

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08601

研究課題名（和文）腎透析のバスキュラーアクセスに用いる新しい素材からなる人工血管の開発

研究課題名（英文）Development of artificial blood vessels made from new materials for use in renal dialysis vascular access

研究代表者

金 徳男（Jin, Denan）

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：90319533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：近年、ePTFE人工血管をアクセスルートとして使用する機会が多いが、その開存率の低さが問題になってきている。

我々はePTFE人工血管移植後、外膜側の線維芽細胞が人工血管壁素材の隙間を介して内腔側へと浸潤し、そこで足場を提供したり、浸潤した線維芽細胞自身が増殖、形質転換して筋線維芽細胞になったりして内膜肥厚を形成し、最終的にバスキュラーアクセス不全に陥ると考えている。本研究では、キマーゼ阻害薬を人工血管外膜側にコーティングしてハムスターやイヌに移植して検討した結果、線維芽細胞の血管内腔内への遊走を有意に抑制することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はePTFE人工血管移植後、外膜側の線維芽細胞が人工血管壁素材の隙間を介して内腔側へと浸潤し、そこで足場を提供したり、浸潤した線維芽細胞自身が増殖、形質転換して筋線維芽細胞になったりして内膜肥厚を形成し、最終的にバスキュラーアクセス不全に陥ると考えている。また、このような線維芽細胞の遊走および増殖、筋線維芽細胞への形質転換には肥満細胞由来のキマーゼが非常に深く関与することも明らかにしてきた。本研究では、キマーゼ阻害薬の人工血管外膜側へのコーティングが線維芽細胞の遊走を有意に抑制することが確認でき、今後の腎透析患者のバスキュラーアクセス不全に対する治療法の開発に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In recent years, ePTFE artificial blood vessels have been frequently used as access routes; however, their low patency rate has become a significant issue.

We found that after the transplantation of ePTFE artificial blood vessels, fibroblasts from the outside invade the inner lumen through the gaps in the artificial vessel wall material. There, they provide scaffolding, proliferate, and transform into myofibroblasts, forming intimal hyperplasia, which ultimately leads to vascular access failure. In this study, we coated the outer membrane of the artificial blood vessels with a chymase inhibitor and transplanted them into hamsters and dogs. As a result, it was found that the migration of fibroblasts into the vascular lumen was significantly suppressed.

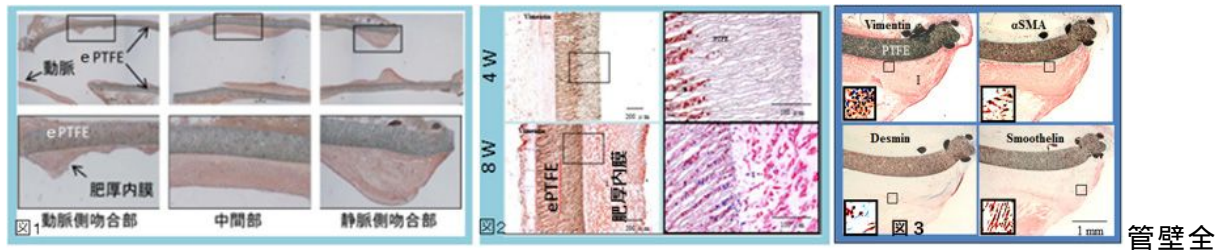
研究分野：j腎透析のための新しい人工血管開発

キーワード：人工血管 腎透析 キマーゼ阻害薬 バスキュラーアクセス不全

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

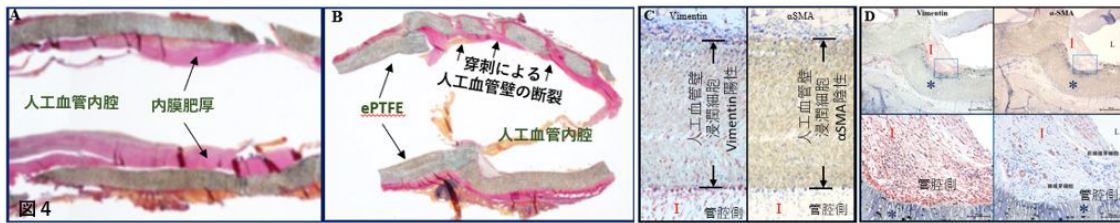
これまでに、我々は科学研究費の助成により、色々な実験動物モデルや実際透析患者から提供された機能不全人工血管の解析を介して、人工血管移植後のバスキュラーアクセス機能不全の機序の一部を明かしてきた。たとえば、図1に示しているように、**ePTFE** 人工血管をイヌの頸動脈と頸静脈間に移植4ヶ月後では、動静脈吻合部以外のところにおいても肥厚が見られるようになる。そして、非常に興味深いことに(図2) 移植4週後までは、静脈と人工血管吻合部以外の管腔内では内膜肥厚が全く見当たらなかった。その時の**ePTFE** 血管壁での線維芽細胞の浸潤距離を測ってみたが、このような外



膜側から内腔へ向けての線維芽細胞の遊走距離は人工血体の約半分程に留まっていた(図2の上部)。しかし、8週後では人工血管素材全壁に渡る線維芽細胞の浸潤が認められ(図2の下部) この時期とあいまって明らかな血管内膜肥厚が認められていた。このようなことは、人工血管移植後の吻合部以外の血管内膜肥厚には外膜からの線維芽細胞の遊走を必要とし、このような細胞の血管内腔側での足場提供が血管内膜肥厚形成の初期段階および肥厚の進展において非常に重要な役割を果たしていることを示唆している。実際、人工血管内の内膜肥厚部位の細胞成分を細胞マーカーであるビメンチンやαSMAなどを用いての免疫染色も行ったところ、図3に示しているように、その肥厚組織の細胞成分の殆どがビメンチン陽性細胞であり、また、それらの殆どの細胞が同時にαSMAを発現していた。このようなことより、**ePTFE** 人工血管移植後の内膜肥厚部位の細胞成分が間葉系細胞である筋線維芽細胞と線維芽細胞より構成されていることが明らかとなった。また、このような線維芽細胞の人工血管壁での遊走および増殖、筋線維芽細胞への形質転換には肥満細胞由来のキマーゼが非常に深く関与することもキマーゼ特異的な阻害薬の投与実験によって証明され、人工血管移植後の血管内膜肥厚の予防におけるキマーゼ阻害薬の有用性も期待されるようになった。

上記のイヌの**ePTFE** 移植モデルから得られた知見が果たして透析患者のバスキュラーアクセス機能不全を実際反映するか否かを検討するため、実際患者から提供された機能不全人工血管を用いて検討を加えてみた。図4のAに示すように、ヒトに移植された機能不全人工血管内腔においても人工血管中間部で著明な内膜肥厚が認められ、そして、長期に渡る穿刺は人工血管壁を破壊し、この隙間からも内膜肥厚に関連する細胞が遊走してくる可能性が示された(図4B)。そして、イヌの人工血管移植モデルで得られた結果と同様に、ヒトに移植された人工血管壁の浸潤細胞はすべてビメンチン陽性細胞であったが、SMAは発現しておらず(図4C)、人工血管移植後の外膜側から遊走細胞はヒトでも筋線維芽細胞ではなく、線維芽細胞が主役であることが示された。そして、人工血管管腔内の内膜肥厚組織の細胞はほとんどがビメンチン陽性であることから(図4D)、ヒトでもやはり線維芽細胞のような間葉系細胞が内膜肥厚組織細胞成分を構成していることが改めて立証された。ここでは示さなかったが、人工血管外膜側や内膜肥厚部位においてはイヌ人工血管移植モデルと同様に、キマーゼ陽性肥満細胞の多数の集積が認められ、肥満細胞由来のキマーゼの活性化がヒトの人工血管移植後の内膜肥厚形成においても非常に重要な役割を果たしている可能性が示された。

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】



2. 研究の目的

昨今、人工血管移植後の内膜肥厚機序に対する研究は疎らで、人工血管の内膜肥厚形成に外膜側の線維芽細胞の管腔内遊走がその管腔内内膜肥厚形成に関与することを指摘された報告は全くなく、また、このような線維芽細胞の遊走・増殖、筋線維芽細胞への形質転換に肥満細胞由来のキマーゼという酵素が非常に積極的にかかわっていることも全く新しい知見である。これまでは、冠動脈狭窄のような自己血管内膜肥厚の形成機序には血管平滑筋の中膜から内腔への遊走説が主流であり (Axel et al. **Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery.** Circulation., **96:636-645, 1997**)、人工血管移植後の内膜肥厚形成にもこのような機序が当てはまると信じられてきた。しかし、我々は間葉系細胞のマーカーであるビメンチンと平滑細胞のマーカーでもある SMA、デスミン、ズムースセリンなどの免疫染色を連続切片で行うことによって人工血管移植後に形成される肥厚細胞成分が平滑筋細胞ではなく、主に線維芽細胞や SMA を形質転換によって獲得した筋線維芽細胞であることを初めて突き止めた。人工血管移植後、外膜側の線維芽細胞の管腔内への遊走を可能にしたのは ePTFE 特有の素材構造に由来する。図 2 をよく観察すると、ePTFE 人工血管壁には壁内外を貫通する無数の隙間が存在し、この隙間は人工血管作製時に引張られることによって形成されたものである。人工血管移植後、外膜側の線維芽細胞がこのような隙間を介して内腔側へと浸潤し、内腔側に到達すると、そこで足場を提供したり、浸潤した線維芽細胞自身が増殖、形質転換して筋線維芽細胞になったりして内膜肥厚形成を引き起こすと考えている。このような遊走、増殖、形質転換には TGF-1 やアンジオテンシン II などが積極的に関与するが、近年、肥満細胞由来のキマーゼがこのような因子の活性化に酵素学的に非常に重要であることも徐々にわかってきている。従って、現在、我々は ePTFE とは別の素材を用いて、線維芽細胞の遊走を食い止められるだけでなく、穿孔にも耐久性をもつ新しい人工血管の開発を試みている最中である。また、線維芽細胞の遊走、増殖および形質転換にはキマーゼが非常に重要な役割を担っている故に、キマーゼ阻害薬の新しい人工血管の吻合部内膜肥厚に対する抑制効果をも合わせて検討するつもりである。

3. 研究の方法

ePTFE 人工血管移植後に、外膜側からの線維芽細胞が人工血管壁に存在する隙間を遊走して人工血管の管腔内の内膜肥厚形成に関与することが明らかになっているが、今回我々が開発した新しい人工血管はこのような遊走を完全に遮断可能なことが試作品 1 号のイヌへの移植実験で判明されている。勿論、これから色々改良を加えないといけないが、今後、ePTFE 人工血管と我々の新しい人工血管をイヌを用いて比較検討することにより、線維芽細胞に対する遊走遮断作用が人工血管内膜肥厚形成への抑制効果につながるかを検討していきたい。我々の予想では、動静脈吻合部から若干離れた人工血管内の内膜肥厚には非常に効果的ではないかと考えている。吻合部周辺の内膜肥厚は自家動静脈に存在する線維芽細胞の管腔内遊走が重要であることも我々の研究によって明らかになってきている。従って、吻合部周辺の内膜肥厚は新しい人工血管でも形成されると予想され、キマーゼ阻害薬の使用法

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

なども工夫しながらより理想的な人工血管の開発を目指したい。

4. 研究成果

近年、ePTFE 人工血管をアクセスルートとして使用する機会が多いが、その開存率の低さが問題になってきている。

我々は ePTFE 人工血管移植後、外膜側の線維芽細胞が人工血管壁素材の隙間を介して内腔側へと浸潤し、そこで足場を提供したり、浸潤した線維芽細胞自身が増殖、形質転換して筋線維芽細胞になったりして内膜肥厚を形成し、最終的にバスキュラーアクセス不全に陥ると考えている。本研究では、キマーゼ阻害薬を人工血管外膜側にコーティングしてハムスターやイヌに移植して検討した結果、線維芽細胞の血管内腔内への遊走を有意に抑制することが明らかになり、今後の腎透析患者のバスキュラーアクセス不全に対する治療法の開発に貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 13件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Nishimura Hiromi, Jin Denan, Kinoshita Ichita, Taniuchi Masataka, Higashino Masaaki, Terada Tetsuya, Takai Shinji, Kawata Ryo | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Increased Chymase-Positive Mast Cells in High-Grade Mucoepidermoid Carcinoma of the Parotid Gland | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 8267 ~ 8267 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24098267 | 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 - |
| 1. 著者名 Lapointe Catherine, Vincent Laurence, Giguere Hugo, Auger Messier Mannix, Schwertani Adel, Jin Denan, Takai Shinji, Pejler Gunnar, Sirois Martin G., Tinel Hanna, Heitmeier Stefan, D'Orleans Juste Pedro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Chymase Inhibition Resolves and Prevents Deep Vein Thrombosis Without Increasing Bleeding Time in the Mouse Model | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association | 6. 最初と最後の頁 e028056 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.122.028056 | 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 Shimada Kazumi, Hamabe Lina, Hirose Miki, Watanabe Momoko, Yokoi Aimi, Takeuchi Aki, Ozai Yusuke, Yoshida Tomohiko, Takai Shinji, Jin Denan, Kocaturk Meric, Uehara Katsumi, Tanaka Ryou | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Plasma Chymase Activity Reflects the Change in Hemodynamics Observed after the Surgical Treatment of Patent Ductus Arteriosus in Dogs | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Veterinary Sciences | 6. 最初と最後の頁 682 ~ 682 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci9120682 | 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 - |
| 1. 著者名 Takai Shinji, Jin Denan | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Pathophysiological Role of Chymase-Activated Matrix Metalloproteinase-9 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biomedicines | 6. 最初と最後の頁 2499 ~ 2499 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10102499 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Yoneyama Hiroki, Hosohata Keiko, Jin Denan, Yoshida Iroha, Toyoda Miyui, Kitamura Ikuko, Takai Shinji, Usami Yoshihide | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Design, synthesis, and evaluation of new vanin-1 inhibitors based on RR6 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry | 6. 最初と最後の頁 116791 ~ 116791 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116791 | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Fujita Yasushi, Jin Denan, Mimura Masashi, Sato Yohei, Takai Shinji, Kida Teruyo | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Activation of Mast-Cell-Derived Chymase in the Lacrimal Glands of Patients with IgG4-Related Ophthalmic Disease | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2556 ~ 2556 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052556 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Morishita Seita, Sato Takaki, Oosuka Shou, Horie Taeko, Kida Teruyo, Oku Hidehiro, Nakamura Kimitoshi, Takai Shinji, Jin Denan, Ikeda Tsunehiko | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Expression of Lymphatic Markers in the Berger 's Space and Bursa Premacularis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2086 ~ 2086 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22042086 | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ikeda Tsunehiko, Nakamura Kimitoshi, Morishita Seita, Sato Takaki, Horie Taeko, Kida Teruyo, Oku Hidehiro, Takai Shinji, Jin Denan | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Decreased Presence of Mast Cells in the Bursa Premacularis of Proliferative Diabetic Retinopathy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Ophthalmic Research | 6. 最初と最後の頁 1002 ~ 1012 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000518438 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Hosohata Keiko, Jin Denan, Takai Shinji | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 In Vivo and In Vitro Evaluation of Urinary Biomarkers in Ischemia/Reperfusion-Induced Kidney Injury | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 11448 ~ 11448 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111448 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Kuramoto Toru, Jin Denan, Komeda Koji, Taniguchi Kohei, Hirokawa Fumitoshi, Takai Shinji, Uchiyama Kazuhisa | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Chymase as a Novel Therapeutic Target in Acute Pancreatitis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 12313 ~ 12313 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212313 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Kinoshita Ichita, Jin Denan, Higashino Masaaki, Terada Tetsuya, Kurisu Yoshitaka, Takai Shinji, Kawata Ryo | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Increase in Chymase-Positive Mast Cells in Recurrent Pleomorphic Adenoma and Carcinoma Ex Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 12613 ~ 12613 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312613 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hosohata Keiko, Jin Denan, Takai Shinji | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Glucocalyxin A Ameliorates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Injury in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell Line HK-2 Cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 446 ~ 446 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010446 | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yoshizaki Yuta, Nagata Takuya, Fujiwara Soichiro, Takai Shinji, Jin Denan, Kuzuya Akinori, Ohya Yuichi | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Postoperative Adhesion Prevention Using a Biodegradable Temperature-Responsive Injectable Polymer System and Concomitant Effects of the Chymase Inhibitor | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials | 6. 最初と最後の頁 3079 ~ 3088 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.0c01467 | 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 | 高井 真司 (Takai Shinji) (80288703) | 大阪医科薬科大学・医学研究科・教授 (34401) | |

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 |
|---------|---------|