

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06635

研究課題名(和文)自家静脈グラフトを用いた下肢動脈バイパス術後狭窄形成の機構解明および治療応用

研究課題名(英文) Investigation on vein graft restenosis after lower extremity bypass surgery

研究代表者

高山 利夫 (Takayama, Toshio)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80802694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈バイパスに使用された自家静脈グラフトが狭窄から閉塞に至るメカニズムとして、血管平滑筋細胞が異常増殖することで発生する内膜肥厚の関与が示唆されているが、血管平滑筋細胞を異常増殖に向かわせる機構は未だ解明されていない。本研究においては、ラット大腿静脈グラフトを用いた大腿動脈バイパスモデルを作成して経時的に観察し、自家静脈グラフトが狭窄から閉塞に至る変化を観察することが第一段階である。研究期間終了時において、静脈グラフトモデル作成手技の安定化が得られるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット大腿静脈グラフトを用いた大腿動脈バイパスモデルは、静脈グラフトの内膜肥厚を研究するために適した動物実験モデルであるが、微小な血管どうしを顕微鏡下に吻合するという操作を必要とし、その技術的難易度は非常に高い。我々は研究期間終了時までモデル作成手技の安定化に成功し、次なる段階としての静脈グラフト内膜肥厚機構解明に向けた実験の準備段階を終えることができた。

研究成果の概要(英文)：Vein graft restenosis is a common problem after lower extremity bypass surgery. Intimal hyperplasia caused by pathological proliferation of arterial smooth muscle cell is supposed to be a major etiology of this problem; however, the actual mechanism of the smooth muscle cell hyperproliferation is still unknown. We planned to investigate on this question by analyzing rat femoral artery bypass model using autovein graft. Although this model requires a high technical skill, we have successfully stabilized the surgical skill at the end of the research term.

研究分野：血管外科

キーワード：静脈グラフト 内膜肥厚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下肢動脈バイパスに用いる代用血管(グラフト)として大伏在静脈を代表とする自家静脈は、合成素材を材料とする人工血管に比較すると良好な長期開存が報告されているが、それでも大腿膝窩動脈バイパス静脈グラフトの5年開存率は約75%、脛骨動脈や腓骨動脈を末梢吻合部とする遠位バイパスの静脈グラフト5年開存率は約50%と、長期的には一定の頻度で閉塞を来すことが知られている。グラフト閉塞の主な原因が新生内膜形成とそれに続く内膜肥厚であり、特に血管狭窄病変に対するバルーン形成術後や金属ステント留置後に、機械的損傷により健全な血管内皮細胞が欠損しそれを契機に血管中膜内に豊富に存在する血管平滑筋細胞が異常増殖することで内膜肥厚が起り血管内腔を狭窄せしめ、最終的に閉塞を来すというメカニズムはよく知られている。しかしながら静脈グラフトにおいては血管内膜と内皮細胞は健全に保たれているはずであり、前述のメカニズムとは別の機序たとえば吻合操作や静脈の動脈化による血流増大に伴う shear stress などが内膜肥厚の発生に関与していると予想されるが、その詳細な機構は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

応募者は先行実験により、ラットより採取した血管平滑筋一次細胞を用いた in vitro 実験により、内膜肥厚をもたらす血管平滑筋細胞の異常増殖の一因として Kruppel-like factors の一種である Klf5 が関与していることを発見した。Kruppel-like factors は細胞分化に関わる遺伝子発現を調節する一連の因子群であり、特に Klf4 は iPS 細胞を作成する際の4因子の一つとして有名である。一方これまで Klf5 の役割については未知の部分が多かったが、応募者らの実験結果から血管内膜肥厚形成において平滑筋細胞の増殖を促進する効果が示され、かつレスベラトロール投与によりこの効果が抑制されることも判明した。

ラット頸動脈バルーン擦過モデルを用いたこれら一連の研究結果はすでに応募者らにより論文発表されているが静脈グラフト狭窄において Klf5 の役割と抗炎症物質レスベラトロールの効果は依然不明であり、これを明らかにすることが今回の研究目標である。

3. 研究の方法

in vivo 実験として、まずはラット自家静脈グラフトを用いた大腿動脈バイパスモデル作成手技の安定化を得た後に静脈グラフト内膜肥厚の経時的評価を行う。次いで、バルーン擦過モデルで内膜肥厚抑制効果を認めたレスベラトロールが静脈グラフトモデルにおいても有効であるかを評価し、投与群と非投与群の組織切片に対して Klf5 とその関連因子を標的とした免疫組織学的染色を行う。in vitro 実験として、まずはラット平滑筋一次細胞培養プロトコルを確立し、PDGF や TGF-beta 等の growth factor を用いた細胞刺激実験を行う。その後レスベラトロールの細胞増殖抑制効果の判定を行い、RT-PCR 法および Western blot 法にて Klf5 とその関連因子を標的とした RNA 発現と蛋白発現の観察を行う。

4. 研究成果

ラット大腿静脈グラフトを用いた大腿動脈バイパスモデルは、静脈グラフトの内膜肥厚を研究するために適した動物実験モデルであるが、微小な血管どうしを顕微鏡下に吻合するという操作を必要とし、その技術的難易度は非常に高い。

研究期間中に径 14 匹のラットに対して施行した静脈グラフト手術結果を表 1 に示す。

No.	Model	Vein Graft Outcome	Months after Surgery
1	FA bypass	Open w/o IH	8
2	FA bypass	Open w IH	8
3	FA bypass	Open w IH	8
4	FA bypass	Open w IH	3
5	FA bypass	Died (= No. 8)	1
6	CCA interposition	Open w IH	7
7	CCA interposition	Occluded	1.5
8	CCA interposition	Died (= No. 5)	0
9	CCA interposition	Occluded	6
10	CCA interposition	Occluded	6
11	FA interposition	Died	?
12	FA interposition	Occluded	6
13	FA interposition	Occluded	6
14	FA interposition	Occluded	3

表1. ラット静脈グラフトバイパス結果

5 匹に対し大腿静脈グラフトを用いたバイパス手術を行い (No.1~5) 5 匹に対し外頸静脈グラフトを用いた総頸動脈置換手術を行い (No.6~10) 4 匹に対し大腿静脈グラフトを用いた大腿動脈置換手術を行った (No.11~14)。大腿動脈バイパス群 5 匹中 1 匹は術後 1 ヶ月で死亡したが、それ以外の 4 匹はいずれも静脈グラフトは開存しており、特に 3 匹は 8 ヶ月という長期間の開存が得られた。総頸動脈置換群 5 匹に関しては 1 匹が死亡、3 匹が閉塞、1 匹が開存という結果で、大腿動脈置換群 4 匹に関しては 1 匹が死亡、残り 3 匹は全て閉塞という結果だった。

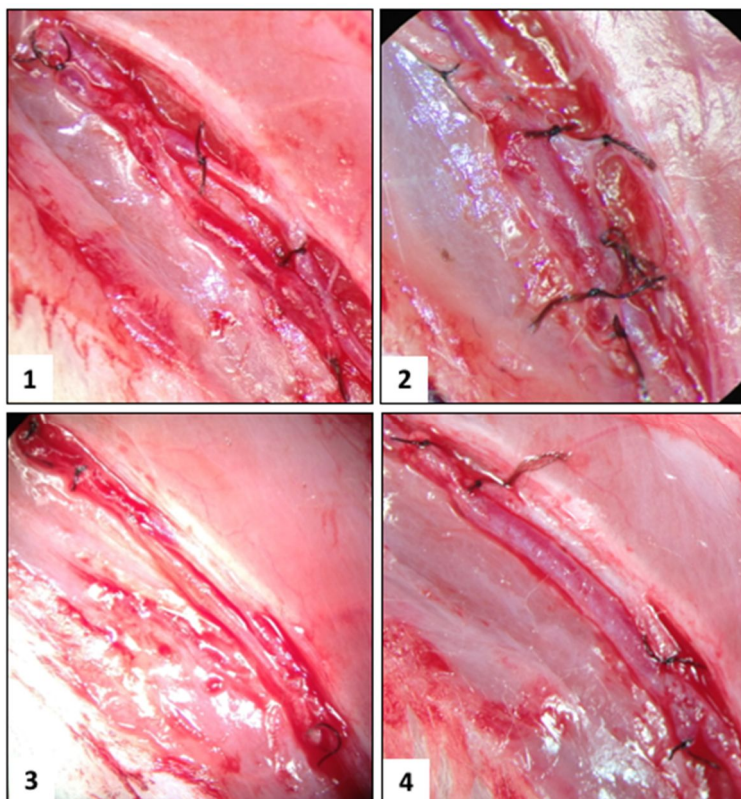


図1. ラット大腿動脈バイパスモデル

図1に開存が得られた4匹の手術写真を示す。これらの結果より、ラットを用いた静脈グラフトモデルの術式としては大腿静脈グラフトを用いたバイパス手術が最も優れているという結果が得られ、研究期間終了時までにはモデル作成手技の安定化に成功し、次なる段階としての静脈グラフト内膜肥厚機構解明に向けた実験の準備段階を終えることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。