

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16380

研究課題名(和文)自家静脈グラフト弁部内膜肥厚に關与する細胞同定とその機能解明

研究課題名(英文) Identification and elucidating of function of cells involved with intimal hyperplasia in a valve site of vein graft

研究代表者

菊地 信介(Kikuchi, Shinsuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80596297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病が蔓延する中、下肢動脈硬化症を患う患者さんは増えてきている。閉塞した動脈に対するバイパス手術の位置づけは高く、カテーテルで治療が困難な患者さんに行われる。一般的に患者自身の静脈を用いたバイパス手術は長持ちすることが期待される治療であるが、20%程度の患者さんはバイパスの血管に狭窄を起こしたり、血栓をつけたりし閉塞に至る。本研究ではバイパス血管の狭窄に關わる細胞の同定や遺伝子の変化を確認しており、遺伝子変化を制御によってこの問題を解決できるかもしれない。今後の臨床の応用に向けてさらなる検討を重ねる必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢動脈疾患に対する外科的血管再建では、大伏在静脈を用いることが多い。しかし、20-30%の割合で、グラフト狭窄を生じ、閉塞に至ってしまう点が臨床上的の問題である。本研究課題では、下肢動脈再建に用いられる大伏在静脈におけるグラフト狭窄の原因を同定することを目的としており、前回の若手研究結果から大伏在静脈の弁部にグラフト狭窄と關連するターゲットが存在することを証明した。静脈グラフトを用いた外科的血管再建は、カテーテル治療が発達する時代でも一定の役割をもつため、グラフト不全の原因となる内膜肥厚の制御により、その治療耐久性は飛躍的に向上することを背景に研究している。

研究成果の概要(英文)：With spreading of lifestyle-related diseases, a number of peripheral artery disease (PAD) patients is increasing. As one of treatments for PAD, bypass surgery is very important for PAD patients with severe grade of atherosclerosis, which is difficult to treat by endovascular therapy. Bypass surgery using a vein graft is generally durable, however 20% of bypass grafts develop graft stenosis and graft thrombosis due to mainly intimal hyperplasia. In this study, elucidating of identification and function of cells involved with intimal hyperplasia at a venous valve site of vein graft, common site of graft stenosis. Especially, genetic changes of the cells and tissues are elucidated, and further study is needed to establish as clinical application for overcoming the clinical issues by regulating the genetic changes of cells.

研究分野：血管外科

キーワード：内膜肥厚 静脈グラフト 重症虚血 末梢バイパス術 グラフト不全 静脈弁 末梢動脈疾患

1. 研究開始当初の背景

自家静脈グラフトは、閉塞性動脈硬化症をはじめとする末梢動脈疾患 (PAD) に対する血行再建術に使用する第一選択のグラフトである。その耐久性は良好 (Bradbury, A. W. et al. 2010 J Vasc Surg. 51,5S-17S) であるが、自家静脈グラフト症例の 20-30% に発生する進行性内膜肥厚 (IH) によるグラフト閉塞が問題となる (Figure 1A-B)。これは静脈が動脈環境に置かれることで生じる生理的反応 (graft healing) であるが、これが過度となると IH を惹起し術後中長期のグラフト開存成績に大きな影響を及ぼす。グラフト不全の原因は多岐にわたるが、その大半は IH によるものと当教室からも報告されている (Figure 1C, Kikuchi S, Journal of Vasc. Surg. 2017)。IH 好発部位の1つは静脈弁部で約 20% である (Szilagyi, D. E. et al. 1973. Ann Surg 178 (3) 232-46)。弁部では動脈圧刺激 (vascular injury) に伴う壁肥厚が生じ、グラフト狭窄、閉塞をきたす。

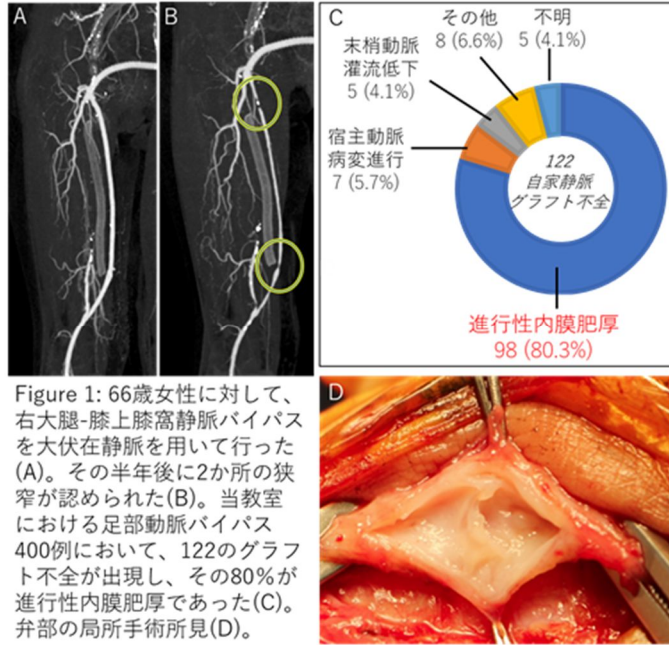


Figure 1: 66歳女性に対して、右大腿-膝上膝窩静脈バイパスを大伏在静脈を用いて行った (A)。その半年後に2か所の狭窄が認められた (B)。当教室における足部動脈バイパス400例において、122のグラフト不全が出現し、その80%が進行性内膜肥厚であった (C)。弁部の局所手術所見 (D)。

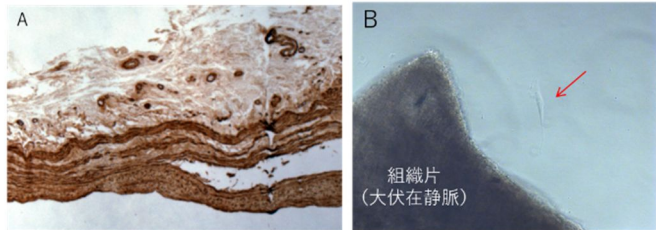


Figure 2: 大伏在静脈を α -SMA で免疫染色した。組織は外側層 (外膜中膜)、内側層 (中膜内膜) で離れてきている (A)。組織片から遊走した細胞をカウントすることで遊走能を評価した。(B)

我々は血管外科であるメリットを最大限に利用し、実際にバイパス手術における余剰移植前大伏在静脈 (SM) を用いて、同一患者の弁部と非弁部から細胞を採取し、その機能を比較した。これまでに得られた知見は以下のとおりである。

- (1) 組織学的に分離した2層のうち (Figure 2)、内側層で弁部遊走能が亢進していた。(Figure 3)。
- (2) 蛍光免疫染色にて弁部、非弁部内側層由来細胞は、共に平滑筋細胞 (SMC) マーカーが陽性であった。
- (3) 組織から遊走した弁部 SMC は非弁部 SMC に比較して、PDGF-BB 刺激下遊走能が有意に亢進していた。
- (4) 弁部 SMC の機能亢進メカニズムは、PDGF-FGF2 との相互作用であった。(Figure 4)
- (5) 細胞レベルのメカニズムを組織遊走能で適応させてみたが、弁部、非弁部ともに FGF2 抗体による抑制効果は認められなかった。(Figure 5)

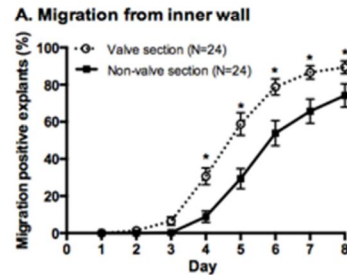


Figure 3: 内側層からの細胞遊走は弁部で有意に亢進していた。

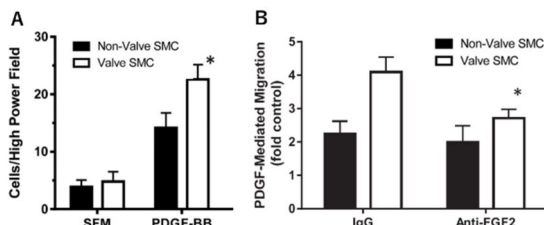


Figure 4: 弁部SMCにおけるPDGF刺激下細胞遊走能は有意に亢進していた (A)。PDGF刺激細胞遊走をFGF2抗体を用いて阻害したところ、弁部由来SMCのみに有効であった。

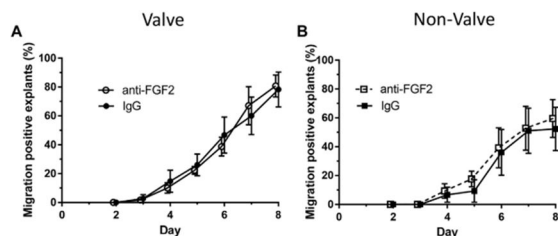


Figure 5: 弁部SMCに特徴的なFGF2関与について、FGF2抗体を用いて組織遊走能を評価したが、弁部 (A)、非弁部 (B) 共に効果は認められなかった。

2. 研究の目的

弁部 SMC から得られた PDGF-FGF2 相互作用メカニズムは、組織から遊走した細胞群が培養と継代を重ねる中で分化した過程で得られた結果である可能性がある。細胞レベルから得た結果は、本来我々が実臨床に向けて着目したい IH 制御因子とは異なり、弁部組織内に存在し、かつ増殖因子によりその細胞自体が分化もしくは周囲細胞分化を促す、比較的未分化な細胞が存在しているという(細胞の多様性、複雑性)仮説が想起された。

3. 研究の方法

(1) 組織獲得と準備

下肢静脈瘤に対して大伏在静脈抜去術を受ける患者様から大伏在静脈を獲得する。この際に大伏在静脈分岐部から 2 番目に位置する弁部及びその中枢側の無弁部を獲得する。静脈瘤の場合、得られる組織長は 5cm ほどであるため、下記実験に十分に使用可能である。以下、**弁部と非弁部の比較研究**を 20%血清/D MEM を培養条件として用いて実施する。

(2) 組織免疫染色による壁リモデリング因子の発現と関与の確認

組織の免疫組織染色を培養前(獲得時)、培養 14 日目で評価する。本実験は全層リング状組織で行い、組織固定は 70%エタノールを用いる。壁リモデリングに関与する因子発現(FGFR1-3、FGF2、PDGFR 及び PDGFR)と炎症マーカー発現の評価をする(IL-6, MCP1, IL-1 , SRF, KLF4 など)。

(3) 組織からの遊走細胞の生物学的特徴の評価

獲得組織の**内側層(内膜中膜)**を培養し、組織周囲に遊走増殖した細胞の特徴を、免疫染色にて評価する。評価項目は、前駆細胞(CD34)、平滑筋細胞(SMA)、内皮細胞(CD31)、マクロファージ/単球系細胞(CD68)に対するマーカーと、弁部における IH 関連因子を評価する(FGFR1-3、FGF2、PDGFR 及び PDGFR)。スライドガラス上の組織から遊走した細胞(Passage 0)を免疫染色する。特に未分化細胞の同定には多重蛍光免疫染色を用いて、上記表面マーカーの発現を確認する。組織は tissue chopper を用いて当分に分割し、1.5X1.5mm 大のサンプルが 20 - 30 個/組織ほど獲得できるため、各染色 2 サンプルずつの染色が可能である。

(4) 遺伝子スクリーニング

本研究では弁部、非弁部内側組織からそれぞれ RNA を獲得し、RNA シークエンスを用いた網羅的遺伝子発現解析を用いて評価を行う。組織からの細胞遊走は培養後 3 日目から生じるため、培養 2 日目の組織からの RNA の獲得がベストと考えている。弁部と非弁部の比較に加えて、培養による組織刺激による変化を捉えるため、培養前と培養 2 日目の組織が必要であり、1 ペアあたり 4 サンプル必要である。

(5) 細胞分画の確認

各細胞集団がどのような構成により成り立っているかを確認するため、前駆細胞マーカー(CD34)、血管内皮細胞マーカー(CD31)、SMC 細胞マーカー(-SMA、MHC11)、線維芽細胞マーカー(FGF1-3)、マクロファージ/単球系細胞マーカー(CD68)、未分化細胞マーカーである Nanog、Myc、Sca-1、c-kit などの発現や、ペリサイトマーカーNG2、RGS-5 などの発現の違いを mRNA レベルで解析する。本解析は 1)で獲得した RNA を用いる予定である。

(6) 弁部由来細胞群の未分化細胞の探索

弁部で証明された機能的な違いが、組織の修復過程で活性化される組織幹細胞や前駆細胞による可能性を検討する。FACS により各細胞成分の存在割合を確認するが、上記実験から得られた結果から、弁部に局在する細胞に目星をつける。組織から遊走した細胞を用いて FACS による細胞分画検索を行う。(当大学完備の FACS Calibur を使用する。目標 5 ペア)

(7) 弁部由来未分化細胞の反応性の検討

FACS を行い各細胞を分離した後(BD FACS Aria にて弁部遊走細胞 5 検体を分離し用いる予定)、内皮や平滑筋細胞に誘導するため培養し、反応性に違いがあるか検討する。得られた細胞に対して、血清や PDGF,FGF を用いて分化誘導し、上記内皮細胞、SMC マーカー、線維芽細胞マーカー、マクロファージ単球系細胞マーカーについて、免疫染色と mRNA 発現を用いて細胞を同定していく。また、非弁部で得た SMC との共培養による PDGF 刺激による遊走能や増殖能の違いについてもアイデアの一つとして考えている。

4. 研究成果

(1) 組織獲得と準備

下肢静脈瘤の手術で組織を得る予定だったが、その治療法はレーザー治療が多く、実際に静脈組織片を採取する事ができなかった。ただし末梢バイパス手術で用いられた余剰静脈片を獲得できたが、わずか 1-2cm であり、そこに静脈弁が存在している可能性は低く、遺伝子スクリーニングに用いるのが精一杯であり、静脈弁から細胞を採取することはできなかった。そのため弁部から直接細胞を得ることができなくなったため、無弁部から得た細胞を用いて実験する方針となった。

(2) 組織免疫染色による壁リモデリング因子の発現と関与の確認

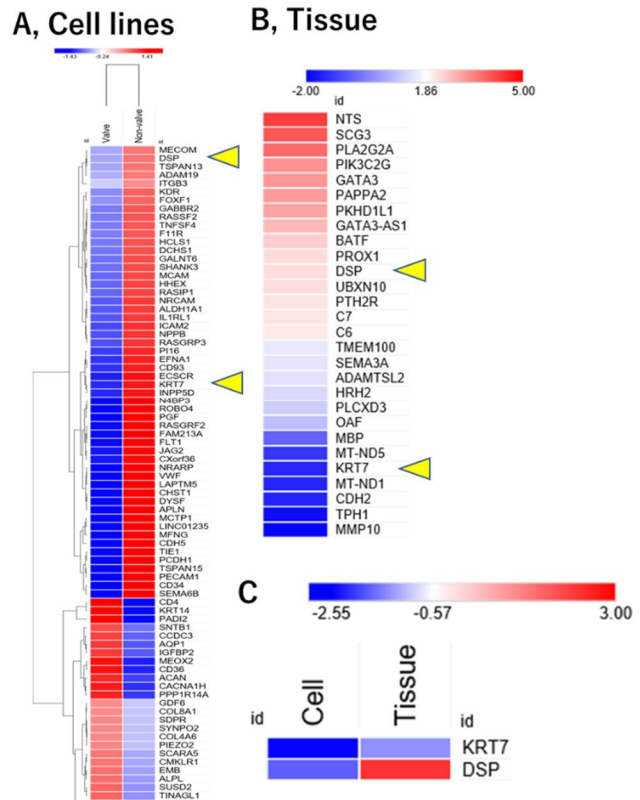
弁部組織の獲得が困難となり、培養前後のリモデリング因子発現変化を免疫染色で評価することが困難となった。

(3) 細胞と組織の反応性の違いと遺伝子スクリーニング

冠動脈及び下肢動脈バイパスに使用された大伏在静脈を用いた ex-vivo 研究で弁部は、非弁部に比較して有意に遊走能が亢進しており、組織から抽出した細胞(主に平滑筋細胞)を用いた in-vitro では、弁部由来細胞の増殖能、遊走能が有意に亢進し、組織片結果と一致したが、この細胞表現型の違いは、PDGFB による刺激により共発現した FGF2 が、弁部におけるさらなる増殖能亢進に寄与していたことが in-vitro でわかったが、本メカニズムは組織片の ex-vivo 研究で無効であった。そのため、組織及び細胞レベルで、弁部と非弁部由来組織及び細胞の RNA シークエンスを行った結果、そのほとんどが共通しない遺伝子発現であったが、唯一 2 遺伝子のみが一致した。その内の 1 遺伝子は DSP (Desmoplakin) という遺伝子であったが、組織と細胞間で全く反する発現形態であった一方で、KRT7(Keratin7)は同様の発現形態であり、KRT7 をターゲットした機能解析を行うこととした。(ヒートマップ参照)

(4) KRT7 のノックダウンによる細胞機能評価

余剰片を用いて細胞を新規に採取しているが、平滑筋細胞増殖能のばらつきが大きい。血行再建対象となる末梢動脈疾患患者は、腎機能障害、糖尿病など多数の背景疾患が併存しており、これらの背景疾患に関連して細胞増殖能に違いが生じているのかは定かでない。上記機能評価には、ある一定の増殖能を持つ細胞を用いて行う必要があるため、細胞をある程度選定し行っている。無弁部から得られた細胞は -SMA が高発現しており免疫染色から平滑筋細胞と考えられるが、Silencer® Select (Thermo fisher) を用いてノックダウンを試みたが、ノックダウン効率が非常に悪く断念した。現在、ウイルスベクターによる遺伝子導入を試みており、数株導入し KRT7 のノックダウンが得られており、細胞増殖が亢進される傾向にあるが、N 数を増やして再現性を確認中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchida Daiki, Saito Yukihiro, Kikuchi Shinsuke, Yoshida Yuri, Hirata Satoshi, Sasajima Tadahiro, Azuma Nobuyoshi	4. 巻 71
2. 論文標題 Development of gene therapy with a cyclic adenosine monophosphate response element decoy oligodeoxynucleotide to prevent vascular intimal hyperplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Surgery	6. 最初と最後の頁 229 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvs.2019.02.042	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 Wang Lei, Kikuchi Shinsuke, Schmidt Tannin A., Hoofnagle Max, Wight Thomas N., Azuma Nobuyoshi, Tang Gale L., Sobel Michael, Velamoor Gautum R., Mokadam Nahush A., Kenagy Richard D.	4. 巻 253
2. 論文標題 Inhibitory Effects of PRG4 on Migration and Proliferation of Human Venous Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 53 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2020.03.028	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 Kikuchi Shinsuke, Yoshioka Yusuke, Prieto-Vila Marta, Ochiya Takahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Involvement of Extracellular Vesicles in Vascular-Related Functions in Cancer Progression and Metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2584 ~ 2584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20102584	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 Kikuchi Shinsuke, Yamaguchi Takuya, Miyake Keisuke, Uchida Daiki, Koya Atsuhiko, Iida Takafumi, Kurosawa Atsushi, Sasakawa Tomoki, Kunisawa Takayuki, Azuma Nobuyoshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Effectiveness and Safety of Ultrasound Guided Lower Extremity Nerve Blockade in Infragenicular Bypass Grafting for High Risk Patients With Chronic Limb Threatening Ischaemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Vascular and Endovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 206 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejvs.2019.03.023	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Shinsuke Kikuchi, Naoya Kuriyama, Ai Tochikubo, Daiki Uchida, Atsuhiko Koya, Tadahiro Sasajima, Nobuyoshi Azuma
2. 発表標題 Prognostic Factors of Long-term Survivors After Surgical Revascularization in Dialysis-dependent Patients with Chronic Limb Threatening Ischemia
3. 学会等名 ESVS Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoya Kuriyama, Shinsuke Kikuchi, Takamitsu Tatsukawa, Ai Tochikubo, Daiki Uchida, Atsuhiko Koya, Nobuyoshi Azuma
2. 発表標題 A Change of Duplex Sonographic Velocities and Flow of Infrapopliteal Vein Graft in 30 Days After Surgery is a Strong Predictor for 1-year Graft Patency
3. 学会等名 ESVS Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinsuke Kikuchi
2. 発表標題 The Factors Associated with Postoperative Ambulatory Function After Lower Extremity Bypass: The Importance of Wound Severity of WIFI Classification
3. 学会等名 Vascular Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地信介
2. 発表標題 CLTIにおける末梢動脈バイパス術の立ち位置とその創傷治癒への貢献
3. 学会等名 Complex Cardiovascular Therapeutics 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地信介
2. 発表標題 重症下肢虚血に対する外科的血行再建後の創傷治癒及び歩行能維持 / 獲得における阻害因子の検討
3. 学会等名 第47回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地信介
2. 発表標題 重症下肢虚血に対する血行再建後の創傷治癒の実態と課題
3. 学会等名 第11回日本下肢救済・足病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地信介
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

1. 発表者名 菊地信介
2. 発表標題 透析例に対する創傷治癒を目指したバイパス術の適応と創傷管理
3. 学会等名 第60回 日本脈管学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinsuke Kikuchi
2. 発表標題 Possibility of Exosomal MicroRNAs Associated with Chronic Limb-Threatening Ischemia as a promising Biomarker
3. 学会等名 ISEV2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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

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			
米国	University of Washington	Benaroya Research Institute	Virginia Mason Medical Center	他3機関