

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19408

研究課題名(和文) 下肢虚血性血管新生における間歇的圧迫法の有用性とその機序の解明

研究課題名(英文) Effect of intermittent compression in a mouse hindlimb ischemia model

研究代表者

丸橋 達也 (Maruhashi, Tatsuya)

広島大学・病院(医)・医科診療医

研究者番号：10727069

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)：虚血性末梢血管障害において、運動療法が低酸素応答を誘導することで下肢血流を改善することが知られている。本研究では、マウス虚血肢に対する間歇的圧迫が、血管新生に及ぼす効果について検討した。C57BL/6マウスに下肢虚血モデルを作成し、独自に開発したマウス専用カフにて虚血下肢の間歇的圧迫を行った。間歇圧迫群において、コントロール群と比較して、血流の改善傾向を認めたと、有意差は認めなかった。また、筋切片において、免疫学的染色法(CD31染色)による毛細血管密度評価を行ったが、両群間で有意差を認めなかった。現時点において、虚血肢に対する間歇的圧迫の有用性は示されなかった。

研究成果の概要(英文)：Exercise training has been demonstrated to improve exercise performance through promoting angiogenesis by inducing hypoxic response. The purpose of this study was to investigate whether external pneumatic intermittent compression promotes angiogenesis in a mouse ischemic limb model by inducing hypoxic response. Hindlimb ischemia was surgically induced by femoral artery ligation in wild type mice. Blood flow recovery after hindlimb ischemia was assessed by Laser Doppler blood perfusion index (LDPI). Capillary index (capillary/field) was assessed in the tissue sections from the ischemic hindlimb muscles. External pneumatic intermittent compression was applied (5 min×6/day) for consecutive 46 days. There was no significant difference in LDPI and capillary index between intermittent compression group and control group. These findings suggest that intermittent compression applied to ischemic limb was not effective in promoting angiogenesis in a mouse ischemic limb model.

研究分野：血管機能

キーワード：血管新生

### 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国において、食生活の欧米化などによる生活習慣病の増加に伴い、下肢閉塞性動脈硬化症の罹患率が急増している。下肢閉塞性動脈硬化症に対する一般的な治療方法として、運動療法や薬物療法、血行再建術などが存在する。しかしながら、患者の全身状態が悪い場合や血管病変が複雑で重症な場合は、血行再建術が時として困難であり、このような場合は、薬物療法や運動療法による保存的治療を行わざるをえない。

監視下運動療法により、間欠性跛行出現までの歩行距離ならびに歩行時間が有意に延長することが示されている。運動療法による歩行能力の改善について、いくつかの機序が想定されている。一つは、運動により下肢組織が一時的に低酸素状態、虚血状態となり、vascular endothelial growth factor (VEGF) の mRNA および蛋白が増加し、それにより血管新生が誘導されるとするものである。その他の機序として、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の活性化と、nitric oxide (NO) の生物学的活性の増加が関与していることが想定されている。NO の生物学的活性の増加により、側副血行路の発達がおけると想定されている。このような機序により、運動療法により閉塞性動脈硬化症患者の歩行能力が改善すると考えられる。しかしながら、併存するその他の心血管疾患合併症や筋力低下などのため、十分な運動療法が行えない下肢閉塞性動脈硬化症患者群が存在する。

以前われわれは、カフにより上腕に対して間歇的圧迫を繰り返すことで、血管内皮依存性拡張反応が有意に改善することを報告した。四肢に対する間歇的圧迫は、下肢組織の低酸素応答を誘導し VEGF の増加、shear stress の増加を介し、血管新生と側副血行路発達がおこることが期待される。これらの点から、間歇的圧迫を虚血肢に繰り返すことにより、運動療法と同様の効果が得られる可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

マウスの下肢虚血作成後、虚血肢に対してマウス専用カフにて間歇的圧迫を行うことにより、マウス虚血肢に対する間歇的圧迫が血管新生に及ぼす効果について検討する。また、間歇的圧迫が虚血性血管新生を誘導する機序について、細胞実験ならびにマウス下肢筋組織を採取して、免疫学的染色法ならびにウエスタンブロットにて評価する。

### 3. 研究の方法

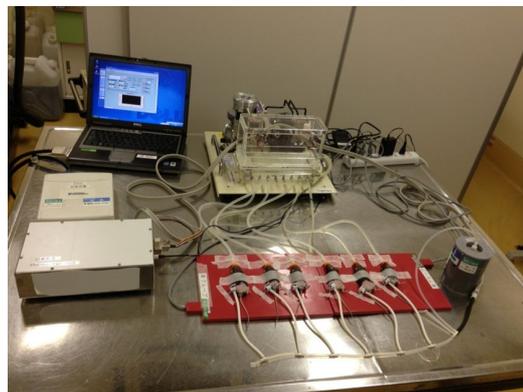
(細胞実験)

マウス血管内皮細胞を、コントロール (21% O<sub>2</sub>) と低酸素 (1% O<sub>2</sub>) 下で、24 時間培養した。Western blot 法によって血管新生に関する因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF-1 $\alpha$ , VEGF) の発現を検討した。

#### (動物実験)

C57BL/6 マウスに下肢虚血モデルを作成し、独自に開発したマウス専用カフにて虚血下肢の間歇的圧迫を行い (図 1)、Laser Doppler perfusion imaging (LDPI) による下肢血流評価を経時的に行った。さらに、筋切片の免疫学的染色法 (CD31 染色) による毛細血管密度評価を行った。間歇的圧迫圧 (100 mmHg、150 mmHg)、圧迫回数 (3 回、6 回)、圧迫開始日 (下肢虚血作成 1 日後、8 日後) の組み合わせを変えて予備試験を施行した。圧迫圧 150 mmHg では血流が悪化傾向であった。また、圧迫回数 3 回では血流増加効果は認めなかった。また、圧迫開始が 1 日目からでは血流が悪化傾向であった。したがって、最終的に、8 週齢の C57BL/6 マウスに下肢虚血モデルを作成し、作成 8 日目よりマウス専用カフを用いて虚血肢に対する間歇的圧迫を開始した。100 mmHg による 5 分間の圧迫と 5 分間の解除を計 6 回繰り返すことにより、間歇的圧迫を行った。これを 1 日に 1 セット、45 日目まで連日行った。血流評価は、下肢虚血作成前、作成後 3 日目、7 日目、10 日目、14 日目、21 日目、24 日目、29 日目、31 日目、36 日目、45 日目に LDPI にて、非虚血肢に対する虚血肢の血流比を評価した。

図 1



(マウス下肢圧迫装置)



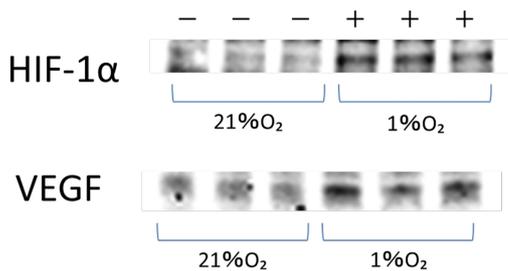
(拡大写真)

#### 4. 研究成果

##### 1) 細胞実験

低酸素 (1% O<sub>2</sub>) 下では、コントロール (21% O<sub>2</sub>) と比較して、マウス血管内皮細胞において HIF-1α と VEGF 発現の有意な増加がみられた (図 2)。

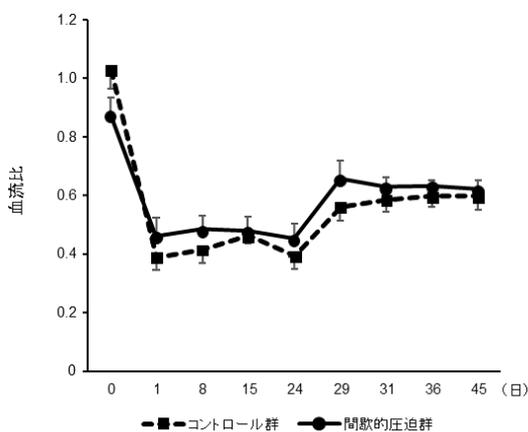
図 2



##### 2) LDPI

下肢虚血作成前から下肢虚血作成後 45 日目まで適宜、LDPI にて下肢血流の評価を行った。間歇圧迫群 (n=9) において、コントロール群 (n=9) と比較して血流の改善傾向を認めたが、有意差は認めなかった (図 3)。

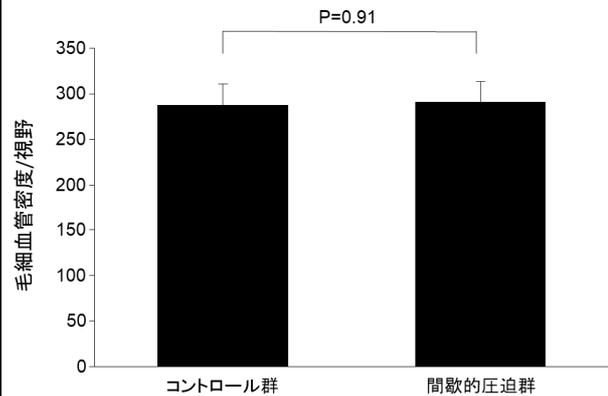
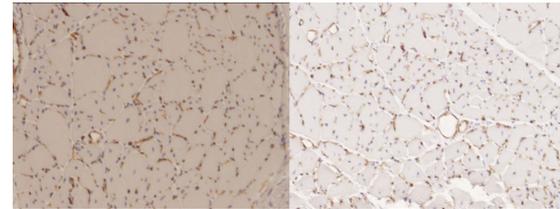
図 3



##### 3) 毛細血管密度評価 (筋切片)

下肢虚血作成後 45 日目に下肢筋組織を採取し、筋切片を作成後、免疫学的染色法 (CD31 染色) による毛細血管密度評価を行ったが、両群間で有意差を認めなかった (図 4)。

図 4



現時点において、虚血肢に対する間歇的圧迫の有用性は示されなかった。

#### 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 4 件)

1. Maruhashi T, Iwamoto Y, Kajikawa M, Oda N, Kishimoto S, Matsui S, Hashimoto H, Aibara Y, Yusoff FM, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Goto C, Higashi Y: Chronic kidney disease is associated with vascular smooth muscle dysfunction but not with endothelial dysfunction. *Int J Cardiol.* (査読有) 254:284-290, 2018
2. Maruhashi T, Iwamoto Y, Kajikawa M, Oda N, Kishimoto S, Matsui S, Hashimoto H, Aibara Y, Yusoff FM, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Goto C,

- Hida E, Higashi Y: Interrelationships Among Flow-Mediated Vasodilation, Nitroglycerine-Induced Vasodilation, Baseline Brachial Artery Diameter, Hyperemic Shear Stress, and Cardiovascular Risk Factors. *J Am Heart Assoc.* (査読有) 7:e006797, 2017
3. Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, Iwamoto A, Kajikawa M, Matsumoto T, Oda N, Kishimoto S, Matsui S, Hashimoto H, Aibara Y, Yusoff FM, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Goto C, Tomiyama H, Takase B, Kohro T, Suzuki T, Ishizu T, Ueda S, Yamazaki T, Furumoto T, Kario K, Inoue T, Koba S, Watanabe K, Takemoto Y, Hano T, Sata M, Ishibashi Y, Node K, Maemura K, Ohya Y, Furukawa T, Ito H, Ikeda H, Yamashina A, Higashi Y: Brachial artery diameter as a marker for cardiovascular risk assessment: FMD-J study. *Atherosclerosis.* (査読有) 268:92-98, 2017
4. Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, Iwamoto A, Kajikawa M, Matsumoto T, Oda N, Kishimoto S, Matsui S, Hashimoto H, Aibara Y, Yusoff FBM, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Goto C, Tomiyama H, Takase B, Kohro T, Suzuki T, Ishizu T, Ueda S, Yamazaki T, Furumoto T, Kario K, Inoue T, Koba S, Watanabe K, Takemoto Y, Hano T, Sata M, Ishibashi Y, Node K, Maemura K, Ohya Y, Furukawa T, Ito H, Ikeda H, Yamashina A, Higashi Y: Endothelial Function Is Impaired in Patients Receiving Antihypertensive Drug Treatment Regardless of Blood Pressure Level: FMD-J Study (Flow-Mediated Dilation Japan). *Hypertension.* (査読有) 4:790-797, 2017

[学会発表] (計 1 件)

Tatsuya Maruhashi, Yukihito Higashi, Yumiko Iwamoto, Masato Kajikawa, Shinji Kishimoto, Shogo Matsui, Haruki Hashimoto, Farina Mohamad Yusoff, Takayuki Hidaka, Ayumu Nakashima, Kensuke Noma, Yasuki Kihara, Impaired Endothelial Function in Patients with Hypertension Receiving Antihypertensive Drug Treatment Regardless of Achieved Blood Pressure Level: FMD-J Study  
90<sup>th</sup> Scientific Sessions, American Heart Association, November 12, 2017. Anaheim

[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

丸橋 達也 (MARUHASHI, Tatsuya)  
広島大学・大学病院 (医)・医科診療医  
研究者番号: 10727069

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

東 幸仁 (HIGASHI, Yukihito)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

木原 康樹 (KIHARA, Yasuki)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授

野間 玄督 (NOMA, Kensuke)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

中島 歩 (NAKASHIMA, Ayumu)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・共同研究講座教授