

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19918

研究課題名(和文)腎不全患者の冠動脈バイパス血管内皮機能障害におけるメチルアルギニン誘導体の関与

研究課題名(英文) Involvement of methylarginine derivatives in endothelial dysfunction of coronary artery bypass grafts in patients with chronic kidney disease

研究代表者

木下 武(Kinoshita, Takeshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90437161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000 円

研究成果の概要(和文)：研究期間内に以下の4つの実験を行った。血中ADMA濃度に関連する患者の背景因子、内胸動脈グラフトにおける内皮由来平滑筋弛緩因子産生能と血中ADMA濃度の関連性、内胸動脈グラフトのDDAH-2および一酸化窒素合成蛋白の発現量と慢性腎臓病ないし血中ADMA濃度の関連、内胸動脈グラフトにおける内膜肥厚と血中ADMA濃度の関連。結果：術前の血中ADMA濃度を測定し推定糸球体濾過率に負の相関関係があることが明らかになったが、その他の項目に有意な関連性を見出すことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：The following four experiments were conducted within the research period. Relationship between the patient background factors and preoperative plasma ADMA concentration Relationship between endothelium-derived smooth muscle relaxation and plasma ADMA concentration in the internal thoracic artery graft, Relationship between expression level of DDAH-2 and nitric oxide synthesis in the internal thoracic artery graft and chronic kidney disease or plasma ADMA concentration, (4) Relationship between intimal hyperplasia and blood ADMA concentration in internal thoracic artery graft. As a result, we found that there was a negative correlation between estimated glomerular filtration rate and preoperative blood ADMA concentration, but no significant association could be found in other items.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：冠動脈バイパス術 内胸動脈グラフト 慢性腎臓病 血管内皮障害

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (chronic kidney disease, CKD) の有病者は増加の一途をたどり、約 1,330 万人に達するという。CKD は冠動脈疾患の発症と進展に深く関与し強力な予後不良因子である。申請者はグラフト血管の長期的な開存が最も期待できる内胸動脈を多用した冠動脈バイパス手術 (coronary artery bypass grafting, CABG) を CKD 患者に対しても積極的に適応しその成績を報告してきた (Kinoshita et al. Ann Thorac Surg 2010)。一方で CKD 患者においては CABG で完全血行再建しても生命予後が悪いことも明らかにした (Kinoshita, et al. Circ J 2010)。軽症を含めると CABG 患者のおよそ半数が CKD を合併しており、CKD 患者の成績不振の原因究明と対策立案が急務である。原因の一つとして CKD とグラフト機能不全の関連が想定されるが、CKD 患者は造影剤を使った検査の対象になりにくく開存率は未だ不明であるし、CKD とグラフト血管機能の関連を評価した基礎研究も極めて限られていた。そのため申請者は、CABG 術中に余剰となったグラフト血管の病理標本を再評価し、内胸動脈の約 7 割において内膜肥厚を認めること、またその程度は推定糸球体濾過率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) と有意な負の相関がある (上図)、つまり CKD が重度であるほど内膜肥厚の程度が強いことを明らかにした (Kinoshita, et al. Eur J Cardiothorac Surg 2014)。内膜肥厚は動脈硬化の初期段階と考えられ、この結果は血管内皮障害と CKD の関連を示唆する。そのため次の段階として申請者は 2012 年から引き続き CABG 患者の余剰グラフト血管を対象にマグヌス装置による張力測定を開始し、CKD における内胸動脈グラフトの内皮障害を示唆する以下のような予備的な実験結果を得た。(下図はニトロプルシドとアセチルコリンに対する内胸動脈グラフトの濃度反応曲線)。上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は CKD 患者におけるグラフト血管の内皮障害に関連する機序のさらなる解明と治療薬への臨床応用に展開するための基盤を築くことを目的とする。

2. 研究の目的

CKD 患者の内胸動脈グラフトにおける内皮依存性平滑筋弛緩反応の低下は NO 産生系の異常に起因することが予備実験でわかっているため、その原因探索を主目的とする。研究期間内には、腎障害と関連が深いとされる NO 合成酵素 (NOS) の内因性阻害物質である asymmetric dimethylarginine (ADMA) と NO の基質となる L-アルギニンの内皮細胞による取り込みを阻害する作用があるとされる asymmetric dimethylarginine (SDMA) に着目したい。ADMA と SDMA は NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) とな

らび体内で産生されるメチルアルギニン誘導体で、ADMA は L-NMMA とともに NO の基質となる L-アルギニンと競合することで NOS の活性を阻害し、dimethylarginine

dimethylaminohydrolase-2 (DDAH-2) により分解される。以下の実験により得られた結果を統合的に解析することで CKD 患者におけるグラフト血管の内皮機能障害の分子メカニズムとメチルアルギニン誘導体が果たす役割を明らかにすることができると考える。具体的には以下の 4 項目の実験を施行予定である

(1) 血中 ADMA・SDMA 濃度上昇に関連する患者の背景因子を調べる

患者の入院時採血にて血中 ADMA、SDMA 濃度を測定、また患者の背景因子を取得する。血中 ADMA・SDMA 濃度は競合 ELISA 法で定量する。患者背景としては、年齢、性別、併存疾患の頻度 (高血圧、糖尿病、慢性腎臓病、高脂血症など)、術前の検査結果 (血清生化学検査、ボディマス係数、ヘモグロビン A1c、血圧脈波速度、糸球体濾過率など)、術前の心機能 (収縮期・拡張期左室容量、左室駆出率)、内服状況などが挙げられる。これらの患者の臨床情報は術前に取得しデータベース化し管理する。

(2) グラフト血管の内皮由来平滑筋弛緩因子産生能と CKD ないし血中 ADMA・SDMA 濃度の関連を調べる

CABG 術中に余剰となったグラフト血管をマグヌス装置を用いて好氣的条件下に栄養液中に懸垂し、アセチルコリンやニトロプルシドなどの薬物を添加することにより生じる内皮依存性あるいは非依存性の平滑筋反応を測定する。必要に応じて内膜面を綿花で擦過した内皮除去標本、あるいはプロスタノイド合成阻害薬や NOS 阻害薬で前処置した内皮正常標本を作製する。内皮の存在は硝酸銀染色の en-face 解析により行う。

(3) グラフト血管の DDAH-2 および NOS 蛋白の発現量と CKD ないし血中 ADMA・SDMA 濃度の関連を調べる

張力測定に使用したグラフト血管をパラフィン包埋ブロックとして保管しておく。20~30 人分のブロックが集まった時点で組織マイクロアレイを作成、薄切した後に DDAH-2 と NOS に対する免疫組織染色を行う。染色後のスライドをデジタルデータとして画像解析ソフトに取り込んだ後、DDAH-2 と NOS の発現量をスコア化し評価する。組織マイクロアレイは複数のパラフィン包埋ブロックの任意領域を円柱状に抜き取り、新たなブロック 1 個に再包埋し、最終的に 1 枚のスライドガラスに複数の切片を搭載したもので、染色条件による結果のばらつきが少ない画一的なデータが得られるため、定量的な比較が可能である。

(4) グラフト血管における内膜肥厚と CKD ないし血中 ADMA・SDMA 濃度の関連を調

べる

グラフト血管の横断面をヘマトキシリン・エオジン染色とエラスチカ・ワンギーソン染色し、内弾性板の裂隙や病的変性の有無、中膜平滑筋細胞の遊走ならび増殖などの病的変化を評価すると同時に内膜肥厚の程度を定量評価する。内膜肥厚の指標は intima-to-media ratio および percentage of luminal narrowing とする。

3. 研究の方法

本研究はCKD患者におけるグラフト血管の内皮機能低下の分子機序とメチルアルギニン誘導体の果たす役割を明らかにし、治療薬への臨床応用に展開するための基盤を築くことを目的とする。術前の血中ADMAとSDMA濃度、術中に採取したグラフト血管を対象にした等尺性張力測定、DDAH-2蛋白とNOS蛋白の発現、内膜肥厚の定量と患者の背景因子、特にCKDとの関連性を統合的に解析する。

(1) 血中ADMA濃度上昇に関連する患者因子の解析

血管グラフトの内皮機能とADMAの関連性を調べる前段階として、血中ADMA濃度の上昇が患者のどの背景因子と関連があるか調べる。具体的には、入院翌日の早朝空腹時に静脈血2mLをEDTA入り採血管で採取した後、10000gで5分間の遠心分離を行い、上清を別容器に移し冷凍保存(-80℃)する。測定は競合ELISA法を用いた市販キットにて複数の標本が集まった時点で行う。患者情報の取得は紹介医からの診療情報提供書、問診、診察、各種検査にて行い、データベース化し一元管理する。具体的な患者背景としては、年齢、性別、併存疾患の頻度(高血圧、糖尿病、慢性腎臓病、高脂血症など)、術前の検査結果(血清生化学検査、ボディマス係数、ヘモグロビンA1c、血圧脈波速度、糸球体濾過率など)、術前の心機能(収縮期・拡張期左室容量、左室駆出率、左室心筋重量係数など)、内服状況などが挙げられる。多重回帰モデルなどを用いてADMA上昇と有意に関連のある患者因子を同定する。

(2) グラフト血管の内皮由来平滑筋弛緩因子産生能の解析

血管内皮機能の評価はマグヌス法による等尺性張力測定にて行う。具体的には、CABG術中に余剰となり術野から降ろしたグラフト血管を4℃に冷却したブレットシュナイダー(Brettschneider)溶液に浸し速やかに実験を開始する。周囲組織を丁寧に除去した後、血管内膜面に損傷を与えないように注意してラセン状条片標本を数本作製する。必要に応じて内膜面を綿花で擦過した内皮除去標本も作製する。マグヌス装置を用いて好気的条件下に栄養液中に懸垂し、アセチルコリン($10^{-9} \sim 10^{-5}$ mol/L)やニトロプルシド($10^{-11} \sim 10^{-6}$ mol/L)などの薬物を添加することにより生じる内皮依存性あるいは非依存性の等尺

性張力変化をレコーダーに記録し、濃度反応曲線を作成する。必要に応じて内膜面を綿花で擦過した内皮除去標本や、プロスタノイド合成阻害薬やNOS阻害薬で前処置した内皮正常標本も作製する。また内皮の存在は硝酸銀染色のen-face解析により行う。内皮細胞依存性血管拡張因子には、NOだけでなくプロスタノイド、内皮依存性過分極因子があるが、種々の病態、とくにCKDや高ADMA血症において、これら因子の産生系のどれがどれくらい障害されているか、あるいは代償性に亢進しているか、などを調べることができる。

(3) グラフト血管におけるDDAH-2およびNOS蛋白の発現量の解析

張力測定に使用したグラフト血管の一部をリン酸緩衝4%パラホルムアルデヒドで固定後にパラフィン包埋ブロックとして保管しておく。20~30人分のブロックが集まった時点で組織マイクロアレイを作成、薄切した後DDAH-2とNOSに対する免疫組織染色を行う。NOSの染色は3つのアイソフォーム(神経型、誘導型、内皮型)すべてを対象にする予定である。染色後のスライドをバーチャルスライド作製装置(浜松ホトニクス社製NanoZoomer 2.0-RS、現有設備)を用いて標本全体を精密にスキャンしてデジタル画像として保存した後、画像解析ソフトを用いてDDAH-2とNOSの発現量をスコア化し評価する。組織マイクロアレイは複数のパラフィン包埋ブロックの任意領域を円柱状(コア)に抜き取り、新たなブロック1個に再包埋し、最終的に1枚のスライドガラスに複数の切片を搭載した病理標本である。染色条件による結果のばらつきが少ない画一的なデータが得られ、定量的な比較が可能となる。組織マイクロアレイの作成は専門業者に委託し、コアの径は1.0mmにする予定である。

(4) グラフト血管における内膜肥厚の定量評価

張力測定に使用したグラフト血管の一部をヘマトキシリン・エオジン染色とエラスチカ・ワンギーソン染色し、内弾性板の裂隙や病的変性の有無、中膜平滑筋細胞の遊走ならび増殖などの病的変化を評価すると同時に二次元画像計測処理ソフト(Media Cybernetics社製Image-Pro Plus J、現有設備)で内膜肥厚の程度を定量評価する。内膜肥厚の重症度の指標としては、intima-to-media ratio(内膜肥厚部の面積と中膜部分の面積の比)とpercentage of luminal narrowing(内膜肥厚部の面積と内弾性板よりも内側の面積の比率)を用いる。いずれも高値であるほど内膜肥厚の程度が高度であることを示す。

4. 研究成果

最終年度を含め研究期間全体に以下の実験を行った。

(1) 血中ADMA濃度に関連する患者の背景因子: 患者の入院時採血にて血中ADMA濃度

を測定したところ推定糸球体濾過率と ADMA 濃度に負の相関関係があることが明らかになった。そのほかの患者背景（年齢、性別、併存疾患など）と ADMA 濃度の関連は有意でなかった。

（２）胸動脈グラフトにおける内皮由来平滑筋弛緩因子産生能と血中 ADMA 濃度の関連性：冠動脈バイパス術で余剰となった内胸動脈を対象にしたマグヌス装置による張力実験において、糸球体濾過率と内皮由来一酸化窒素の産生能に正の相関がある可能性を明らかにし論文発表した（Endothelial dysfunction of internal thoracic artery graft in patients with chronic kidney disease. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2017;153:317-324）。一方 ADMA 濃度と内皮依存性平滑筋弛緩反応の有意な関連性は明らかでなかった。

（３）内胸動脈グラフトの DDAH-2 および一酸化窒素合成蛋白の発現量と慢性腎臓病ないし血中 ADMA 濃度の関連：張力測定に使用したグラフト血管をパラフィン包埋ブロックとして保管し、45 症例を用いて組織マイクロアレイを作成した。薄切した後に DDAH-2 と NOS に対する免疫組織染色を行い、染色後のスライドをデジタルデータとして画像解析ソフトに取り込んだ後、DDAH-2 と NOS の発現量をスコア化し評価したが、それぞれの発現量と ADMA 濃度の関連性は明らかなでなかった。

（４）内胸動脈グラフトにおける内膜肥厚と血中 ADMA 濃度の関連：グラフト血管の横断面をヘマトキシリン・エオジン染色とエラスチカ・ワンギーソン染色し、内膜肥厚の程度（intima-to-media ratio および percentage of luminal narrowing）を評価したが、有意な関連は見いだせなかった。

結果として、血中 ADMA 濃度、DDAH-2、内胸動脈グラフトの内皮障害、内膜肥厚の関連性は見いだせず臨床的に意義のある所見は得られなかった。今後も慢性腎臓病患者の内胸動脈グラフトの内皮障害の原因検索を継続していく必要がある。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 ２ 件）

Endothelial dysfunction of internal thoracic artery graft in patients with chronic kidney disease. Kinoshita T, Tawa M, Suzuki T, Aimi Y, Asai T, Okamura T. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2017 Feb;153(2):317-324.e1. doi: 10.1016/j.jtcvs.2016.09.037. Epub 2016 Sep 23. PMID: 27771030（査読あり）

Suppression of Graft Spasm by the Particulate Guanylyl Cyclase Activator in

Coronary Bypass Surgery. Kinoshita T, Tawa M, Suzuki T, Aimi Y, Asai T, Okamura T. *Annals of Thoracic Surgery*. 2017 Jan 19. pii: S0003-4975(16)31434-5. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.10.003. [Epub ahead of print] PMID: 28110808（査読あり）

〔学会発表〕（計 ０ 件）

６．研究組織

(1)研究代表者

木下 武（KINOSHITA, Takeshi）

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90437161