

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08749

研究課題名(和文) 流血中幹細胞機能とPAD患者予後 内皮前駆細胞老化のメカニズム解析

研究課題名(英文) Clinical study of stem cell function in patients with peripheral arterial disease: Role of stem cell senescence in poor prognosis of patients.

研究代表者

東 信良 (Nobuyoshi, Azuma)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30250559

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)：本研究では、血管幹細胞の機能を維持したり、逆に機能を老化させるような物質が流血中に存在しているのではないかという仮説のもと、流血中のmicroRNA(miR)に着目して、予後が特に不良な末梢動脈疾患(PAD)の末期である包括的高度慢性下肢虚血(CLTI)症例の凍結保存血漿(血行再建前に採血)を用い、血中miRを解析した。生命予後良好であったCLTI患者と1年未満に死亡したCLTI患者のマイクロアレイを実施して、生命予後不良に関わる可能性のあるmiR 14個と、良好な生命予後をもたらす可能性のあるmiR 3個を同定した。それらは全てにおいて、臨床的意義や作用について既報にない未知のmiRである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PADは、冠動脈疾患(CAD)や脳血管疾患(CVD)と並んで3大動脈硬化性疾患の柱であるが、PADはCADやCVDとの合併頻度が高く、かつ、PADが最も生命予後が不良であることが知られている。さらに、PADが合併するとCADやCVDの予後が著しく不良になることも知られている。本研究で生命予後に関与する可能性のあるmiRNAの機能が解明され、幹細胞との関係性が明らかになれば、PADがどのような機序で予後不良を招いているのか理解が深まると期待される。さらに、血行再建後の再狭窄にもmiRNAが関連しているのであれば、血管再生能や修復能の改善ひいては生命予後改善への介入研究につながることを期待する。

研究成果の概要(英文)：To understand mechanisms why peripheral artery disease (PAD) is associated with poor prognosis, we collected blood samples from patients with chronic limb-threatening ischemia (CLTI) before revascularization, then those CLTI patients were observed thereafter. Regarding prognosis after revascularization, we selected four patients who died within 1year after bypass surgery and another 4 patients who are surviving more than 2 years were selected. Then we performed microarray of microRNAs (miRNAs) using the preserved blood sample took before bypass surgery. As the results, 14 species of unknown miRNAs negatively associated patient's prognosis and 3 species of unknown miRNA positively associated the prognosis. We will continue this study to find out miRNAs function, which might contribute to understand why PAD is so strong predictor of poor prognosis.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：下肢閉塞性動脈硬化症 生命予後 幹細胞機能 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 末梢動脈閉塞症(PAD)の生命予後不良の背景について

動脈硬化による PAD は、閉塞性動脈硬化症 (ASO) と呼ばれ、冠動脈疾患(CAD)や脳血管疾患(CVD)と並んで 3 大動脈硬化疾患のひとつであるが、これら 3 大動脈硬化性疾患の中でもとりわけ PAD は生命予後不良であり、多くの消化器癌よりも予後不良であることが知られている。さらに、PAD が合併すると CAD や CVD の予後が著しく不良になることが知られている。これら 3 大動脈硬化性疾患は動脈硬化という共通の疾病発生原因を有するにも関わらず、PAD がとりわけ予後不良である現象がどのようなメカニズムで起こるのか詳細は解明されていないのが現状であり、超高齢化で糖尿病が国民病と言われて久しい我が国にとって、高齢化とともに急増する PAD の予後不良要因を研究・解明することは急務であると考えます。

### (2) 本研究の作業仮設とその背景

PAD 患者に生命予後不良例が多いという事実の背景に、血管細胞の再生に関わる幹細胞の機能低下があるのではないかとという仮説のもとに本研究を着想した。

PAD 患者の血管内皮前駆細胞 (EPC) の数の低下について多くの報告はあるが、代償性に増加しているという報告もあり、一定した見解は得られていない。また、その機能不全の分子生物学的メカニズムに関する研究成果は冠動脈疾患で近年精力的に研究されているが、PAD では極めて限定的である。当大学の連携研究者らは心筋梗塞発症患者における EPC 機能と予後を解析し、患者予後が EPC 機能と相関し、そのメカニズムとして EPC での SIRT1 発現が重要であることを報告している。<sup>1)</sup>

## 2. 研究の目的

PAD の病態を血管障害部修復機能不全と捉え、血管修復機能すなわち EPC などの流血中の幹細胞の機能障害に焦点をあて、幹細胞機能やそれに影響する因子について明らかにすることを旨として、研究を開始した。

## 3. 研究の方法

### (1) 生命予後分析

包括的高度慢性下肢虚血 (CLTI) 187 症例の外科的血行再建術後の生命予後を後ろ向きに術後 2 年間追跡し、術後生命予後に影響を与える可能性のある術前要因を検討した。

### (2) 生命予後に関わる液性因子

PAD 患者の生命予後の多様性に関与する液性因子は無いかを検討するため、PAD の中でも特に予後不良と言われる CLTI 患者について、血行再建手術前に血清を採取して凍結保存し、術後 2 年経過した後の実際の生命予後をアウトカムとして、術後 1 年未満に死亡した患者群と術後少なくとも 2 年以上生存した生存群との間で、d-ROM などの酸化ストレス関連因子、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 などのサイトカイン類、HMBD-1 や 8-OHdG などの細胞障害関連因子などを測定し、生命予後良好群と不良群とで、比較した。

### (3) CLI 患者の EPC 機能解析

当大学の倫理委員会の承認（19084号）を得て、臨床例での検討を行った。

採血を行った後（7ml程度）に全血を0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）入りリン酸緩衝平衡塩類溶液で2倍量に希釈し、Ficoll法にて収集・調整した。

#### （4）血中 miRNA(miR)解析

流血中の何らかのシグナルが幹細胞機能に影響を与えているのではないかという仮説のもと、血清中の miR の解析を実施した。

##### ①生命予後に関わる miR

重症下肢虚血患者から血行再建前に採取した血清サンプルを凍結保存して、その後の予後を観察し、術後2年以上生存した群と術後1年未満に死亡した群から、それぞれ、糖尿病・男性、糖尿病・女性、非糖尿病男性、非糖尿病女性のサンプルを各1検体ずつ抽出して、miRのマイクロアレイを実施した。

##### ②再建部狭窄に関わる miR

重症下肢虚血患者から血行再建前に採取した血清サンプルを凍結保存して、その後の臨床経過を観察し、術後2年以上バイパスグラフトが開存した群と術後1年未満にバイパスグラフト（静脈グラフト）が内膜肥厚による狭窄ないし閉塞した群から、それぞれ、糖尿病・男性、糖尿病・女性、非糖尿病男性、非糖尿病女性のサンプルを各1検体ずつ抽出して、miRのマイクロアレイを実施した。

## 4. 研究成果

### （1）生命予後不良に関する臨床的要因解析

CLTI症例の外科的血行再建術後の生命予後を解析した結果、多変量解析によって以下の5つの臨床的要因が血行再建後の生命予後規定因子として抽出された。すなわち、低BMI、心不全、静脈材料の質不良、創治癒不全であった。低BMIについては、他の研究でも重要な生命予後不良因子として報告されており、<sup>2)</sup>フレイルやサルコペニアとの関連も報告されている。<sup>3)</sup>

我々は、低BMIとともにコリンエステラーゼ低値が生命予後不良因子であることも見出しており、低BMIは炎症性の消耗の結果ではないかと考えている。<sup>4)</sup>加えて、創傷治癒不全が生命予後不良因子とし

### Results: Factors related to survival rate

Variables	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P
<b>BMI (&gt;18, &lt;25)</b>	<b>Ref.</b>			
<18	<b>1.9 (1.1 – 3.4)</b>	<b>0.04</b>	<b>2.9 (1.4 – 6.0)</b>	<b>&lt;0.01</b>
>25	<b>0.8 (0.5 – 1.3)</b>	<b>0.32</b>	<b>1.6 (1.0 – 2.7)</b>	<b>0.1</b>
Dialysis	2.8 (1.8 – 4.3)	<0.01		
Coronary intervention	1.4 (1.0 – 2.2)	0.09		
<b>Chronic heart failure</b>	<b>3.8 (2.5 – 6.0)</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>3.8 (2.3 – 6.4)</b>	<b>&lt;0.01</b>
Albumin <3.0 g/dl	1.6 (1.0 – 2.5)	0.03		
<b>Spliced vein graft</b>	<b>1.8 (1.1 – 2.9)</b>	<b>0.03</b>	<b>2.2 (1.2 – 3.8)</b>	<b>&lt;0.01</b>
Poor quality vein	1.6 (1.0 – 2.6)	0.03		
Non-ambulatory at admission	1.7 (1.1 – 2.6)	0.02		
<b>Unhealed wound</b>	<b>5.1 (2.8 – 9.3)</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>7.8 (3.9 – 15.4)</b>	<b>&lt;0.01</b>
Wfl clinical stage				
2	<b>Ref.</b>			
3	1.8 (0.9 – 3.4)	0.1		
4	1.5 (0.8 – 2.7)	0.2		

第51回日本動脈硬化学会 合同シンポジウム 菊地ら発表スライドから引用

て拳がっていることも興味深い。低BMIやフレイル、創傷治癒不全といった、いずれも細胞の再生能の低下につながる因子が生命予後不良の臨床的因子として抽出されたことは、

本研究の作業仮設に合致するものと考えられる。

## (2) 患者生命予後予測術前バイオマーカーの探索

術後死亡に関与する血中バイオマーカー探索目的に術前の血液中の酸化ストレス指標やサイトカインなどを調査した中で、**8-OHdG** のみが術後予後不良例で有意に高値であった(平均値: 0.1887 vs 0.2943,  $p=0.05$ )。8-OHdG は、活性酸素による生体損傷を鋭敏に反映する優れたバイオマーカーであるとされ、遺伝子 DNA が修復される過程で細胞外に排出されるタンパクで、血液循環の後に尿中に排泄される。

CLTI において血管障害やその血管から酸素や栄養供給を受ける組織(下肢動脈障害の場合には下肢筋など)における細胞障害マーカーが特に予後不良例で高値であることは、下記に提示する CLTI 患者で高発現している miRNA との関連がある可能性が示唆される。あるいは、仮設に挙げた障害血管の修復機転の障害や EPC 機能障害の機序と関連がある可能性も考えられる。

## (3) CLI 患者の EPC 機能解析

CLTI 患者から得た全血を上記 Ficoll 法によって PBMC を抽出することに努めたが、採血量増量や条件調整したものの PBMC を抽出できなかった。PBMC は全血内で非常に少ない割合で存在しており、特に PBMC が減少していると考えられる CLTI 患者においては通常の採血量では抽出する事は非常に困難であった。

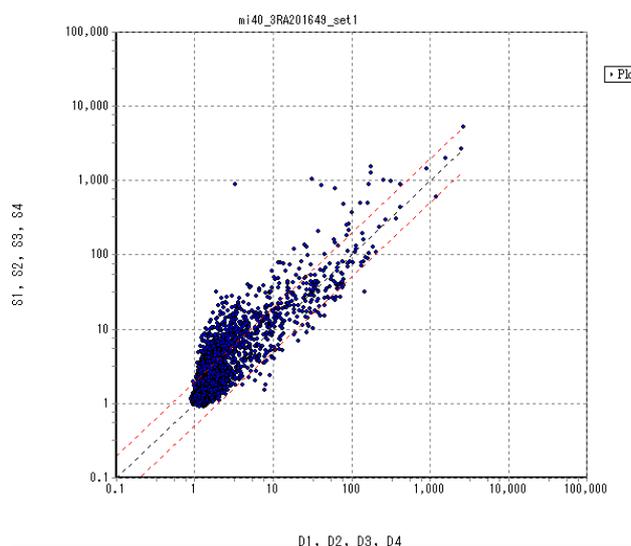
患者に G-CSF を投与し増血したのちに採取できたとの報告があるが、CLTI 患者にそのような介入をして検体を採取することは適切でないと判断し、CLTI 患者からの PBMC の抽出は断念した。

## (4) 生命予後に関わる血中 miR 解析

臨床研究登録した CLTI 症例で 2 年生存が確定している 4 例(S 群)と 1 年以内に死亡した 4 例(D 群)について miR のマイクロアレイ解析を行ったところ、死亡例に高発現(コントロールに比して 2 倍以上のもの)している miR が 14 種、生存例で高発現している miR が 3 種検出された。

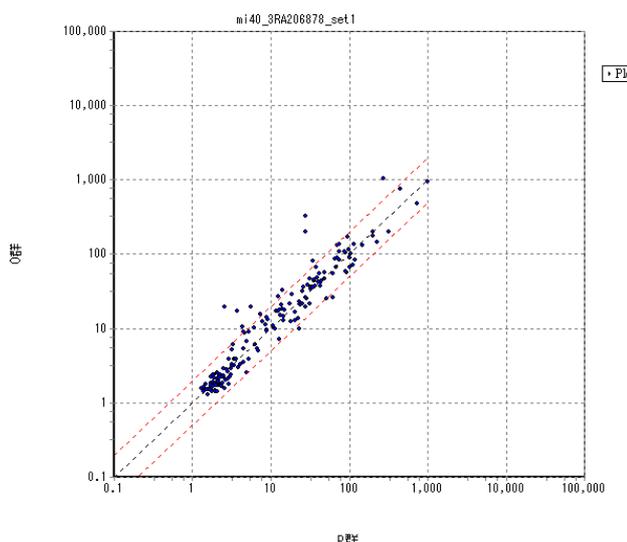
【検出された miR の臨床的意義】いずれも臨床的意義は未知であり、解明されていない。なお、非常に興味深いことに、上記

「生存例で高発現している miR」のうちの 1 種が、下記の「再狭窄を起こさなかった群に高発現している miR」のうちの 1 種と同一の miR であった。すなわち、この当該 miR “X” は、「生命予後」にも「治療血管の再狭窄」の両方に関与して、生命や治療血管を良い状態に維持する役割を果たしている可能性があり、血管幹細胞機能維持に重要な miR である可能性も含んでいると考え、注目に値するものと今後の機能解析に期待している。



#### (5) 再狭窄に関わる血中 miR 解析

上記(4)と同様、臨床研究登録した CLTI 症例で2年以上グラフト狭窄を認めず開存が確定している4例(P群)と1年未満にグラフト狭窄・閉塞した4例(O群)について miR のマイクロアレイ解析を行ったところ、グラフト狭窄・閉塞例に高発現(コントロールに比して2倍以上のもの)している miR が12種、グラフト開存例(非狭窄・閉塞例)で高発現している miR が3種検出された。いずれも、機能や病的意義については未知のものである。このうち、後者の miRNA 一つが生命予後良好に関与する miR "X" と同一であった。



#### 結語

本研究を通じて、PAD が生命予後不良である要因として低 BMI があること、血中バイオマーカーとして、細胞障害に関わる因子が関連していることが明らかとなり、動脈硬化症そのものや創傷による炎症性の消耗が生命予後不良の重要な背景であることが示唆された。そうした中、血中の miR 解析により、生命予後や治療血管再狭窄に関わる可能性のある未知の血中 miR が複数検出された。特に、本研究で発見された miR "X" は、生命予後と治療血管再狭窄の両者に関連している可能性があり、今後の研究の進展が期待される大きな成果であったと考えている。

#### 引用文献

1. Ota H, Takehara N, Aonuma T, et al. Association between microalbuminuria predictiong in-stent restenosis after myocardial infarction and cellular senescence of endothelial progenitor cells. PLoS One. 2015; DOI:10.1371/journal.pone.0123733..
2. Iida O, Soga Y, Hirano K, et al. Midterm outcomes and risk stratification after endovascular therapy for patients with critical limb ischaemia due to isolated below-the-knee lesions. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2012; 43: 313-321.
3. Matsubara Y, Matsumoto T, Aoyagi Y, et al. Sarcopenia is a prognostic factor for overall survival in patients with critical limb ischemia. J Vasc Surg. 2015; 61: 945-950.
4. Azuma N, Takahara M, Kodama A, et al. Predictive Model for Mortality Risk Including the Wound, Ischemia, Foot Infection Classification in Patients Undergoing Revascularization for Critical Limb Ischemia. Circ Cardiovasc Interv. 2019; e008015. doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.119.008015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Azuma N, Takahara M, Kodama A, Soga Y, Terashi H, Tazaki J, Yamaoka T, Koya A, Iida O	4. 巻 12
2. 論文標題 Predictive Model for Mortality Risk Including the Wound, Ischemia, Foot Infection Classification in Patients Undergoing Revascularization for Critical Limb Ischemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation. Cardiovascular interventions.	6. 最初と最後の頁 e008015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.119.008015. Epub	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daiki.U, Kikuchi S, Uchida D, Kuriyama N, Takahashi K, Kamada K, Tatsukawa T, Tochikubo A, Yoshida Y, Koya A, Azuma N
2. 発表標題 Pre-operative d-ROMs as a biomarker for predicting graft failure after distal bypass surgery in CLTI patients
3. 学会等名 SVS 2020 Vascular Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊地信介、内田大貴、東信良、ほか。
2. 発表標題 重症下肢虚血症例の予後改善策 - 予後を規定する創傷治癒の位置づけ -
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会
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
研究分担者	菊地 信介 (Shinsuke Kikuchi) (80596297)	旭川医科大学・医学部・助教  (10107)	

6. 研究組織（つづき）

	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	吉田 有里  (Yuri Yoshida)  (50646057)	旭川医科大学・大学病院・助教     (10107)	

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