

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21590295
研究課題名（和文）	人工血管管腔狭窄における機序の解明とキマーゼ阻害薬を中心とした治療法の探索
研究課題名（英文）	Investigation of the mechanisms involving PTFE graft occlusion and searching its pharmacotherapeutics with chymase inhibitor.
研究代表者	
金 徳男	(Jin Denan)
大阪医科大学・医学部・講師	
研究者番号：	90319533

研究成果の概要（和文）：PTFE グラフト移植後の外膜側から線維芽細胞の遊走がその管腔内内膜肥厚の形成に關与する可能性が示唆されてきた。本研究では現在広く使用されてきた多孔構造を有する PTFE 人工血管と近年日本で開発された中層無孔体からなるグラシル（Grasil）人工血管を用いて比較検討し、PTFE 人工血管移植後の血管内膜肥厚にはその外膜側からの線維芽細胞の遊走が非常に重要な役割を果たしていることを証明した。

研究成果の概要（英文）：The inside neointima formation of polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts may be associated with the migration of outside fibroblasts to the luminal surfaces. In this study we have demonstrated that the migration of outside fibroblasts into inside of the PTFE grafts is indeed participated in the neointima formation by performing a comparative investigation with use of two different types of prosthetic vessels, the porous PTFE graft and the impermeable_Grasil graft, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,600,000	1,050,000	4,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：人工血管、PTFE、グラシル、狭窄、アンジオテンシン II、キマーゼ。

1. 研究開始当初の背景

近年、腎透析レベルの向上によって末期腎不全患者のライフスパンが十数年～数十年も延長されるようになった。透析患者は週3回血液透析を行わなければならない。短時間

の透析で効率よく血液を浄化するには穿刺しやすく、かつ血流量の豊富な血管の確保が不可欠である。ゆえに、通常臨床では透析を必要とされる患者に動静脈シャント術（内シャント）あるいは動静脈間人工血管移植術（人工血管グラフト）が施される。しかし、

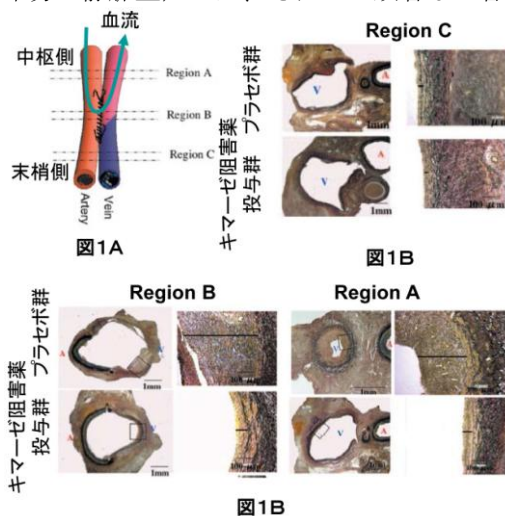
このように作製された血液アクセスルート
のいずれも、その後の血管内膜肥厚による内
腔狭窄によって十分な血液量が確保できず、
新たなルートの作製が強いられるようになる。
近年、日本やアメリカをはじめとする先進
国ではこのような再建術に使われる医療費
が年々上昇し、国家医療保険制度に多大な
負担をかけているだけではなく、患者様にお
ける肉体的と経済的な損失も非常に大きい。
しかし、未だに血液アクセス不全に対する有
効な治療法などが開発されていないのが現
状である。

本研究の目的であるが、従来の人工血管
(PTFE) と最近開発された人工血管 (グラ
ジル) を用いて移植後の血管内膜肥厚特徴を
比較検討することにより血液アクセス不全
の機序を解明すると同時にキマーゼ阻害薬
をはじめとする種々のレニン-アンジオテ
ンシン系 (RAS) 抑制薬との併用効果を評
価することにより血液アクセス不全に対す
る新しい治療法を模索する。

① 研究の学術的背景

1) イヌ内シャント作製後の血管内膜肥厚 の特長とその病態におけるレニン-ア ンジオテンシン系の重要性 (Jin et al., J Am Soc Nephrol 16:1024-1034, 2005)

本研究ではイヌの上腕動脈と静脈との
間にシャント術を施し (図1 A)、術一ヶ
月後の血管内膜肥厚特徴について検討を
加えた。図1 Bで示すように、術後一ヶ月
において、血流動態の影響をあまりうけ
ない末梢側 (Region C) の動静脈および動
静脈吻合部 (Region B、左半分: 動脈壁;
左半分: 静脈壁) では、それほど顕著な血管



内膜肥厚を認めなかった。しかし、動脈血
の流出口にあたる中枢側の静脈 (Region
A) においては血管全壁における顕著な血
管内膜肥厚が認められた。このような血管
内膜肥厚部位において、大量のキマーゼ陽
性細胞の浸潤とその局在とほぼ一致する
アンジオテンシン I I (Ang II) および
TGF- β 1 陽性染色像が認められた (近年、
Ang II および TGF- β 1 の産生には肥満細
胞由来のキマーゼが酵素学的に非常に重
要であることが明らかになっている)。こ
のような血管内膜肥厚はキマーゼ阻害薬
の投与により大きく抑制され、動静脈シャ
ント作製後の血管内膜肥厚におけるキマ
ーゼの重要性が示された。

2) イヌ人工血管移植後 (PTFE) の血管 内膜肥厚の特長とその病態におけるレ ニン-アンジオテンシン系の重要性 (Jin et al., Life Sci., 81:1921-1300, 2007)

我々はイヌを用いて人工血管移植モデル
を作製し、その後の血管内膜肥厚特徴、キマ
ーゼ、Ang II および TGF- β 1 の分布およびキ
マーゼ阻害薬の血管内膜肥厚に対する効果
を検討した。図2に示されるように、移植2
週後では人工血管と静脈との吻合部に局限
して軽度な血管内膜肥厚が認められたが、そ
の4週、8週後では、このような血管内膜肥
厚がより顕著となり、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った。キマ
ーゼ阻害薬である NK3201 の投与は人工血管
移植8週後の内膜肥厚を著明に抑制した。ま
た、人工血管移植後の血管内膜肥厚部位とそ
の周辺部における多数のキマーゼ陽性細胞
の集積、Ang II および TGF- β 1 の増加を認
めた。本モデルにおいて、キマーゼ阻害薬の
投与は吻合部およびそれ以外の部位におけ
る血管内膜肥厚を有意に抑制することから、
人工血管移植後の血管内膜肥厚におけるキ
マーゼの重要な役割が示された。

本研究を介して、人工血管移植後の血管内
膜肥厚における非常に興味深く、これまでに
報告されていなかった全く新しい機序を示
唆する現象を捉えている。

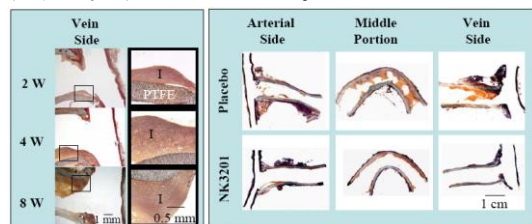


図2

図3に示されるよう、移植4週後では、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い。その時の血管素材中の線維芽細胞の浸潤度合いは外膜側から内腔に向けて約半分程度に留まっている (図3の上部)。

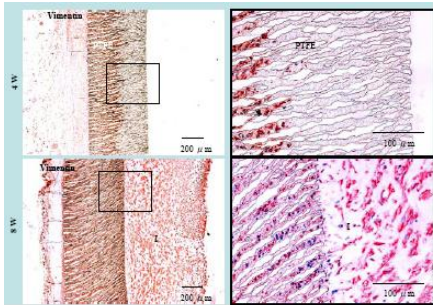


図3

しかし、8週後では素材全壁に渡る線維芽細胞の浸潤が認められ (図3の下部)、この時期とあいまって明かな血管内膜肥厚が認められた。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浸潤を必要とし、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最初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。

2. 研究の目的

イヌを用いて、従来の多孔体 PTFE 人工血管と最近開発され、内外層多孔体および中層無孔体の三層からなる人工血管グラジルを同一個体で比較検討することにより細胞外からの細胞浸潤、遊走の血管内膜肥厚への関与を明らかにする。

また、PTFE人工血管移植後の内膜肥厚形成におけるキマーゼ阻害薬の人工血管移植局部での徐放効果を検討し、人工血管移植後の外膜側の線維芽細胞の遊走と、その結果として起こる内膜肥厚におけるキマーゼ依存性アンジオテンシン I I 産生経路の役割を解明したい。

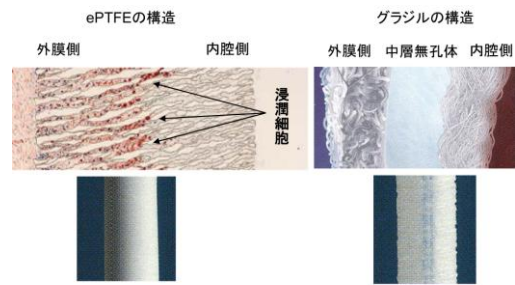
3. 研究の方法

① PTFE (多孔体人工血管) とグラジル (内外層多孔体、中層無孔体の三層構造を有する人工血管) の血管内膜肥厚特徴の同一固体での比較検討

従来の多孔体 PTFE 人工血管では移植後の外膜からの線維芽細胞の浸潤が血管内膜肥厚形成の最初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が考えられる。図4に示すように、PTFEには人工血管内外を結ぶ多数の間隙が存在し、人工血管外膜の線維芽細胞が移植後このような間隙に沿って管腔内へと遊走する。グラジルは中層が無孔体であるゆえに、このような線維芽細胞の浸潤を阻止可能と考えられ

る (図4)。

方法として、内径6mm、長さ100mm



従来のePTFEとグラジルの構造学的の相違

図4

の PTFE とグラジルを8~10kgのビーグル犬の左右大腿動脈の静脈の間にループ状にそれぞれ移植し、その2ヶ月と4ヶ月後に標本を摘出した。

② イヌPTFE人工血管移植後のキマーゼ阻害薬徐放効果の検討

イヌの頸部動静脈間に PTFE 人工血管を移植し、その人工血管周囲にボルフィールとキマーゼ阻害薬徐放剤を塗布し、ボルフィール単独塗布群と移植2ヶ月と4ヶ月後に内膜肥厚度を評価した。

4. 研究成果

① PTFEとグラジルの血管内膜肥厚特徴の同一固体での比較検討

図5はPTFE人工血管移植1ヶ月、2ヶ月と4ヶ月後の人工血管壁への線維芽細胞の遊走進達度を示している。また、人工血管移植後の管腔内血流による内圧の変動によっても線維芽細胞の遊走速度が変化するのでPTFE人工血管を皮下に留置する群も同時に作製した。移植1ヶ月の時点での線維芽細胞の遊走は外膜側から内腔側に完全に到達していなかった。このような時期では中間部位における血管内膜肥厚は全く見当たらなかった。しかし、移植2ヶ月と4ヶ月後では線維芽細胞の遊走が人工血管全壁に

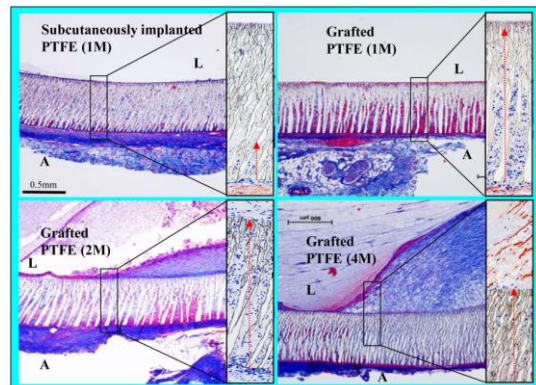


図5

行き渡っており、このような部位でフォーカルな血管内膜肥厚が顕著に見られていた。一

方、皮下移植されて人工血管における線維芽細胞の進達度は動静脈間に移植された群より有意に浅かった。

図6はPTFEとグラシル人工血管移植2ヶ月と4ヶ月後の血管内膜肥厚割合を示している。PTFEグラフトの内膜肥厚は動脈吻合部、静脈吻合部およびその中間部位の

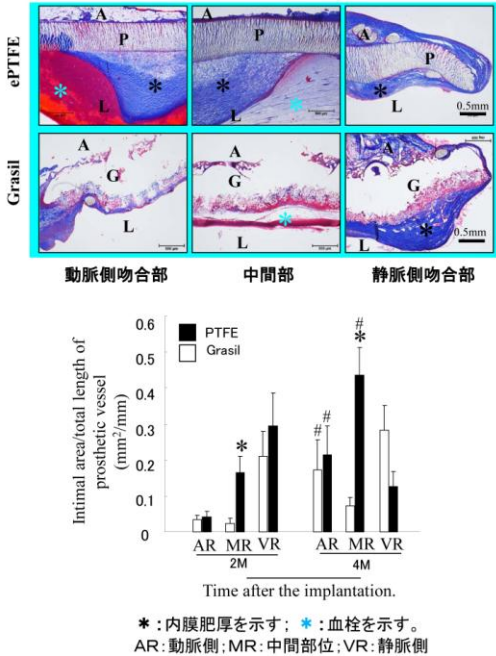


図6
いずれの部位において時間依存的に増加していたが、グラシルグラフトでは動静脈吻合部を除き、中間部位では内膜肥厚が殆ど認められていなかった。このようなことは人工血管移植後に外膜側から遊走してくる線維芽細胞がPTFE人工血管移植後の中間部血管内膜肥厚の形成・進展に非常に重要な役割を果たしていることを示している。

図7に示しているように人工血管素材へ遊走してきた細胞はビメンチン陽性、そしてαSMA陰性であり、線維芽細胞の特徴を備えており、しかも活発的に増殖していることがPCNA染色で捉えられていた。また、A

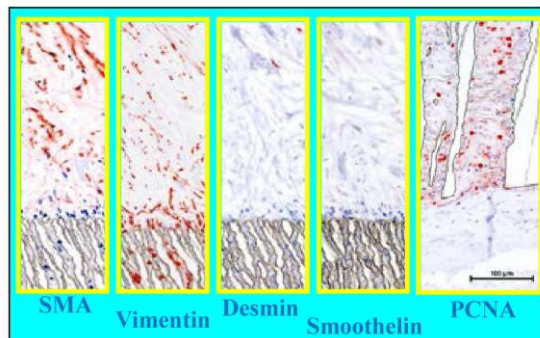


図7
CEやキマーゼをはじめとするレニン-アンジオテンシン系諸要素がPTFE移植後の血管周囲で大量に発現していることも裏

つけている(図8)。

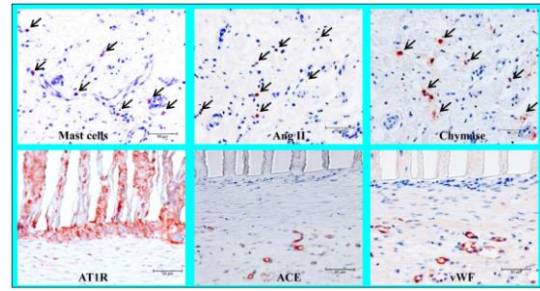


図8

② イヌPTFE人工血管移植後のキマーゼ阻害薬徐放効果

本研究ではPTFE人工血管移植時に移植された人工血管周囲にボルフィールとキマーゼ阻害薬徐放剤を塗布し、移植2ヶ月と4ヶ月後に内膜肥厚度を評価してみた。図9に示すように、PTFE人工血管移植後の血管

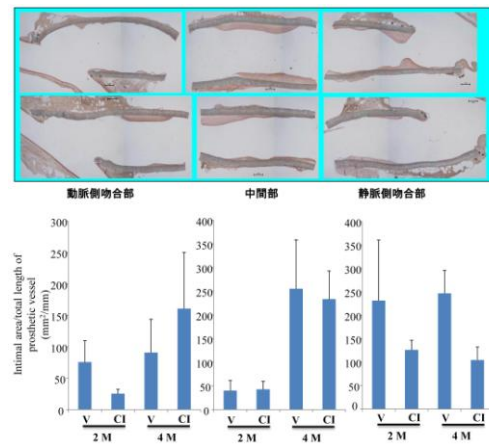


図9

内膜肥厚は移植2ヶ月と4ヶ月後に特に静脈の吻合部で顕著に抑制されている傾向にあったがその他の部位では抑制効果が弱く、キマーゼ阻害薬の徐放剤の散布量やその他薬物、例えば、抗癌剤などとの併用効果の模索を必要とすると考えられた。

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19件)

① Jin D, Takai S, Li Z, et al. Outside fibroblasts play a key role in the development of Inner neointima after the implantation of polytetrafluoroethylene grafts. J Pharmacol Sci, 査読有, (in press).

② Kojima S, Sugiyama T, Takai S, Jin D, et al. Effects of gelatin hydrogel containing chymase inhibitor on scarring in a canine filtration surgery model. Invest

Ophthalmol Vis Sci. 査読有, 2011, 52:7672-7680.

③ Takai S, Jin D, Miyazaki M. Targets of chymase inhibitors. Expert Opin Ther Targets. 査読有, 2011, 15:519-527.

④ Takai S, Jin D, Miyazaki M. Chymase as an important target for preventing complications of metabolic syndrome. Curr Med Chem, 査読有, 2010, 17, 3223-3229.

⑤ Inoue N, Jin D, Takai S, et al. Effects of chymase inhibitor on angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm development in apolipoprotein E-deficient mice. Atherosclerosis, 査読有, 2009, 204 (2), 359-364.

⑥ Simard E, Jin D, Takai S, et al. Chymase-dependent conversion of exogenously administered big endothelin-1 in the mouse in vivo. J Pharmacol Exp Ther, 査読有, 2009, 328 (2), 540-548.

⑦ Jin D, Takai S, et al. Long-term angiotensin II blockade may improve not only hyperglycemia but also age-associated cardiac fibrosis. J Pharmacol Sci, 査読有, 2009, 109 (2), 275-284.

[学会発表] (計 10 件)

① Takai S, Jin D, Miyazaki M. Chymase as a useful target to prevent abdominal aortic aneurysm. Keystone Symposia, 2011 年 1 月 26 日、リノ、米国。

② 高井真司、金徳男、宮崎瑞夫、キマーゼ阻害薬による腹部大動脈瘤進展予防の可能性 (シンポジウム) 第 38 回薬物活性シンポジウム、2010 年 11 月 11 日、札幌

③ Takai S, Jin D, et al. Combination therapy with angiotensin receptor blocker and T- and L-type calcium channel blocker for attenuation of proteinuria in Dahl-salt sensitive rats. 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2010 年 9 月 26 日 September 26th, Vancouver, Canada.

④ 高井真司、金徳男、宮崎瑞夫、キマーゼ阻害薬のターゲット疾患について (シンポジウム)、第 15 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2010 年 8 月 20 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 徳男 (Jin Denan)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90319533

(2) 連携研究者

高井 真司 (Takai Shinji)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80288703