

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09741

研究課題名(和文) ePTFE人工血管と自家動静脈グラフト移植後の内腔狭窄の機序の解明と治療法の探索

研究課題名(英文) Searching for the mechanisms and therapeutics in the pathogenesis of stenosis after the implantation of arteriovenous ePTFE artificial and auto blood vessel grafts.

研究代表者

金 徳男 (Jin, Denan)

大阪医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：90319533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ネイティブ動静脈シャントに比べて、PTFE人工血管からなるこのアクセスルートの開存率が悪く、ほとんどの患者は2年以内に新たなルートの作製を強いられる。このような血管アクセスルートの不全を引き起こす主な原因は人工血管管腔内の内膜肥厚による狭窄である。本研究ではキマーゼ特異的な阻害薬、非活性体および溶媒をPTFE人工血管外膜側にコーティングしたものと非コーティングPTFE人工血管をハムスターの皮下に移植し、その3カ月後の線維芽細胞の遊走度合いについて検討を行った。また、イヌ人工血管移植モデルを用いて、新旧のPTFE人工血管の内膜肥厚特徴について比較検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、腎透析によってその生命が維持されている患者さんが年々増え続けており、血液の浄化に費やされている医療費も莫大に膨れ上がっている。それに加えて、人工血管移植後のバスキュラーアクセス不全によるアクセスルートの再建術にも更なる医療費を必要とする。また、近年、冠動脈バイパス術が年々増えており、術後の血管管腔内狭窄に対する再手術率もかなり増えている。本研究を介して、血管狭窄性疾患における動静脈中膜平滑筋細胞と外膜側の線維芽細胞のそれぞれの役割を解明し、人工血管や動静脈グラフトの血管内膜肥厚の病態生理に最も適した治療法を模索することにより基礎研究から臨床応用への橋渡しができればと考えている。

研究成果の概要(英文)： We have compared the migration patterns of outside fibroblasts after subcutaneous implantation of PTFE vascular prosthesis either coated with chymase inhibitor or solvent only at 3 months after the implantation in hamsters. We found that chymase inhibitor coating tended to reduce the migration distance in the PTFE wall more than the PTFE vascular prosthesis coated solvent only, however, it did not reach a statistical significance. On the other hand, we also investigated if there is a qualitative difference between new and old version of PTFE vascular prosthesis, former adventitial interstices are modified to more narrow (20 μ m) to decrease seroma after the implantation compared to old one. Although the modification of adventitial interstices in the new version of PTFE vascular prosthesis delay the migration speed of outside fibroblasts in the wall of PTFE vascular prosthesis, however, no statistical differences were found between two groups.

研究分野：心血管系疾患

キーワード：血管アクセス不全 内膜肥厚 線維芽細胞遊走

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は腎透析患者の人工血管移植後のバスキュラー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を作製し、検討を重ねてきた。非常に興味深いことに、PTFE (polytetrafluoroethylene) 人工血管をイヌの頸動脈と頸静脈間に移植4週後までは、静脈と人工血管吻合部以外の管腔内で内膜肥厚が全く見当たらなかった。その時のPTFE 素材中の線維芽細胞の浸潤割合は外膜側から内腔に向けて約半分程度に留まっていた。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、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(文献1)。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するならば、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たので、次のような検討を試みた。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、中膜が無孔体からなっている。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ことから、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間に移植し、その後の内膜肥厚の特徴について検討してみた。結果、移植4ヵ月後の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殆ど認められなかった(文献2)。このようなことより、人工血管移植後の中間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すことが示された。また、人工血管移植後の血管周囲においては、キマーゼをはじめとするレニン-アンジオテンシン系(RAS)の諸要素やTGF- β 1の活性化が認められ、キマーゼ特異的な阻害薬の投与がPTFE人工血管移植後の血管内膜肥厚形成を有意に抑制できたことから、人工血管周囲組織局所でのアンジオテンシンIIとTGF- β 1の産生過剰が線維芽細胞の形質転換、遊走および増殖を促すことによりPTFE人工血管移植後の血管内膜肥厚性病態生理に深く関与していることが示された(文献1、3)。非常に興味深いことに、PTFE人工血管管腔内の肥厚部位での細胞成分をビメンチン、デスミンや α -SMAなどの発現割合から特定した結果、細胞成分の殆どが筋線維芽細胞と線維芽細胞であったことから、頸動脈バルーン障害後や自家動静脈グラフト移植後の血管内膜肥厚の「中膜平滑筋遊走説」とは機序的に大きく違うことを窺わせた。しかし、一方では、これまでの自己動静脈血管内膜肥厚の細胞成分に関する検討の殆どは単に α -SMA発現の有無を平滑筋の判定基準とし、筋線維芽細胞とは区別せず、このような病態における外膜側の線維芽細胞に関する役割については殆ど不明である。

2. 研究の目的

近年、腎透析患者のバスキュラーアクセスルートにはPTFE人工血管移植術がよく用いられているが、その後の管腔内狭窄によるバスキュラーアクセス不全が臨床上大きな問題となっている。また、冠動脈狭窄性疾患の患者に施されるバイパス術などには自家動脈か自家静脈が用いられるが、いずれも術後に血管管腔内狭窄という難題を抱えており、その対策法が急がれる。このような血管内腔狭窄性病態に共通して関与するのは術後の血管内膜肥厚ではあるが、これまでに多数の研究が進められてきたにも関わらず、その機序や有効な治療法が未だ確立されていない。そこで、本研究では人工血管移植後と自家動静脈移植後の血管内膜肥厚の特徴を比較検討したい。

3. 研究の方法

(1) ラット動静脈シャントモデルの確立

麻酔下 SD ラットにヘパリンを投与後、頸部の正中切開を行い、左外頸静脈と左総頸動脈をそれぞれ剥離した。上記の血管の血流遮断後、それぞれの血管を切断し、10-0 ナイロン糸を用いて端 端吻合を行った。その後、血流を再開し、正中切開口を吻合後に飼育施設に戻した。その 1 ヶ月後に動静脈シャントサンプルを採取し、動静脈の吻合部付近の静脈側と動脈側の内膜肥厚特徴について組織学的な検討を行った。

(2) キマーゼ阻害薬コーティング PTFE 人工血管移植実験

本研究ではキマーゼを特異的に抑制可能な阻害薬を PTFE 人工血管外膜側にコーティングし、非活性体をコーティングしたもの並びにコーティングを施していなかった PTFE 人工血管をハムスターの皮下に移植し、その 3 ヶ月後の線維芽細胞遊走度合いについて検討した。群分けとして、① 非コーティング群； ② 溶媒コーティングのみ群； ③ キマーゼ阻害薬溶媒アンカーなしコーティング群；④ キマーゼ阻害薬溶媒アンカーありコーティング群； ⑤ キマーゼ阻害薬非活性体溶媒アンカーありコーティング群とした。

(3) イヌ人工血管移植モデルを用いた新旧バージョンの PTFE 人工血管の内膜肥厚特徴についての比較検討

これまで臨床で使用されてきた PTFE 人工血管の血管壁には 20 ~ 50 ミクロンの隙間が存在していたが、この隙間構造について修正を行った新しい PTFE 人工血管が去年から発売されるようになった。そこで、新しい PTFE 人工血管における内膜肥厚特徴を従来の血管と比較する必要性が生まれたゆえ、次のような検討を行った。ビーグル犬 5 頭を用いて、左頸動静脈間には古いバージョンの PTFE 人工血管を、そして右頸動静脈間には新しいバージョンの PTFE 人工血管を移植し、その 4 ヶ月後に血管サンプルを摘出して比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) ラット動静脈シャントモデルの確立

図 1 の移植直後の写真に示しているように、外頸静脈を総頸動脈間に端 端吻合することは術的に可能であった。そして、移植 1 ヶ月後、エコーにて移植された外頸静脈を確認したところ、その形状がはっきりと映されているだけではなく、内腔の血流も確認できた。しかし、エコーで明らかな内膜肥厚は確認できなかった。移植 1 ヶ月後のエラスチカ・ワーギソン染色を図 2 に示す。ご覧のように、外頸静脈両端には総頸動脈が続いているが、数層の弾性線維から平滑筋層をもつ中膜が組織学的な特徴である。そして、移植された外頸静脈には平滑筋細胞からなる明らかな中膜層が認められず、新生内膜形成は静脈内腔全体ではなく、局所的に形成されていることが確認された。今回、数例での検討を行ってみたが、す



べてにおいて、内腔全周性ではなく、局所的に内膜肥厚が形成されていることが示された。また、内膜肥厚形成にはパラツキがあり、薬効評価などには移植 1 カ月後のモデルが適しないことが示唆された。今後、移植 3 カ月モデルを検討していきたい。

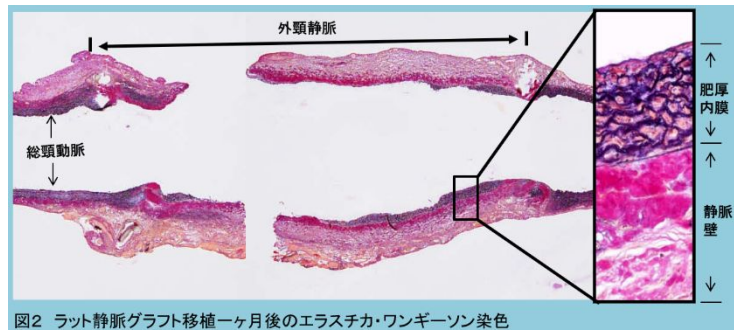


図2 ラット静脈グラフト移植一ヶ月後のエラスチカ・ワンギーソン染色

(2) キマーゼ阻害薬コーティング PTFE 人工血管移植実験

本研究ではキマーゼ特異的な阻害薬、非活性体および溶媒を PTFE 人工血管外膜側にコーティングしたものと非コーティング PTFE 人工血管をハムスターの皮下に移植し、その 3 カ月後に摘出して検討を加えた。具体的に、カルノア固定後にパラフィンブロックを作製し、各ブロックから 3 μm のパラフィン切片を切り出し、Toluidine Blue 染色を行った。Toluidine

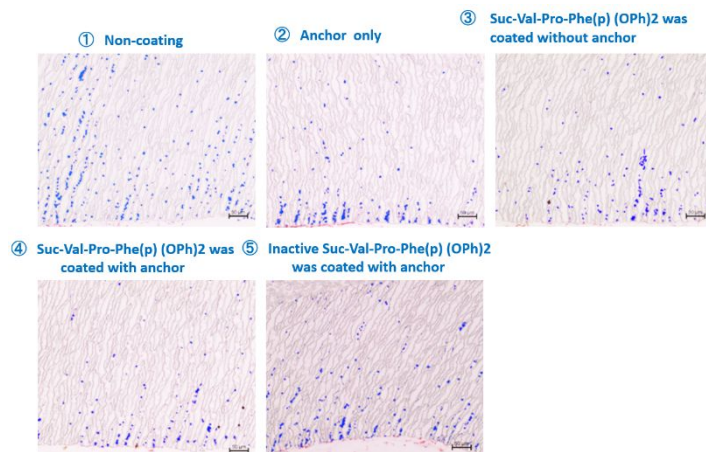
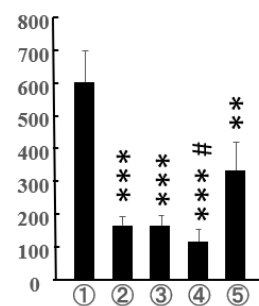


図3 PTFE人工血管壁における各群の線維芽細胞の浸潤度合い

Blue 染色では肥満細胞が紫色に染色され、その他の細胞核青色に染色される。従って、人工血管壁の浸潤細胞数を計測するのに非常に便利である。結果(図3、4) PTFE 人工血管壁

を溶媒のみでコーティングしても移植 3 カ月後の人工血管壁への細胞浸潤を有意に抑えていた。キマーゼ阻害薬を溶媒アンカーなしでコーティングしても細胞浸潤に対する抑止効果が認められた。キマーゼ阻害薬を溶媒アンカーを介してコーティングすると細胞浸潤に対する抑止効果がさらに増強された。④ キマーゼ阻害薬の非活性体をコーティングしても非コーティング群に比べて細胞浸潤を有意に抑制できたが、キマーゼ阻害薬そのものをコーティングした群に比べては有意に弱かった(図4)。今回、PTFE 人工血管壁を溶媒のみでコーティングしても移植 3 カ月後の人工血管壁への細胞浸潤に対する有意な抑制効果を認めた。その機序については明らかではないが、人工血管コーティングが線維芽細胞などの細胞浸潤を物理的に抑制する可能性が示唆された。従って、PTFE 人工血管外膜側コーティングが人工血管移植後の狭窄に対する予防策のホープになる可能性が示唆された。キマーゼ阻害薬コーティング群では人工血管移植後の細胞浸潤に対する更なる抑制効果を示す傾向にあるものの、溶媒コーティング群とは有意差を示さなかった。

Mean cellular number (cells/200x field)



p < 0.01, *p < 0.001. vs ①
#p < 0.05 vs ⑤

図4 PTFE人工血管壁における各群の線維芽細胞の浸潤数

(3) イヌ人工血管移植モデルを用いた新旧バージョンの PTFE 人工血管の内膜肥厚特徴についての比較検討

これまで臨床で使用されてきた PTFE 人工血管の血管壁には 20 ~ 50 ミクロンの隙間が存在し、移植後の血清の隙間からの漏出が移植後の成熟を遅らせてきた。この問題を改善するため、

この隙間について修正を行い、バージョンアップされた新しい PTFE 人工血管が発売されるようになった。そこで、新しい PTFE 人工血管における内膜肥厚特徴を従来の血管と比較する必要性が生まれた。ビーグル犬の左右の頸動静脈間にそれぞれ新旧バージョンの PTFE 人工血管を移植し、その 4 ヶ月後に血管サンプルを摘出して比較検討を行った。結果、新しいバージョンの人工血管外膜側の隙間縮小が外膜側からの線維芽細胞遊走を若干減らす傾向を示したものの、古いバージョンの PTFE 人工血管の線維芽細胞の浸潤度と大差がなかった。また、新旧バージョンの PTFE 人工血管の管腔内内膜肥厚度と内膜形成パターンも極めて類似していた。

<引用文献>

- 1、Jin D, Ueda H, Takai S, Muramatsu M, Furubayashi K, Ibaraki T, Kishi K, Katsuoka Y, Miyazaki M.: Roles of chymase in stenosis occurring after polytetrafluoroethylene graft implantations. *Life Sci.* 81(16):1291-1300 (2007).
- 2、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.* 119(2):139-149 (2012).
- 3、Jin, D., Ueda, H., Takai, S., Okamoto, Y., Muramatsu, M., Sakaguchi, M., Shibahara, N., Katsuoka, Y., Miyazaki, M.: Effect of chymase inhibition on the arteriovenous fistula stenosis in dogs. *J Am Soc Nephrol.* 16 (4), 1024–1034 (2005).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Sato T, Morishita S, Horie T, Fukumoto M, Kida T, Oku H, Nakamura K, Takai S, Jin D, Ikeda T. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Involvement of premacular mast cells in the pathogenesis of macular diseases. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One. | 6. 最初と最後の頁 e0211438 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211438 | 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 Ozeki M, Jin D, Miyaoka Y, Masubuchi S, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Comparison of a chymase inhibitor and hyaluronic acid/carboxymethylcellulose (Septrafilm) in a novel peritoneal adhesion model in rats. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One. | 6. 最初と最後の頁 e0211391 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211391 | 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 Jin D, Takai S, Nonaka Y, Yamazaki S, Fujiwara M, Nakamura Y. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 A Chymase Inhibitory RNA Aptamer Improves Cardiac Function and Survival after Myocardial Infarction. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Mol Ther Nucleic Acids. | 6. 最初と最後の頁 41-51 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2018.11.001 | 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 - |
| 1. 著者名 Hosohata K, Jin D, Takai S, Iwanaga K. | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Vanin-1 in Renal Pelvic Urine Reflects Kidney Injury in a Rat Model of Hydronephrosis. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 6. 最初と最後の頁 E3186 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19103186 | 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 Miyaoka Y, Jin D, Tashiro K, Masubuchi S, Ozeki M, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K. | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 A novel hamster nonalcoholic steatohepatitis model induced by a high-fat and high-cholesterol diet. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Exp Anim. | 6. 最初と最後の頁 239-247 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.17-0126 | 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 Miyaoka Yuta, Jin Denan, Tashiro Keitaro, Komeda Koji, Masubuchi Shinsuke, Hirokawa Fumitoshi, Hayashi Michihiro, Takai Shinji, Uchiyama Kazuhisa | 4. 巻 134 |
| 2. 論文標題 Chymase inhibitor prevents the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 139 ~ 146 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2017.04.005 | 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 Maeda Michiko, Kojima Shota, Sugiyama Tetsuya, Jin Denan, Takai Shinji, Oku Hidehiro, Kohmoto Ryohsuke, Ueki Mari, Ikeda Tsunehiko | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Effects of Gelatin Hydrogel Containing Anti-Transforming Growth Factor- β Antibody in a Canine Filtration Surgery Model | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 985 ~ 985 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18050985 | 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 Takai Shinji, Yoshino Masafumi, Takao Kazumasa, Yoshikawa Kazunori, Jin Denan | 4. 巻 133 |
| 2. 論文標題 Periostin antisense oligonucleotide prevents adhesion formation after surgery in mice | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 65 ~ 69 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2016.10.009 | 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 Hirahara I, Kusano E, Jin D, Takai S. | 4. 巻 167 |
| 2. 論文標題 Hypermetabolism of Glutathione, Glutamate and Ornithine via Redox Imbalance in Methylglyoxal Induced Peritoneal Injury Rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Biochem | 6. 最初と最後の頁 185-194 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz077 | 査読の有無 無 |
| 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 Li W, Jin D, Takai S, Hayakawa T, Ogata J, Yamanishi K, Yamanishi H, Okamura H. | 4. 巻 317 |
| 2. 論文標題 Impaired function of aorta and perivascular adipose tissue in IL-18-deficient mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Am J Physiol Heart Circ Physiol | 6. 最初と最後の頁 H1142-H1156 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00813.2018 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Denan Jin, Shinji Takai, Yosuke Nonaka2), Satoko Yamazaki, Masatoshi Fujiwara, Yoshikazu Nakamura |
| 2. 発表標題 Effect of an anti-chymase specific aptamer on cardiac function after myocardial infarction |
| 3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Denan Jin, Hyogo Nakakura, Yoichiro Maeda, Taketoshi Kanemiya, Nobuhisa Shibahara, Shinji Takai |
| 2. 発表標題 Expression profile of mast cell chymase in stenotic lesions from patients with hemodialysis vascular access failure. |
| 3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金 徳男、金宮健翁、前田陽一郎、中倉兵庫、柴原伸久、高井真司 |
| 2. 発表標題 キマーゼ阻害薬を用いたシャント狭窄予防の試み（第3報） |
| 3. 学会等名 第62回日本透析医学会学術集会・総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 金 徳男、高井 真司、吉野 雅文、高尾 和正、吉川 寿徳 |
| 2. 発表標題 術後腹部癒着に対するペリオスチンアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性 |
| 3. 学会等名 日本核酸医薬学会第3回年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金 徳男、高井真司、野中洋介、山崎聡子、藤原将寿、中村義一 |
| 2. 発表標題 新規核酸製剤（アプタマー）によるキマーゼ阻害と心筋梗塞後の心機能改善効果 |
| 3. 学会等名 第27回日本循環薬理学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 野中 洋介、金 徳男、高井 真司、藤原 将寿、中村 義一 |
| 2. 発表標題 抗キマーゼアプタマーによる心筋梗塞後の心機能および生存率の改善効果 |
| 3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|