

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10243

研究課題名(和文)血管新生因子誘導剤による術後脊髄虚血予防法の開発

研究課題名(英文) Development of a protection method to prevent spinal cord ischemia by promoting spinal collateral circulation with proangiogenic cytokine-inducer.

研究代表者

島村 和男 (Shimamura, Kazuo)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10507205

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)：本研究は、血管再生因子誘導剤による脊髄側副血行促進法を開発することを目的とした。まず虚血部位局所の薬剤濃度を上げるのに有効な手段として、nanoparticle(NP)を利用した静脈投与時の薬物動態および有効性の検証を行なった。また組織学的に血管再生因子の発現が血管再生因子誘導剤投与群で有意に増加していることを確認し、さらには投与群では虚血部位の血管内皮細胞が有意に増加していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to develop a protection method to prevent spinal cord ischemia by promoting spinal collateral circulation with proangiogenic cytokine-inducer (ONO-1301). We found that intravenously injected ONO-1301 incorporated liposome-based nanoparticle was selectively accumulated in ischemic area. Histologically, gene expression of proangiogenic cytokines of hepatocyte growth factor or angiopoietin-1 in the ischemic area were significantly higher and CD31-positive capillaries in the ischemic area were significantly greater in the ONO-1301 group.

研究分野：大動脈疾患

キーワード：大動脈瘤 脊髄虚血

## 1. 研究開始当初の背景

### 胸部大動脈瘤術後の脊髄虚血 (対麻痺)

胸部大動脈瘤は破裂すれば高率に死亡に至る予後不良な疾患である。このため、未破裂大動脈瘤が発見された場合、外科的手術 (開胸、人工心肺装置使用) による人工血管置換術が行われるが、重篤な術後合併症として脊髄虚血 (対麻痺) が術後に高率に発生する事が知られている。脊髄虚血の発生機序として、脊髄を還流する前脊髄動脈の血流不全がその主な原因とされており、前脊髄動脈への主要な血液流入路である肋間動脈および Adamkiewicz 動脈 (下行大動脈の下部胸椎-上部腰椎レベルから分枝) の血流を温存する事が重要とされてきた。

一方、従来の人工血管置換術に変わる低侵襲治療として、大動脈瘤に対するステントグラフト内挿術 (Thoracic endovascular aortic repair; TEVAR) が臨床導入され、外科治療との比較で術後死亡率および術後合併症が有意に低いことが明らかとなり、ガイドライン上で推奨治療とされるなど外科治療に変わる第一選択治療となりつつある。TEVAR は血管内にステントグラフトを留置し動脈瘤への血流・動脈圧を遮断することで動脈瘤を血栓化させ、破裂を予防する治療であり、治療原理上は肋間動脈血流を温存する事が不可能である。しかし興味深い事に TEVAR 術後の脊髄麻痺発生率は外科手術と同等以下であることが明らかとなり、その後の研究にて脊髄血流温存機序として脊髄への副側血行還流 (Spinal collateral circulation) が関与していることが明らかとなってきた。

### 脊髄への副側血行還流 (Spinal collateral circulation)

脊髄への血液還流は、前脊髄動脈へと続く主要な流入血管である肋間動脈・腰動脈の他、鎖骨下動脈および腸骨動脈の分枝からの副側血行が関与する事が知られている。これらの分枝からの副側血流が十分でない状態で

肋間動脈の血流を遮断すると、高率に脊髄麻痺が発生する事が臨床研究ならびに動物実験にて報告されており、また我々は Thin slice CT による画像解析にて、ステントグラフトにより全ての肋間動脈・腰動脈を閉塞させた症例において副側血行路からの脊髄還流を確認できることを報告し、この副側血行還流が脊髄虚血回避に重要な役割を伴っている可能性を示した。さらに、段階的に肋間動脈閉鎖を行う (= 一期的広範囲大動脈治療を回避する) ことが脊髄虚血回避に有用である事が示され、これは段階的肋間動脈閉鎖にて副側血行還流の発達が促されるためであると考えられている。更に、循環不全 (血圧低下) 症例では術後の対麻痺発生率が高い事、さらには遠隔期にも循環不全から脊髄虚血が発症する例が少なからずある事が報告されており、これは副側脊髄血行路の発達・還流が不十分であることが脊髄虚血発生の原因となっていると考えられている。

### 血管再生因子誘導材 ONO-1301 による血管新生

プロスタサイクリンアンタゴニストである ONO-1301 は安定した化合物であり、Polylactic and Glycolic Acid; PGLA のポリマーに含有させた ONO-1301 microsphere として使用する事で 1 ヶ月-3 ヶ月に渡り徐放させる事が可能である。我々の研究室では ONO-1301 が HGF や VEGF などの血管再生因子を誘導し、微小血管の新生を促す事で心筋梗塞モデルマウスの心機能を改善させる事を報告して来た。さらに、ONO-1301 除放型ステントグラフトを用いることで、大動脈周囲の血管新生が促進される事を示し、結果的にステントグラフトと大動脈壁の組織学的修復が促進される可能性を示した。そこで、ONO-1301 の血管新生効果を利用し、最終的に脊髄還流側副血行促進法を開発する事を目的とした本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、血管再生因子誘導剤であるONO-1301による脊髄副側血行促進法を開発し、術後の脊髄虚血を予防する方法を開発するための基礎的研究を行う事を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 薬剤の投与経路として脊髄内注入も候補となったが、経静脈投与は最も汎用性が高いことから、nano-sized liposomal particle (NP) を利用したONO-1301の静脈投与の薬物動態および有効性をまず検証した。今回は虚血再還流モデルとして既に確立されている心筋虚血再還流モデルを用い、ONO-1301NP投与後の血中濃度および心筋組織中濃度変化を観察した。

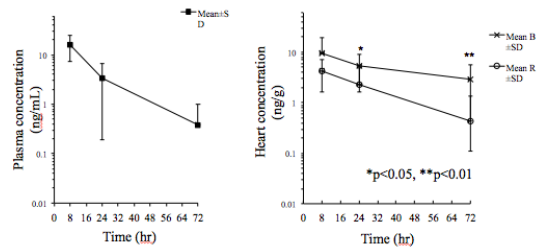
(2) ONO-1301NP投与後の虚血再灌流組織内分布を可視化するため、ガドリニウムを用いてliposomeをラベリングし、MRIによる組織内分布の検証を行なった。またliposomeを蛍光標識し共焦点顕微鏡にて組織観察を行なった。

(3) ONO-1301NP投与後の虚血部位における血管再生因子(VEGF,HGF,PDGF-,Ang1,SDF1)の発現および血管内皮発現を組織学的に観察した。

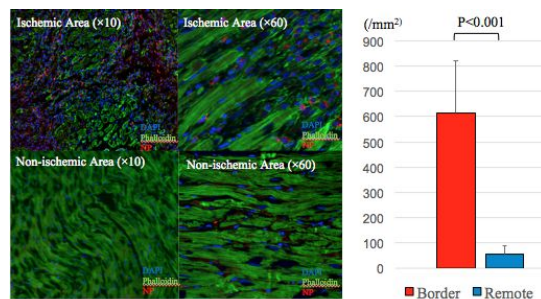
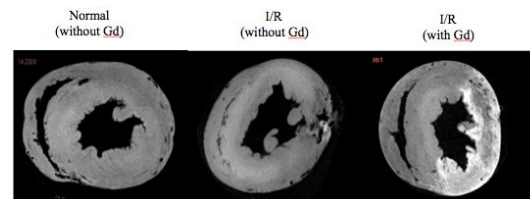
(4) 脊髄虚血に類似したモデルとして下肢虚血モデルを作成し、ONO-1301の徐放性マイクロスフェア製剤であるYS-1402を投与後の組織血流量の定量化をLaser Doppler Perfusion Imagingを用いて行なった。

### 4. 研究成果

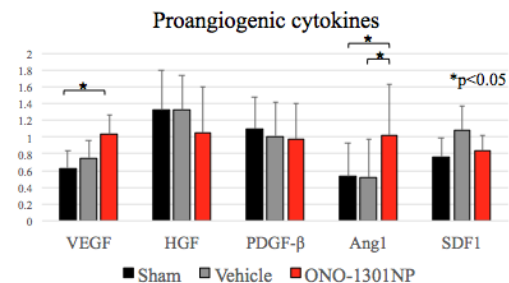
(1) 投与後8時間にONO-1301の血中濃度および心筋組織濃度ともにピークとなる事が確認された。さらに投与後24時間では心筋内濃度が血清濃度に比べ有意に上昇していることが確認された。

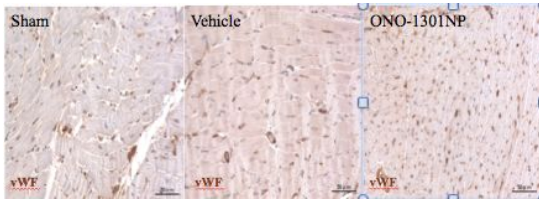


(2) ガドリニウムラベルを用いたMRIによる検証では投与後24時間で虚血部位にNPが集積することが確認された。また組織学的にはLiposomeが虚血部位に集積していることが確認された。

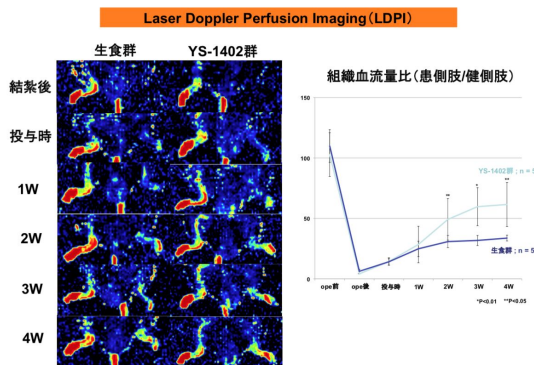


(3) 虚血再灌流部位において、VEGF, Ang1はONO-1301NP投与群で有意に多く発現していた。またvWV陽性毛細管も有意に増加していることが観察された。





(4) ONO1301(YS-1402)投与群においては、虚血肢における健常肢に対する組織血流比が2週間後より有意に高値となった。



本研究により、血管再生因子誘導剤である ONO-1301 の虚血再灌流部位への drug-delivery system として nanoparticle を用いた静脈内投与が有用となる可能性が示された。また各種虚血モデルにて ONO-1301 投与による虚血再灌流部位での血管新生効果および組織血流の増加が示された。今回は脊髄虚血モデルでの検証に至らなかったものの、ONO-1301 にて再灌流障害における側副血行路の発達を促進し、脊髄虚血予防法に繋がる可能性が示唆された。現在脊髄虚血モデルの作成および投与実験が進行中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Intravenous Injection of Liposome-based Nanoparticles Containing a Novel Prostacyclin Analogue Selectively Targets Ischemia-reperfused Myocardium

to Enhance Angiogenesis and Functional Recovery in Rat.

Shin Yajima, Shigeru Miyagawa et al.  
American Heart Association 2017,  
November 11, Anaheim

(2) 下肢虚血モデルマウスに対する ONO-1301 徐放性マイクロスフェア製剤の有効性の検討

中川 敬也、宮川 繁、倉谷 徹、澤 芳樹 他

第 17 回再生医療学会 2018 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

島村 和男 (SHIMAMURA, Kazuo)  
大阪大学医学系研究科助教  
研究者番号：10507205

(2) 研究分担者

倉谷 徹 (KURATANI, Toru)  
大阪大学医学系研究科寄附講座教授  
研究者番号：90448035

鳥飼 慶 (TORIKAI, Kei)

大阪大学医学系研究科講師  
研究者番号： 7 0 3 6 4 7 9 2

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)