

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09259

研究課題名(和文)自家静脈グラフト内膜肥厚抑制に向けた遠赤外線照射による新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of FIR therapy for suppressing vascular intimal hyperplasia

研究代表者

内田 大貴 (UCHIDA, DAIKI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80422038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：重症下肢虚血患者のバイパス手術における自家静脈グラフトには、内膜肥厚による再狭窄が発生するが、未だ有効な予防法は確立されておらず解決急務の課題である。バスキュラーアクセスの狭窄予防に対する遠赤外線照射(FIRAPY療法)をその病態近似性から自家静脈バイパスグラフトに応用する。In vitroでの基本的解析では、外膜(Fib)、中膜(SMC)を標的に4条件(1:37°C、2:Light、3:FIR、4:Dark)に分け増殖能、遊走能、遺伝子発現を評価した。線維芽細胞の増殖が平滑筋細胞に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。今後SMCとの共培養や熱反応タンパク(HSP)との関連を加えていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血肢に対する血行再建は、患者の下肢を守る、生活を守るための必須な手段方法である。殊に、透析、糖尿病の爆発的増加から対象患者も増加し、重症虚血患者に対するバイパス術のニーズは高い。術後20%前後で発症する進行性内膜肥厚は術後成績ひいては患者の予後に直結する一方で、未だ解決策のない喫緊の課題である。現状では、侵襲的な経皮的バルーン拡張や外科的修復に頼らなければならない。非侵襲的かつ、他領域(バスキュラーアクセス)での診療実績のある遠赤外線(FIR)照射による内膜肥厚による狭窄予防が可能となれば、血管外科学ならびに患者側にとってもブレイクスルーになることが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Autologous vein grafts used for bypass surgery in patients with critical limb threatening ischemia are associated with restenosis due to intimal thickening, but no effective treatment has yet been established and is urgently needed. Basic in vitro analysis suggested that fibroblast proliferation may play an inhibitory effect on smooth muscle cells. In the future, we will investigate the relationship between SMC and reactions under co-culture and heat reaction proteins (HSP).

研究分野：血管外科学

キーワード：遠赤外線 内膜肥厚 自家静脈グラフト 重症下肢虚血 FIRAPY

1. 研究開始当初の背景

重症下肢虚血(CLTI)に対する治療の現状 近年、本邦における生活習慣病の欧米化・高齢化社会到来により、糖尿病および透析患者における末梢動脈硬化性疾患(PAD)は増加の一途を辿っており、まさに血管病時代の到来を迎えている。2017年にESCおよびESVSより発表されたPADに対するガイドラインの改定⁽¹⁾において、CLTI患者の膝下病変に対しては自家静脈グラフト(VG)を用いた下肢バイパス手術(Distal bypass)が第一選択の治療となった。VGは主たる長期開存を可能とする代用血管の一つであるが、術後2年程度で全グラフトの20~30%の患者において、進行性の内膜肥厚(IH)によるVG狭窄・閉塞が発生し再手術が必要となる。この自家血管グラフトの内膜肥厚の抑制は血管外科学の永年の研究テーマであり、未だ有効な予防、治療方法は確立されていないのが現状である。透析糖尿病患者が激増する血管病時代において、VGを用いたバイパス手術の需要に対し、未だ解決策の見えないIH抑制療法の開発は急務であり、VG狭窄・閉塞の主因である進行性IHの解決は長期開存成績の向上のみならず、再手術回避や生活習慣病患者の活動性寿命の向上が大いに期待される。

我々の教室で臨床上得られた狭窄静脈グラフトの病理染色標本では著明な中膜内膜肥厚像(図1)を認めており、ヒト移植後自家静脈グラフトに発生した進行性IHの臨床サンプルを用いた基礎実験解析では、IH関連遺伝子の同定に成功し、これらが作用する転写因子CREBの抑制によりVSMC増殖抑制を介してIHが抑制される事が確認され、中膜血管平滑筋をターゲットとした治療線戦略の重要性を報告している。⁽²⁾近年透析患者のバスキュラーアクセス(VA)への遠赤外線(FIR)の体外照射による血管機能の改善により、VAの狭窄発生を予防させるFIRAPY療法(図2)が注目されている。振動波長3~25μmのFIRを照射するFIRAPYの効果は、基礎実験によるとヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)の活性化の促進、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)活性化の促進から内皮機能の改善の報告⁽³⁾が散見されるが、FIR照射そのものによるVSMCへの作用機序についての直接の言及、報告はない。我々の教室の研究では、静脈グラフトに生ずる進行性IHは質的不良静脈(小口径、拡張不良)や静脈弁部に多く発生することが報告されている⁽⁴⁾。VAの狭窄発生の原因は、ずり応力や炎症性サイトカイン、酸化ストレス発生等による静脈の動脈環境下への適応不順に由来する内膜肥厚であるとされ、下肢バイパス手術におけるVGと病態は近似していると考えており、VGのIH抑制にむけて臨床応用が期待される。

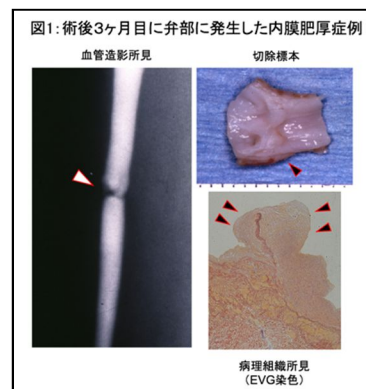


図1:術後3ヶ月目に弁部に発生した内膜肥厚症例



A: FIR generator TY-101F

B: FIRAPY療法施行例

図2

2. 研究の目的

未だ予防法、治療法の確立に至っていない下肢バイパス後VGにおける進行性IHの抑制療法を確立することを目的とする。VGへの遠赤外線照射(FIRAPY療法)の応用による進行性IH抑制を実現するため、細胞レベルでのFIR照射による抑制効果とその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

~VSMCへのFIR照射による活性抑制効果とその機序解明~
 基本的解析は外膜(Fib)、中膜(SMC)をターゲットとした。4条件(1:Control群:37インキュベーター内、2:Light群:30分/日でライトをつけたベンチ内、3:FIR群:30分/日でFIR照射(室温)、4:Dark FIR群:アルミホイルで被覆30分/日でFIR照射)に分け、A増殖能(MTS Assay)、B遊走能(Scratch assay)、C遺伝子発現(p27kip1)を評価した。

4. 研究成果

A増殖能(MTS Assay、図3)
 VSMCおよびFib(各n=3)にFIRを上記4条件で照射し、MTS Assayによる増殖能をDay2とDay4評価した。Day2で行ったMTS assayでは、SMCもFibも全群で有意差がみられないもののDay4では、SMCでは全群の間に有意差は見られませんでした。一方で、Fibにおいて、コントロール群に比して、FIR群とDark FIR群で有意差を認めていた。この結果から増殖能に関してはFIR照射により、Fibは増殖、SMC不変と

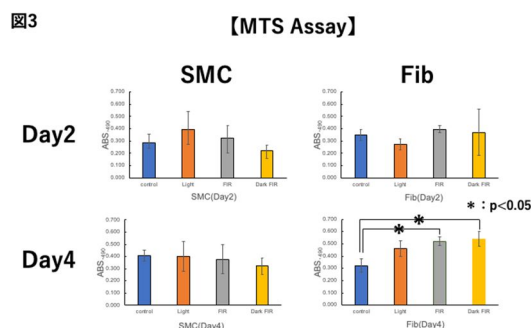
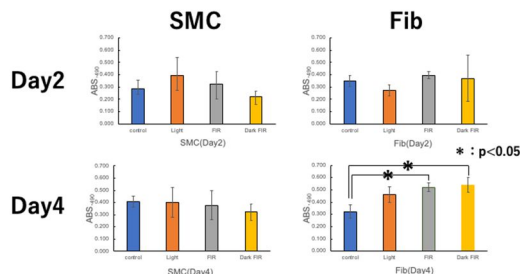
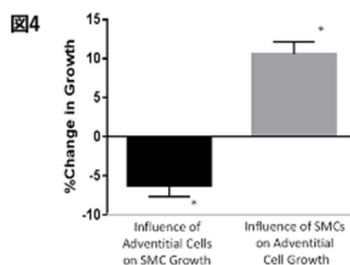


図3

【MTS Assay】



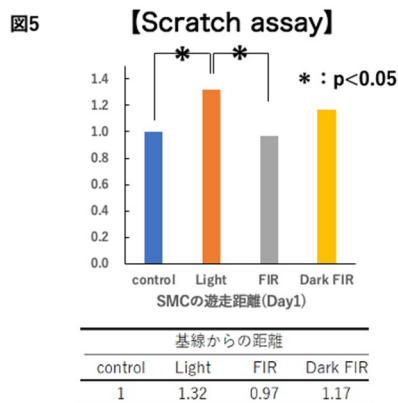
という知見が得られた。Sobel らの研究⁽⁵⁾によると SMC と Fib の共培養モデルにおいて、Fib は SMC の増殖を抑制し得るという報告(図4)があるが、FIR 照射によるグラフト狭窄の抑制は血管内皮細胞だけでなく Fib の増殖が関係している可能性が考えられた。今後 Fib と SMC の共培養モデルに対して FIR 照射の効果を見る必要があり今後の課題である。



B 遊走能 (Scratch assay, 図5)

VSMC (n=15) に FIR を上記4条件で照射し、Scratch Assay による遊走能を Day1 で評価した。

4群で比較すると Light 群が特に遊走していました。FIR 照射により、Light 群を対照とすると遊走能が有意に減少していた。また暗条件を加味しても FIR による遊走能抑制効果が示されている。

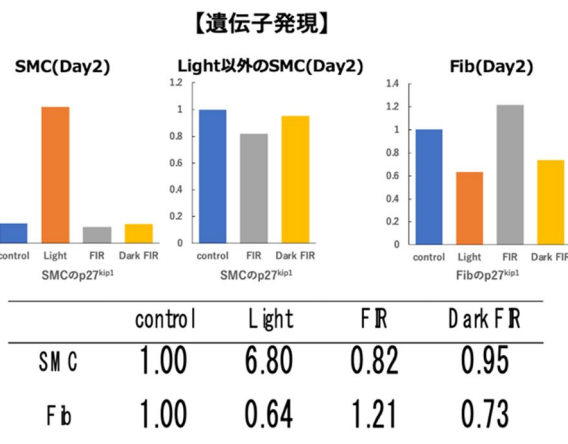


C 遺伝子発現(図6)

遺伝子発現においては p27kip1 遺伝子の評価を行った。Light や FIR を照射した SMC と Fib を破碎、遠心し、RNA を抽出、それを cDNA に変換し、遺伝子の発現量を測定した。今回測定した 18s はハウスキーピング遺伝子とも呼ばれ多くの細胞中に一定量発現している遺伝子で、p27kip1 は細胞増殖サイクル G0 期から G1 期に移行する

図6

のを「抑制」している遺伝子である。そこで、18s を基準とし p27kip1 の発現量変化を SMC・Fib(n=3)に FIR を4条件で照射し比較、検討した(図6)。SMC では Light を照射した群が control 群と比べて遺伝子発現が高くなった。Light 以外の条件では有意差を認めなかった。Fib では FIR 群でやや発現量の増加を認めたが有意差を認めなかった。



今回、当初計画で予定していた動物レベル、臨床段階での FIR 照射による狭窄予防の実施には至らな

かったが、細胞レベルでの VSMC、FIR における基本的解析を実施した。いずれも、VSMC 単独では活性の抑制には至らず、Fib との関連性を示唆するにとどまる結果であった。基本的活性の方法追加(Quick Cell Proliferation Assay、Boyden chamber 法)や、新たに細胞活性酸素種(ROS)レベルの影響評価を DCF アッセイで確認していく作業が必要と考えられた。今後は、熱反応性タンパク(HSP)との関連、最終的には、既知の内皮細胞と VSMC による 2 面的内膜肥厚抑制機序の解明に向けて、次の研究課題で証明していきたい。

参考文献

- (1)Victor Aboyans., et al. Eur J Vasc Endovasc Surg (2018) 55, 305e368
- (2)Uchida D, J Vasc Surg. 2020 Jan;71(1):229-241
- (3)Lin CC., et al. Am J Kidney Dis.2013
- (4)Hsu YH., et al. PLoS One. 2012; 7(1):e30674.
- (5)M Sobel, J Vasc Surg. 2018 Dec; 68(6 Suppl): 165S-176S.e6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田大貴
2. 発表標題 Predict IH study ~ 自家静脈バイパスグラフト狭窄発生を予測する術前サロゲートマーカー探索
3. 学会等名 第48回日本血管外科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菊地 信介 (Kikuchi Shinsuke) (80596297)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	
研究分担者	竜川 貴光 (Tatsukawa Takamitsu) (80837914)	旭川医科大学・大学病院・助教 (10107)	
研究分担者	古屋 敦宏 (Koya Atsuhiko) (90463752)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------