

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590336

研究課題名(和文)人工血管移植後の外膜側線維芽細胞の遊走と血管内腔狭窄の機序の解明と治療法の探索

研究課題名(英文) Mechanistic and therapeutic investigation of the outside fibroblasts involving the inner neointima formation after implantation of PTFE grafts.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：透析患者の血管アクセスルートの確保には動静脈シャント術(内シャント)がポリテトラフルオロエチレン(PTFE)の動静脈間移植術(外シャント)が通常施される。しかし、末期腎臓疾患を有する患者においては内シャント術を施すのに適する血管が殆どなく、外シャントを血管アクセスルートとする患者が近年増加しつつある。不幸にも、外シャントを血管アクセスルートとして使用可能な期間は二年足らず、その治療や再手術に費やす医療保険コストが膨らみ、臨床上大きな問題となってきている。

本報告書ではイヌ外シャントモデルにおける薬物的と物理的な治療法に関する試みを紹介したい。

研究成果の概要(英文)：The most common way to provide vascular access for hemodialysis in patients is to either create a native arteriovenous (AV) fistula or to graft an artificial vessel made by polytetrafluoroethylene (PTFE) between a native artery and vein in a clinical setting. However, the creation of a native AV fistula is often restricted due to the lack of suitable vascular sites in patients with end-stage renal disease. Thus, the AV graft currently accounts for the majority of vascular access routes in hemodialysis patients. Unfortunately, in most cases, patency of the AV graft as vascular access route is often less than 2 years. Therefore, not only the economic costs for this type of treatment, but also the need for surgical revision to correct the poor patency rate in hemodialysis patients has become a very big problem.

In this report, we will introduce our attempts for the treatment of vascular access failure in the dog AV graft models by using pharmacological and physical fashions.

研究分野：医歯薬学

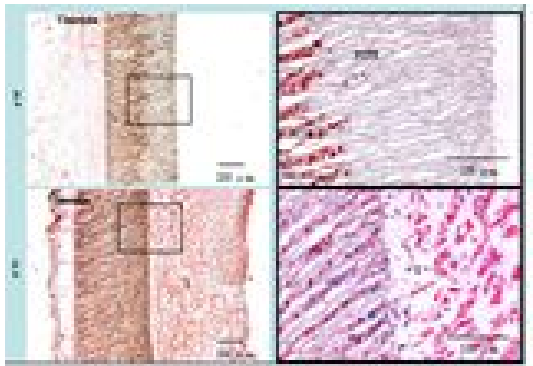
キーワード：PTFE 人工血管 内腔狭窄 キマーゼ キマーゼ阻害薬

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てきているが、それに伴う血液アクセス不全が医療費のコスト面だけでなく透析患者自身にも甚大な苦痛を与えてきている。特に現在広く使用されているPTFE素材の人工血管の移植後の血栓と内膜肥厚によるアクセス不全が最も顕著であり、1～2年で再手術を必要とされるのが現状である。

これまでに、我々は腎透析患者の血液アクセス不全の機序を解明するために色々な実験動物モデルで検討を重ねてきた。去年までの科学研究費のお蔭で血液アクセス不全と密接に関連する内膜肥厚の機序の一部も明らかにしてきている。

たとえば、PTFE人工血管をイヌに移植四カ月後では、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い。その時のPTFE素材中の線維芽細胞の浸潤具合は外膜側から内腔に向けて約半分程度に留まっている(下図の上部)。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(下図の下部)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(**Jin et al., Life Sci., 81:1921-1300, 2007**)



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。

そして、もし外膜側の線維芽細胞の遊走を物理的に、あるいは薬理的に阻止しうらば、少なくともPTFEグラフト中間部の血管内膜肥厚が抑制されることが考えられる。そこで、我々は更なる検討を試みた。近年、日本で新しく開発された人工血管グラシル(Grasil)は三層構造を有し、従来のPTFE人工血管と異なり、中膜が無孔体である。故に、移植後の外膜側からの細胞遊走を完全に遮断可能である。従って、グラシルとPTFE人工血管をイヌのそれぞれの左右の頸部動静脈に移植し、その後内膜肥厚の特徴を四カ月まで検討してみた。結果、グラシル群の総血管内膜肥厚がPTFEより有意に少なく、吻合部以外のところでは血管内膜肥厚が全く認められなかった(**Jin et al., J Pharmacol Sci.119:139-149, 2012**)。このようなことより、人工血管移植後の中部血管内膜肥厚には人工血管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が示された。

また、人工血管移植後に外膜側においてキマーゼをはじめとするレニン-アンジオテンシン系(RAS)の諸要素が活性化されることから(**Jin et al., J Am Soc Nephrol 16:1024-1034, 2005**)、キマーゼ徐放剤のPTFE外膜側への塗布効果を検討した結果、外膜側の線維芽細胞の遊走抑制に伴う血管内膜肥厚の抑制効果も認められており、PTFE移植後に認められる線維芽細胞の遊走と血管内膜肥厚には外膜側でのRASの活性化が非常に重要な役割を果たしていることも示された。上記のエビデンスを踏まえて考えると、人工血管移植後の血液アクセス不全を改善するには、勿論、移植後の外膜側からの線維

芽細胞の遊走や増殖を如何に抑えるかがポイントとなる。

2. 研究の目的

これまでに線維芽細胞の遊走や血管内膜肥厚に有効とされてきたキマーゼ阻害薬と抗がん剤（パクリタキセル）などのそれぞれと各自の併用効果を検討すると同時に、血液アクセス不全には血栓形成も深く関与するので COX 阻害薬（インドメタシン）の併用効果も併せて検討していきたい。

3. 研究の方法

PTFE 人工血管移植後の血管内内膜肥厚には線維芽細胞の外膜側の遊走・増殖が非常に大事であり、そのイベントには外膜で大量に産生するアンジオテンシン II (AngII) や TGF- β 1 などが重要な役割を果たしている。キマーゼは AngII を産生する酵素として知られるだけでなく、他方ではラテント型 TGF- β 1 から活性型の TGF- β 1 の変換などといった酵素学的な役割も果たしている。線維芽細胞の増殖や形質転換には AngII や TGF- β 1 が深く関与している。従って、キマーゼ阻害薬に血栓予防の目的でインドメタシンを、そして線維芽細胞の増殖をより有効に抑制するためには抗癌剤であるパクリタキセルを併用しそれぞれの単独効果を比較検討したい。

4. 研究成果

平成 24 年ではまずはキマーゼ阻害薬である Suc-Val-Pro-Phep(OPh)₂ の徐放効果が PTFE 人工血管移植後の血管内膜肥厚に対して有効か否かを検討した。方法として、ホソカワミクロンにキマーゼ阻害薬 (2 mm g) そして、ホソカワミクロンに FITC をそれぞれ封入し、PTFE 人工血管壁 (直径: 6 mm; 長さ: 7 cm) へ浸透させた。その後、ビーグル犬 4 頭の左右の頸動脈間にそれぞれ移植し、2 ヶ月後にサンプルを採取した。採取された PTFE 人工血管を三等分し、カ

ルノア固定後にパラフィンブロックを作製した。HE 染色後の血管内膜肥厚度を比較検討したが、両群間で著明な差がなく、今後薬物封入術や人工血管へ薬物付着方法の改良が求められた。

また、これまでに、我々は PTFE 人工血管移植後の管腔内血管内膜肥厚の形成には移植後の血管周囲からの線維芽細胞の管腔内への遊走が非常に重要であることを指摘してきた。そこで、今回は PTFE 人工血管 (直径: 6 mm; 長さ: 7 cm) の周囲にフィルムを取り巻き、このような線維芽細胞の遊走に対する物理的な遮断効果が移植後の管腔内血管内膜肥厚の形成へ抑制につながるか否かを検討した。方法として、ビーグル犬 4 頭の左右の頸動脈と静脈間にそれぞれフィルムを取り巻いた PTFE 人工血管と通常のもの移植し、その 3 ヶ月後に管腔内の血管内膜肥厚度を検討してみた。結果、フィルムを取り巻いた PTFE 人工血管内の血管内膜肥厚度が対照群に比べて有意に少なく、これまでの我々の仮説が強く支持された。

平成 25 年度では、ホソカワミクロンのナノ粒子が薬物徐放キャリアとしてどれくらい持続可能かを検討した。方法として、PTFE 人工血管をハムスターの皮下に移植し、その周囲に 5% FITC 封入ナノ粒子懸濁液を散布した。その 1、2、4 と 8 週間後にサンプルを摘出し、凍結切片作成後、FITC の発光状態を調べた。術前の FITC 封入懸濁液の蛍光度は非常に強かったが、皮下移植された PTFE 人工血管グラフト周囲においてはいずれの時点でも明瞭な蛍光発色が検出されなかった。FITC 封入ナノ粒子懸濁液を室温に放置しても 2 週間までは蛍

光を観察されていたことから、ナノ粒子が移植後に血流によって流された可能性が考えられた。前年度のイヌ人工血管移植モデルにおけるキマーゼ阻害薬の無効が当現象によるものではないかと考えられた。今後、局所で限局して徐放可能なキャリアの選定が課題となる。

また、人工血管移植後の血栓、内膜肥厚に対するアスピリンとマイトマイシンの有効性をも検討した。方法として、アスピリンとマイトマイシンを P T F E 人工血管外膜側にコーティングし、イヌの右頸動脈に移植し、その左側に未処理の P T F E 人工血管をコントロールとして移植した。移植直後エコーのドプラーで血流量を測定してみたが、殆どが血流の流れがあまり良くなかった。術二ヶ月後にサンプルを回収したが、薬物処理有無を問わず、非常に顕著な管腔内血栓が認められた。頭部へ流れる血流が鼠蹊部より遅いの原因ではないかと考えた。

平成 26 年度では、ペプチド性キマーゼ阻害薬とパクリタキセルの長期併用効果を検討するため、犬 4 頭の左右の頸動脈間に P T F E 人工血管壁（直径：6 mm；長さ：7 cm）をそれぞれ移植した。頸部の切口を吻合する前に、左の P T F E 人工血管移植部位にはキマーゼ阻害薬とインドメタシンをそれぞれ含有するアルゼット浸透圧ポンプを設置し、右の P T F E 人工血管移植部位にはキマーゼ阻害薬、パクリタキセルおよびインドメタシンをそれぞれ含有するアルゼット浸透圧ポンプを設置した。アルゼット浸透圧ポンプは一ヶ月ごとに交換した。その四ヶ月後、P T F E 人工血管を採取し、血管内膜肥厚度や人工血管壁への外膜からの線維芽細胞の浸潤度などを検討した結果、左右のいずれの人工血管内の血管内膜肥厚度がこれまでのビークル群とあまり差がなかった。また、血

栓形成予防効果を期待してインドメタシンの投与を行ったが、人工血管内腔内の血栓形成にもビークル群（これまでの既存データとの比較）と有意な差がなく、左右の差も認められなかった。その詳細な原因は不明ではあるが、浸透圧ポンプから遊離される薬剤が人工血管移植部位全体をカバーできなかったことが考えられた。

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 12 件)

Takai S, Sakonjo H, Jin D, Significance of vascular dipeptidyl peptidase-4 inhibition on vascular protection in Zucker diabetic fatty rats. J Pharmacol Sci. 査読有 125, 2014; 386- 193.

Takai S, Jin D, Chen H, Li W, Yamamoto H, Yamanishi K, Miyazaki M, Higashino H, Yamanishi H, Okamura H. Chymase inhibition improves vascular dysfunction and survival in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 査読有 32, 2014, 637-648;

doi: 10.1097/HJH.0000000000000231.

Imai Y, Takai S, Jin D, Komeda K, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M, Uchiyama K. Chymase inhibition attenuates lipopolysaccharide/ d-galactosamine-induced acute liver failure in hamsters.

Pharmacology. 査読有 93, 2014, 47-56.

doi: 10.1159/000357684.

Takai S, Jin D, Sakonjo H, Takubo T, Nakanishi T. Significance of the vascular concentration of angiotensin II-receptor blockers on the mechanism of lowering blood pressure in spontaneously hypertensive rats. J Pharmacol Sci. 査読有 123, 2013, 371-379.

Takai S, Jin D, Yamamoto D, Li ZL, Otsuki Y, Miyazaki M. Significance of matrix metalloproteinase-9 inhibition by imidapril for prevention of abdominal aortic aneurysms in angiotensin II type 1 receptor-knockout mice. *J Pharmacol Sci*. 査読有 123, 2013, 185-194.

Masubuchi S, Komeda K, Takai S, Jin D, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M, Uchiyama K. Chymase inhibition attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in hamsters. *Curr Med Chem*. 査読有 20, 2013, 2723-2729.

Masubuchi S, Takai S, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M, Uchiyama K. Chymase inhibitor ameliorates hepatic steatosis and fibrosis on established non-alcoholic steatohepatitis in hamsters fed a methionine- and choline-deficient diet.

Hepatol Res 査読有 43, 2013, 970-978. doi: 10.1111/hepr.12042.

Nakanishi T, Takai S, Jin D, Takubo T. Quantification of Candesartan in Mouse Plasma by MALDI-TOFMS and in Tissue Sections by MALDI-Imaging Using the Stable-Isotope Dilution Technique. *Mass Spectrom (Tokyo)*. 査読有 2, 2013; A0021.

doi: 10.5702/massspectrometry.A0021.

Takai S, Jin D, Aritomi S, Niinuma K, Miyazaki M. Powerful vascular protection by combining cilnidipine with valsartan in stroke-prone, spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 査読有 36, 2013, :342-348. doi: 10.1038/hr.2012.187.

Fujisaka T, Hoshiga M, Hotchi J, Takeda Y, Jin D, Takai S, Hanafusa T, Ishizaka N.

Angiotensin II promotes aortic valve thickening independent of elevated blood pressure in apolipoprotein-E deficient mice. *Atherosclerosis*. 査読有 226, 2013, 82-87. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.055.

Jin D, Takai S, Li Z, Sakonjo H, Otsuki Y, Shibayama Y, Miyazaki M. Outside fibroblasts play a key role in the development of inner neointima after the implantation of polytetrafluoroethylene grafts. *J Pharmacol Sci*. 査読有 119, 2012; 139-149.

Takai S, Jin D, Miyazaki M. Multiple mechanisms for the action of chymase inhibitors. *J Pharmacol Sci*. 査読有 118, 2012, 311-316.

〔学会発表〕(計 12 件)

国際学会

Role of chymase in acute liver failure of hamsters induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine: Imai Y, Takai S, Jin D, Komeda K, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M. Uchiyama K. *Digestive Disease Week 2014*. Chicago, USA, 2014

Chymase inhibitor, TY-51469, attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in hamsters: Masubuchi S, Takai S, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Hayashi M, Uchiyama K. *European Cancer Congress 2013*, Amsterdam, Netherland, 2013.

A chymase inhibitor, ty-51469, ameliorates already formed hepatic steatosis and fibrosis in a hamster nonalcoholic steatohepatitis (nash) model: Masubuchi S, Takai S, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Hayashi M, Uchiyama K. *63th Annual meeting of American Association for the Study of Liver Diseases*. Boston, USA, 2012

国内学会

ハムスター lipopolysaccharide/
D-galactosamine誘発性急性肝不全にお
けるキマーゼの役割: 今井義朗, 高井真司,
金徳男, 米田浩二、田代圭太郎, 林道廣,
内山和久. 第50回日本肝臓学会総会、東京
、2014年

高血圧自然発症ラットの降圧機序にお
けるアンジオテンシンII受容体拮抗薬の血
管組織濃度の重要性: 高井真司、金徳男
、左近上博司、田窪孝行、中西豊文. 第
87回日本薬理学会総会、仙台、2014年

脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの血
管障害におけるキマーゼの役割: 高井真
司、金徳男、陳紅、李文、山本英幸、山
西恭輔、宮崎瑞夫、山西博道、
岡村春樹. 第36回日本高血圧学会総会、
大阪、2013年

イヌ眼球癒着モデルにおけるキマーゼ阻
害薬の結膜癒着抑制: 田尻健介、勝村浩三
、金徳男、清水一弘、高井真司、池田恒彦. 第
117回日本眼科学会総会、
東京、2013年

ハムスターモデルにおけるキマーゼ阻
害薬による類洞閉塞性症候群の軽減効果
の検討: 鱒淵真介、高井真司、金徳男、
米田浩二、井上善博、林道廣、内山和久.
第113回日本外科学会定期学術集、福岡、
2013年

Outside fibrosis play a key role in the
development of inner neointima after
the implantation of PTFE grafts: Jin D,
Takai S, Miyazaki M. 第86回日本薬理学
会年会、福岡、2013年

PTFE人工血管移植後の血管周囲線維芽
細胞の遊走とその管腔内肥厚の形成: 金
徳男、高井真司、宮崎瑞夫. 第42回日本
心脈管作動物質学会、奈良、2013年

腹部大動脈瘤予防におけるACE阻害薬に
よるMMP-9阻害の重要性: 高井真司、金徳
男、山本大助、宮崎瑞夫. 第42回日本心
脈管作動物質学会、奈良、2013年

ハムスターNASHモデルに対するキマー
ゼ阻害薬の治療効果の検討: 鱒淵真介、
高井真司、金徳男、田代圭太郎、米田浩
二、林道廣、内山和久. 第17回日本病態
プロテアーゼ学会、浜松、2012年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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