

p38 MAPK阻害剤FR-167653の術後内膜肥厚抑制機序

山村 光弘 宮本 裕治 向井 資正 田中 宏衛
良本 政章 吉岡 良晃 鍛冶 正範

要 旨：われわれはこれまで、p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) 阻害剤FR-167653 (旧藤沢薬品工業株式会社、大阪、現アステラス製薬株式会社、東京)によって、ラットinterposition vein graftの術後内膜肥厚を抑制できることを報告してきたが、その作用機序はいまだ不明である。今回、術後内膜肥厚の引き金である単球・マクロファージを誘導するmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の血中濃度を測定し、術前と比較検討することによって、その作用機序について考察した。顕微鏡手術下に雄Lewisラット(487±5g)の右腹壁静脈グラフトを採取し、同側総大腿動脈に10-0 ナイロン糸を用いinterposition bypassした。術直前にFR-167653 4.0μg/gを腹腔内投与した群 (FR群, $n = 5$)と、同量の生理食塩水を腹腔内投与した群 (コントロール群, $n = 5$)の2群に分け、術後4週目の術後内膜肥厚の程度とMCP-1 血中濃度を測定し、比較検討した。術後内膜肥厚はコントロール群が $0.43 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ であったのに対し、FR群では $0.05 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ と有意に抑制されていた ($p < 0.001$)。同様に、平均MCP-1 血中濃度も、コントロール群が $169 \pm 10 \text{ pg/ml}$ であったのに対し、FR群では $112 \pm 12 \text{ pg/ml}$ と有意に抑制された ($p = 0.006$)。

一般に*in vivo*実験でp38 MAPKは血管内皮細胞のMCP-1産生を増加させるといわれている。よって、p38 MAPK阻害剤FR-167653の術後内膜肥厚抑制機序として、FR-167653が血管内皮細胞のMCP-1産生を抑制することで、単球・マクロファージの浸潤を抑制し、ひいては術後内膜肥厚を抑制する仮説が考えられた。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 263–267)

Key words: postoperative intimal hyperplasia, monocyte chemoattractant protein-1, p38 mitogen activated protein kinase, FR-167653

序 言

日本人における冠動脈バイパス術後10年開存率は、内胸動脈グラフトを使用した場合が約90%であるのに対し、大伏在静脈グラフトを使用した場合は約67%と不良である¹⁾。この術後晩期に静脈グラフトが閉塞する原因は、術後内膜肥厚によると考えられている。われわれはこれまでp38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) 阻害剤FR-167653 (旧藤沢薬品工業株式会社、大阪、現アステラス製薬株式会社、東京)によって、ラットinterposition vein graftの術後内膜肥厚を抑制できることを報告してきたが²⁾、その作用機序はいま

だ不明である。今回、術後内膜肥厚の引き金である単球・マクロファージを誘導するmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の血中濃度を測定し、比較検討することで、FR-167653の作用機序についての考察を加えた。

方 法

手術手技はすでに本学会誌で発表した方法にて行った³⁾。

雄Lewisラット(平均487±5g)に対し、手術顕微鏡 (Olympus社、耳鼻科脳外科手術用顕微鏡OME-J&N J73507®)を使用し、約30倍視野下で以下に記述する手術を施行した。右腹壁静脈グラフトを採取した後、同

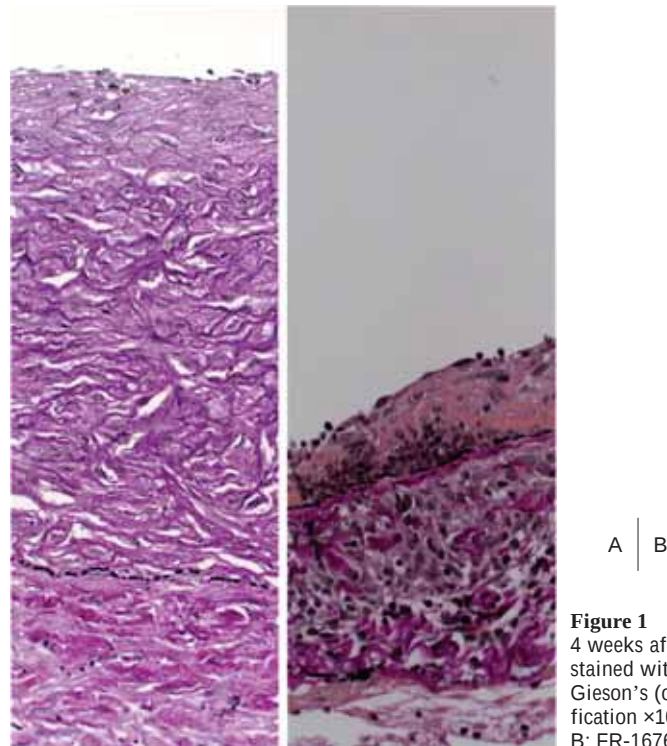


Figure 1 Rat vein grafts 4 weeks after the bypass, stained with Elastica-van Gieson's (original magnification $\times 100$, A: Control, B: FR-167653).

側総大腿動脈に10-0 ナイロン糸 (ELP社, 黒ナイロン 10-0, WM4-10-0N2[®]) を用い, 7 針前後の結節縫合にて interposition bypass した。

対象の雄Lewisラットを, FR-167653 $4.0\mu\text{g/g}$ を術直前に腹腔内投与した群 (FR群, $n=5$) と, 溶解したのと同量の生理食塩水 (4.0ml/kg に相当) を腹腔内投与した群 (コントロール群, $n=5$) の2群に分けた。術後4週目に interposition bypass した静脈グラフトを採取し, ホルマリン固定した。切片はこれまで同様に, 術後内膜肥厚が最も顕著に現れると報告されている⁴⁾, 縫合系の部分を除いたすぐ中枢側吻合部の静脈グラフトをHE染色とElastica-van Gieson's染色した。コンピュータ分析 (NIH Image Ver. 1.61) により, 吻合中枢側の内膜断面積を測定し, 比較検討した。同時に術後4週目のMCP-1 血中濃度をELISA法 (enzyme linked-immunosorbent assay, raMCP-1 kit catalog#KRC 1012/KRC1919-SB, TFB Co., Tokyo) により測定し, 比較検討した。

なお, この実験は兵庫医科大学動物実験委員会の承認を得て, 愛護的に行った (承認番号136)。また, 数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示し, 統計処理にはUnpaired

t-test (Stat View 5.0J for Macintosh) を用いて, $p<0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

平均吻合時間は, コントロール群が 70 ± 4 分で, FR群が 63 ± 1 分で有意差はなかった。また, 術直後のグラフト開存率は, コントロール群が85%で, FR群が83%であった。

コントロール群における術後4週目の静脈グラフトでは, 明らかな全周性の内膜肥厚が認められた (Fig. 1 A)。一方, FR群の静脈グラフトでは, 内膜肥厚はほとんどなく, わずかに限局性に認められるのみであった (Fig. 1 B)。これらの内膜断面積を測定してみると, コントロール群が $0.43\pm 0.05\text{mm}^2$ であったのに対し, FR群では $0.05\pm 0.02\text{mm}^2$ と有意に抑制されていた ($p<0.001$, Fig. 2)。

術後4週目の平均MCP-1 血中濃度も, コントロール群が $169\pm 10\text{pg/ml}$ であったのに対し, FR群では $112\pm 12\text{pg/ml}$ と有意に抑制されていた ($p=0.006$, Fig. 3)。

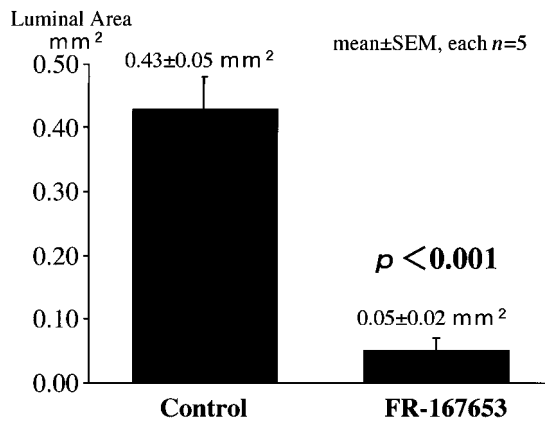


Figure 2 Luminal area 4 weeks after the bypass (Control vs. FR-167653).

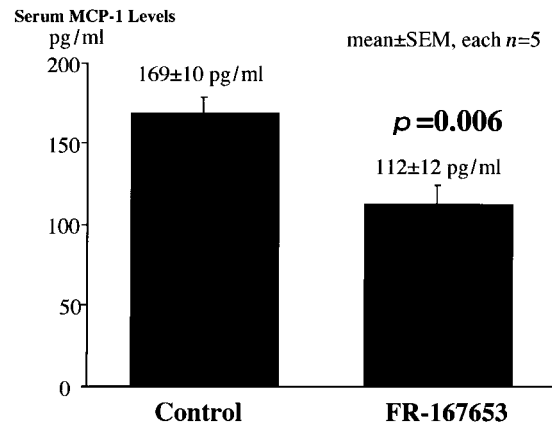


Figure 3 Serum MCP-1 levels 4 weeks after the bypass (Control vs. FR-167653).

考 察

(1) 術後内膜肥厚とMCP-1

1987年に米国NIHのMatsushimaらは、MCP-1 が単球・マクロファージの強力な走化因子chemotactic cytokine, すなわちケモカインであることを発見した⁵⁾。このMCP-1 が単球・マクロファージを誘導し、動脈硬化の引き金になることは、1996年のRossの障害反応説でも再度強調されている⁶⁾。術後内膜肥厚形成においても、術後3時間に単球・マクロファージが血管内皮細胞へ癒着し始めていることを証明し、さらに、静脈グラフト中のMCP-1 mRNAも上昇することを、われわれは報告した⁷⁾。よって、動脈硬化と同様に、術後内膜肥厚においてもMCP-1 による単球・マクロファージの誘導がその引き金になると考えられる。

(2) FR-167653の術後内膜肥厚抑制機序

1996年にYamamotoらは、TNF- α ・IL-1 β 産生阻害剤であるFR-167653(低分子pyrazolotriazine誘導体, C₂₄H₁₈FN₅O₂・H₂SO₄・H₂O, 分子量543)を開発した⁸⁾。その後の研究によって、FR-167653の作用機序は、炎症刺激で活性化されるp38 MAPKを阻害することとわかっており、今日では、FR-167653はp38 MAPK阻害剤であるとも言える⁹⁾。文頭で述べたように、われわれはこのFR-167653によって、ラットinterposition vein graftの術後内膜肥厚を抑制できることを報告してきた²⁾。しかし、なぜp38 MAPK阻害剤FR-167653によって術後内膜

肥厚が抑制できるのか、詳しい作用機序はいまだ不明である。

今回の研究では、FR-167653によって術後内膜肥厚が抑制されたのと同様に、術後4週目の平均MCP-1 血中濃度も有意に抑制されていた。ここで興味深い報告として、血管内皮細胞の*in vivo*実験においてp38 MAPKがMCP-1 産生を増加させたとの報告がある¹⁰⁾。以上から、われわれはFR-167653の作用機序として、『血管内皮細胞のMCP-1 産生を抑制することで、単球・マクロファージの浸潤を抑制し、さらに、術後内膜肥厚を抑制する』との仮説を考えている(Fig. 4: 自著のラット単球・マクロファージに特異的なED-1 染色の原図に上記の仮説を黄色文字で加筆した⁷⁾)。もし、この仮説が正しければ、p38 MAPK阻害剤であるFR-167653の利点は、初回投与で術後内膜肥厚が抑制できるという点にある。つまり、将来の臨床応用を想定した場合、大伏在静脈グラフトを採取した時点でFR-167653を初回投与すれば、その後の術後内膜肥厚を抑制することが期待できる。

(3) 今回の研究における限界と展望

今回の研究における問題は、証明された『FR-167653投与によってMCP-1 血中濃度が抑制された』という全身的变化をもって、局所的变化である『血管内皮細胞のMCP-1 産生が抑制された』と考えてよいかということである。この点については先に述べたように、われわれが施行した別の実験で、術後内膜肥厚を形成した静

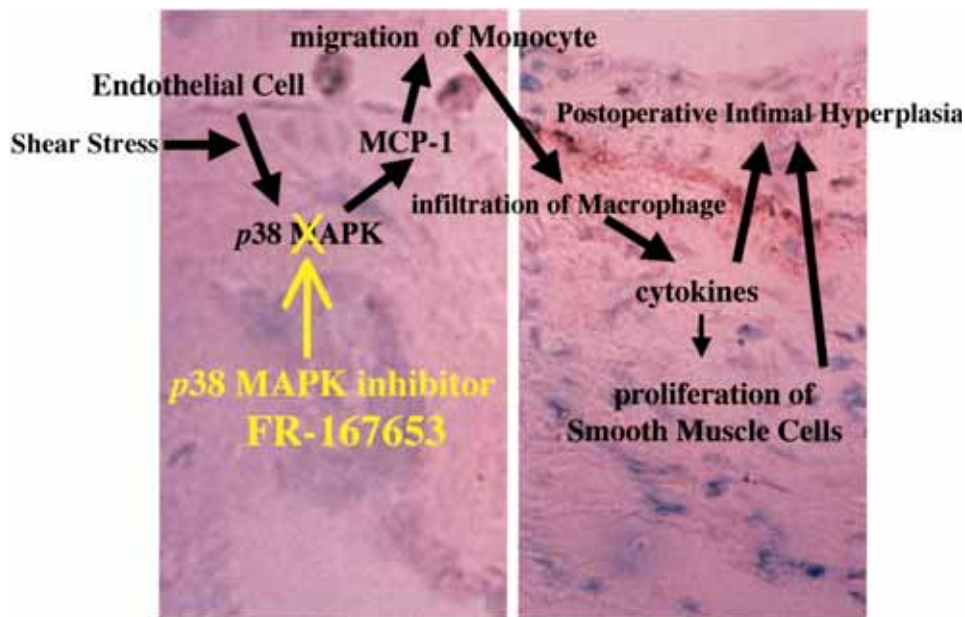


Figure 4 The hypothetical mechanism of FR-167653 against postoperative intimal hyperplasia (yellow).

脈グラフトにおいてMCP-1 mRNAの上昇とともに⁷⁾, MCP-1 血中濃度も上昇することを報告していることから¹¹⁾, 上記の仮説は有力と思われる。

しかしながら, MCP-1 血中濃度のラット半減期から考え, Fig. 4 に示した仮説ではFR-167653が術後早期に作用していることを想定している。FR-167653作用時期が術後早期であるという仮説は, 同じくわれわれが施行したこの実験の前段階のFR-167653投与量決定において, FR-167653を分割投与するより初期倍量投与した方が効果的であった事実とも一致する²⁾。さらに先の考察で, p38 MAPKがMCP-1産生を増加させた血管内皮細胞の*in vivo*実験報告を紹介したが⁹⁾, この仮説のとおりFR-167653がp38 MAPK阻害し, MCP-1産生を抑制している直接証明はまだない。

このように, この一連の研究はまだ始まったばかりで, 今回の結果はあくまで間接証明にすぎない。現在, 血管内皮細胞のMCP-1 特殊免疫染色を施行し, FR-167653投与時にMCP-1タンパク合成が抑制されていることを直接示し, さらに, 静脈グラフト中のMCP-1 mRNAレベルでも研究を進めているところである。

結 語

p38 mitogen activated protein kinase阻害剤FR-167653の術後内膜肥厚抑制機序の一つとして, FR-167653が血管内皮細胞のmonocyte chemoattractant protein-1産生を抑制することで, 単球・マクロファージの浸潤を抑制し, ひいては術後内膜肥厚を抑制するのであろうと考えられた。

謝 辞

本論文を終えるにあたり, 御協力いただいた本学動物実験施設 佐藤浩治氏, 病院病理部 針山良二氏, 共同研究施設 久保博嗣氏, 医療情報部 八木正人氏および藤沢薬品薬理研究所 須藤有二氏, さらに米国Wisconsin州立大学血管外科John R. Hoch準教授に深謝いたします。

なお本論文の要旨は, 第34回日本心臓血管外科学会学術総会(平成16年2月, 福岡)にて発表した。

文 献

- 1) Kitamura S, Kawachi K, Taniguchi S et al: Long-term benefits of internal thoracic artery-coronary artery bypass in Japanese patients. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 46: 1-10.

- 2)山村光弘, 宮本 巍, 八百英樹: ラットinterposition vein graftにおけるTNF- α 産生阻害剤FR-167653の術後内膜肥厚抑制効果: 続報. 日心外会誌, 2003, 32: 75–78.
- 3)山村光弘, 八百英樹, 宮本 巍: 術後内膜肥厚研究のための動物実験モデル. 脈管学, 2003, 43: 755–759.
- 4)Hoch JR, Stark VK, Hullet DA et al: Vein graft intimal hyperplasia: leukocytes and cytokine gene expression. Surgery, 1994, 116: 463–471.
- 5)Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T et al: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemoattractant factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. J Exp Med, 1988, 167: 1883–1893.
- 6)Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. N Eng J Med, 1999, 340: 115–126.
- 7)Yamamura M, Miyamoto T, Hoch JR: Monocyte chemoattractant protein-1 expression in intimal hyperplasia of vein grafts in a rat model. Surg Today, 2002, 32: 329–334.
- 8)Yamamoto N, Sakai F, Yamagishi H et al: Effect of FR 167653, a cytokine suppressive agent, on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. Eur J Pharmacol, 1996, 314: 137–142.
- 9)Takahashi S, Keto Y, Fujita T et al: FR167653, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, prevents *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 296: 48–56.
- 10)Goebeler M, Kilian K, Gillitzer R et al: The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor- α -induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells. Blood, 1999, 93: 857–865.
- 11)Yamamura M, Miyamoto T, Yao H: Serum monocyte chemoattractant protein-1 levels in rat models of intimal hyperplasia. Int J Angiol, 2002, 11: 80–82.

Mechanism of FR-167653 against Postoperative Intimal Hyperplasia

Mitsuhiro Yamamura, Yuji Miyamoto, Sukemasa Mukai, Hiroe Tanaka,
Masaaki Ryomoto, Yoshiteru Yoshioka, and Masanori Kaji

Department of Cardiovascular Surgery, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan

Key words: postoperative intimal hyperplasia, monocyte chemoattractant protein-1, p38 mitogen activated protein kinase, FR-167653

We have reported that FR-167653 (Fujisawa Pharm. Co., Ltd., Osaka/Astellas Pharm. Inc., Tokyo), an inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) can suppress postoperative intimal hyperplasia developed after the vein graft in a rat model. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is reported as the most potent chemoattractant chemokine for monocyte & macrophage, which infiltrates into vessel walls before the development of intimal hyperplasia. In this study, we evaluated intimal areas in the rat vein grafts, and rat serum levels of MCP-1 4 weeks after the vein bypass grafting, in order to clarify the mechanism of FR-167653. In ten male rats (487 $\pm$ 5g), we interposed the right epigastric vein grafts into the common femoral arteries. The rats were divided into two groups: group FR ($n = 5$) with the preoperative administration of FR-167653 4.0 μ g/g, and the control group ($n = 5$) with the same dose of saline. The mean of intimal hyperplasia in group FR was significantly lower, compared with the control group (0.05 $\pm$ 0.02 mm² vs. 0.43 $\pm$ 0.05 mm², $p < 0.001$). The mean of rats serum MCP-1 levels in group FR was also significantly lower, compared with the control group (112 $\pm$ 12 pg/ml vs. 169 $\pm$ 10 pg/ml, $p = 0.006$). Considering p38 MAPK is known to play an important role in increasing MCP-1 of vessel endothelial cells, our results suggest that FR-167653 can suppress postoperative intimal hyperplasia developed after the vein graft by inhibiting MCP-1 in vessel endothelial cells.

(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 263–267)