

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10749

研究課題名(和文) 動静脈瘻発達過程でのEphB4など静脈関連分子の関わり方：長期開存への基礎的研究

研究課題名(英文) Vein associated molecules in AVF maturation: a study for better patency

研究代表者

山本 晃太 (Yamamoto, Kota)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：00753542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：実験成果としては2つある。

1. 動静脈瘻の開存率にEphB4およびAkt1の関連について：マウスにおける動静脈瘻の静脈標本においてEphB4およびAkt1はともに7-21日目をピークに増加していることが判明した。またこれらをそれぞれ刺激または抑制することで静脈の径および壁の厚さをコントロールできることがわかった。
2. 動静脈瘻開存率の長期開存にシルデナフィルの関与について：当初は1のみで予定していたがこれらの結果を踏まえてシルデナフィルの関与を考慮し追加実験を計画した。最終結果には至っていないがシルデナフィルの投与法の確立および副作用なく投与可能であることの確認までは行うことができています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎不全患者における自家動静脈瘻は人工透析用アクセスの第一選択でありながらも他の一般的手術と比較して手術成績が悪く、腎不全患者の生活の質(QOL)を損なう一因となっている。本研究はその改善のきっかけとなるべく始まっており動静脈瘻の成熟と不全を司る分子生物学的なメカニズムの一部は解明されたと考えている。そのメカニズムに対して積極的に介入する基礎実験の途中であり、今後も当施設および関連施設でこの研究を継続することが重要であるが、本実験の後半で改めてたてた仮説が証明されれば既にヒトに使用されている薬物もあるので確実に早期に手術成績(長期開存率)の改善へとつながると思われる。

研究成果の概要(英文)：We have achieved the following.

1. Association of EphB4 and Akt1 during arteriovenous fistula (AVF) maturation. We confirmed that mRNA and protein level of EphB4 and Akt1 are both increased in the venous limb of the AVF, 7-21 days after surgery using our AVF mouse model. We also confirmed that the venous diameter (inferior vena cava) and its wall thickness can be controlled by stimulating or suppressing these molecules.
2. Association of sildenafil and long term patency of AVF. At first, we have only planned on performing 1, but the results have led us to perform further experiment. We have not reached a final conclusion but have confirmed the method to give sildenafil in mouse without adverse effects after AVF surgery. We believe that these results will lead to better AVF surgery results using commercially available drugs.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：動静脈瘻 開存率 マウス EphB4 Akt-1 シルデナフィル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において、維持血液透析療法を受ける慢性腎不全患者の数は年々増加傾向にある。血液透析のためのブラッドアクセスの第一選択としては自己血管を動員した動静脈瘻

(AVF) 作成が推奨されているが、この第一選択である AVF においてもしばしば発達不良あるいは発達後の狭窄や閉塞をきたすことで不全に陥るため、作成後 1 年における 1 次開存率はわずか 60-65% と血管外科領域における手術成績としては最悪のものひとつとなっている。AVF が不全に陥る際には静脈側に問題が多いことが臨床的に知られているが、血管生物学領域で静脈をターゲットとした研究は少なく、成熟と不全の詳細なメカニズムは解明されていない。研究代表者が所属した Yale 大学血管外科では、静脈グラフトと AVF の二つのモデルを用いることで、静脈の動脈環境への適応過程を研究している。本研究では Yale 大学とお互いに協力しながら AVF 固有の分子生物学的過程を明らかにして介入することで、AVF 手術成績の改善につなげることを目的とする。

### (1) 使用される動物モデル

研究代表者である山本は Yale 大学血管外科で本人が中心となり AVF の研究を立ち上げた。これまで右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改良し、マウス AVF モデルを確立した。(図 1) このモデルは以下の点で本研究に使用できると考えている。

- ・簡便な手技の為、短時間で多数のデータを取得できる (Yamamoto et al, J Vis Exp. 2013)
- ・成熟と不全の相を有し、ヒトにおける発達の過程をよく再現している (図 2)
- ・一定の割合で発達後不全例が存在するため、不全機序の研究にも適している

(Yamamoto et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013)

### (2) 候補となる分子生物学的マーカーの背景

#### ① Eph-B4

胎生期の静脈のマーカーとして知られていた Eph-B4 受容体は、成人で静脈がグラフトとして使用される際には減少する一方で (Muto et al, J Exp Med. 2011)、AVF の流出路静脈においては増加していることをヒト臨床検体で確認した。また Eph-B4 受容体の 14 のチロシンリン酸化部位のうち、リガンドである Ephrin-B2 刺激下での質量分析法と突然変異誘発の網羅的なアプローチを用いて、特定の残基 (Y774) がこの受容体の機能を司ることを *in vitro* で同定確認することに成功している。

#### ② Akt1

Akt1 は細胞増殖を司る因子であり、これまでは特になんに関連でよく研究されてきた。Eph-B4 は Akt1 を調節すること、血管のリモデリングにおいて血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の増殖が重要な役割を果たしていることから、Akt1 が Eph-B4 による AVF 成熟調節の介在因子となっている仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

### (1) 研究の全体構想

AVF は人工透析用アクセスの第一選択でありながらも手術成績が悪く、腎不全患者の QOL を損なう一因となっているため、その成熟と不全を司る分子生物学的なメカニズム

を明らかにする。またそのメカニズムに対して積極的に介入することで手術成績(長期開存率)の改善につなげる。

## (2) 具体的な目的

- ① 正常に発達するAVFにおいて、胎生期の静脈マーカーEph-B4そのものの経時的変化およびこれが調節する細胞増殖因子、Akt1・Cav1などの経時的変化を明らかにする。
- ② AVFにおいて遺伝子改変マウスなど種々の方法でAkt1やCav-1を過剰発現もしくは阻害し、流出路静脈のリモデリングに与える影響を調べる。
- ③ AVFにおいてEph-B4シグナルを刺激することで、流出路静脈の内膜肥厚を抑制し、長期開存率を改善するかどうかを評価する。

## 3. 研究の方法

### ・動物実験

前述のモデルを各種マウスに施行した。エコーにて大動脈および下大静脈(IVC)の径および血流を術前、術後1,3,7,21,42日に測定した。AVFより中枢のIVCを標本として摘出した。Shamとしては全身麻酔下に開閉腹したものを利用した。すべての動物実験は施行施設における倫理委員会の審査を受けた後に認められた方法のみを施行している。

### (1) EphB4のAVFにおける経時的変化の確認

- ① AVFモデルをWTマウスに施行し、AVFよりも中枢側の静脈を標本として摘出
- ② 静脈におけるEphB4の発現量をqPCRもしくはWestern Blotで定量した

### (2) EphB4の刺激によるAVFにおよぼす変化

- ① EphB4を刺激するEphrinB2/FcをAVF造設術前日に腹腔内投与し、術後1日目から毎日全身麻酔下に連日投与した。
- ② エコーに加え、病理学的な静脈壁の厚さの測定および免疫染色にて増殖の様子を観察した。

### (3) EphB4の抑制によるAVFにおよぼす変化

- ① EphB4のheteroマウスにAVFを作成し静脈壁の厚さおよびIVC径を測定した。
- ② EphB4の774番目のチロシンを変異させたlentivirusを作成しこれを含むジェルをAVF造設時に外膜側から投与した。その後上記実験同様のパラメーターを測定した。

### (4) EphB4のリモデリングがAkt-1を介していることの推測

- ① 通常のWTマウスに対してAVF造設後のAkt-1および全Aktの発現量をmRNAおよび蛋白レベルで経時的に観察した。
- ② WTマウスにAVF造設後にAkt-1を増加させるべく作成したadenovirusを含むジェルを外膜側より投与して静脈の厚さおよびIVC径の経時的変化を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) EphB4のAVFにおける経時的変化

mRNA(図1)および蛋白で(図2,3)AVF作製後の静脈にEphB4の発現が術後7日目をピークに発現が増加していることを確認した。

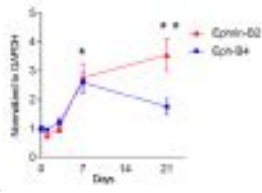


図 1

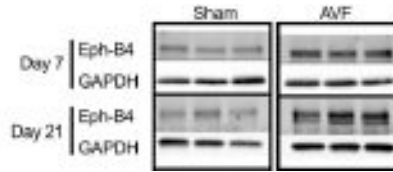


図 2

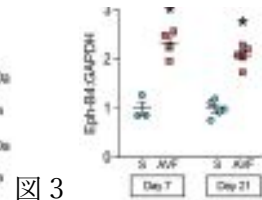


図 3

(2) EphB4 の刺激による AVF におよぼす変化

EphB4 を EphrinB2 で刺激すると静脈壁の厚みは減少し (図 4A) 静脈径は縮小 (図 4B)、細胞増殖は抑制され (図 4C)、長期的開存は改善 (図 4D) した。

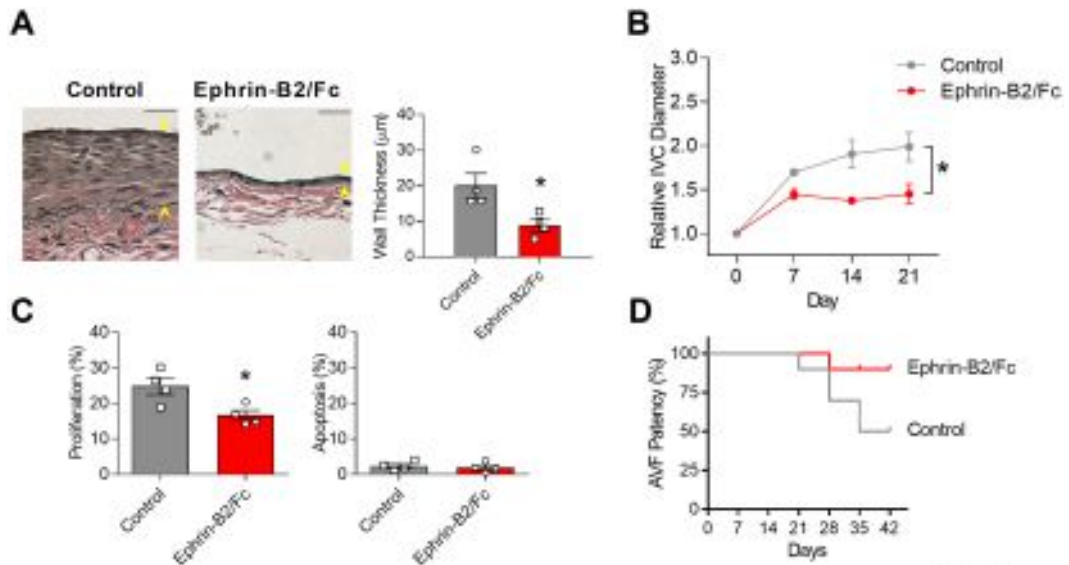


図 4

(3) EphB4 の抑制による AVF におよぼす変化

EphB4 のノックアウトマウスを使用すると AVF 手術後の静脈は壁肥厚をみるものの径の変化は認められなかった。(図 5A,B) EphB4 における 774 番目のチロシンを変化させるべく作成した Lentivirus を含むジェルを AVF 作製直後に外膜から投与して経過観察したところ壁肥厚に加え静脈径の差が認められた (図 5C-F)

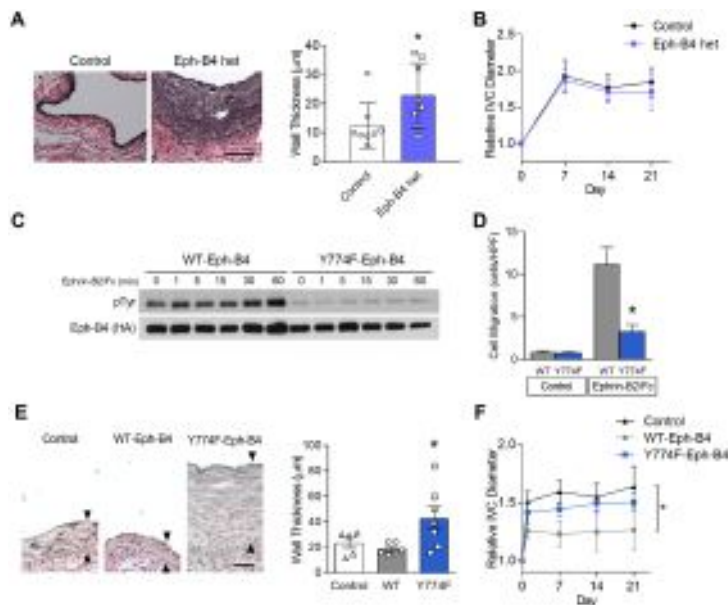


図 5

(4) EphB4 のリモデリングが Akt-1 を介していることの推測

AVF を造設したマウスにおいて遺伝子・蛋白レベルで Akt-1 の発現増加が認められ、AVF の発達によって Akt-1 が影響を受けていることがわかった。WT のマウスに AVF を造設しそこに active Akt-1 を投与したものが control もしくは negative Akt-1 を投与したものと比較して壁の厚みは他の 2 者より増加していたが IVC の径は WT と同等であった。続いて Akt-1 の KO マウスにおいて AVF を造設したところ WT と比較して静脈壁は菲薄であり IVC の径も小さく発達は不良であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 10件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hashimoto Takuya, Isaji Toshihiko, Hu Haidi, Yamamoto Kota, Bai Hualong, Santana Jeans M., Kuo Andrew, Kuwahara Go, Foster Trenton R., Hanisch Jesse J., Yatsula Bogdan A., Sessa William C., Hoshina Katsuyuki, Dardik Alan	4. 巻 39
2. 論文標題 Stimulation of Caveolin-1 Signaling Improves Arteriovenous Fistula Patency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 754 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.119.312417	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 Hanada Kazumasa, Yamamoto Kota, Akai Takafumi, Taniguchi Ryosuke, Takayama Toshio, Hoshina Katsuyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Phlegmasia cerulea dolens as an initial manifestation of a fistula between a ruptured iliac artery aneurysm and the iliac vein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Surgery Cases and Innovative Techniques	6. 最初と最後の頁 41 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvscit.2018.11.004	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 Makino Yoshihisa, Miyahara Takuya, Nitta Jun, Miyahara Kazuhiro, Seo Akihiko, Kimura Masaru, Suhara Masamitsu, Akai Atsushi, Akagi Daisuke, Yamamoto Kota, Hoshina Katsuyuki	4. 巻 233
2. 論文標題 Proresolving Lipid Mediators Resolvin D1 and Protectin D1 Isomer Attenuate Neointimal Hyperplasia in the Rat Carotid Artery Balloon Injury Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 104 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2018.07.049	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 Akagi Daisuke, Hoshina Katsuyuki, Akai Atsushi, Yamamoto Kota	4. 巻 59
2. 論文標題 Outcomes in Patients with Critical Limb Ischemia due to Arteriosclerosis Obliterans Who Did Not Undergo Arterial Reconstruction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.17-592	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 Yamamoto Kota, Kawahara Takuya, Akai Atsushi, Isaji Toshihiko, Akagi Daisuke, Miyahara Takuya, Hoshina Katsuyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Increase in skin perfusion pressure predicts amputation-free survival after lower extremity bypass surgery for critical limb ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vascular Medicine	6. 最初と最後の頁 243 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1358863X18760181	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 Seo Akihiko, Yamamoto Kota, Akai Atsushi, Akagi Daisuke, Takayama Toshio, Hoshina Katsuyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 The relationship between medical expenses and the severity of peripheral arterial disease in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 853 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-018-1127-3	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 Sato Chihiro, Okuda Kenichi, Tamiya Hiroyuki, Yamamoto Kota, Hoshina Katsuyuki, Narumoto Osamu, Urushiyama Hirokazu, Noguchi Satoshi, Amano Yosuke, Watanabe Kosuke, Mitani Akihisa, Kage Hidenori, Tanaka Goh, Yamauchi Yasuhiro, Takai Daiya, Nagase Takahide	4. 巻 57
2. 論文標題 Acute Arterial Thrombosis during Postoperative Adjuvant Cisplatin-based Chemotherapy for Completely Resected Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 557 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8996-17	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 Protack Clinton D., Foster Trenton R., Hashimoto Takuya, Yamamoto Kota, Lee Monica Y., Kraehling Jan R., Bai Hualong, Hu Haidi, Isaji Toshihiko, Santana Jeans M., Wang Mo, Sessa William C., Dardik Alan	4. 巻 7
2. 論文標題 Eph-B4 regulates adaptive venous remodeling to improve arteriovenous fistula patency	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-13071-2	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 Isaji Toshihiko, Hashimoto Takuya, Yamamoto Kota, Santana Jeans M., Yatsula Bogdan, Hu Haidi, Bai Hualong, Jianming Guo, Kudze Tambudzai, Nishibe Toshiya, Dardik Alan	4. 巻 10
2. 論文標題 Improving the Outcome of Vein Grafts: Should Vascular Surgeons Turn Veins into Arteries?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Diseases	6. 最初と最後の頁 8~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3400/avd.ra.17-00008	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 Go Kuwahara, Takuya Hashimoto, Masayuki Tsuneki, Kota Yamamoto, Roland Assi, Trenton R. Foster, Jesse J. Hanisch, Hualong Bai, Haidi Hu, Clinton D. Protack, Michael R. Hall, John S. Schardt, Steven M. Jay, Joseph A. Madri, Shohta Kodama, Alan Dardik	4. 巻 37
2. 論文標題 CD44 Promotes Inflammation and Extracellular Matrix Production During Arteriovenous Fistula Maturation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 1147-1156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 下肢重症虚血化の危険因子の検討<対側肢のフォローからえられた知見>
3. 学会等名 第52回日本成人病(生活習慣病)学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 若年重症虚血肢の背景因子および予後についての検討ー特別な治療方針は必要かー
3. 学会等名 第48回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 下腿単独病変に対する当科治療方針とその予後
3. 学会等名 第46回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 DVT検索を目的とした血管エコー
3. 学会等名 VTE Conference in TOKYO (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 PAD患者における血行再建術後のSPP値変化の検討
3. 学会等名 第47回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 重症虚血化の危険因子としての対側肢の検討 - 予防的な外科的処置介入の余地はあるか -
3. 学会等名 第15回日本フットケア学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 より進行した重症虚血肢においてのみ予後規定因子となる透析症例の治療方針
3. 学会等名 第 117 回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 超高齢者(85歳以上)重症虚血肢患者の手術適応とそのリスク評価
3. 学会等名 第45回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本晃太
2. 発表標題 重症虚血肢における下腿病変血行再建時の目標 およびその影響因子
3. 学会等名 第58回日本脈管学会総会
4. 発表年 2017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 分担 者	赤木 大輔  (Akagi Daisuke)  (20464753)	東京大学・医学部附属病院・助教    (12601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	保科 克行  (Katsuyuki Hoshina)  (90571761)	東京大学・医学部附属病院・講師    (12601)	
研究 分 担 者	渡邊 聡明  (Toshiaki Watanabe)  (80210920)	東京大学・医学部附属病院・教授    (12601)	