一

論文題目

Involvement of platelet activation by P2Y₁₂ receptor in the development of transplant arteriosclerosis in mice

(マウス移植後動脈硬化の進展における P2Y₁₂ 受容体を介した血小板活性化の関与)

論文の内容の要旨

[はじめに]

生体移植は、末期臓器不全患者の長期生存を可能とする治療法である。しかしながら、その予後は移植後に生じる拒絶反応により妨げられる。拒絶反応は、急性拒絶と慢性拒絶に分類され、前者は手術手技の向上や効果的な免疫抑制剤の使用により、劇的な改善を認めるが、後者の原因の一つである移植後動脈硬化は、長期予後を妨げる主要な因子となっている。移植後動脈硬化の進展は、①宿主免疫応答や血管内皮細胞の障害、②炎症細胞と僅かな平滑筋細胞で構成される早期血管障害、③平滑筋細胞の過形成を来たす成熟した血管障害(動脈硬化病変の成立)の3ステージに分類される。最終的には、これらの過程が閉塞性の新生内膜を形成し、グラフト片の機能不全を引き起こす。

血小板は、血栓止血のみならず、様々な病態に対して炎症や免疫応答に関与することが知られている。血小板に発現している P2Y₁₂ 受容体は、ADP により活性化され、血栓の成長・安定化に関与しており、血小板の完全な活性化を成立させる重要な因子である。活性化した血小板の移植後動脈硬化への関与は、P2Y₁₂ 受容体拮抗薬であるクロピドグレルやセロトニン拮抗薬であるサルボグレートが移植後動脈硬化の進展を抑制することなどから明らかであるが、そのメカニズムは十分に解明されていない。

今回、我々は、マウス頸動脈移植モデルを用い、移植後動脈硬化の進展に対する P2Y₁₂ 受容体の関与を検討した。

[材料ならびに方法]

レシピエントに 129S:C57BL/6(野生型:WT)と 129S:C57BL/6- P2Y₁₂^{-/-}(ノックアウト:KO)、ドナーに 129SvJX1 の 8~12 週齢のマウスを用いた。ドナーの頸動脈を摘出し、レシピエントへ同所性に移植した。移植後 7、14、28、56 日にレシピエントマウスより移植片を摘出し、組織学的検索・免疫組織染色により、動脈硬化の程度および炎症蛋白の発現を検討した。また、移植後 7、14 日にフローサイトメトリー(FCM)およびリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(real-time RT-PCR)を実施し、CD154 陽性細胞および血小板-白血球凝集塊の割合により血小板活性化の存在を、また細胞接着分子-1(ICAM-1)、CD40 メッセンジャーRNA の発現量により炎症の程度を検討した。

[結果]

移植後動脈硬化:移植後 14、28、56 日目に摘出した移植病変は、WT 群(n=8-13)では時間依存的に病変の進展を認めたが、KO 群(n=8-14)では 28 日目以降の病変の進展は見られなかった。内膜/中膜比は、KO 群では WT 群に比べ有意に低かった(移植後 14 日目:WT 0.209±0.022, KO 0.127±0.012, p<0.05, 移植後 28 日目:WT 0.408±0.049, KO 0.281±0.036, p<0.05, 移植後 56 日目:WT 0.696±0.154, KO 0.263±0.053, p<0.05)。同様の結果は狭窄率においても認められた。FCM:移植後 14 日目の採血サンプルでの FCM において、KO 群(n=9)では WT 群(n=9-10)に比

べて、CD154 陽性細胞および血小板-白血球凝集塊 (CD41/CD45 陽性細胞) の割合は有意に減少していた (CD154 陽性細胞の割合: WT 14.9±1.1 %, KO 9.9±0.8 %, $p<0.05$ 、CD41/CD45 陽性細胞の割合: WT 15.6±2.6 %, KO 9.4±1.3 %, $p<0.05$)。

免疫組織染色: 移植後 7、14 日目に摘出した移植片での免疫染色では、CD45 陽性細胞数は WT 群で有意に多く (WT 76.4±14.3 cells, KO 26.6±14.4 cells, $p<0.05$)、ICAM-1、CD40 の局在が WT 群で高い傾向を示した。また、WT 群の CD40 の局在は、移植後 28 日目においても高い傾向を示した。

Real-time RT-PCR: 移植後 7、14 日目に摘出した移植片での real-time RT-PCR では、KO 群 (n=7-8) は WT 群 (n=7-8) に比べ ICAM-1、CD40 の相対的な転写活性が有意に低かった (ICAM-1: 移植後 7 日目 55.1%、移植後 14 日目 33.7%、 $p<0.05$ CD40: 移植後 14 日目 58.6%、 $p<0.05$)。

[考察]

本研究では、マウス同所性頸動脈移植モデルを用いて、P2Y₁₂ 受容体を介した血小板の活性化による移植後動脈硬化の進展を検討した。移植後早期において、CD154 の陽性率の増加による血小板の活性化を、また血小板-白血球凝集塊や接着因子の発現が増強され、その結果として血管内膜への炎症細胞の接着を誘導することが示唆された。また、これらの一連の過程を経て、最終的には広範囲にわたる新生内膜が形成されることが明らかになった。P2Y₁₂ 受容体 KO マウスは、移植後早期から中期 (14~28 日) に認められる軽度の血管障害を有意に抑制し、その後のさらなる進展をほぼ完全に抑制した。移植後早期に見られた血管障害の抑制は、ICAM-1 や CD40 の転写・局在、CD154 の発現、血小板-白血球凝集塊の割合と関係していた。

[結論]

本研究では、移植後に見られる血小板の活性化、接着因子の発現や血小板-白血球凝集塊の促進が移植後動脈硬化の進展に関与することを明らかにした。P2Y₁₂ 受容体は、移植後動脈硬化病変の成立過程において、より早期の段階に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

生体移植後に生じる拒絶反応のうち、慢性拒絶の原因の一つである移植後動脈硬化は、長期予後を妨げる主要な因子となっている。申請者は移植後動脈硬化の進展に関与する血小板の活性化における P2Y₁₂ 受容体の関与についてマウス頸動脈移植モデルを用いて検討した。

レシピエントとして C57BL/6 (WT 群) と C57BL/6-P2Y₁₂^{-/-} (KO 群) を、ドナーに 129SvJX1 マウスをそれぞれ用い、ドナーの頸動脈をレシピエントへ同所性に移植した。経時的に移植片を摘出し、組織学的検索・免疫組織染色により、動脈板-白血球凝集塊の割合から血小板活性化の存在を、また細胞接着分子-1 (ICAM-1)、CD40 mRNA の発現量により炎症の程度を検証した。

その結果、移植後 14、28、56 日目に摘出した移植病変は、WT 群では時間依存的に病変の進展を認めたが、KO 群では 28 日目以降の病変の進展は見られなかった。内膜/中膜比や狭窄率は、KO 群では WT 群に比べ有意に低かった。さらに、KO 群では WT 群に比べて、CD154 陽性細胞および血小板-白血球凝集塊の割合は有意に減少していた。また、移植後 7、14 日目における移

植片での CD45 陽性細胞は WT 群で有意に多く、ICAM-1、CD40 の局所が WT 群で高い傾向を示した。また、ICAM-1、CD40 の相対的な転写活性は KO 群で有意に低かった。

本研究により、移植後動脈硬化の進展に、血小板の活性化、接着因子の発現や血小板-白血球凝集塊の促進が関与することを明らかにし、P2Y₁₂受容体が移植後動脈硬化病変の成立過程において、より早期の段階に関与することを示した点を審査員一同高く評価した。

以上により本論分は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 間賀田 泰寛
副査 佐藤 康二 副査 最上 秀夫