

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20313

研究課題名(和文) HGFの血管新生効果の研究-微小循環を可視化したチャンバー法を用いて確かめる

研究課題名(英文) A study for angiogenesis of hepatocyte growth factor using a rabbit ear chamber

研究代表者

安倍 吉郎 (ABE, Yoshiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・准教授

研究者番号：40467808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Rabbit Ear Chamberを用いて観察した結果、hepatocyte growth factor (HGF)は微小血管形成を促進する効果を有していることがわかった。投与時期に関しては、潰瘍形成前に投与する方がより効果を発揮できる可能性があると考えられた。投与部位については、過去の報告ではHGFは筋肉内投与で導入効率が良いことが言われており、今回の結果と一致しない結果となった。耳介基部の筋肉では潰瘍部位から距離が遠く、HGF蛋白が潰瘍部に十分に発現されていない可能性があると思われた。このことについては今後の研究課題の一つであると思われた。

研究成果の概要(英文)：Inspection using a rabbit ear chamber (REC) revealed a hepatocyte growth factor (HGF)-induced angiogenesis. Preliminary HGF injection before, rather than after, ulcer formation was more effective for angiogenesis. Subcutaneous injection around the REC was also more effective, although intramuscular injection has been reported to be superior to injection through other sites. Distance from the base of the ear, in which HGF was injected, to the ulcer possibly led to the decreased HGF protein expression. The result of our study warrants further research.

研究分野：形成外科学

キーワード：微小血管 血管新生 遺伝子治療 肝細胞増殖因子

### 1. 研究開始当初の背景

近年の健康調査によれば、本邦における尿病患者は 2000 万人以上と推測され、そのうち約 4 割は十分な治療を受けていない。合併症の一つである糖尿病性足潰瘍の多くは難治性で再発率が高く、下肢切断に至ることもしばしば経験する。下肢救済を目的とした血管内治療やバイパス術、あるいは遊離組織移植が行われることもあるが、全身状態が不良な症例では適応にならないこともある。

そこで負担が少ない非侵襲的な治療方法として、あらたに遺伝子治療を用いた血管新生療法が期待され、VEGF (vascular endothelial growth factor) 遺伝子や FGF (fibroblastic growth factor) 遺伝子を用いた遺伝子治療が臨床応用されつつある。

HGF (hepatocyte growth factor) は、発見当初は肝細胞に特異的な増殖因子として考えられていたが、その後多くの細胞で増殖を促進していることが明らかになり、血管内皮細胞においても増殖効果と抗アポトーシス効果を有することが明らかになっている。虚血性疾患や糖尿病など血管内皮細胞障害を引き起こす疾患においては、障害組織中の HGF が低下しており、その低下がますます内皮細胞の修復や機能改善を妨げていることが想定され、これらの疾患において HGF の補充は内皮再生と血管新生を促し、側副血行路の発達を助けるものと考えられる。

現在までに発表されている研究では、直径 100~200  $\mu\text{m}$  の微小循環における HGF の影響について言及したものはなく、実際にどのような形態的、機能的な過程を経て血管新生に至っているかは不明である。微小循環における HGF が果たしている役割を検証することは、これから HGF を臨床において応用していく上できわめて重要である。

われわれの施設ではウサギの耳介に潰瘍を作り、観察用のチャンバーを設置して微小循環を可視化し観察する研究を行っている。今回の研究ではこの微小循環を可視化できる技術を用いて、HGF の微小循環における影響と血管新生について検証する。

### 2. 研究の目的

難治性で下肢切断に至る可能性がある糖尿病性潰瘍に対する標準的な治療は侵襲が大きく、全身状態が不良な症例では適応にならないこともある。そこで、われわれはより低侵襲な治療方法として HGF (hepatocyte growth factor) 遺伝子を導入した血管新生療法に注目した。微小循環を可視化したチャンバーを作製し、同因子による微小血管の新生効果と形成された血管機能について、動物モデルを用いて検証する。

### 3. 研究の方法

体重 3,000g 前後の日本白色家兎の片側耳介遠位部に、専用パンチャーを用いて潰瘍を形成して観察用のプラスチックチャンバー

(rabbit ear chamber: REC) を装着し、約 3 週間待機するとチャンバー内を新生してくる直径 100~200  $\mu\text{m}$  の微小血管が観察できる。その後観察可能であった微小血管の状態・数について、可視的な評価とイメージソフトを用いて計算し、各項目で比較・検討した。

まず HGF plasmid の投与量の違いによる微小血管形成の差異について検討するために、コントロールとして生理食塩水 1ml を投与した HGF 非投与群と、すべて生理食塩水 1ml に溶解した 1mg/body、2mg/body、4mg/body の 3 種類の投与量について、それぞれ n=5 で検討した。

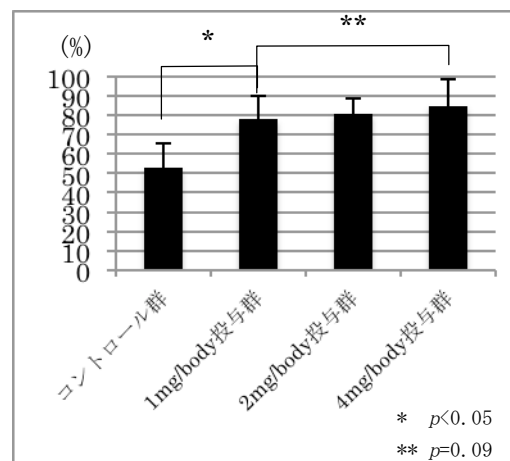
次に HGF plasmid の投与時期の違いによる微小血管形成の差異について検討するために、REC 装着前日に HGF plasmid を投与する群と REC 装着時に HGF plasmid を投与する群に分けて、それぞれ n=5 で検討した。

さらに投与部位の違いによる微小血管形成の差異について検討するために、耳介基部に投与する群と REC 周囲の皮下に投与する群に分けて、それぞれ n=5 で検討した。

### 4. 研究成果

HGF の投与量については、1mg/body 投与群において HGF 非投与群と比較して有意に多数の血管新生を認めた ( $p < 0.05$ )。投与量の変化では、今回の実験では HGF 投与群間で有意差を認めなかったものの、1mg/body 投与群と 4mg/body 投与群の比較では、4mg/body 投与群の方が血管数の増加傾向を認めた ( $p = 0.09$ ) (図1)。

図1. HGF 投与量の違いによる微小血管形成量の比較



投与時期については、REC 装着前日に投与した群と、REC 装着時に投与した群を比較して、有意な差を認めないものの、REC 装着前日に投与した群で、成熟した太さを有する血管新生が多く観察される傾向を認めた (図2、3)。REC 装着前日に投与した群では、REC 内の感染による血管新生阻害も少ない傾向を認めた

(図4)。なお、HGFの投与量は、投与量に関する結果を参考に4mg/bodyとした。

図2. REC装着時投与群の微小血管形成

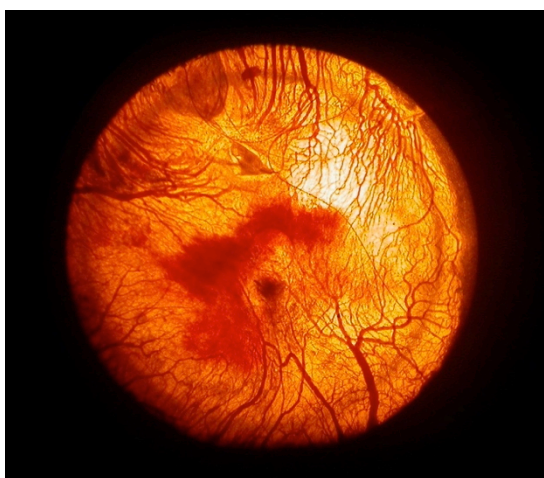


図3. REC装着前日投与群の微小血管形成

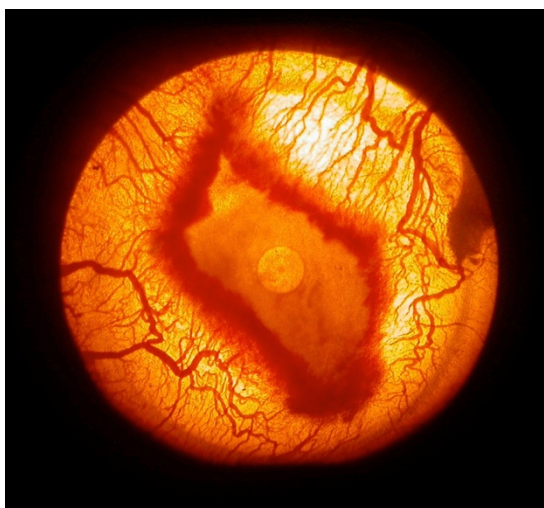
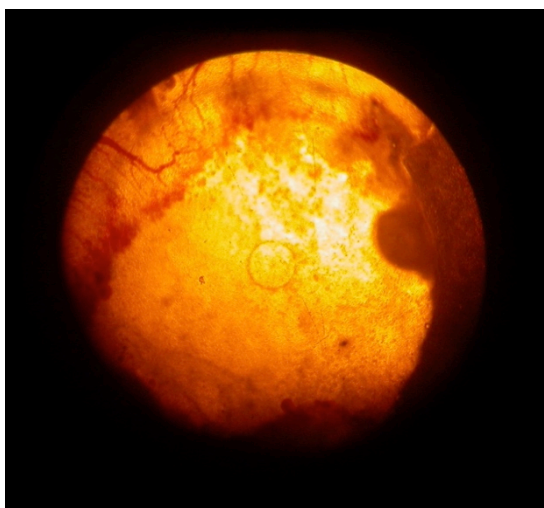
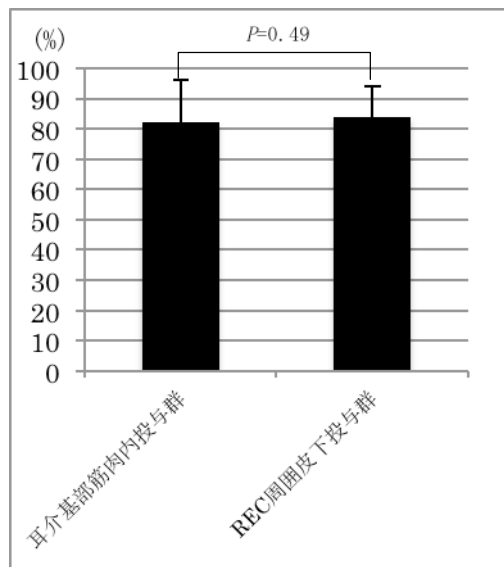


図4. REC装着時投与群においてREC内に感染が生じ微小血管形成が阻害された様子



投与部位については、HGFを耳介基部筋肉内に投与する群とREC周囲に投与する群を比較したが、耳介基部投与群において太い血管を多く認める傾向はあったが、両群間に有意差を認めなかった( $p=0.49$ ) (図5)。なお、HGFの投与量は、投与量に関する結果を参考に4mg/bodyとした。

図5. HGF投与部位の違いによる微小血管形成量の比較



本研究の結論としては、RECで観察した結果HGF plasmidは微小血管形成を促進する効果を有していることがわかった。特に1mg/bodyと4mg/bodyでは形成される微小血管の量について差を認めなかったが、今回は実験に使用した個体数が少ないことも影響していると考えられたため、個体数が増えれば4mg/bodyで形成量が増加する結果が得られる可能性があると思われた。投与時期に関しては、潰瘍形成前にHGF plasmidを投与する方がより効果を発揮できる可能性があると思われた。HGF plasmidの発現は1週間程度でピークに達することが報告されており、潰瘍の発生前に投与できれば予防的な効果を期待できると思われた。投与部位について過去の報告においては、HGFは筋肉内投与で遺伝子の導入効率が良いことが言われており、今回の結果と一致しない結果となった。耳介基部の筋肉では潰瘍発生部位から距離が遠く、うまくHGF蛋白が発現されていない可能性があると思われた。このことについても今後の研究課題の一つであると思われる。

#### 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)

未だなし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安倍 吉郎 (ABE, Yoshiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学系)・准教授

研究者番号：40467808

(4) 研究協力者

長坂 信司 (NAGASAKA, Shinji)