

令和元年6月20日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26293309

研究課題名(和文) 臨床標本遺伝子解析結果に基づいた静脈グラフト内膜肥厚予測のバイオマーカー開発

研究課題名(英文) Clinical study for biomarker predicting vein graft intimal hyperplasia

研究代表者

東 信良 (AZUMA, NOBUYOSHI)

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) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：静脈グラフトを用いたバイパス術において、グラフト閉塞は再血行再建や下肢切断につながる重大なイベントであるが、その予測や予防手段は未だ実現できていない。本研究では120例を前向き臨床研究に登録し、グラフト閉塞の術前予測因子を検討し、以下の成果を得た：術前血液中の酸化ストレス(d-ROMs)、心不全、女性がグラフト閉塞危険因子として検出された。次世代シーケンズを用いたexosome内microRNAsの網羅的解析によりグラフト不全に関与するmicroRNAsを検出した。グラフト閉塞のバイオマーカーとして、d-ROMsおよびexosome内miRNAが有力なバイオマーカーとなりうると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

静脈グラフトの進行性内膜肥厚はおよそ25%程度の症例に発生するとされているが、どの症例に発生するのか未だ明らかではなく、的確なグラフト予後予測が困難な状況である。今回の研究によって、いくつかのグラフト予後予測因子が明らかとなったことで、これらを適切に組み合わせて用いて術前に静脈グラフトを移植した場合の予後を予測できるようになれば、予後不良と予測された症例には別の治療法を選択するなど適切な治療方法の提示が可能となり、患者にも医療コストにも大いに意義がある。

さらに内膜肥厚の発生予測は他の血管治療にも応用可能であり、動脈硬化発生や再狭窄予防などの分野においても学術的価値も高いと考える。

研究成果の概要(英文)：A prospective observational study enrolled 120 vein bypass grafts in patients with critical limb ischemia was done in order to explore some biomarkers predicting the graft stenosis or occlusion. Preoperative oxidative stress marker (d-ROMs), heart failure, and female gender were listed as preoperative factors predicting vein graft failure. We also found some microRNAs extracted from exosome possibly predicting graft failure as results of next generation sequencer analysis.

Combinations of these preoperative factors may contribute to prediction of graft prognosis which may provide clinicians important suggestions for adequate treatment selection.

研究分野：血管外科学

キーワード：下肢閉塞性動脈硬化症 下肢血行再建 静脈グラフト狭窄 内膜肥厚 バイオマーカー マイクロRNA 酸化ストレス エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

自家静脈を用いたバイパス術は下肢閉塞性動脈疾患や冠動脈疾患において、最重要の術式の一つである。しかし、そのグラフト閉塞の主因であるグラフト内膜肥厚は未だ解決されておらず、内膜肥厚の発生予測も未だ不可能である。我々の研究では、内膜肥厚発生に関わる2種の遺伝子(MAPKAP kinase 3 および FHL5)を解明してきたが、その発現に関わる患者背景はいまだ解明されていない。グラフトを閉塞に至らしめるような進行性内膜肥厚を発生する機序として、糖尿病や高脂血症、高血圧、喫煙、腎不全、足病変発生などの酸化ストレスや炎症性ストレスが患者の静脈に複雑に影響し、移植前にすでに静脈に背景変化をすでに起こしているという仮説が提唱されている。教室の臨床研究でも、術中摘出静脈の病理組織で移植前からすでに中膜線維化および内膜肥厚を認めるものが存在していることが明らかになっており、移植後に発生する内膜肥厚を移植前に予測する可能性が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

バイパスグラフトとして用いる静脈材料の質的不良を引き起こすリスクファクター(静脈不良因子)を明らかにし、静脈不良因子の中でも移植後内膜肥厚に影響を及ぼす因子を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 【単施設・前向き観察研究とエンドポイント】

静脈グラフトを用いて血行再建を行う適応のある下肢末梢動脈閉塞性疾患および冠動脈疾患に対し、本研究への参加同意が得られた患者を登録し、下記の必要な情報収集および検査を行い、手術後、1, 3, 6, 9, 12, 18, 24ヶ月後に追跡調査を行い、評価項目について評価して、術後グラフト予後に影響を及ぼすバイオマーカーの解析を行う。

バイパスグラフトの有意狭窄ないし閉塞の発生(グラフト不全)をエンドポイントとする。有意狭窄とは、エコーにて3m/secの加速血流を伴うか、あるいは造影検査で直径の75%以上狭窄が証明されたグラフトまたは吻合部の狭窄とする。

### 【測定項目】

年齢、性別、歩行能、糖尿病、腎不全等の背景因子の把握、術前血液検査における酸化ストレス、炎症性ストレス、糖尿病や高脂血症の管理状況指標、バイオマーカーとしての Exosomal microRNAs の抽出、術中静脈の質的評価、グラフト予後、生命予後

## 4. 研究成果

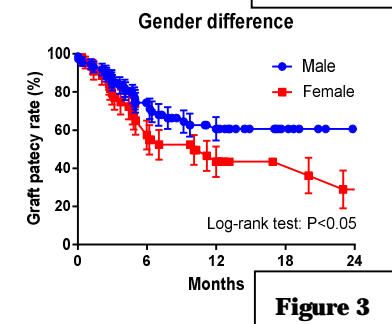
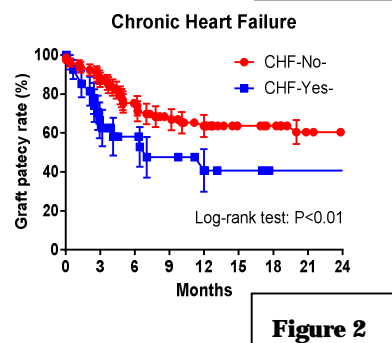
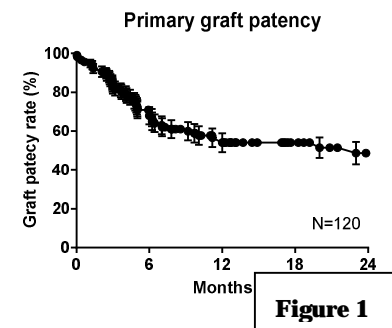
### 研究成果

#### 【背景因子からみるグラフト不全関与因子】

登録された120例(重症虚血肢103例、間欠性跛行17例)の背景因子は以下の通りである。平均年齢72歳、平均BMI 22.4、女性44例(36.8%)、糖尿病90例(75%)、慢性腎不全透析55例(46%)、歩行困難例28例(23%)、虚血性心疾患63例(52.6%)、慢性心不全31(26%)、脳血管疾患29例(24%)であった。Single vein graftとして用いられた静脈グラフトは105例(87.5%)であり、術中グラフト評価において、不良と判断された症例は25例(21%)であった。一次グラフト開存率は術後1年54%、術後2年48%であった(Figure 1)。開存率は、Figure 1にもあるとおり、術後3~12か月で最も顕著に低下することから、移植後に発生する内膜肥厚による進行性のグラフト狭窄が当初の予想通り最重要のグラフト狭窄・閉塞原因であった。

グラフト不全に関与する因子をCox比例ハザードモデルで検出した結果、慢性心不全(Figure 2)、女性(Figure 3)、酸化ストレス反応(後に記載)が有意な因子として検出された。当初、術中グラフト評価がグラフト予後に関与すると推測していたが、不良グラフトの関与の傾向のみ認められ、有意ではなかった(P=0.12)。

慢性心不全(CHF)は虚血性心疾患に伴う虚血性心不全が主であり、CHF合併例では術後6か月と比較的早期にグラフト不全が生じていることから、循環動態がグラフトリモデリングに及ぼす影響や、冠動脈硬化症と末梢動脈疾患によるPolyvascular diseaseを背景とした循環因子がグラフト不全に及ぼす可能性を考察した。本研究は術前バイオマーカーという視点による研究であることから、上記のPolyvascular diseaseに関与するバイオマーカーを検索することとした。動脈硬化性病変は中膜を主に炎症を背景とする病変であり、今後動脈硬化性疾患の活動度を適切に推



測できる特徴を持つ Exosome に着目し、かつ多機能に渡ると言われている microRNAs の検出が好ましく、患者血清から Exosomal microRNAs の抽出を試みた。

【Polyvascular disease に関与する】

患者血清から超遠心法を用いて Exosome を抽出し、small RNAs を獲得したのちに、重症虚血肢をベースとした polyvascular disease に関与する exosomal microRNAs を次世代シーケンスを用いて検出した (Figure 4 ; D; Polyvascular disease を合併した群、C: D と背景因子を一致させたコントロール群、H: 動脈硬化背景因子の無いヘルシー群 各 5 例)。microRNAs は upregulation しているものが多く、これらからグラフト不全に関与する microRNAs を絞っており、その成果が期待される。

【内膜肥厚発生における女性の意義】

女性が男性に比較してグラフト不全が有意に生じていることから (Figure 3)、グラフト内膜肥厚発生率の追跡を大規模に後ろ向きに調査することとした。教室で経験した single vein graft 246 末梢バイパスグラフトを調査した結果、女性における内膜肥厚発生率が有意に高いこ

とが証明された (Figure 5)。

Propensity score matching 法を用いて背景因子を調整したが、グラフト内膜肥厚率の性差は維持されたことから、女性がグラフト不全における有意な不良因子であることが証明された (Figure 6,7,8)。

ここで性差がグラフト因子に関連するメカニズム解明の第一歩として、術前酸化ストレス/炎症マーカーの関与を分析した。足部創部の大きさや感染合併に性差は認めなかったが、酸化ストレスマーカーである D-ROM が女性で有意に高値であった一方で (P<0.01)、炎症マーカーである HMGB-1 が有意に低値であり (P=0.04)、加えて血管内皮障害マーカーである RAGE も術前低い傾向であることがわかった (P=0.07) (Table 1)。

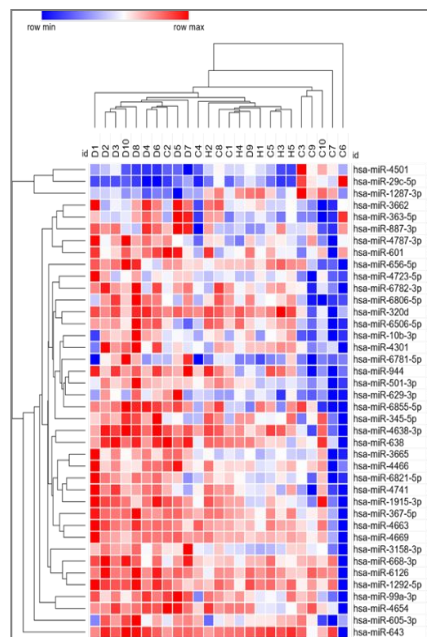


Figure 4

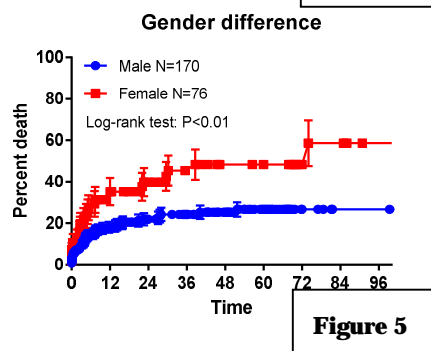


Figure 5

Table 1.

| 酸化ストレス<br>炎症マーカー |    | 平均値      | 標準偏差     | P値     |
|------------------|----|----------|----------|--------|
| D-ROM            | 男性 | 276.8537 | 75.60343 | P<0.01 |
|                  | 女性 | 382.3333 | 100.4519 |        |
| BAP              | 男性 | 2460.707 | 824.6905 | 0.296  |
|                  | 女性 | 2262.5   | 533.7637 |        |
| LOX              | 男性 | 749.3333 | 717.4314 | 0.137  |
|                  | 女性 | 563.4074 | 282.7994 |        |
| LAB              | 男性 | 3.6881   | 1.19902  | 0.628  |
|                  | 女性 | 3.8222   | 0.96927  |        |
| LOXindex         | 男性 | 2677.429 | 2354.201 | 0.175  |
|                  | 女性 | 2114.741 | 981.3116 |        |
| TNF              | 男性 | 6.7974   | 8.2048   | 0.64   |
|                  | 女性 | 6.0089   | 3.73194  |        |
| MCP1             | 男性 | 290.0357 | 138.6894 | 0.61   |
|                  | 女性 | 309.5926 | 179.9785 |        |
| HMGB1            | 男性 | 22.2667  | 34.30855 | 0.04   |
|                  | 女性 | 10.4407  | 11.28547 |        |
| 8-OHdG           | 男性 | 0.2033   | 0.19645  | 0.44   |
|                  | 女性 | 0.2418   | 0.20977  |        |
| MIF              | 男性 | 41.6214  | 23.17043 | 0.30   |
|                  | 女性 | 36.9593  | 13.7982  |        |
| RAGE             | 男性 | 2122.333 | 1377.204 | 0.07   |
|                  | 女性 | 1606.185 | 963.2201 |        |

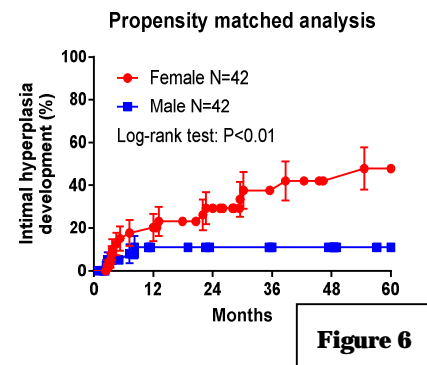


Figure 6

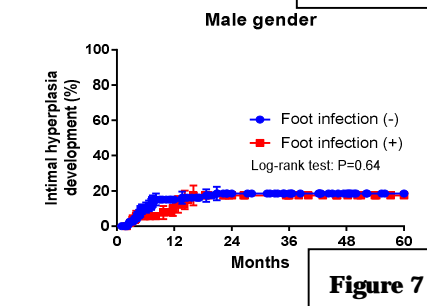


Figure 7

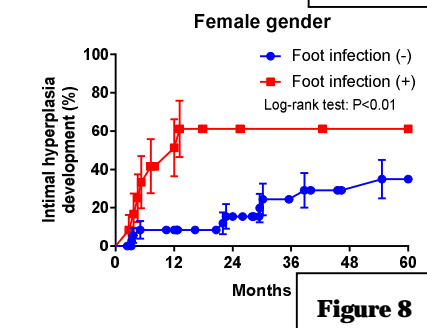
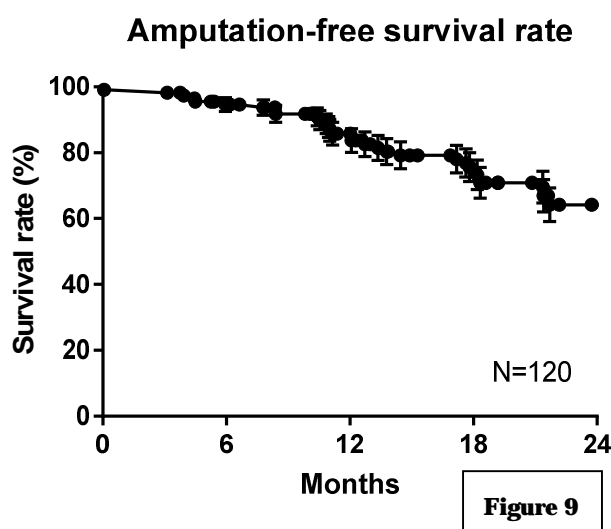


Figure 8

女性は術前酸化ストレスが亢進している一方で、炎症が男性に比べて抑制されていることがわかったが、グラフト内膜肥厚と炎症は非常に密接な関係にあることから、女性において特に足部感染合併がグラフト内膜肥厚発生に影響を与えると仮説を立て上記後ろ向きデータを検証したところ、女性において感染合併例はバイパス後のグラフト内膜肥厚の発生が有意に多かった。術前酸化ストレスとの関連の可能性も考えられ、今後のさらなるメカニズム解明が期待される。

【グラフト閉塞予測術前バイオマーカーの探索】

グラフト開存に関与する術前バイオマーカーを検索したところ、グラフト開存例とグラフト不全例の間で有意な差が認められたのは、酸化ストレスマーカーである D-ROM であり、グラフト不全例で有意に高値であった(P=0.03 Table 2)。上記で示した通り、D-ROM 高値は女性による影響も考えられるが、酸化ストレスの背景には、酸化 LDL コレステロールと炎症の関与が考えられ、静脈グラフトを動脈環境に移植した後に、この環境変化の際に生じる刺激が、術前の酸化ストレスの程度で大きく左右されることが示唆される。



【患者生命予後予測術前バイオマーカーの探索】

Amputation-free survival rate を Figure 9 に示す。

術後大切断に至った症例は認めなかった。

生存率は術後 1 年 86%、術後 2 年 64%であった。術後死亡に関与するバイオマーカーは、8-OHdG のみであった(Table 3)。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。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。循環中は生体内で代謝や分解されることなく、比較的安定して保持されている。下肢虚血や心筋虚血に寄与する動脈硬化病変により、活性酸素が産生され、生体損傷を通じて生存率に影響を与えることが考えられる。

【結語】

静脈グラフトを用いたバイパス術において、グラフト閉塞は再血行再建や下肢切断につながる重大なイベントであるが、その術前予測は症例の背景因子や術前状態に基づいた個別医療、即ち適切な治療方法選択において極めて重要となる。本研究では 120 例の前向き臨床研究から、術前血液中の酸化ストレス(d-ROMs)、心不全、女性がグラフト閉塞予測危険因子として検出された。次世代シ-

Table 2.

| 酸化ストレス炎症マーカー | 生存  | 平均値      | 標準偏差     | P値   |
|--------------|-----|----------|----------|------|
| D-ROM        | 生存例 | 314.913  | 94.40688 | 0.91 |
|              | 死亡例 | 318.1667 | 115.7936 |      |
| BAP          | 生存例 | 2434.544 | 811.7635 | 0.41 |
|              | 死亡例 | 2265.056 | 504.4218 |      |
| LOX          | 生存例 | 621.6    | 593.6154 | 0.19 |
|              | 死亡例 | 836.6667 | 586.8115 |      |
| LAB          | 生存例 | 3.826    | 1.13404  | 0.28 |
|              | 死亡例 | 3.4944   | 1.06189  |      |
| LOXindex     | 生存例 | 2331.44  | 1974.02  | 0.36 |
|              | 死亡例 | 2825.333 | 1927.968 |      |
| TNF          | 生存例 | 5.5364   | 3.44206  | 0.24 |
|              | 死亡例 | 8.9761   | 11.84958 |      |
| MCP1         | 生存例 | 287.93   | 163.4081 | 0.52 |
|              | 死亡例 | 315.5556 | 130.7297 |      |
| HMGB1        | 生存例 | 19.31    | 29.45745 | 0.45 |
|              | 死亡例 | 13.3     | 25.2547  |      |
| 8-OHdG       | 生存例 | 0.1887   | 0.1847   | 0.05 |
|              | 死亡例 | 0.2943   | 0.23226  |      |
| MIF          | 生存例 | 40.202   | 19.97915 | 0.68 |
|              | 死亡例 | 37.9167  | 21.00835 |      |
| RAGE         | 生存例 | 2034.68  | 1373.303 | 0.15 |
|              | 死亡例 | 1633.389 | 819.4167 |      |

Table 3.

| 酸化ストレス炎症マーカー | グラフト開存 | 平均値      | 標準偏差     | P値   |
|--------------|--------|----------|----------|------|
| D-ROM        | 開存例    | 300.714  | 88.1788  | 0.03 |
|              | 閉塞例    | 365.2    | 121.938  |      |
| BAP          | 開存例    | 2412.755 | 805.3935 | 0.62 |
|              | 閉塞例    | 2302.333 | 468.6376 |      |
| LOX          | 開存例    | 663.451  | 628.8557 | 0.72 |
|              | 閉塞例    | 723.7647 | 494.5528 |      |
| LAB          | 開存例    | 3.6431   | 0.95105  | 0.23 |
|              | 閉塞例    | 4.0235   | 1.51184  |      |
| LOXindex     | 開存例    | 2345.373 | 2009.36  | 0.40 |
|              | 閉塞例    | 2812.588 | 1814.869 |      |
| TNF          | 開存例    | 6.7684   | 7.67601  | 0.51 |
|              | 閉塞例    | 5.4824   | 3.13255  |      |
| MCP1         | 開存例    | 293.902  | 138.4418 | 0.90 |
|              | 閉塞例    | 299.2647 | 201.6138 |      |
| HMGB1        | 開存例    | 17.6451  | 31.63142 | 0.97 |
|              | 閉塞例    | 17.9412  | 15.43442 |      |
| 8-OHdG       | 開存例    | 0.2104   | 0.20083  | 0.67 |
|              | 閉塞例    | 0.2352   | 0.21093  |      |
| MIF          | 開存例    | 38.5667  | 20.06336 | 0.47 |
|              | 閉塞例    | 42.6882  | 20.59693 |      |
| RAGE         | 開存例    | 1992.471 | 1327.514 | 0.47 |
|              | 閉塞例    | 1736.412 | 1030.999 |      |

クエンズを用いた exosome 内 microRNAs の網羅的解析によりグラフト不全に関与する microRNAs を検出した。グラフト閉塞のバイオマーカーとして、d-ROMs および exosome 内 miRNA が有力なバイオマーカーとなりうると期待される。

さらに、末梢動脈硬化疾患の生命予後が悪性腫瘍に匹敵するかそれ以上に予後不良であることが知られているが、生命予後予測も適切な治療法選択の上で重要となる。本研究で得られた 8-OHdG は生命予後予測バイオマーカーとして有用なツールになると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Uchida D, Saito Y, Kikuchi S, Yoshida Y, Hirata S, Sasajima T, and Azuma N. Development of gene therapy with a cyclic adenosine monophosphate response element decoy oligodeoxynucleotide to prevent vascular intimal hyperplasia. J Vasc Surg 2019 in press: doi: 10.1016/j.jvs.2019.02.042.

Miyake K, Kikuchi S, Okuda H, Koya A, Sawa Y, Azuma N. Graft flow predictive equation in distal bypass grafting for critical limb ischemia. J Vasc Surg. 2019 in press: doi: 10.1016/j.jvs.2018.12.057.

### 〔学会発表〕(計 3 件)

Development of the Gene Therapy With CRE Decoy ODN to Prevent Vascular Intimal Hyperplasia. ATVB2018 サンフランシスコ 2018/5/10~12 Uchida D, Saito Y., Azuma N. Current Status of CLTI Treatment in Japan.

Vascular Annual Meeting 2019. ワシントン 2019/6/12-15, Azuma N.

The Factors Associating with Postoperative Ambulatory Function after Lower Extremity Bypass: The Importance of Wound Severity of Wifl Classification.

Vascular Annual Meeting 2019. ワシントン 2019/6/12-15 Miyake K, Azuma N.

### 〔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〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：内田 大貴

ローマ字氏名：UCHIDA, daiki

所属研究機関名：旭川医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：80422038

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。