

## ピオグリタゾンによるウサギ静脈グラフトモデル内 膜肥厚抑制効果の検討

森崎, 浩一  
九州大学大学院医学系学府

<https://doi.org/10.15017/21734>

---

出版情報：九州大学, 2011, 博士（医学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：

ピオグリタゾンによるウサギ静脈グラフトモデル  
内膜肥厚抑制効果の検討

論文提出者 森崎 浩一

九州大学大学院医学研究院 消化器・総合外科学専攻

指導教員 前原 喜彦

## 【要 旨】

**背景：**バイパス術後の静脈グラフト閉塞の主な原因は静脈グラフトの内膜肥厚である。いくつかの臨床試験で Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) のリガンドであるピオグリタゾンが心血管保護作用を有することが報告されている。我々は今回、ウサギ静脈グラフトモデルを用いてピオグリタゾンによる静脈グラフト内膜肥厚抑制効果について検討した。

**方法：**日本白色種のウサギをピオグリタゾン投与群と対照群の2群に分けた。ピオグリタゾンは混餌投与とし、バイパス手術1週間前より開始し、グラフト採取まで続けた。バイパス手術は右外頸静脈を約2 cm 採取し、右総頸動脈にバイパスを行った。術後28日目に内膜肥厚を評価した。術後14日目に免疫染色を行い、Ki-67染色で細胞増殖を、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuride-5' -triphosphate nick-end labeling (TUNEL) 染色でアポトーシスを評価した。血液を術後28日目に採取し、血糖、コレステロール、中性脂肪について検討した。血中アディポネクチンレベルはウエスタンブロットにて評価した。最後に術後14日目のグラフトでアディポネクチンに關与するシグナル、5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 活性についてウエスタンブロットで検討した。

**結果：**ピオグリタゾン投与群で静脈グラフトの内膜肥厚が有意に抑制された (ピオグリタゾン投与群： $0.54 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 、対照群： $0.93 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 、 $P < 0.01$ )。ピオグリタゾン投与群でKi-67陽性細胞が有意に減少した (ピオグリタゾン投与群： $4.1 \pm 1.1 \%$ 、対照群： $16.8 \pm 1.7 \%$ 、 $P < 0.05$ )。TUNEL陽性細胞はピオグリタゾン投与群で有意に増加した (ピオグリタゾン投与群： $3.5 \pm 0.5 \%$ 、対照群： $1.2 \pm 0.1 \%$ 、 $P < 0.05$ )。ピオグリタゾン投与により血糖値、脂質に影響を与えなかった。ピオグリタゾン投与群で血中アディポネクチンは増加し、静脈グラフトのAMPKリン酸化が促進され、ERKリン酸化が抑制された。

**結論：**ピオグリタゾン投与により静脈グラフトの内膜肥厚抑制効果を認め、細胞増殖の抑制とアポトーシスの亢進を伴っていた。その機序の一つとしてアディポネクチンの増加との関連が示唆された。ピオグリタゾンはバイパス術後の静脈グラフト閉塞を予防する治療法のターゲットとなる可能性が示唆された。

## 【背景】

閉塞性動脈硬化症に対する血管内治療が普及してきているが、自家静脈グラフトを用いたバイパス術も標準治療の一つである(参考文献1)。問題点として自家静脈グラフトを用いた下腿へのバイパス手術では術後5年で約20~30%に晩期閉塞を認める点があり、静脈グラフトの内膜肥厚が原因の一つと考えられている(参考文献2,3)。様々な治療が試みられているが、標準的治療法は確立していない。そのため、静脈グラフトの内膜肥厚を抑制する何らかの治療法の確立が望まれるところである。

ピオグリタゾン(PPAR- $\gamma$ )はPeroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )のリガンドで、臨床では2型糖尿病に対するインスリン抵抗性改善薬として用いられている(参考文献4)。近年、PPAR- $\gamma$  リガンドにはインスリン抵抗性改善作用以外に、抗炎症・細胞増殖抑制、アディポサイトカイン分泌調節などを介して心血管保護作用を発揮し、循環器領域における新たな分子標的薬として注目されており、2型糖尿病患者における心血管イベント発生を低下させた(参考文献5,6)。さらに注目すべき点として、ピオグリタゾンは非糖尿病患者において冠動脈ステント留置後の内膜肥厚を抑制することが報告されている(参考文献7)。

これらの報告と一致して、基礎実験でもピオグリタゾンが動脈障害後の内膜肥厚を抑制させることが数々報告されている(参考文献8-12)。これらの結果を考慮すると、ピオグリタゾンはインスリン抵抗性改善作用以外にも血管リモデリングに関連する修飾因子として作用する可能性が考えられる。

ピオグリタゾンによる静脈グラフト内膜肥厚抑制効果に関する報告はほとんどなく、今回、ウサギ静脈グラフトモデルを用いて、ピオグリタゾン投与による内膜肥厚抑制効果について検討した。

## 【方法】

### 薬剤

実験には 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)、phosphorylated AMPK、phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK)は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz、 Calif)から購入した。Total ERK 抗体は Cell Signaling (Beverly、 Mass)より購入した。アディポネクチン抗体は総アディポネクチンを検出する抗体を R & D Systems (Minneapolis、 Minn)より購入した。ピオグリタゾン は武田製薬より購入した。

### 実験手順

すべての動物実験は名古屋大学大学院医学系研究科の動物実験倫理委員会の承認のもと、倫理規定に沿って行われた。日本白色種、オス、体重が 2.5~3.0 kg のウサギを対照群とピオグリタゾン投与群に分け、ピオグリタゾン投与群には手術 1 週間前よりピオグリタゾン入りの餌を開始した。以前の報告と同様にピオグリタゾンの 1 日投与量は、3 mg/kg となるようにした(参考文献 13, 14)。バイパス術を行い、静脈グラフトを採取するまでピオグリタゾンを混餌投与とした。対照群には通常の餌を投与した (図 1)。

### バイパス手術

麻酔の導入はケタミン(50 mg/kg)とキサラジン(10 mg/kg)の筋注にて行い、麻酔維持はケタミン(10 mg/kg)とキサラジン(10 mg/kg)の静注にて行った。バイパス手術は右外頸静脈を約 2.0 cm 採取し、reverse graft として右総頸動脈に 8-0 プロリンで端々吻合にてバイパスを行った(参考文献 15, 16, 17)。右内頸動脈および右外頸動脈三分枝のうち二分枝を結紮し、血流を落とした状態で実験を行った (図 2)。

### グラフト採取

バイパス手術時と同様の麻酔を行った後、静脈グラフトを周囲組織より剥離し摘出した。グラフトを採取した後、ウサギはペントバルビタール(50 mg/kg)の過量投与により安楽死させた。採取した静脈グラフトの内腔に 4%ホルマリンを浸し 30 分間、100 mmHg の圧をかけて内腔を固定し、同液に一晩浸透させた。その後、パラフィン固定を行い、5  $\mu$ m の切片を作成した。

### 内膜肥厚の評価

採取した約 2 cm の静脈グラフトを 4 分割し、それぞれをパラフィン固定した

ものを5  $\mu\text{m}$ の切片とした。脱パラフィン後、Hematoxylin and Eosin (HE)染色、Elastica van Gieson (EVG)染色を行った。内膜面積、中膜面積、全血管面積をMACSCOPEにて計測した。4個の切片の平均値を1つの静脈グラフトの内膜肥厚として統計学的に評価した。

### 免疫組織化学的評価

バイパス術後14日目に静脈グラフトを採取し、Ki-67染色、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuride-5'-triphosphate nick-end labeling (TUNEL)染色を行い、新生内膜の細胞増殖、アポトーシスについて評価した。採取した静脈グラフトを4分割し、それぞれをパラフィン固定したものを5  $\mu\text{m}$ の切片とした。脱パラフィン後、Ki-67染色、TUNEL染色を行った(参考文献16, 17)。4分割した切片を、それぞれ400倍の倍率でランダムに8カ所、観察し、新生内膜のKi-67陽性細胞、TUNEL陽性細胞、全細胞数を計測した。Ki-67陽性細胞およびTUNEL陽性細胞を全細胞数で割ったものをKi-67 index、TUNEL indexとした。4分割した切片の平均値を1つの静脈グラフトのKi-67 index、TUNEL indexとした。

### ウエスタンブロット

バイパス術後14日目に静脈グラフトを採取し、ウエスタンブロットにてAMPKおよびERKシグナルについて検討した。採取した静脈グラフトをphosphate buffered salineで洗浄し、3 mmの切片を作成し、すぐに液体窒素で凍結させた。凍結標本をice-cold lysis buffer (20mM Tris-hydrochloride pH 8.0、1% NP-40、150mM NaCl、0.5% deoxycholic acid、1mM sodium orthovanadate、protease inhibitor)にてホモジナイズさせた。ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動でタンパクを分離した。1000倍希釈した一次抗体で免疫ブロットし、続いて5000倍希釈した二次抗体で免疫ブロットを行った。バンドは化学発光検出キット(Amersham Pharmacia Biotech Piscataway, NJ)を用いて評価した。ウエスタンブロットは対照群、ピオグリタゾン投与群、偽手術群で評価を行った。剥離操作のみ行い、バイパス術を施行していない静脈を偽手術群として検討した。

### 血液検査

一晩絶食とし、バイパス術後28日目のグラフト採取前に血液を採取した。血糖、総コレステロール、中性脂肪、LDLコレステロール、HDLコレステロールを和光純薬工業株式会社のキットを用いて測定した。血中アディポネクチンは採取した血液を遠心分離にかけた後、nonreducing sample bufferに溶かし、ドデ

シル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動でタンパクを分離し、評価した(参考文献 18)。

### 統計学的評価

統計は StatView 5.0 software (SAS Institute、Cary、NC) を用いて行った。データは平均値±標準誤差で表記した。一元配置分散分析、Scheffe 分析にて統計学的に評価を行い、 $P < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。

## 【結果】

### 血液検査

ピオグリタゾン投与は血糖値、コレステロール、中性脂肪、LDL コレステロール、HDL コレステロール値に影響を与えなかった（表 1）。

### 静脈グラフト内膜肥厚の評価

術後 28 日目での内膜肥厚はピオグリタゾン投与群で  $0.54 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 、対照群で  $0.93 \pm 0.04 \text{ mm}^2$  とピオグリタゾン投与群で有意に抑制されていた（図 3、表 2）（ $P < 0.01$ ）。

### 静脈グラフト新生内膜の細胞増殖、アポトーシスの評価

新生内膜での Ki-67 陽性細胞は対照群で  $16.8 \pm 1.7 \%$ 、ピオグリタゾン投与群で  $4.1 \pm 1.1 \%$  とピオグリタゾン投与群で有意に抑制されていた（図 4）（ $P < 0.05$ ）。TUNEL 陽性細胞はピオグリタゾン投与群で  $3.5 \pm 0.5 \%$ 、対照群で  $1.2 \pm 0.1 \%$  とピオグリタゾン投与群でアポトーシスは有意に亢進していた（図 5）（ $P < 0.05$ ）。

### 血中アディポネクチンの評価

バイパス手術により血中アディポネクチン濃度に影響を与えなかった。ピオグリタゾン投与群において血中アディポネクチンが 1.8 倍上昇していた（図 6）。

### 静脈グラフトでの AMPK、ERK の発現の評価

静脈グラフトでの AMPK のリン酸化はバイパス術を行っていない静脈と比較して促進されていた。静脈グラフトで AMPK のリン酸化は促進されていたが、AMPK リン酸化の程度はピオグリタゾン投与群において有意に増加していた。ERK のリン酸化はバイパスを行っていない静脈と比較して静脈グラフトで増加していたが、ピオグリタゾン投与群において有意に抑制されていた（図 7）。



## 【考 察】

今回の研究の結果では、ピオグリタゾン投与によりウサギ静脈グラフトの内膜肥厚抑制効果を認め、血管平滑筋細胞の増殖抑制、アポトーシスの亢進を伴っていた。

静脈グラフト内膜肥厚の機序として、血管平滑筋細胞の遊走・増殖や細胞のアポトーシスの減弱などが報告されている(参考文献 19, 20, 21)。ピオグリタゾン投与により術後 14 日目において血管平滑筋細胞の増殖抑制、アポトーシスの亢進作用を認め、内膜抑制肥厚の抑制機序として血管平滑筋細胞の増殖抑制、アポトーシスの亢進作用が関与している可能性が考えられた。

ピオグリタゾンによる血管リモデリング抑制効果が多数報告されているが、その機序の一つとして AMPK シグナルの関与が考えられている。活性化された AMPK シグナルはアンギオテンシン II 刺激による ERK のリン酸化を抑制したり、血管平滑筋細胞の増殖を抑制したりすることが報告されている(参考文献 22, 23)。また、AMPK の活性化因子である 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside がラットの大腿動脈擦過モデルの内膜肥厚を抑制することが報告されている(参考文献 22)。今回の研究ではピオグリタゾン投与により、静脈グラフトの AMPK シグナルが活性化され、ERK シグナルが抑制されていた。

ピオグリタゾンは脂肪細胞の PPAR- $\gamma$  を活性化させることにより、アディポネクチンの発現、分泌を増加させることが報告されている(参考文献 24, 25)。アディポネクチンは虚血性心疾患、末梢動脈疾患やメタボリックシンドロームで発現が低下している(参考文献 26, 27)。アディポネクチンには様々な代謝、心血管保護作用が報告されている。例えば、アディポネクチンにはインスリン抵抗性改善作用(参考文献 28)以外に動脈硬化抑制(参考文献 29, 30)、血管機能改善作用(参考文献 31)、血管新生促進(参考文献 32)、心筋障害抑制作用(参考文献 33, 34)があることが報告されており、その機序の一つとして AMPK シグナルの関与が報告されている。最近、我々はピオグリタゾンの心血管保護作用の一つとしてアディポネクチンが関与している可能性があることを報告した(参考文献 14)。さらにピオグリタゾン投与により心筋細胞における AMPK シグナルの活性化、ERK シグナルの抑制が生じるが、その機序としてアディポネクチンが関与していることを報告した。その他にアディポネクチンの欠損により、マウスの動脈擦過モデルで内膜肥厚が増強されることが報告されている(参考文献 30)。逆にアディポネクチンの過剰発現によりマウスで動脈硬化が抑制されることも報告されている(参考文献 29)。

今回の研究では、ピオグリタゾン投与により血中のアディポネクチン濃度が上昇し、静脈グラフトの AMPK シグナルの増強、ERK シグナルの減弱化を認めた。

これらの結果より、ピオグリタゾン投与による静脈グラフト内膜肥厚抑制の機序としてアディポネクチンによる AMPK シグナルの活性化、ERK シグナルの抑制が関与している可能性が示唆された。しかしながら、ピオグリタゾン投与によるアディポネクチンの発現増加と静脈グラフト内膜肥厚抑制との関連を明らかにするにはさらなる遺伝子レベルでの分子生物学的研究が必要である。

肥満に関連したメタボリックシンドロームはバイパス術後の再狭窄の危険因子であるとの報告がある(参考文献 35, 36)。今回の研究結果でアディポネクチンがバイパス術後の静脈グラフトの再狭窄抑制に関与している可能性が示唆されたことにより、ピオグリタゾン治療のようなアディポネクチンを標的とした薬理的アプローチによりグラフト狭窄の予防法となる可能性がある。

今回の実験では、ピオグリタゾン投与により有害事象は認めなかった。ピオグリタゾンは 2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性改善薬として日常臨床で幅広く使用されており、ヒトにおいても心血管病に対して有益な作用をもたらす可能性があると思われる。

今回の研究にはいくつかの限界がある。ひとつは PPAR- $\gamma$  の活性やピオグリタゾン濃度との関連について実験を行っていないことである。また今回の研究で用いたピオグリタゾンの 1 日量 (3 mg/kg) は、ヒトにおける 1 日量に相当するものである(参考文献 37)。この環境下で、ピオグリタゾン投与により PPAR- $\gamma$  遺伝子により制御されている aP2 遺伝子の発現が増加していた。最近の報告ではアディポネクチン欠損下では、ピオグリタゾン投与により aP2 遺伝子を含めた PPAR- $\gamma$  により誘導される遺伝子が反応しなくなるとの報告もある(参考文献 38)。ピオグリタゾンには静脈グラフトに対する直接作用及び、アディポネクチンを介した間接的経路が存在するのかもしれない。二番目にピオグリタゾンによる再内皮化について検討していない。ウサギにおける動脈擦過モデルでピオグリタゾン投与により再内皮化が促進されたとの報告もある(参考文献 39)。それゆえにピオグリタゾンは静脈グラフトの内皮細胞にも影響を及ぼす可能性がある。ピオグリタゾンによる静脈グラフト内膜肥厚抑制の機序解明にはさらなる研究が必要である。

## 【結 論】

ピオグリタゾン投与により静脈グラフトの内膜肥厚抑制効果を認め、細胞増殖の抑制とアポトーシスの亢進を伴っていた。ピオグリタゾンのような PPAR- $\gamma$  アゴニストはバイパス術後の静脈グラフト閉塞を予防する治療法の標的となる可能性が示唆された。

## 【参考文献】

1. Nguyen LL, Conte MS, Menard MT, Gravereaux EC, Chew DK, Donaldson MC, et al. Infrainguinal vein bypass graft revision: factors affecting long-term outcome. *J Vasc Surg.* 2004;40(5):916-923.
2. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;27(4):357-362.
3. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation.* 1998;97(9):916-931.
4. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 2004;351(11):1106-1118.
5. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366(9493):1279-1289.
6. Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA.* 2007;298(10):1180-1188.
7. Marx N, Wohrle J, Nusser T, Walcher D, Rinker A, Hombach V, et al. Pioglitazone reduces neointima volume after coronary stent implantation: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial in nondiabetic patients. *Circulation.* 2005;112(18):2792-2798.
8. Aizawa Y, Kawabe J, Hasebe N, Takehara N, Kikuchi K. Pioglitazone enhances cytokine-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells and reduces intimal hyperplasia. *Circulation.* 2001;104(4):455-460.
9. Kasai T, Miyauchi K, Yokoyama T, Kajimoto K, Sumiyoshi K, Kubota N, et al. Pioglitazone attenuates neointimal thickening via suppression of the early inflammatory response in a porcine coronary after stenting. *Atherosclerosis.* 2008;197(2):612-619.
10. Desouza CV, Gerety M, Hamel FG. Long-term effects of a PPAR-gamma agonist, pioglitazone, on neointimal hyperplasia and endothelial regrowth in insulin resistant rats. *Vascul Pharmacol.* 2007;46(3):188-194.

11. Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998;83(11):1097-1103.
12. de Dios ST, Bruemmer D, Dilley RJ, Ivey ME, Jennings GL, Law RE, et al. Inhibitory activity of clinical thiazolidinedione peroxisome proliferator activating receptor-gamma ligands toward internal mammary artery, radial artery, and saphenous vein smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 2003;107(20):2548-2550.
13. Shimano M, Tsuji Y, Inden Y, Kitamura K, Uchikawa T, Harata S, et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator, attenuates atrial fibrosis and atrial fibrillation promotion in rabbits with congestive heart failure. *Heart Rhythm.* 2008;5(3):451-459.
14. Li P, Shibata R, Unno K, Shimano M, Furukawa M, Ohashi T, et al. Evidence for the importance of adiponectin in the cardioprotective effects of pioglitazone. *Hypertension.* 2010;55(1):69-75.
15. Kodama A, Komori K, Hattori K, Yamanouchi D, Kajikuri J, Itoh T. Sarpogrelate hydrochloride reduced intimal hyperplasia in experimental rabbit vein graft. *J Vasc Surg.* 2009;49(5):1272-1281.
16. Furuyama T, Komori K, Shimokawa H, Matsumoto Y, Uwatoku T, Hirano K, et al. Long-term inhibition of Rho kinase suppresses intimal thickening in autologous vein grafts in rabbits. *J Vasc Surg.* 2006;43(6):1249-1256.
17. Hattori K, Yamanouchi D, Banno H, Kobayashi M, Yamamoto K, Kajikuri J, et al. Celiprolol reduces the intimal thickening of autogenous vein grafts via an enhancement of nitric oxide function through an inhibition of superoxide production. *J Vasc Surg.* 2007;46(1):116-123.
18. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40352-40363.
19. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330(20):1431-1438.
20. Ishida M, Komori K, Yonemitsu Y, Taguchi K, 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*. 2001;154(2):345-354.
21. Davies MG, Hagen PO. Pathophysiology of vein graft failure: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1995;9(1):7-18.
  22. Nagata D, Takeda R, Sata M, Satonaka H, Suzuki E, Nagano T, et al. AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2004;110(4):444-451.
  23. Igata M, Motoshima H, Tsuruzoe K, Kojima K, Matsumura T, Kondo T, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circ Res*. 2005;97(8):837-844.
  24. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001;50(9):2094-2099.
  25. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 2003;52(7):1655-1663.
  26. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999;100(25):2473-2476
  27. Iwashima Y, Horio T, Suzuki Y, Kihara S, Rakugi H, Kangawa K, et al. Adiponectin and inflammatory markers in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis*. 2006;188(2):384-390.
  28. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8(7):731-737.
  29. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002;106(22):2767-2770.
  30. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37487-37491.
  31. Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H,

- et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension*. 2003;42(3):231-234.
32. Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*. 2004;279(27):28670-28674.
33. Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med*. 2005;11(10):1096-1103.
34. Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, et al. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med*. 2004;10(12):1384-1389.
35. Yilmaz MB, Guray U, Guray Y, Biyikoglu SF, Tandogan I, Sasmaz H, et al. Metabolic syndrome negatively impacts early patency of saphenous vein grafts. *Coron Artery Dis*. 2006;17(1):41-44.
36. Selcuk MT, Selcuk H, Maden O, Ozeke O, Ulupinar H, Temizhan A, et al. Effect of obesity on saphenous vein graft stenosis in patients with postoperative recurrent angina. *Acta Cardiol*. 2007;62(4):397-402.
37. Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M, Wen J, et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106(24):3126-3132.
38. Higuchi A, Ohashi K, Shibata R, Sono-Romanelli S, Walsh K, Ouchi N. Thiazolidinediones Reduce Pathological Neovascularization in Ischemic Retina Via an Adiponectin-Dependent Mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(1):46-53.
39. Tanaka T, Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Yamashita J, Chun TH, et al. Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration. *Eur J Pharmacol*. 2005;508(1-3):255-265

表 1 血液検査

	血糖値 (mg/dL)	総コレステロール (mg/dL)	中性脂肪 (mg/dL)	LDL コレステロール (mg/dL)	HDL-コレステロール (mg/dL)
コントロール	214 ± 19	26.0 ± 3.7	37.4 ± 6.3	5.9 ± 1.2	14.6 ± 2.2
ピオグリタゾン	196 ± 19	30.4 ± 3.5	24.9 ± 4.3	6.9 ± 1.7	20.3 ± 2.3
P 値	0.50	0.40	0.13	0.64	0.09

表 1 血液検査

一晩絶食としたバイパス術後 28 日目のグラフト採取前に採血をし、対照群とピオグリタゾン投与群で血糖値、中性脂肪、コレステロール値を検討した。2 群間で血糖値、中性脂肪、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール値に有意差を認めなかった。



表 2 バイパス術後の内膜肥厚の検討

	Day 14			Day 28		
	コントロール (n=4)	ピオグリタゾン (n=4)	P 値	コントロール (n=7)	ピオグリタゾン (n=7)	P 値
内膜面積 (mm <sup>2</sup> )	0.66±0.04	0.46±0.02	<0.01	0.93±0.04	0.54±0.04	<0.01
中膜面積 (mm <sup>2</sup> )	0.91±0.05	0.99±0.04	0.88	0.80±0.03	0.82±0.07	0.60
内腔面積 (mm <sup>2</sup> )	11.5±0.65	12.36±0.67	0.79	11.5±0.65	11.9±0.67	0.77
内膜 / 中膜面積比	0.730±0.002	0.459±0.001	<0.01	1.158±0.001	0.652±0.001	<0.01

表 2 バイパス術後の内膜肥厚の検討

術後 14 日目と術後 28 日目において、内膜面積及び内膜・中膜面積比はピオグリタゾン投与群で有意に抑制されていた (P <0.01)。

## 図の説明

### 図1 実験手順

日本白色種、オス、体重が 2.5~3.0 kg のウサギを対照群とピオグリタゾン投与群に分け、ピオグリタゾン投与群には手術 1 週間前よりピオグリタゾン入りの餌を開始した。バイパス術後は静脈グラフトを採取するまでピオグリタゾンを混餌投与とした。対照群には通常の餌を投与した。

### 図2 バイパス手術

バイパス手術は右外頸静脈を約 2.0 cm 採取し、リバーズで右総頸動脈に 8-0 プロリンで端々吻合にてバイパスを行った。右内頸動脈および右外頸動脈三分枝のうち二分枝を結紮し、血流を落とした状態で実験を行った。

### 図3 バイパス術後 28 日目における内膜肥厚の検討

A：静脈グラフト弱拡大（×40）、B：強拡大（×200）

ピオグリタゾン投与群で静脈グラフトの内膜肥厚が有意に抑制されていた。黄色の矢頭は内弾性板を示す。

### 図4 静脈グラフトの新生内膜における細胞増殖の評価

A：術後 14 日目のグラフトにおける新生内膜内の細胞増殖を Ki-67 染色にて評価を行った。矢頭は Ki-67 陽性細胞を表す。

B：新生内膜内の Ki-67 陽性細胞と全細胞数との百分率を Ki-67 index と定義した。Ki-67 index はピオグリタゾン投与群で有意に抑制されていた ( $P < 0.05$ )。\*は対照群と比較してピオグリタゾン投与群で有意に抑制されていたことを示す ( $P < 0.05$ )。

### 図5 新生内膜における TUNEL 染色による細胞のアポトーシスの評価

A：静脈グラフト新生内膜におけるアポトーシスを評価するために TUNEL 染色を行った。矢頭は TUNEL 陽性細胞を示す。

B：新生内膜における TUNEL 陽性細胞数と全細胞数との百分率を TUNEL index と定義した。ピオグリタゾン投与群で有意に増強されていた ( $P < 0.05$ )。

### 図6 ピオグリタゾン投与による血中アディポネクチン濃度に関する検討

A：術後 28 日目の血中アディポネクチンをウエスタンブロットで評価した。

B：定量分析を行い、偽手術群と対照群では血中アディポネクチンに変化を認めなかった。ピオグリタゾン投与により血中アディポネクチンが有意に上昇した

( $P < 0.05$ )。

\*は対照群と比較してピオグリタゾン投与群で有意に上昇していたことを示す ( $P < 0.05$ )。

**図 7 ピオグリタゾン投与による静脈グラフトの 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 、 extracellular signal-regulated kinase (ERK)活性について検討**

術後 14 日目に採取した静脈グラフトで AMPK、ERK 活性についてウエスタンブロットで検討した。

A : ピオグリタゾン投与により AMPK のリン酸化が有意に促進されていた ( $P < 0.05$ )。

B : ERK のリン酸化はピオグリタゾン投与により有意に抑制されていた ( $P < 0.05$ )。

図1

# 実験手順

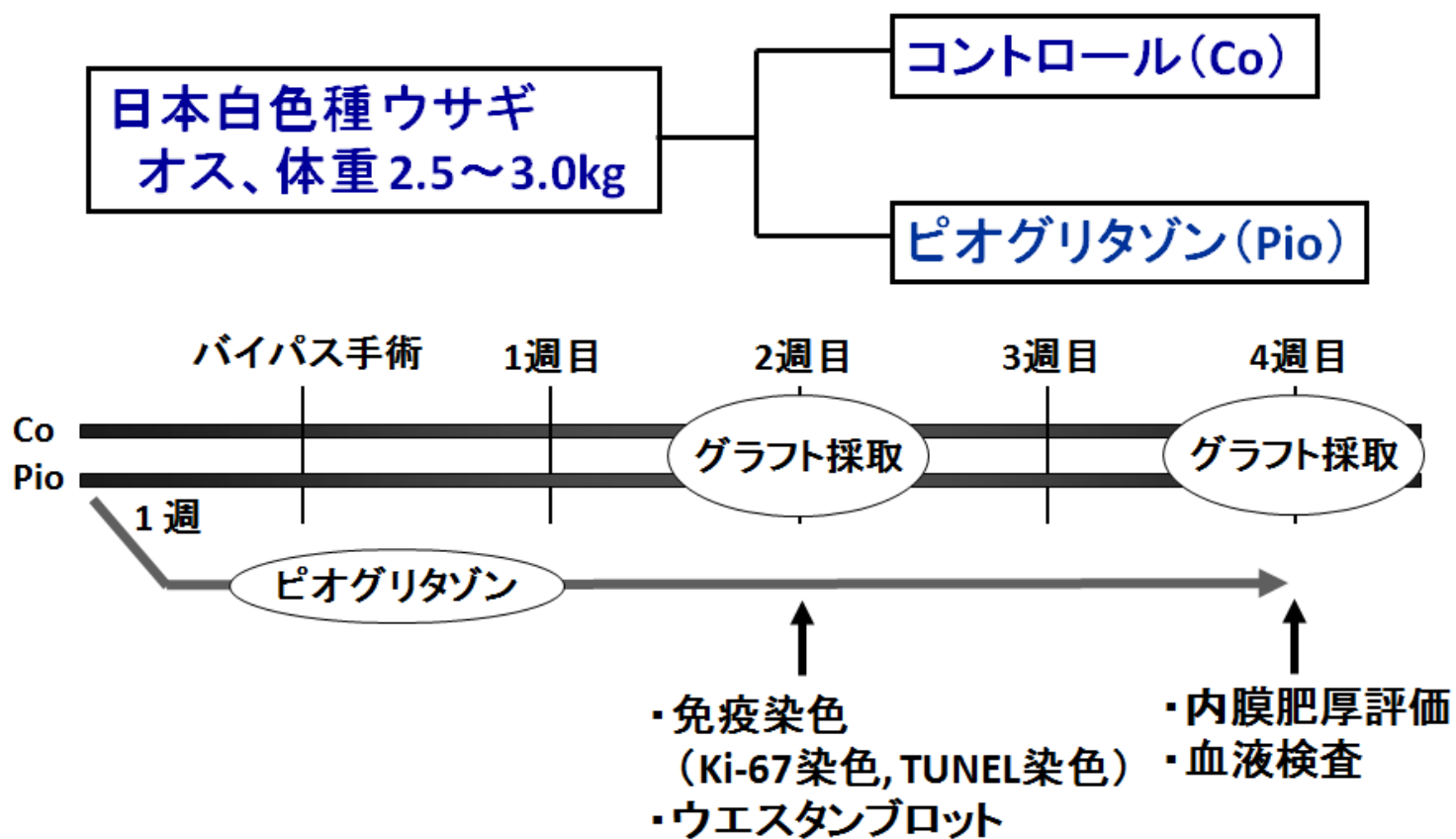


図2

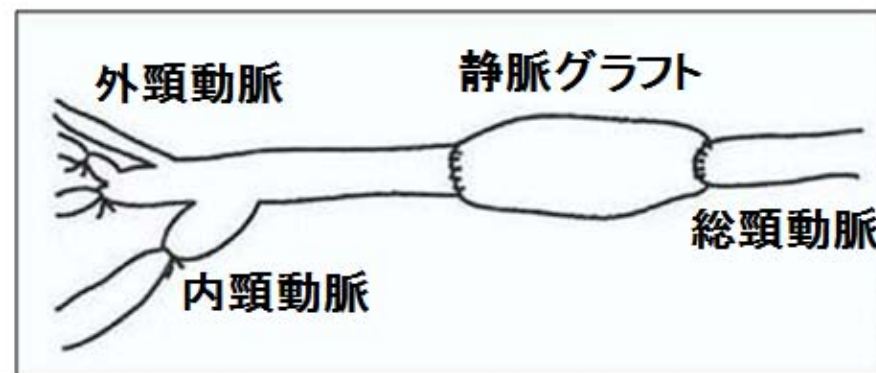
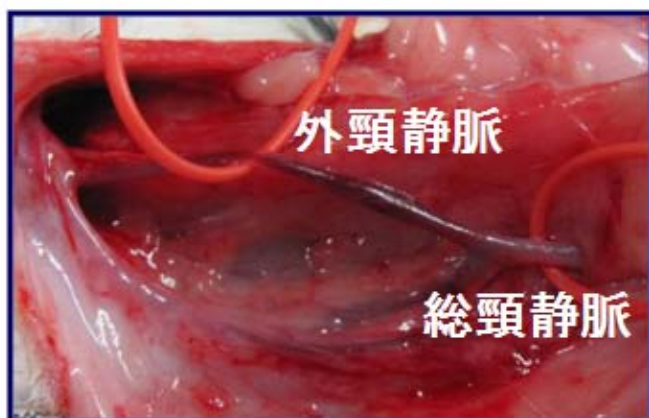


図3

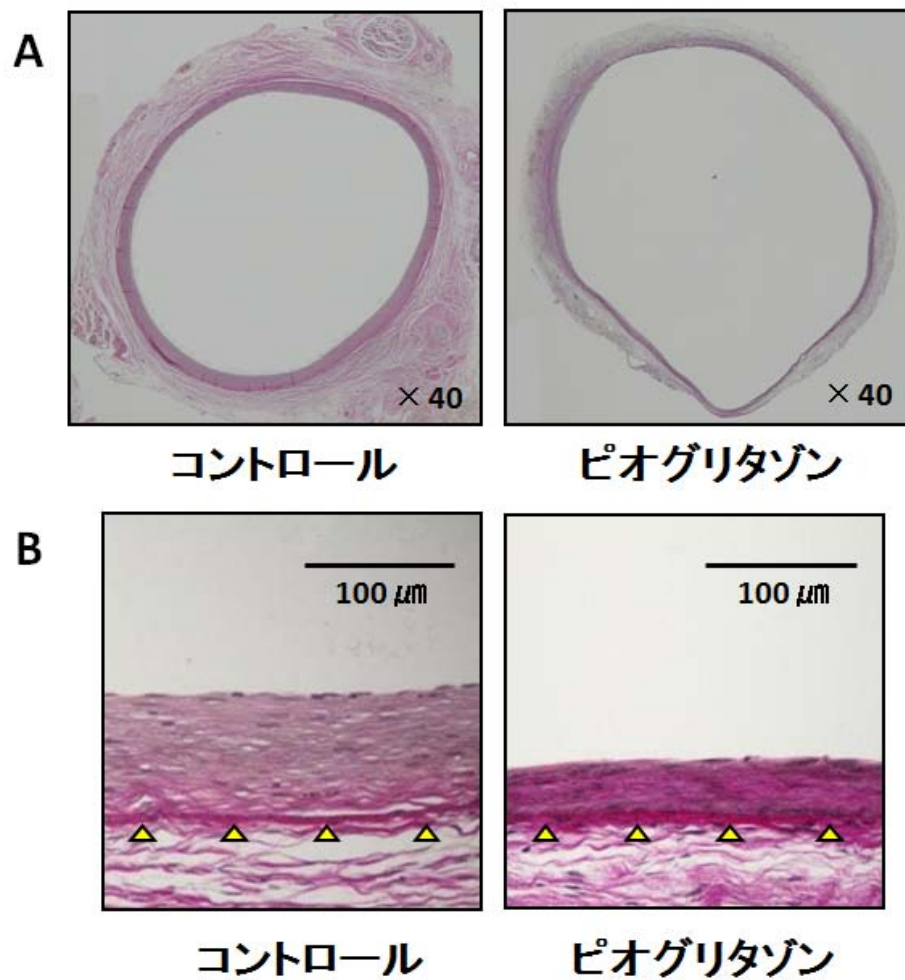


図4

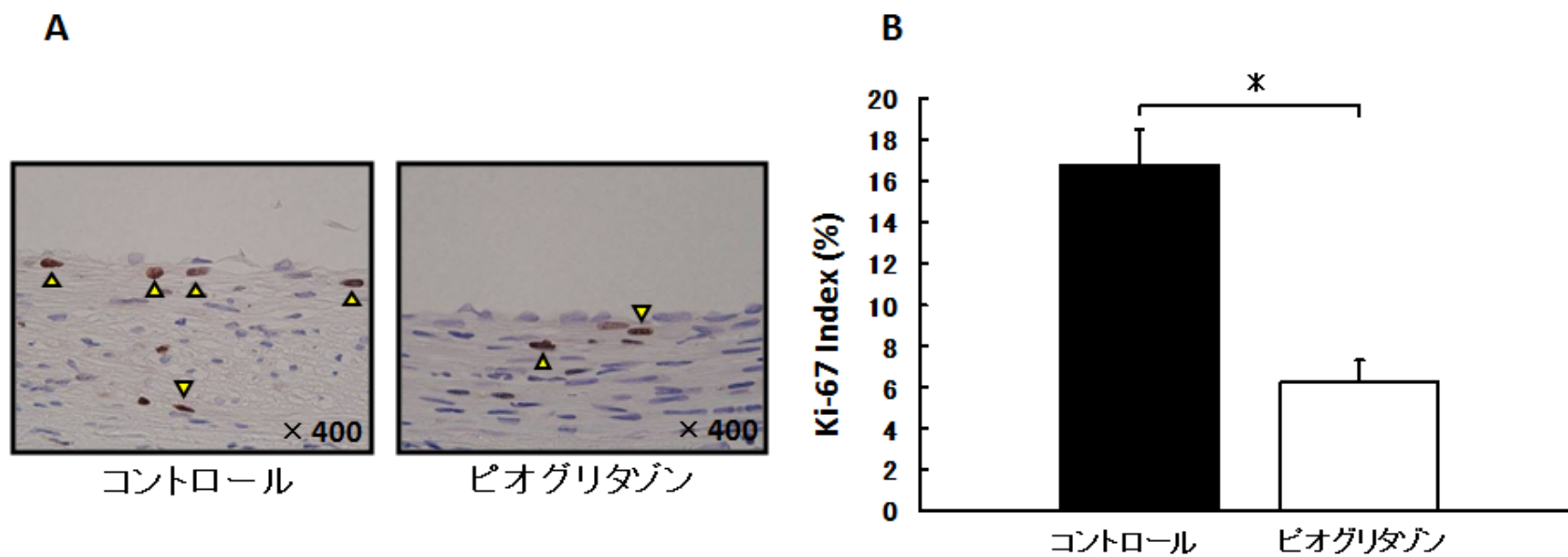


図5

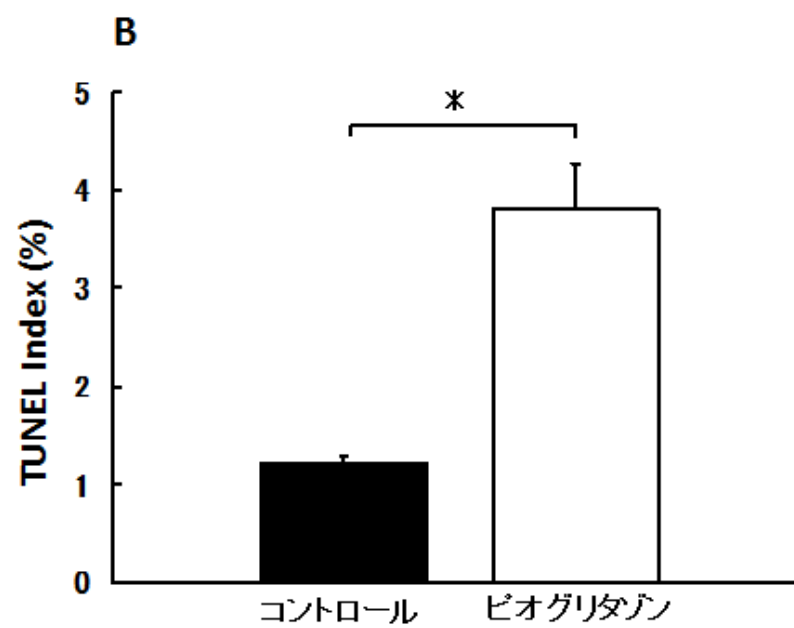
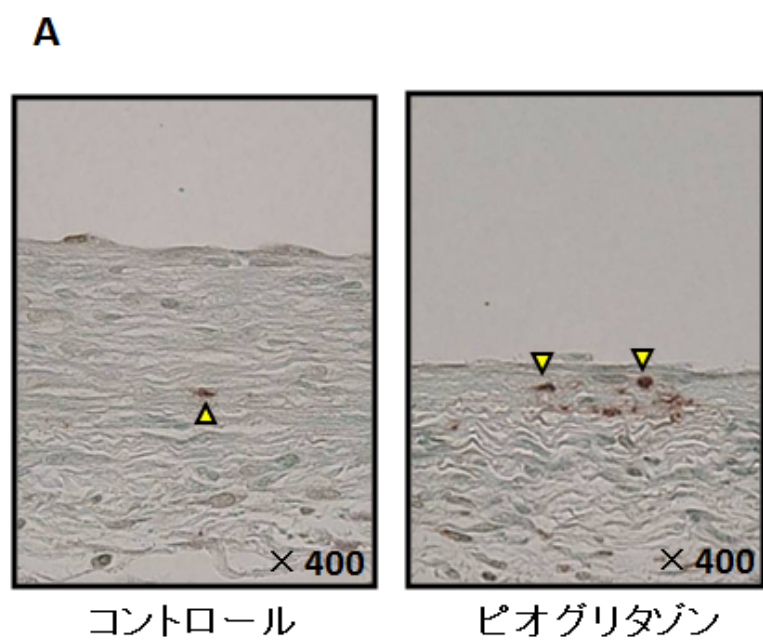




図6

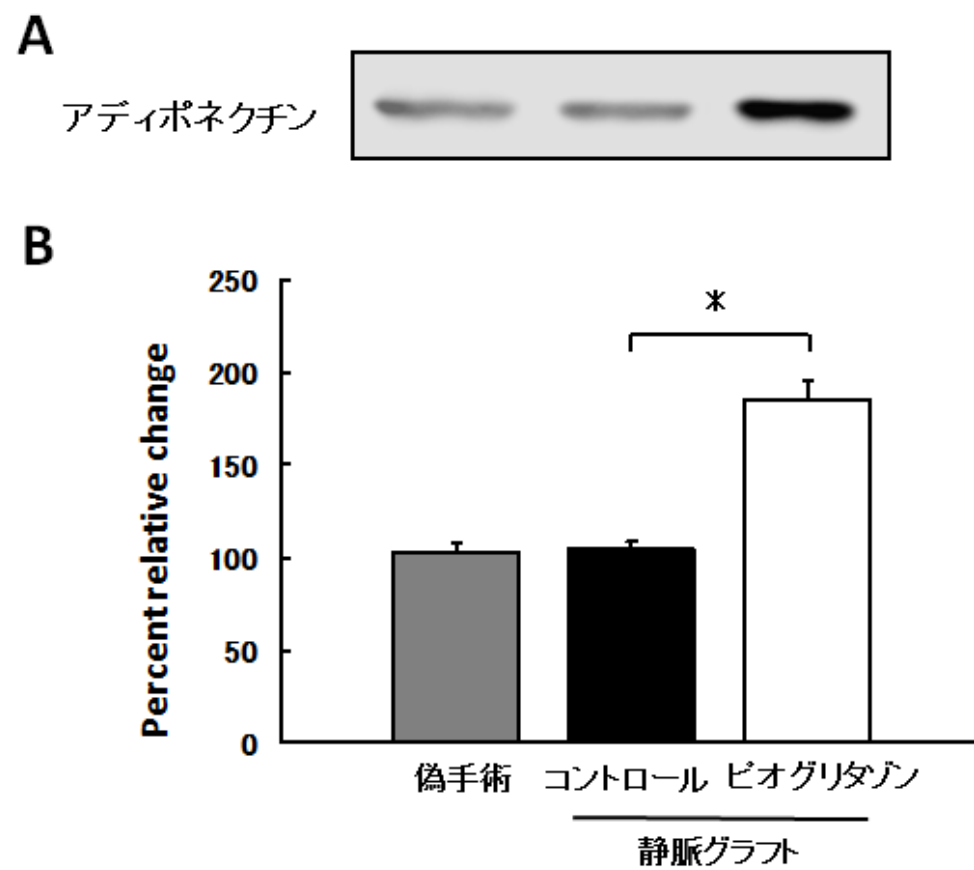


図7

