

血管内膜肥厚とミッドカインの関連について

坂野比呂志 森崎 浩一 宮地 紘樹 前川 卓史 玉井 宏明
高橋 範子 渡辺 芳雄 森前 博文 井原 努 堀 昭彦
小林 昌義 山本 清人 古森 公浩

要 旨: ミッドカイン(MK)は細胞の生存や移動を促進し、癌の進行、炎症性疾患の発症、そして傷害を受けた組織の保存、修復に深く関与している。血管狭窄モデル、静脈グラフトモデル、ステント内膜肥厚モデルいずれにおいてもその内膜肥厚に関与していることが示され、とくに前2者ではMKの抑制により内膜肥厚も抑制された。今後MKを標的とした分子標的薬の術中局所投与や薬剤溶出型ステントの開発による血管内膜肥厚の予防が期待される。(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 415-422)

Key words: intimal hyperplasia, vein graft, midkine, restenosis, graft failure

序 言

動脈硬化や血管形成術後ならびにバイパス術後の血管(再)狭窄のメカニズムは複雑で多岐にわたる¹⁾。病理学的には血管内膜の肥厚が大きな一面を占める。傷害を受けた内皮細胞から放出される反応性シグナルや集まってくる炎症性細胞、中膜から内膜へ移動してくる平滑筋細胞などによって、新生内膜の増殖が起こる。そのため血管形成術後やバイパス術後再狭窄の予防には血管内膜肥厚を抑制することが重要となる。これまで血管狭窄のメカニズムにおける種々のステップに着目し、数多くの分子を標的として、その予防が試みられた。MCP-1やE2F, AP-1, c-myc, MMPなど実験レベルでは結果を残しているものも多いが、現段階で臨床使用に耐えうるものは開発されていない²⁻⁴⁾。

ミッドカイン(MK)は1988年に発見された成長因子およびサイトカインである。MKはもともとレチノイン酸により分化誘導された胚性癌細胞の初期の段階で発現することで発見された。プレイオトロフィンとわずかに2つで成長因子ファミリーを形成し、遺伝子配列はおおよそ半分を共有している。

その生物学的機能は、とくに癌、神経・心臓、炎症な

らびに血圧の4分野で重要である。それを支える生物学的活性として、抗アポトーシス・細胞遊走能・炎症性サイトカイン誘導・血管新生などが挙げられ多岐にわたる⁵⁾。血管内膜肥厚に関して最近報告されているメカニズムを考慮し、われわれはとくにMKの細胞遊走能、炎症性サイトカイン誘導という働きに着目した。MKの抑制により炎症性細胞の遊走が抑えられれば、新生内膜形成も軽減できる可能性があると考えた。

対象と方法

1. 血管狭窄モデル⁶⁾

ラットを用いて頸動脈のバルーン傷害モデルを作成した。術後3日目、7日目、14日目に血管を採取し、組織学的解析、RT-PCR、Western blottingを行った。MK欠損マウスを用いて頸動脈結紮モデルを作成した。このモデルにポンプを用いて、生理食塩水、人アルブミン、MK蛋白を7日間投与し、内膜肥厚の程度を比較した。ウサギMKの遺伝子配列を解析し、アンチセンスODNを作成した。In vitroで効果の高いものを選択し、ウサギ頸動脈のバルーン拡張後LipofectoAmineと混合したアンチセンスODNを血管壁に導入した。後日血管を採取し、Western blottingや組織学的解析を行った。

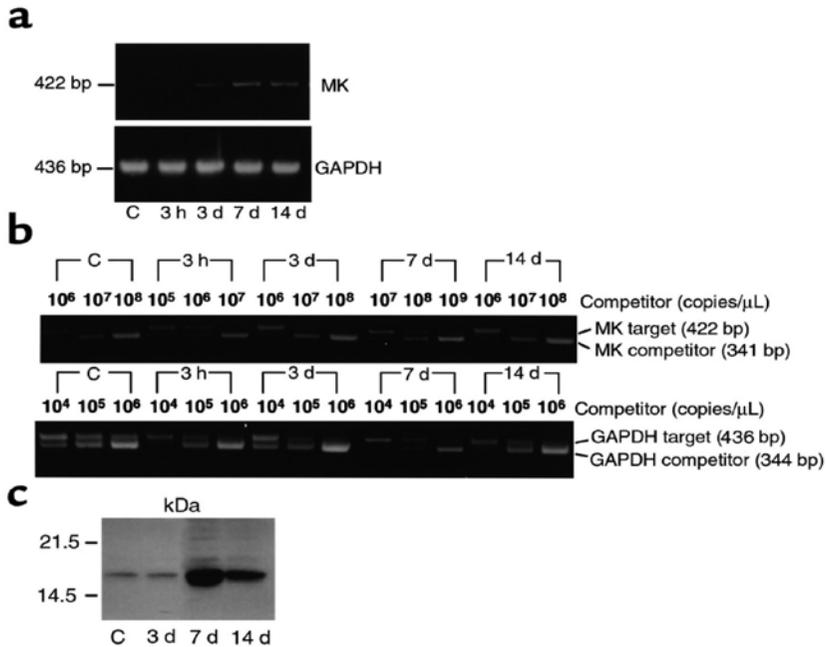


Figure 1 Increased MK expression in the carotid artery after balloon injury. (a) RT-PCR products for MK and GAPDH were separated on 1% agarose gels. (b) Competitive RT-PCR for MK and GAPDH. (c) Proteins extracted from the carotid arteries that corresponded to an original weight of 10 mg were separated by 15% SDS-PAGE. MK protein was detected with anti-mouse MK antibody on Western blotting.

2. スtent留置モデル⁷⁾

高コレステロール食を投与したウサギの頸動脈から5Fr. シースを挿入し、外腸骨動脈にステントを留置するモデルを作成した。後日血管を採取し、RT-PCR、Western blotting、組織学的解析を行った。マウス腹腔内から採取したマクロファージをLDLおよび酸化LDLを加えた培養液で培養し、Western blottingおよびOil red O染色を行った。

3. 静脈グラフトモデル^{8,9)}

ウサギMKに対するsiRNAを作成した。In vitroで効果の高いものを選択し、さらに生体内での安定化を図るため、安定化修飾をしたものを使用した。ウサギの頸動脈を離断後、頸静脈を間置した静脈グラフトモデルを用いた。導入にはアテロコラーゲンをを用いた。アテロコラーゲンは牛真皮から得られるタイプ1コラーゲンでペプシン処理により抗原性が排除されているものである。これまでに遺伝子やオリゴヌクレオチドの細胞内取り込みや分解酵素に対する抵抗性を増加させ、さらにその徐放を可能にするという報告がある。そのためsiRNAの担

体として有用であることが期待される。後日グラフトを採取し、Western blottingや組織学的解析を行った。

また静脈グラフトモデルで通常食と通常食にpitavastatin (1 mg/kg/d)を混合した食事を投与した群とで内膜肥厚の程度を比較、さらにMK発現の差についても比較した。

結 果

1. 血管狭窄モデル

正常動脈ではMK RNAはわずかに発現しているのみであったが、バルーン傷害後3時間ではやや減少し、3日目には増加し始め、7日目にピークに達した。このときには正常血管の約10倍となり、新生内膜が完成する14日目にはやや減少に転じた。MK蛋白の発現はRNAと同様の経過をたどった(Fig. 1)。免疫染色を行うと、正常血管ではMKは内皮細胞にのみ発現していたが、7日目と14日目には新生内膜に強く発現していた。すなわち、MKが新生内膜形成に強く関与していることが示唆された。

MK欠損マウスでは出生後海馬の発達が遅れる以外

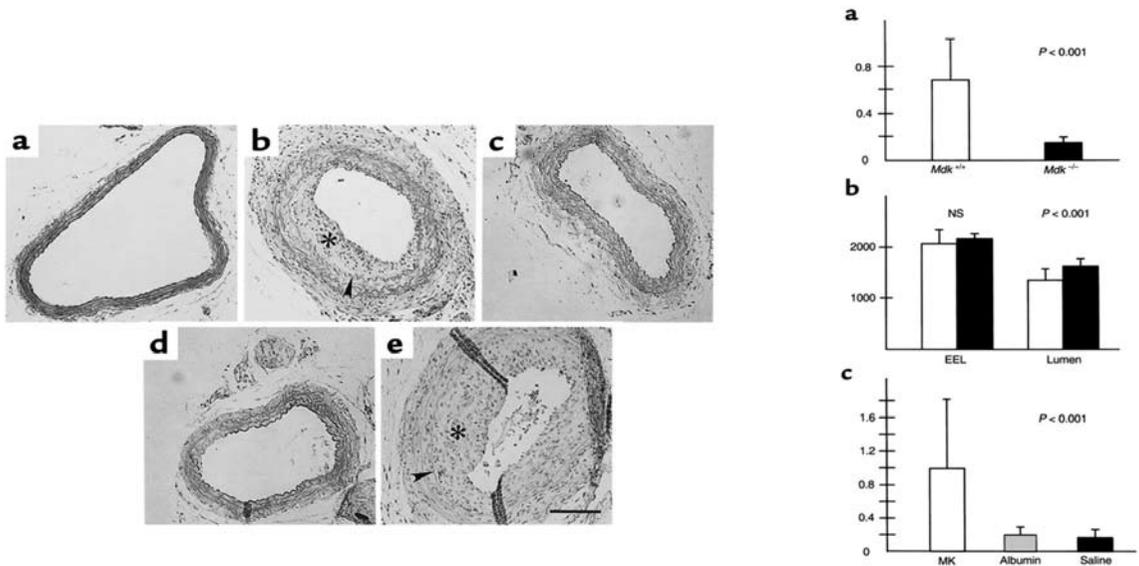


Figure 2 Left: Intimal lesion formation was suppressed in MK-deficient mice, and exogenous MK caused its resumption. The results of hematoxylin and eosin staining of samples 14 days after ligation (b–e) and a control (a) are shown. (a) Control (without ligation); (b) wild-type mice ($Mdk^{+/+}$); (c) MK-deficient mice ($Mdk^{-/-}$); (d) $Mdk^{-/-}$ mice treated with saline; (e) $Mdk^{-/-}$ mice treated with MK protein. Arrowheads indicate the internal elastic lamina. Asterisks indicate intimal lesions. Bar, 100 μm .

Right: Morphometric analysis of neointima formation. (a and b) Comparison between $Mdk^{+/+}$ and $Mdk^{-/-}$ mice; (c) comparison between $Mdk^{-/-}$ mice treated with either saline, albumin, or MK protein. (a) The mean ratios between the areas of the intimal lesion and the media (IL/M) and standard deviations for $Mdk^{+/+}$ and $Mdk^{-/-}$. The difference between $Mdk^{+/+}$ and $Mdk^{-/-}$ mice was statistically significant ($P < 0.001$; Mann-Whitney test). (b) Circumferences of the external elastic lamina (EEL) and lumen (Lumen). The circumference of the lumen was significantly different between $Mdk^{+/+}$ and $Mdk^{-/-}$ mice ($P < 0.001$; Mann-Whitney test). In all plots, the open columns indicate $Mdk^{+/+}$ mice, and the filled columns indicate $Mdk^{-/-}$. NS, not significant. (c) The mean ratios (IL/M) and standard deviations for $Mdk^{-/-}$ mice treated with saline, human albumin, or MK. The open column indicates mice treated with MK; the gray column indicates mice treated with human albumin; and the filled column indicates mice treated with saline. The difference between the MK-treated group and those treated with human albumin or saline was statistically significant ($P < 0.001$; Mann-Whitney test).

大きな異常は認めない。新生内膜形成は MK 欠損マウスではほぼ完全に抑制されていた。新生内膜 / 中膜比も有意に減少していることが判明した。一方、中膜の肥厚の程度はほぼ同様であった(**Fig. 2** 左)。

さらに新生内膜形成における MK の直接的な関与をみるために、浸透圧ポンプから MK 蛋白を投与した。すると MK 投与群では新生内膜は通常通り形成され、生理食塩水やアルブミンの投与群では新生内膜の形成は抑制されたままであった(**Fig. 2** 右)。

炎症性白血球、とくにマクロファージは新生内膜形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。CD-45(炎症性白血球抗原)陽性細胞は正常マウスでは新生内膜内に認められたが、MK 欠損マウスではほとんど認めなかった。さらに正常マウスの新生内膜内には MOMA-2(単球・マクロファージマーカー)陽性細胞は

7/4(好中球マーカー)より有意に多く認められたが、MK 欠損マウスではどちらもほとんど認めなかった。

ウサギ MK に対するアンチセンスを LipofectoAmine を用いて導入すると、4 時間後に細胞内に取り込まれていることが確認された。24 時間後にはすでに wash out されていたが、MK 発現の抑制効果は 7 日目にも継続していた。その結果、内膜肥厚も有意に抑制されていた(**Fig. 3**)。

2. スtent留置モデル

高コレステロール食投与ウサギは血清コレステロール値が有意に上昇した。さらにステント内の新生内膜形成も有意に増悪した。MK の発現は蛋白でも RNA でも 3 日以内に認め始め、7 日目にピークに達した(**Fig. 4**)。

術後 7 日目、14 日目、28 日目の血管を採取し、CD31(血管内皮細胞)、 α -SMA(平滑筋細胞)、RAM11(マクロファージ)、MK、それぞれの発現の局在を確認した。平

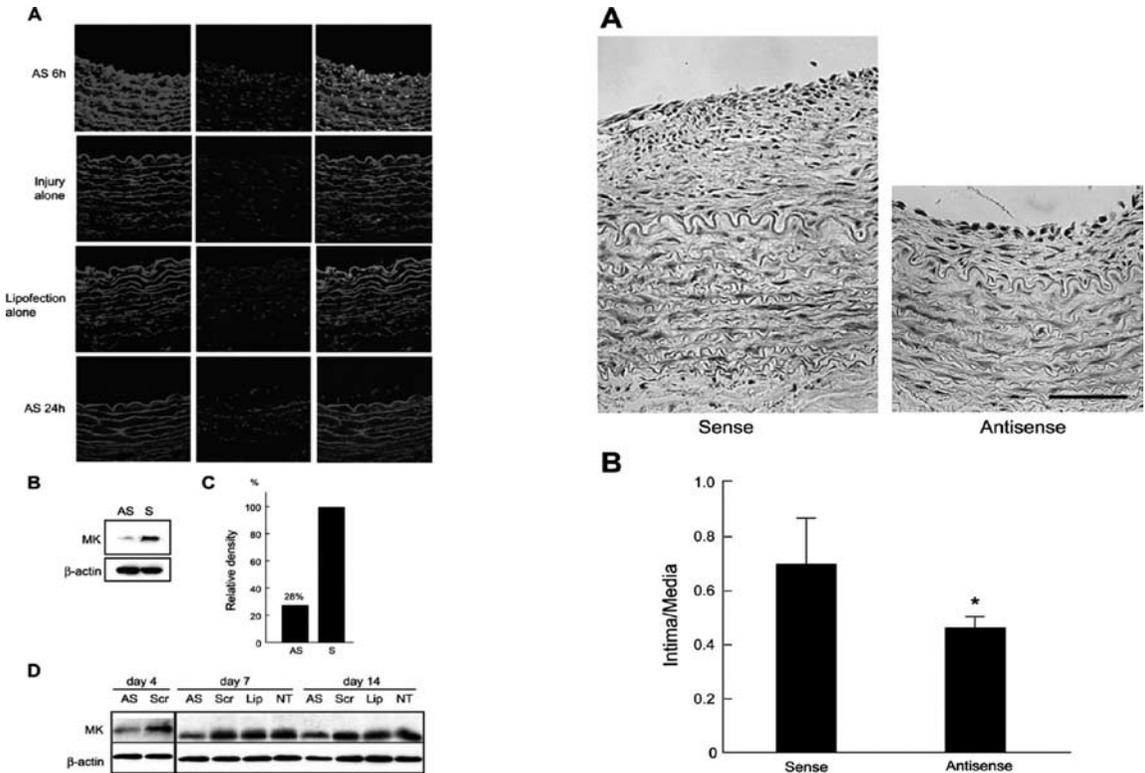


Figure 3 Left: In vivo transfection of a rabbit MK antisense ODN. FITC-conjugated AS3 was transfected into the common carotid artery. *A, top*: localization of the ODN at 6 h after transfection (*left*). The nuclei were stained with propidium iodide (*middle*). A merge view of the ODN and nuclei stain is also presented (*right*). The elastic lamina of the vascular wall is well known to be autofluorescent. However, by merging the green signals with those of propidium iodide, we were able to detect that the transfected FITC-conjugated AS3 persisted in the wall at least 6 h after transfection. *A, top middle* and *bottom middle*: negative controls of no transfection and lipofection alone, respectively. *A, bottom*: localization of ODN 24 h after transfection. Bar = 50 μ m. In *B* and *C*, the artery was transfected with AS3 (AS) or sense control (S), removed 4 days after transfection, and then subjected to Western blot analysis for MK expression. Experiments were performed independently 3 times and gave the similar results, with a representative result shown here. The relative densitometric densities of MK bands in *B* standardized as to β -actin bands are also shown (*C*). In *D*, MK expression was monitored 4, 7, and 14 days after transfection of ODN into the balloon-injured artery. Scramble (Scr), lipofection alone (Lip), and no transfection (NT) controls were included.

Right: Effects of a rabbit MK antisense ODN on intimal thickening induced by balloon injury. Arteries were removed 14 days after balloon angioplasty with MK antisense or sense ODN. They were then stained with hematoxylin and eosin (*A*). The ratio of intima and media (*B*) was calculated by means of an image analyzer. The number of animals used for the experiment was 6; in 3 animals, the antisense ODN (AS3) was administered to the left carotid artery and the corresponding sense ODN to the right carotid artery, whereas in the other 3 animals the sense ODN was administered to the left and antisense one to the right. * $P < 0.05$ (by Mann-Whitney *U*-test). Bar = 50 μ m.

滑筋細胞は新生内膜内の比較的内皮よりに発現し、一方、マクロファージはより深いところに発現していた。MKの発現はマクロファージのそれと同様の分布をみせた。二重蛍光染色でもマクロファージがMKを発現していることが確認された。

酸化LDLはLDL受容体ではなく、スカベンジャー受容体を通してマクロファージに取り込まれるようにな

る。LDLを多量に取り込んだマクロファージは泡沫化し、血管内皮細胞障害、アテローム性動脈硬化病変を引き起こすと考えられている。マクロファージを酸化LDLにさらすと、有意にMK発現の増加を認めた。

3. 静脈グラフトモデル

正常静脈ではMKの発現はほとんど認めなかったが、動脈環境にさらされると有意に増加し、7日目でピークを

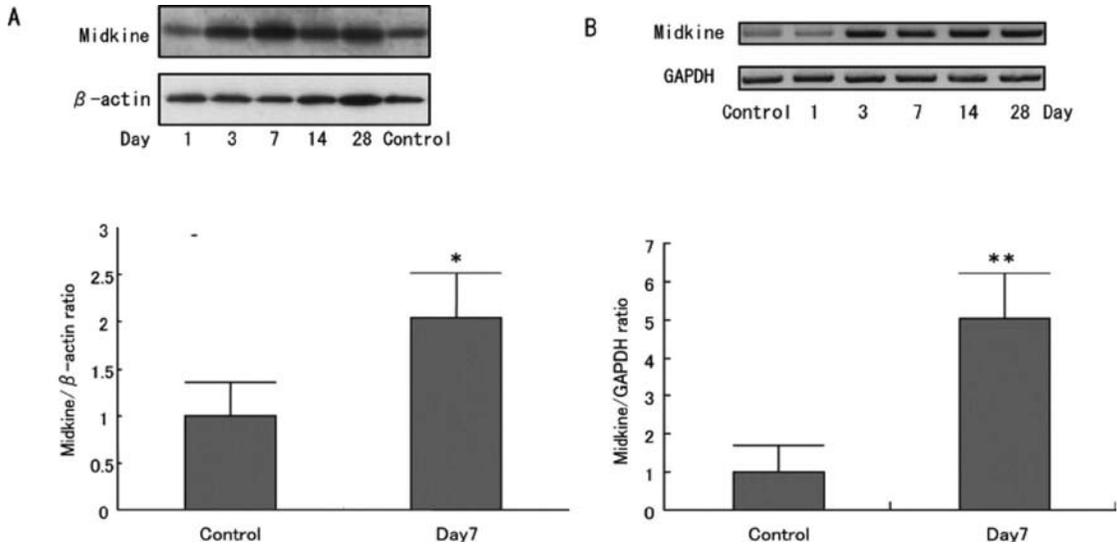


Figure 4 Midkine expression during neointima formation. Right iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits were obtained at the indicated number of days after stenting. The graphs show relative densitometric density ratios presented as the average \pm SE ($n = 4$). * $P < 0.01$; ** $P < 0.0001$ (Student t test). Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) data were obtained from two individual animals, respectively, at each time point (except for control and day 7: $n = 4$). Because the results of each set of experiments were similar, representative data are shown. A: Midkine protein expression revealed by Western blot analysis. B: Midkine messenger RNA expression estimated by RT-PCR. *GAPDH*, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

迎えた。7日目の秒本ではMKは内皮に強く、中膜に中等度発現していた(Fig. 5)。

ウサギMKの遺伝子配列は解析されていたので、それをもとにsiRNAを5種類作成した。In vitroの実験で抑制効果の最も高いものを選択し、さらに生体内での安定化を図る目的で、安定化修飾を施したsiRNAを作成した。導入に用いるアテロコラーゲンも種々の濃度およびシート状のものも用いて比較した。結果、1.75%のアテロコラーゲンにsiRNAを混合したものをを用いると、アテロコラーゲン自体がグラフト周囲でゲル化して、7日以上留まっており、それが吸収されていく過程でsiRNAが血管壁内に効果的に導入されることが証明された。実際に静脈グラフトモデル作成後7日目においてMKの発現が有意に抑制されることが確認された。

その効果により、手術4週後の新生内膜形成はsiRNA投与群で有意に抑制されていた(Fig. 6)。

その機序として細胞増殖の抑制と炎症性白血球の遊走が抑制されていることが示唆された。アポトーシスに関しては変化を認めなかった。

さらに pitavastatin 投与を行うと、MKの発現は約半分抑制され、その結果静脈グラフト内膜肥厚も有意に抑

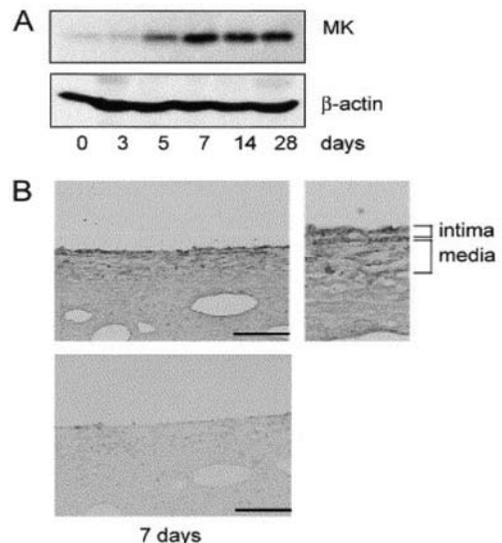


Figure 5 Increased midkine (MK) expression in a rabbit vein graft. A: The time course of MK expression in the rabbit vein graft is shown. Protein extracts of grafted veins at the indicated times after operation were subjected to Western blot analysis for MK and β -actin. B: Immunostaining for MK 7 days after the operation is shown (upper left and right). A magnified photo of the upper left panel is shown at upper right. The bottom panel shows a controlled staining without the first antibody of an adjacent section. Bars, 100 μ m.

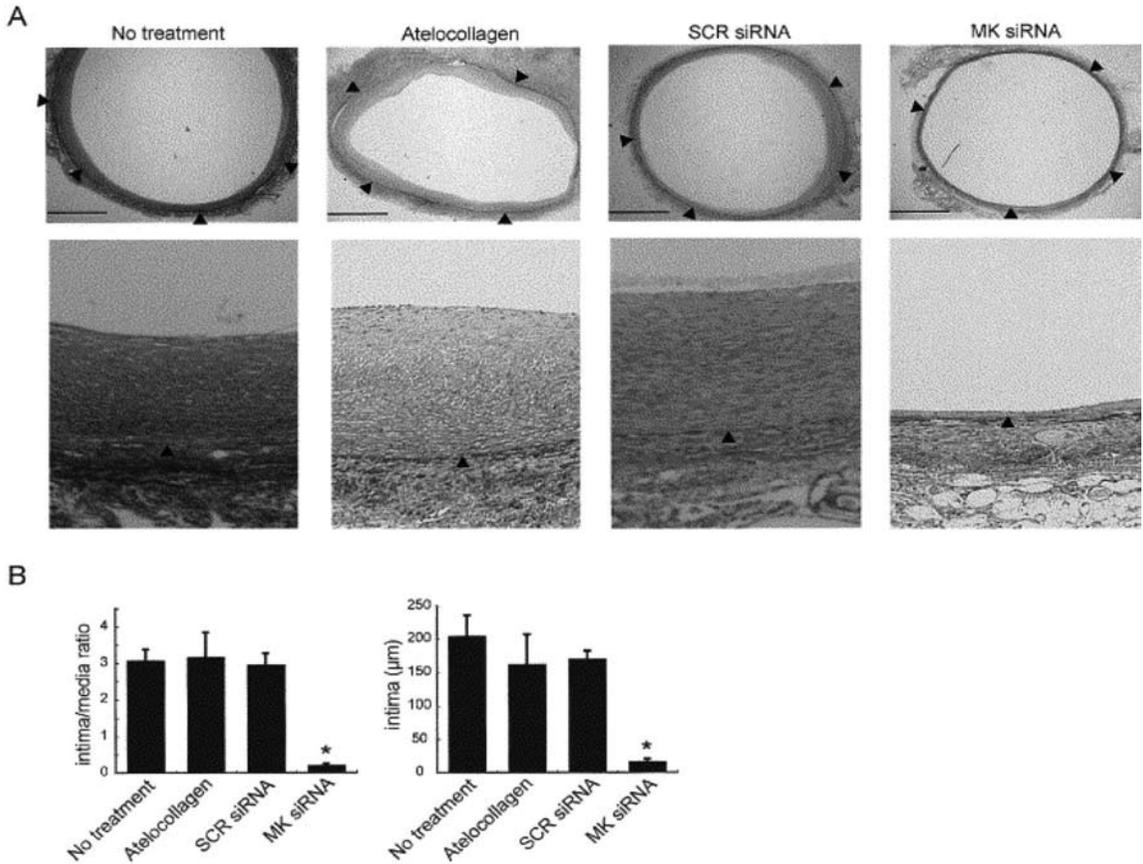


Figure 6 Quantification of intimal hyperplasia. A: Representative elastic Van Gieson-stained sections from animals at 4 weeks after operation. Representative photos at low (above) and high (below) magnifications are presented. Arrowheads indicate the internal elastic lamina. Bars, 1 mm. B: The graph shows the intima-media ratio (left) and intimal thickness (right) (n = 5 in each group, *P < 0.05 by analysis of variance with the Bonferroni post hoc analysis). SCR siRNA, scrambled small interfering RNA; MK, midkine.

制されていた(Fig. 7)。

考 察

最近の研究では動脈硬化病変や血管病変治療後の再狭窄の原因として炎症や血管平滑筋細胞の増殖が言われている。これまでとくに血管形成術後の再狭窄や静脈グラフト晩期閉塞に対する予防的治療が数多く研究されてきた。これらの病変はいずれも局所に起こってくるため、全身性の動脈硬化病変とは異なり、バルーン形成術時に同時に導入したり、ステントから溶出するようにしたり、静脈グラフトそのものに体外で導入、あるいはバイパス後に担体とともにおいてきたりするような方法が考えられている²⁻⁴⁾。唯一臨床的に実用化されているのは冠動脈における薬剤溶出性ステントである¹⁰⁾。薬剤として

は細胞増殖抑制作用のある抗がん剤や免疫抑制剤が用いられている。これにより血管平滑筋細胞の増殖が抑制され、再狭窄は劇的に減少した。しかし、それとともに血管内皮の増殖も抑制されるため、遅発性のステント血栓症の増加が報告されるようになり、抗血小板剤を長期に内服しなければならぬという欠点がある。種々の薬剤溶出性ステントが開発されているが、この問題点は解決されていない。

MK 欠損マウスを用いることで、新生内膜形成に MK が重要な役割を果たしていることが証明された。これは MK 欠損マウスに MK を投与することで通常マウスのような新生内膜形成が惹起されたことによって、さらにはっきりしたものとなった。炎症性細胞は平滑筋細胞の遊走、増殖に強く関与しているが、これが MK を介して

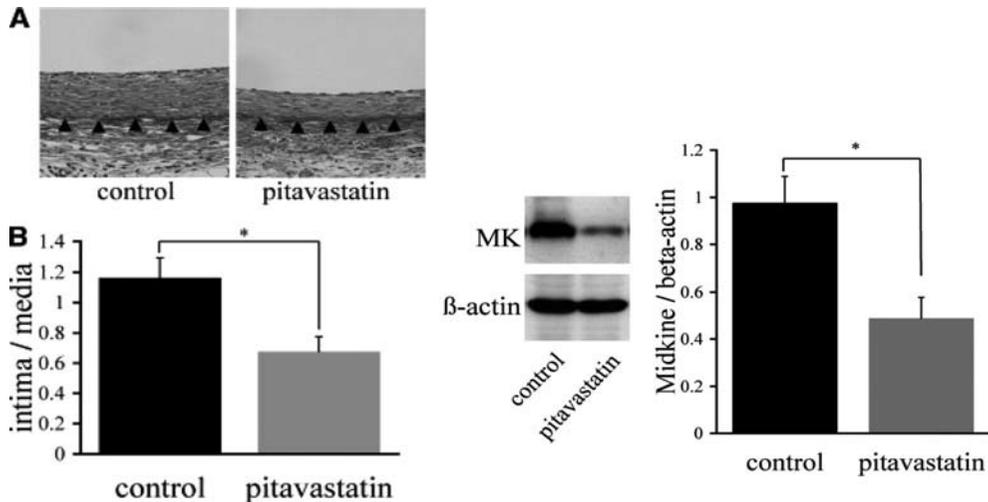


Figure 7 Left: Effect of pitavastatin on the development of neointima formation of the vein graft 4 wk after operation. (A) Microscopic findings of the middle portion of an autologous vein graft from the control group and the pitavastatin group. Arrowheads indicate the internal elastic lamina (elastica van Gieson staining; original magnification $\times 400$). (B) Quantitative analysis of neointima formation of vein grafts. The intima/media index was significantly suppressed in the pitavastatin group ($n = 6$) compared with the control group ($n = 6$). Results are expressed as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

Right: Western blotting of whole vein grafts (2 wk after implantation). Quantitative analysis of MK expression of vein grafts showed significant suppression in the pitavastatin group ($n = 6$) compared with the control group ($n = 6$). Results are expressed as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

起こっていることが示唆された。いくつかの実験を通して、MKは新生内膜に強く発現していたが、これが血管平滑筋細胞そのものではなく、中膜から内膜へ遊走してきたマクロファージから産生されていることが判明した。そして血管平滑筋細胞の増殖そのものを増加させるのではなく、マクロファージや平滑筋細胞の遊走を惹起する作用をもつ。細胞増殖そのものではなく、血管壁の炎症に関与しているという点は、前述の内皮細胞の増殖まで抑制してしまう既存の薬剤と異なる点で、MKを抑制する薬剤あるいは分子標的薬の開発ができれば、この点が克服できる可能性も秘めていると考えられる。さらにMKはひと成人の臓器にはいずれにも発現がほとんどないことから、その抑制によって重篤な副作用が起こる可能性はきわめて少ないと思われる。

MKを抑制する薬剤の開発とともにもう一つの大きな問題は、その投与方法である。たとえばsiRNAを溶出するステントは未だ開発されていない。静脈グラフトでわれわれが使用した投与方法はきわめて優れた利点をもつ。まず手技が簡便であるという点が挙げられる。さらに、これまでに報告のある投与方法やバルーン傷害モデ

ルでわれわれが用いた方法は、投与したその時だけに導入されるというものであるが、この方法では局所に長時間とどまり、siRNAが徐放される。加えて、アテロコラーゲン自体にオリゴヌクレオチドなどの細胞内取り込みや分解酵素への抵抗性を増加させる作用がある。実際にその内膜肥厚抑制作用は著明な効果を認めた。

結 論

MKは血管内膜肥厚に深く関与しており、その抑制により内膜肥厚が抑制された。今後MKを標的とした分子標的薬の術中局所投与や薬剤溶出型ステントの開発による血管内膜肥厚の予防が期待される。

文 献

- 1) Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG: Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002; 8: 1249–1256
- 2) Mori E, Komori K, Yamaoka T, et al: Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive

- remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2002; **105**: 2905–2910
- 3) Conte MS, Bandyk DF, Clowes AW, et al: Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery. *J Vasc Surg* 2006; **43**: 742–751
 - 4) Kume M, Komori K, Matsumoto T, et al: Administration of a decoy against the activator protein-1 binding site suppresses neointimal thickening in rabbit balloon-injured arteries. *Circulation* 2002; **105**: 1226–1232
 - 5) Muramatsu T: Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010; **86**: 410–425
 - 6) Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, et al: Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; **105**: 489–495
 - 7) Narita H, Chen S, Komori K, et al: Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Vasc Surg* 2008; **47**: 1322–1329
 - 8) Banno H, Takei Y, Muramatsu T, et al: Controlled release of small interfering RNA targeting midkine attenuates intimal hyperplasia in vein grafts. *J Vasc Surg* 2006; **44**: 633–641
 - 9) Fujita H, Banno H, Yamanouchi D, et al: Pitavastatin inhibits intimal hyperplasia in rabbit vein graft. *J Surg Res* 2008; **148**: 238–243
 - 10) Garg S, Serruys PW: Coronary stents: current status. *J Am Coll Cardiol* 2010; **56** (10 Suppl): S1–S42

Relationship between Midkine and Intimal Hyperplasia in Vascular Disease

Hiroshi Banno, Kohichi Morisaki, Hiroki Miyachi, Takashi Maekawa, Hiroaki Tamai, Noriko Takahashi, Yoshio Watanabe, Hirofumi Morimae, Tsutomu Ihara, Akihiko Hori, Masayoshi Kobayashi, Kiyohito Yamamoto, and Kimihiro Komori

Division of Vascular Surgery, Department of Surgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

Key words: intimal hyperplasia, vein graft, midkine, restenosis, graft failure

Intimal hyperplasia is a major obstacle to patency after angioplasty or vein grafting. Despite the diverse array of trials to prevent it, a satisfactory therapeutic strategy for clinical use has not been established. However, sufficient inhibition of early stages of intimal hyperplasia may prevent this long-term progressive disease. Midkine promotes migration, survival and other activities of target cells. It plays a role in tumor growth, inflammatory response and repair of injured tissue. In this review, we show that midkine plays a key role for intimal hyperplasia in the experimental restenosis model after balloon injury, vein graft and stent implanting models. In the two former models, suppression of midkine attenuated neointimal formation. Increased clinical application of midkine inhibitors is needed and the improvement in delivery methods are among the subjects on which further basic research is required. Molecular drugs targeting midkine are expected to prevent intimal hyperplasia. (J Jpn Coll Angiol, 2011, **51**: 415–422)