

令和 3 年 5 月 31 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：2019～2020

課題番号：19K24006

研究課題名(和文)透析用動静脈瘻の閉塞ハイリスク群に対する内膜肥厚制御

研究課題名(英文)Regulation of arteriovenous fistula maturation in high-risk groups of occlusion

研究代表者

伊佐治 寿彦(Isaji, Toshihiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40779790

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文):糖尿病は透析用動静脈瘻の内膜肥厚による閉塞のリスク因子として知られている。我々は、糖尿病患者の血管内皮障害に着目し、eNOSを増強するシルデナフィル投与の有無による動静脈瘻術後成熟の比較検討をマウスモデルで行った。術後6週間の動静脈瘻開存率と内膜肥厚の程度に差はなかったが、シャント化大静脈径はシルデナフィル投与群が拡張する傾向にあった。ストレプトゾトシン投与による1型糖尿病マウスモデル動静脈瘻の作成を試みたが術後経過中の死亡率が高く対照群との比較研究は困難であった。その他に、マウスの卵巣摘出モデルを作成したが、術後の死亡率が高く、動静脈瘻モデルの作成まで至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工透析を要する慢性腎不全患者におけるブラッドアクセスの長期開存の確保は喫緊の課題である。これまで我々は動静脈瘻造設術後の成熟と不全を司るいくつかの分子に着目してきたが、いずれも動物実験段階から実臨床への応用の道には数多くのプロセスを経る必要がある。シルデナフィルは勃起不全症に対する治療薬として薬事承認を受けた薬剤であり、本研究を進展させて動静脈瘻に対する内膜肥厚制御効果さらに長期開存率改善効果が認められれば、比較的早期の臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文):Diabetes mellitus is a known risk factor for occlusion of arteriovenous fistulas for dialysis due to intimal thickening. We focused on vascular endothelial damage in diabetic patients and compared postoperative maturation of arteriovenous fistulas with and without sildenafil, which enhances eNOS, in a mouse model. Although there was no difference in arteriovenous fistula patency and degree of intimal thickening at 6 weeks postoperatively, the diameter of shunted vena cava tended to be dilated in the sildenafil-treated group. We attempted to create an arteriovenous fistula model in mice with type I diabetes mellitus by administering streptozotocin, but the mortality rate during the postoperative course made it difficult to conduct a comparative study with the control group. We also created an ovariectomy model in mice, but the postoperative mortality rate was so high that we were unable to create an arteriovenous fistula model.

研究分野：血管外科学

キーワード：動静脈瘻 内膜肥厚 内皮機能 eNOS 糖尿病 性差 Sildenafil

1. 研究開始当初の背景

自己静脈を用いた動静脈瘻は維持透析用ブラッドアクセスの第一選択であるが、造設後一年の一次開存率は約 60%と極めて成績が悪く、半永久的に維持透析療法を受ける患者にとって大きな負担になっている。

動静脈瘻不全に至るメカニズムは完全には明らかにされていないが、流出路静脈の内膜肥厚が主要原因の一つと考えられている。動静脈瘻作成後に動脈血流に晒された静脈は、増加したずり応力に対応して外向性にリモデリングし、張力に対応して強度を増すためにある程度内膜肥厚を生じることで動脈環境に適応し成熟していくが、過剰な内膜肥厚は狭窄・閉塞による動静脈瘻不全をきたす(図 1)(Hu et al, Semin Vasc Surg. 2016)。また、動静脈瘻不全に至る症例の臨床病理学的背景に関しては、報告によりばらつきがあるものの、性別や糖尿病、肥満などがリスク因子として指摘されている(Lee et al, Clin J Am Soc Nephrol. 2011)。

動脈及び静脈の血管内皮細胞で産生される nitric oxide (NO)は、L-arginine と酸素を基質として endothelial nitric oxide synthase (eNOS) によって合成され、血管平滑筋弛緩作用を示す。糖尿病は内皮機能障害をきたす代表的な疾患であるが、これはインスリンシグナル伝達経路の一つにシグナル伝達障害が生じ、血管内皮細胞の NO 産生が低下することで生じると考えられている。筆頭研究者が過去に在籍した Yale 大学血管生物学講座において、静脈マーカーの EphB4 が eNOS を介して動静脈瘻の成熟に関与する可能性が報告された(Protack CD et al. Sci.Reports 2017)。

性差に関しては、多くの論文で女性が男性に比べて透析用動静脈瘻の成熟に時間がかかり、長期化開存率が劣ることが示されている(Miller et al. Kidney Int. 2003)。Wilhelmson らは、血管内皮傷害モデルを用いて、アンドロゲン受容体ノックアウトマウスにおいて内膜肥厚が促進したことを報告した(Wilhelmson et al. Endocrinology 2016)。これは、男性ホルモンであるテストステロンが内膜肥厚制御に重要な性ホルモンであることを示唆する。

筆頭研究者らはこれまで、マウス動静脈瘻モデル(図2)を用いて、動静脈瘻の成熟に関する論文をいくつか報告してきた。これは、心不全モデルとして用いられていたマウス大動脈-下大静脈瘻モデルを、透析用動静脈瘻の研究のために改良したモデルであり、以下のような利点を有する。

- i) 縫合を伴わない極めて簡便な手技で短時間に作成可能であり、再現性が高い。
- ii) 動静脈瘻の成熟期のあと一定の割合で不全をきたすため、ヒトの透析用動静脈瘻の時間経過を再現している。
- iii) マウスモデルであり遺伝子改変動物を用いた研究が遂行しやすい。

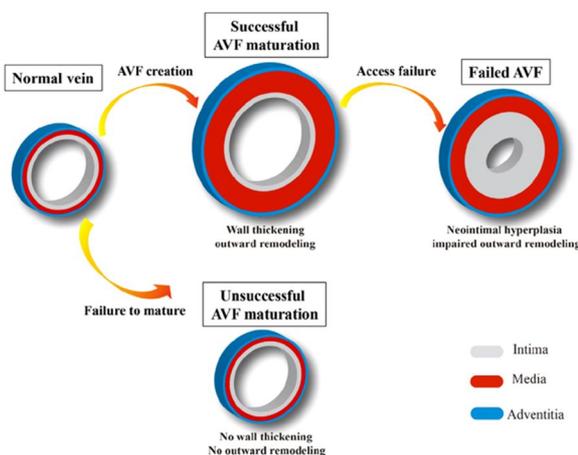


図 1

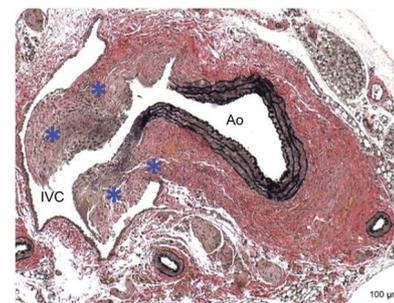


図 2

2. 研究の目的

これまで動静脈瘻不全の疫学的背景に関する報告や、糖尿病を合併した維持透析患者に対する動静脈瘻の臨床治験の報告(V-HEALTH study)(Conte et al, JVS 2011)はあるが、ハイリスク群に注目し動静脈瘻不全のメカニズムを動物モデルを用いて解明した報告はない。

本研究の目的は、過剰な内膜肥厚により動静脈瘻不全に至るメカニズムを、特にハイリスク群(女性、糖尿病合併例)に関して明らかにし、これを制御することにより動静脈瘻の長期成績を改善させ、ひいては維持透析療法中の末期腎不全患者を苦悩から解放することである。

3. 研究の方法

動物実験は、先述のマウス大動脈-下大静脈瘻による動静脈瘻モデルを用いて行った。エコーで大動脈および下大静脈(IVC)の直径及び血流を術前、術後3,7,21,42日目に測定した。動静脈瘻より中枢のIVCを42日目に標本として摘出し、組織学的評価を行った。

(1) sildenafil 投与実験

マウスを投与群と対照群に分け、対照群には通常の餌を、投与群には餌に Sildenafil を 25mg/kg 混入したものを術前日より連日投与する。手術日は、ガス麻酔下で先述の動静脈瘻モデルを作成し、術後の評価を継続する。非糖尿病マウスでの実験が終了次第、以下に述べる糖尿病マウスモデルを用いて同様の実験を行う。

(2) 糖尿病マウスモデルを用いた実験

ストレプトゾチン投与で 型糖尿病マウスを作成し、内膜肥厚および動静脈瘻開存率を対照群と比較する。

(2) 性差に関する実験

雄雌のマウスに動静脈瘻を作成し、術後のリモデリングを比較する。また、性ホルモンの内膜肥厚に対する影響を検討し、動静脈瘻不全に対するホルモン療法の可能性を探る。具体的には、オスに対してアンドロゲン受容体ノックアウトマウス、あるいは去勢マウスを用いる。またメスに対してエストロゲン投与または卵巣摘出を行って性ホルモンを制御し、動静脈瘻不全に対する影響を観察する。

4. 研究成果

(1) Sildenafil 投与実験

術後2週間までの動静脈瘻開存率は投与群が 60.7%、対照群が 50.0%で、術後 6 週間までの開存率は投与群 53.6%、対照群は 40.6%で、 Kaplan-Meier 法による検定では有意差を認めなかった(図3)。リモデリング期間中、エコーで体重・心左室内径短縮率・大動脈径・抵抗係数・大静脈径を測定し比較した。術後 2 週間開存例において、1 週間目の大静脈径が投与群で有意に大きかったが、2 週間目には有意差を認めなかった。2 週間目の大動脈系が投与群で有意に大きかった。術後 6 週間開存例において、大静脈径は統計上有意な差を認めないものの、実験群が対照群に比べて拡張している傾向にあった。

組織標本を用いて、6週間開存例において動静脈瘻の肉芽組織と下大静脈の内膜肥厚の厚さを比較した。投与群において肉芽・内膜ともに抑制傾向にあったが、有意差を認めなかった。また、eNOS 抗体を用いて免疫染色を行ったが、現時点で染色状態が不良であり評価できていない。

(2) 糖尿病マウスモデルを用いた実験

ストレプトゾチンをマウスに 60mg/kg で腹腔内投与すると、投与後一週間で継続した高血糖を認め、型糖尿病マウスモデルの作成は確立できた。しかし、糖尿病群に対して大動脈-下大静脈瘻作成術を行ったところ、術後経過中の死亡を多く認めたために、対照群との動静脈瘻開存率の比較はできなかった。

(3) 性差に関する実験

一定の成果が得られ、共同研究施設において論文が発表されるに至った(Kudze et al. JVS Vasc Sci. 2020)。本論文では、雄と雌のマウスに動脈瘻を作成して成熟度を比較した。雌マウスにおいて、リモデリング期間中のエコーで流速の低下とずり応力の低下、層状流の低下が見られ、術後21日目の動脈瘻開存率も劣っていた。術後21日目に採取した下大静脈の組織標本では、雄と比較して雌の KLF-2 と p-eNOS と VCAM-1 の発現が低下しており(図4)、血行力学的な変化の差が雌の動脈瘻成熟能低下に関連し、動脈瘻不全につながることを示唆された。

卵巣摘出による雌マウス閉経モデルの手技確立を試みたものの、卵巣摘出後の死亡率が高く、動脈瘻モデルの作成まで至らなかった。

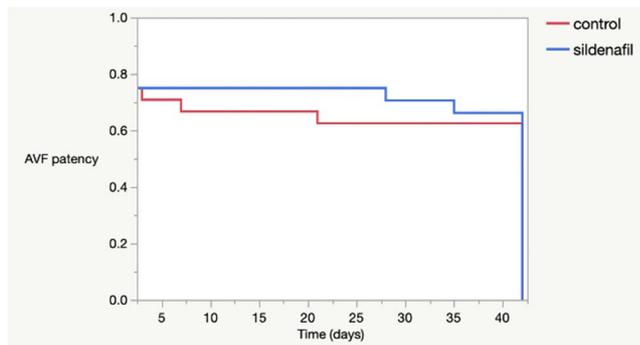


図3

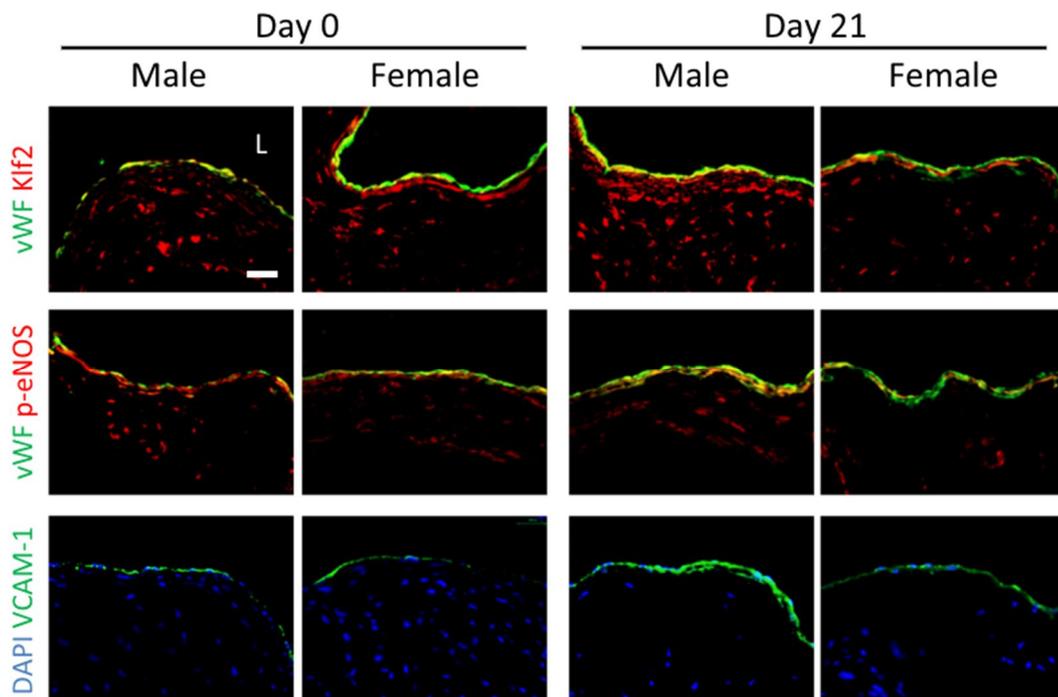


図4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toshihiko Isaji, Shun Ono, Takuya Hashimoto, Kota Yamamoto, Ryosuke Taniguchi, Haidi Hu, Tun Wang, Jun Koizumi, Toshiya Nishibe, Katsuyuki Hoshina, Alan Dardik	4. 巻 149
2. 論文標題 Murine Model of Central Venous Stenosis using Aortocaval Fistula with an Outflow Stenosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e59540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/59540.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Brownson KE, Khosravi R, Lee SR, Goldstein K, Isaji T, Ono S, Protack CD, Humphrey JD, Dardik A.	4. 巻 248
2. 論文標題 Venous Mechanical Properties After Arteriovenous Fistulae in Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 129 136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2019.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Guo X, Fereydooni A, Isaji T, Gorecka J, Liu S, Hu H, Ono S, Alozie M, Lee SR, Taniguchi R, Yatsula B, Nassiri N, Zhang L, Dardik A.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Inhibition of the Akt1-mTORC1 Axis Alters Venous Remodeling to Improve Arteriovenous Fistula Patency.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47542-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sano M, Hoshina K, Kawahara T, Kimura M, Akai T, Isaji T, Yamamoto K, Takayama T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Egg-shell like Calcification as a Protective Factor for Splenic Artery Aneurysm Dilatation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Surgery	6. 最初と最後の頁 193 197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.avsg.2019.08.102.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hu Haidi, Lee Shin-Rong, Bai Hualong, Guo Jianming, Hashimoto Takuya, Isaji Toshihiko, Guo Xiangjiang, Wang Tun, Wolf Katharine, Liu Shirley, Ono Shun, Yatsula Bogdan, Dardik Alan	4. 巻 40
2. 論文標題 TGF (Transforming Growth Factor-Beta)?Activated Kinase 1 Regulates Arteriovenous Fistula Maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 e203 e213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.119.313848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kudze Tambudzai, Ono Shun, Fereydooni Arash, Gonzalez Luis, Isaji Toshihiko, Hu Haidi, Yatsula Bogdan, Taniguchi Ryosuke, Koizumi Jun, Nishibe Toshiya, Dardik Alan	4. 巻 1
2. 論文標題 Altered hemodynamics during arteriovenous fistula remodeling leads to reduced fistula patency in female mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JVS: Vascular Science	6. 最初と最後の頁 42 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvssci.2020.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Isaji T, Hanada K, Matsuura S, Okata S, Ohashi Y, Sano M, Miyahara K, Fukuhara N, Akai T, Takayama T, Hoshina K
2. 発表標題 Long-term outcomes of vein grafts used in distal bypass for critical limb-threatening ischemia
3. 学会等名 International Union of Angiology, Japan Chapter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Isaji T, Hanada K, Matsuura S, Okata S, Ohashi Y, Sano M, Miyahara K, Fukuhara N, Akai T, Takayama T, Hoshina K
2. 発表標題 Predictive ability of the global limb anatomic staging system (GLASS) following distal bypass for chronic limb threatening ischemia
3. 学会等名 the 48th Annual Meeting of Japanese Society for Vascular Surgery
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
研究協力者	保科 克行 (Hoshina Katsuyuki)		

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
---------	---------