

ニホンザル移植心における血管内皮増殖因子の発現

渡辺 智治¹⁾ 鈴木 淳一^{1)*} 横関 整¹⁾天野 純²⁾ 磯部 光章¹⁾

1) 信州大学医学部第1内科学教室

2) 信州大学医学部第2外科学教室

**Expression of Vascular Endothelial Growth Factor
in Cardiac Allografts of Non-Human Primates**Tomoharu WATANABE¹⁾, Jun-ichi SUZUKI¹⁾, Osamu YOKOSEKI¹⁾Jun AMANO²⁾ and Mitsuaki ISOBE¹⁾1) *Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine*2) *Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine*

Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays important roles in regulating angiogenesis. In chronically rejected cardiac allografts, arterial intimal thickening is formed of proliferative smooth muscle cells (SMCs) with enhanced expression of SMemb, a non-muscle myosin heavy chain isoform. However, the detailed mechanisms of the development of these lesions are almost unknown. Heterotopic cardiac transplantation was performed using Japanese monkeys; the grafts were harvested on day 28. Coronary arteries in the transplanted hearts (n=5), recipient native hearts (n=5) and nontransplanted hearts (n=5) were used for pathological analysis. To evaluate VEGF and SMemb expression, we performed immunohistochemistry and the intensity was semiquantitatively scored. VEGF and SMemb reactivity was localized predominately on vascular endothelial cells and SMCs; no immunoreactivity was detected in native hearts. Using serial sections, expression of VEGF and SMemb was seen to be enhanced in the thickened intima, while this expression was diminished in native hearts. The scores of VEGF and SMemb in the vasculature of transplanted hearts were significantly different from those of native hearts ($P < 0.01$). These results indicate that VEGF plays a pivotal role in neointimal formation in chronic rejection, and the expression can be a useful marker for the early diagnosis of chronic rejection in cardiac allografts. *Shinshu Med J* 47 : 393—395, 1999

(Received for publication January 18, 1999; accepted in revised form May 13, 1999)

Key words : heart transplantation, chronic rejection, coronary arteriosclerosis, vascular endothelial growth factor

心臓移植, 慢性拒絶, 冠動脈硬化, 血管内皮増殖因子

I 緒 言

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) は, 血管内皮細胞の増殖や遊走, 血管透過性の亢進等の様々な血管病態において重要な役

割を演じている¹⁾。我々は, 心臓移植の慢性拒絶で観察される冠動脈内膜肥厚の進展において, 血管平滑筋細胞の増殖が形質変換を伴っていることを非筋型ミオシン重鎖 (SMemb) の発現によって明らかにした²⁾。この移植心冠動脈病変の進展において内皮細胞の障害や増殖も重要であり, そのため VEGF の発現が病態に関連することが示唆されたが, 詳細はこれまでに明

* 別刷請求先: 鈴木 淳一 〒390-8621
松本市旭 3-1-1 信州大学医学部第1内科

らかになっていない。VEGF の移植心冠動脈病変における役割を解明するために、我々は VEGF と SMemb の冠動脈での発現をニホンザルの心臓移植モデルを用いて比較検討した。

II 方 法

任意に組み合わせられたニホンザル（オス，1.4～5.5 kg，生後1～5年，ヨシカワ，神戸）間で異所性に心臓移植を実施した（n=5）²⁾。手術時の麻酔にはケタミン（25mg/kg）を用いた。FK506（0.1mg/kg/日，藤沢薬品，大阪）を免疫抑制剤として術後使用し，移植後28日に移植心を摘出した。コントロールとして移植されていないニホンザルの心臓（n=5）と異所性に心臓移植されたレシピエントの心臓（n=5）を用いた。凍結切片は6-8 μm に薄切し，ヘマトキシリン-エオジン（HE）とエラスチカーヴァン-ギーソン（EvG）でそれぞれ染色し，冠動脈の内膜肥厚の程度は既報の方法に従い半定量的にスコア化（0-3）

した。免疫染色は一次抗体として抗ヒト VEGF 抗体（R&D Co., Minneapolis, MN）と抗ラビット SMemb 抗体（ヤマサ，東京）を用い，二次抗体としてそれぞれ適合するビオチン化抗免疫グロブリン抗体を用いた。さらに Vectastain ABC kit（Vector Lab. Inc., Burlingame, CA）を用いて発色し，既報の様にその発現強度を0から3で半定量的に計測し，統計学的に比較検討した³⁾。免疫染色のコントロールとして，一次抗体を反応させない連続切片を用いた。

III 結 果

すべての移植心は摘出されるまで拍動を続けた。HE 染色と EvG 染色標本による検討では，移植心には軽度から中等度の冠動脈硬化が観察されたのに対し，移植されなかったニホンザルの心臓とレシピエントの心臓では内膜肥厚は観察されなかった。免疫染色による検討では，VEGF，SMemb ともに移植されなかった心臓およびレシピエントの心臓では弱い発現にとど

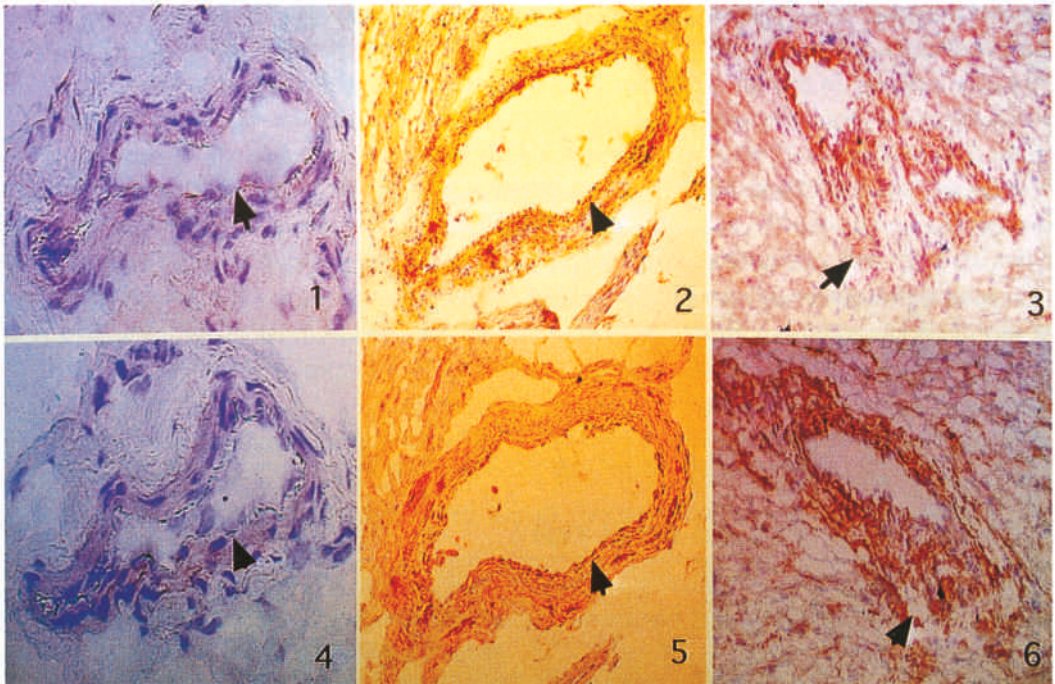


図1 ニホンザル移植心および移植されなかった心臓内の冠動脈における免疫染色の代表的結果

上段（1-3）は VEGF，下段（4-6）は SMemb の免疫染色の代表的結果を示す。移植されなかったニホンザルの心臓（1，4）では発現が確認できないのに対し，移植心の内膜肥厚の観察される以前の冠動脈（2，5）と内膜肥厚の認められる冠動脈（3，6）のいずれにも，それらの発現が強く確認された。矢印は内弾性板を示す。（×200）

IV 考 察

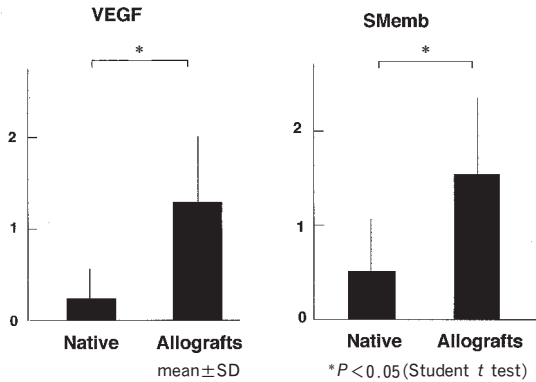


図2 内膜肥厚, VEGF, SMemb の移植心臓と移植されなかった心臓での比較結果
いずれのスコアも移植心で高値であった。

まっていたのに対し, 移植心の冠動脈ではいずれの発現も増強していた。移植心での発現は, 肥厚内膜が著しい冠動脈から内膜肥厚が観察されない血管まで観察された。VEGF の発現分布は, 肥厚内膜が形成される以前には, 内膜および中膜の内膜寄りに発現が限局していたが, 内膜肥厚形成後においては, 肥厚内膜全体にその発現が認められた。SMemb の発現分布は, 肥厚内膜が形成される以前には, 内膜および中膜に不規則であったが, 内膜肥厚形成後においては, 肥厚内膜および中膜全体にその発現が認められた (図1)。免疫染色のコントロールでは, いずれの切片も発色しなかった。VEGF, SMemb 発現スコアによる統計学的検討では, 移植心での発現はレシピエントの心臓内のそれに比べ有意に増強していた (図2)。

文 献

- Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W: Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114: 521-532, 1992
- Suzuki J, Isobe M, Aikawa M, Kawauchi M, Shiojima I, Kobayashi N, Tojo A, Suzuki T, Kimura K, Nishikawa T, Sakai T, Sekiguchi M, Yazaki Y, Nagai R: Nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chain expression in rejected cardiac allografts. *Circulation* 94: 1118-1124, 1996
- Suzuki J, Isobe M, Yamazaki S, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with short-term blockade of ICAM-1 and LFA-1 in a heterotopic murine model of heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 16: 1141-1148, 1997
- Geraghty JG, Stollenberg RL, Sollinger HW, Hullett DA: Vascular smooth muscle cells and neointimal hyperplasia in chronic transplant rejection. *Transplantation* 62: 502-509, 1996
- Torry RJ, Labarrere CA, Torry DS, Holt VJ, Faulk WP: Vascular endothelial growth factor expression in transplanted human hearts. *Transplantation* 60: 1451-1457, 1995

(H 11. 1. 18 受稿; H 11. 5. 13 受理)