

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19962

研究課題名(和文)自家静脈グラフトにおける弁部内膜肥厚発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of intimal hyperplasia development at valve site of human vein graft

研究代表者

菊地 信介(KIKUCHI, Shinsuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80596297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：静脈弁は静脈灌流に重要な構造物である一方、様々な病変の起点となっている。弁部の生物学的特性を解明した。動脈バイパス時に使用されたヒト大伏在静脈の残余片を実験に用いて、弁部及び非弁部の遊走能、増殖能をex-vivo(組織)、in-vitro(細胞)で評価した。弁部は非弁部に比べて有意に遊走能、増殖能が亢進しており、組織から得た細胞も同様の結果であった。両部位から得た細胞は共に血管平滑筋細胞であったが、PDGF-FGF相互作用の観点でその差異を見出した。細胞から得た結果を再び培養組織に適応したが無効であり、培養組織を用いて遺伝子スクリーニングを行ったところ、37遺伝子が有意差をもって検出された。

研究成果の概要(英文)：Venous valves are essential, but are prone to injury, thrombosis and fibrosis. We compared the behavior and gene expression of smooth muscle cells (SMCs) in the valve sinus vs non-valve sites to elucidate biological differences associated with vein valves. Tissue explants of fresh human saphenous veins were prepared, and the migration of SMCs from explants of valve sinus vs non-valve sinus areas was measured. Valve SMCs demonstrated greater proliferation in tissue explants compared to non-valve SMCs. Valve SMCs also proliferated faster than non-valve SMCs in response to PDGF-BB. PDGF-FGF co-activation system caused the difference between both SMCs. This mechanism was applied to the ex-vivo, but no difference was seen cell functions between both SMCs. We finally tried gene screenign using RNA sequence, demonstrating that 37 genes were differentially expressed by valvec compared to non-valve tissue (11 veins).

研究分野：血管外科

キーワード：内膜肥厚 静脈グラフト 下肢動脈疾患 弁部 グラフト狭窄

1. 研究開始当初の背景

自家静脈グラフトは、閉塞性動脈硬化症をはじめとする末梢動脈疾患に対する血行再建術に使用する第一選択のグラフトである。その耐久性は良好(Bradbury, A. W. et al. 2010 J Vasc Surg. 51, 5S-17S)であるが、自家静脈グラフト症例の 20-30%に発生する進行性内膜肥厚 (IH) によるグラフト閉塞が問題となる。これは静脈が動脈環境に置かれることで生じる生理的反応(graft healing)であるが、これが過度となると IH を惹起し、術後中長期のグラフト開存成績に大きな影響を及ぼす。IH 好発部位の 1 つは静脈弁部で約 20%である。¹⁾ 弁部では動脈圧刺激 (vascular injury) に伴う壁肥厚が生じ、グラフト狭窄、閉塞を来す。(Figure1) IH に対する根本的な解決法は未だ見いだされていない。我々は IH の約 20%を占める弁部内膜肥厚に着目し、ヒト大伏在静脈由来の細胞を内側層、外側層に分離し、更に弁部、非弁部に区分することにより細胞生物学的な表現型の違いを解明した。

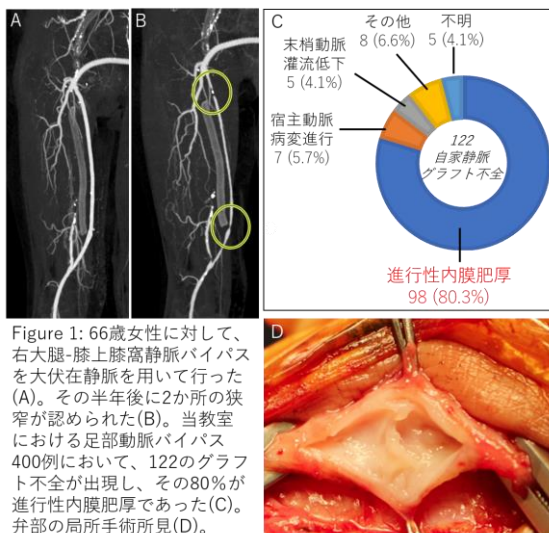


Figure 1: 66歳女性に対して、右大腿-膝上膝窩静脈バイパスを大伏在静脈を用いて行った(A)。その半年後に2か所の狭窄が認められた(B)。当教室における足部動脈バイパス400例において、122のグラフト不全が出現し、その80%が進行性内膜肥厚であった(C)。弁部の局所手術所見(D)。

2. 研究の目的

下肢血行再建術には自家静脈グラフトが頻用されるが、術後2年以内に発生する内膜肥厚(IH)が問題となる。IHに対する根本的な解決法は未だ見いだされていない。我々は IH の約 20%を占める弁部内膜肥厚に着目し、ヒ

ト大伏在静脈由来の細胞を内側層、外側層に分離し、更に弁部、非弁部に区分することにより細胞生物学的な表現型の違いを解明した。そこで2年間で以下の2つを明らかにしたい。1、非弁部細胞に比べて弁部細胞が活性化されている分子生物学的メカニズムを解明する。2、弁部、皮弁部に存在する細胞のアイデンティティ、生物学的分化度の違いを明らかにする。内膜肥厚抑制のターゲット分子の同定を目指したい。ヒトの静脈から採取した細胞を解析することで、これまでに進展のなかった IH の原因を解明し IH 抑制のターゲット分子を同定したい。

3. 研究の方法

(1) 獲得組織からの遊走能/増殖能の評価及び細胞の獲得

(2) 細胞構成の確認：解析する細胞群について詳細な検討は次年度に行うが、現在形態学的に細胞群を構成している主たる細胞は血管平滑筋細胞であると考えている。これを確認するために α -SMA、Myosin heavy chane 11 などによる細胞蛍光免疫染色を行う。

(3) 細胞の PDGF に対する反応性の確認：各部位における増殖能、遊走能の表現型の違いは PDGF-BB に対する反応性の差から生じていると仮定している。

(4) PDGF-BB 刺激による FGF システムの相互活性化の確認 (弁部細胞の機能亢進のメカニズムの可能性について検証)

(5) 上記の結果を改めて組織レベルで検証する。組織培養に FGF 抗体を加え、遊走能/増殖能を検証。

(6) 弁部、非弁部内側組織を用いた遺伝子スクリーニング (RNA sequence)

4. 研究成果

我々は血管外科であるメリットを最大限に利用し、実際にバイパス手術における余剰移植前大伏在静脈(SM)を用いて、同一患者の弁部と非弁部から細胞を採取し、その機能を比較した。これまでに得られた知見は以下のとおりである。

(1) 組織学的に分離した2層のうち(Figure2)、内側層で弁部遊走能が亢進していた(Figure3)。

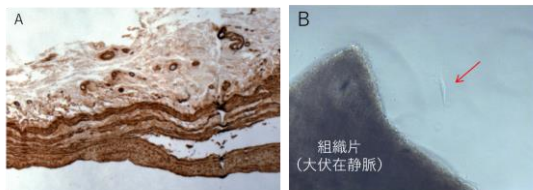


Figure2: 大伏在静脈を α -SMAで免疫染色した。組織は外側層(外膜中膜)、内側層(中膜内膜)で分離されている(A)。組織片から遊走した細胞をカウントすることで遊走能を評価した。(B)

(2) 蛍光免疫染色にて弁部、非弁部内側層由来細胞は、共に平滑筋細胞(SMC)マーカーが陽性であった。

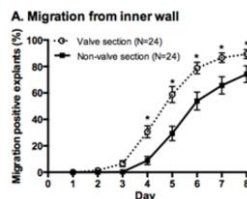


Figure 3: 内側層からの細胞遊走は弁部で有意に亢進していた。

(3) 組織から遊走した弁部 SMC は非弁部 SMC に比較して、PDGF-BB 刺激下遊走能が有意に亢進していた。(Figure4A)

(4) 弁部 SMC の機能亢進メカニズムは、PDGF-FGF2 との相互作用であった。(Figure4B)

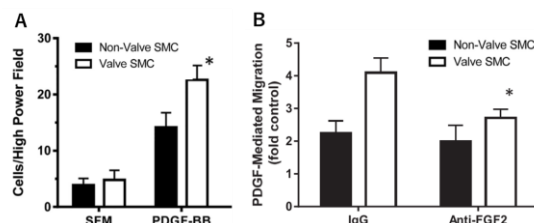


Figure 4: 弁部SMCにおけるPDGF刺激下細胞遊走能は有意に亢進していた(A)。PDGF刺激細胞遊走をFGF2抗体を用いて阻害したところ、弁部由来SMCのみに有効であった。

(5) 上記、細胞レベルのメカニズムを組織遊走能で適応させてみたが、弁部、非弁部ともに FGF2 抗体による抑制効果は認められなかった。(Figure5)

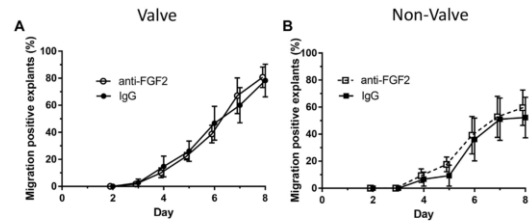


Figure 5: 弁部SMCに特徴的なFGF2関与について、FGF2抗体を用いて組織遊走能を評価したが、弁部(A)、非弁部(B)共に効果は認められなかった。

(6) 組織を用いた RNA シーケンスの結果から、37 遺伝子が弁部組織に特異的に発現しており、その一遺伝子である SEMA3A は弁部組織のみに遊走能抑制作用を示した。(Table)

Table. Differentially expressed genes in valve vs nonvalve intimal-medial tissue

Significant valve vs nonvalve genes		Valve vs nonvalve log fold change	FDR
BRINP2	Bone morphogenetic protein/heteroic acid inducible neural-specific protein	4.52	0.008
NTS	Neurotensin	4.22	0.006
BATF	Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	3.90	0.000
PROX1	Prospero homeobox 1	3.70	0.000
TMEM100	Transmembrane protein 100	3.21	0.017
C4F	C4F homolog (Drosophila)	3.15	0.000
MMRN2	Mitrimycin 2	3.10	0.000
SEMA3A	Semaphorin 3A	2.98	0.008
PKCZC	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2	2.72	0.000
GATA3	GATA binding protein 3	2.46	0.000
GATA3-AS1	GATA binding protein 3 antisense 1	2.29	0.003
PAPP42	Pappalysin 2	2.28	0.032
DBP	Diapyralsin	2.27	0.009
PTH2R	Parathyroid hormone 2 receptor	2.19	0.001
ADAMTS2	ADAMTS-like 2	2.18	0.003
HRH2	Histamine receptor H2	2.13	0.008
PLCCD3	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing3	1.49	0.009
KRT7	Keratin 7	1.46	0.008
PLA2G2A	Phospholipase A ₂ group IIA	1.40	0.010
PKHD1L	Polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)-like	1.28	0.008
USBN1D	UBX domain protein 1D	1.09	0.053
C6	Complement component 6	0.90	0.016
C7	Complement component 7	-0.50	0.043
MBP	Myelin basic protein	-1.18	0.053
MT-ND1	Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1	-1.42	0.052
MT-ND5	Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 5	-1.43	0.009
CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	-1.46	0.010
TPH1	Tryptophan hydroxylase 11	-1.81	0.011
Significant time-valve interaction genes		Tissue-time interaction log fold change	
SNHG15	Small nucleolar RNA host gene 15 (non-protein coding)	3.50	0.050
LINC0272	Long intergenic non-protein coding RNA	-2.54	0.051
CCND4A	C2 calcium dependent domain containing 4A	4.15	0.051
SALL1	Spalt-like transcription factor 1	1.74	0.051
IQCAF	IQ motif containing with AAA domain 1	-1.06	0.051
KIT	Stem cell factor receptor	2.91	0.051
PCDH2	Protocadherin 12	3.11	0.051
KCNQ1	Potassium voltage gated channel, KCQT-like subfamily, member 1	1.89	0.051
PCDH9BP	Protocadherin beta 19 pseudogene	3.50	0.050

<引用文献>

- ① Szilagy DE, *Ann Surg.* 1973 Sep;178(3):232-46. Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes: clinical, angiographic and histopathologic observations in femoro-popliteal operations for atherosclerosis.

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4件)

- ① Kikuchi S, Chen L, Xiong K, Saito Y, Azuma N, Tang G, Sobel M, Wight TN, Kenagy RD, Smooth muscle cells of

human veins show an increased response to injury at valve sites , Journal of Vascular Surgery, 67 (5) (1556 - 1570) , 2018, doi: 10.1016/j.jvs.2017.03.447.

- ② Kikuchi S, Sasajima T, Inaba M, Uchida D, Kokubo T, Saito Y, Koya A, Uchida H, Azuma N, Evaluation of paramalleolar and inframalleolar bypasses in dialysis- and nondialysis-dependent patients with critical limb ischemia., Journal of Vascular surgery, 67 (3) (826 - 837 , 2018, doi: 10.1016/j.jvs.2017.07.116.
- ③ Kenagy RD, Kikuchi S, Chen L, Wijelath ES, Stergachis AB, Stamatoyannopoulos J, Tang GL, Clowes AW, Sobel M, A single nucleotide polymorphism of cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27Kip1) associated with human vein graft failure affects growth of human venous adventitial cells but not smooth muscle cells., Journal of Vascular Surgery, 69 (1) (309 - 317) , 2018, doi: 10.1016/j.jvs.2016.12.113.
- ④ Sobel M, Kikuchi S, Chen L, Tang GL, Wight TN, Kenagy RD, Clinical factors that influence the cellular responses of saphenous veins used for arterial bypass. Journal of Vascular Surgery, 2018 (article in press) doi: 10.1016/j.jvs.2018.03.436

[学会発表] (計4件)

- ① 菊地 信介、Smooth muscle cells of human veins show an increased response to injury at valve sites. 日本循環器学会基礎疾患フォーラム、2018年1月6日、東京都

- ② 菊地 信介、The usefulness of ultrasound-guided lower extremity nerve blockage (UGNB) in infrapopliteal artery bypass grafting for frail patients with critical limb ischemia、2017年5月31日-6月3日、San Diego (USA)
- ③ 菊地 信介 2017年4月19-21日、重症下肢虚血に対する膝下病変に対する神経ブロック下バイパス術、広島
- ④ 菊地 信介、Involvement of Hemodialysis to Intimal Hyperplasia Development in Paramalleolar Bypasses Vein Graft、2016年6月8-11日、Washington DC (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 信介 (KIKUCHI, Shinsuke)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：80596297