

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591520

研究課題名(和文)

重症虚血肢に対するハイブリッド治療—センダイウイルス遺伝子治療と細胞移植療法—

研究課題名(英文)

Hybrid therapy for chronic critical limb ischemia—combination of gene transfer via Sendai virus and endothelial cell plantation.

研究代表者

小林 昌義 (KOBAYASHI MASAYOSHI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60329381

研究成果の概要(和文)：

重症虚血肢 (CLI) に対するセンダイウイルス遺伝子治療と自己骨髄細胞移植 (末梢血単核球細胞移植療法) のハイブリッド治療の基礎的研究として CLI マウスでのシロスタゾールの血管新生効果を検討したところシロスタゾールには血管新生効果があり、その効果は NO を介した経路によって機能していることが推測された。今後はさらに VEGF、HGF 等をはじめとした分子物質の発現に関して検討し、重症虚血肢に対するセンダイウイルスを用いたハイブリッド治療の臨床応用へ進展させることが引き続きの課題である。

研究成果の概要(英文)：

Our final goal is that hybrid therapy combined gene transfer via Sendai virus with bone marrow or peripheral blood cell transplantation can be completed. In this preliminary study, we investigated whether cilostazol induces improvement of blood flow in the ischemic hindlimb of mouse, and if so, examined the mechanisms of angiogenesis. Based on our results, cilostazol caused angiogenesis in ischemic hindlimb model of mouse. This angiogenesis may be due to the enhancement of nitric oxide production. Our final destination is that hybrid therapy with a combination between gene transfer via Sedai virus and cell transplantation can be established in near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般、血管外科学

キーワード：重症虚血肢、遺伝子治療、ハイブリッド治療、シロスタゾール

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は本邦においても増加しておりそれに伴い閉塞性動脈硬化症 (ASO) の有病率も増加している。ASO に対する治療と

してはバイパス術や血管内治療といった血行再建術が有効な治療法であるが糖尿病合併例や透析症例では血行再建できない症例もあり切断に至る症例も存在する。このよう

な観点からこの領域の新しい治療、治療的血管新生療法の確率が望まれているところであった。

## 2. 研究の目的

当時、遺伝子治療と細胞移植療法の二つが実験的、臨床的に行われていたが完全ではないのが現状であった。これまでの重症虚血肢に対する遺伝子治療あるいは自己骨髄細胞移植あるいは末梢血単核球細胞移植、それぞれ単独の基礎的、臨床的な報告はあるが遺伝子治療と自己骨髄細胞移植あるいは末梢血単核球細胞移植を組み合わせたハイブリッド治療の詳細な報告は無かった。従ってこのハイブリッド治療の有効性が認められれば他に治療法が無く切断を余儀なくされている重症虚血肢患者にとっては朗報である。同時に ASO やバージャー病患者の血行再建術困難症例に対して当施設では自己骨髄細胞療法による血管新生療法の臨床応用を実施しているところである。さらには G-CSF で誘導した末梢血単核球より CD34 を分離したものを虚血骨格筋に注入し良好な結果を得た。一方、遺伝子治療においても日本独自の新しいタイプの新規、国産ベクター、組み換えセンダイウイルスベクター (SeV) を用い、FGF-2 搭載 SeV の血管新生効果と静脈グラフト内膜肥厚抑制効果を確認してきた。また名古屋大学再生・遺伝子治療センターでは、既に臨床グレード (治療応用可能) なヒト VEGF およびヒト angiopoietin-1 プラスミド遺伝子の大量生産に成功していた。

以上のように当施設のグループは、自己骨髄細胞移植、末梢血単核球細胞移植、G-CSF 誘導陽性細胞移植、SeV-FGF2、ヒト VEGF プラスミド遺伝子、ヒト angiopoietin-1 プラスミド遺伝子等のノウハウを保有しており、動物モデルで有効性、安全性が確認できれば、重症虚血肢に対する臨床応用が可能と思われる。世界に先駆けた研究の優位性を保ちながら、日本独自の、安全性を有した、更なる重症虚血肢に対する治療の改良と治療法を開発、確立することがこの研究の目的である。

## 3. 研究の方法

マウス野生型を用いて左大腿動脈およびその分枝を結紮して虚血モデルを作製し (1) シロスタゾール投与群 (Cil 群) と通常飼料投与群 (Ctr 群) でまず血管新生の程度を術前、術後 0、3、7、14 日目で比較、検討した。その評価としてレーザー Doppler を用いた。ついで NO 合成酵素阻害剤である

NG-nitro-L-arginin methyl ester を連日、腹腔内投与した群においても Cil 群、Ctr 群に分けて同様の比較、検討を行った。さらに、(2) 術後 5 日目の虚血肢筋肉サンプルを採取し発現タンパクの電気泳動および免疫染色である Western blotting を行い、CD31、eNOS、リン酸化 eNOS、 $\alpha$ -Tubulin の発現を比較、検

討した。

## 4. 研究成果

(1) Cil 群では Ctr 群と比較して術後 3 日目、7 日目では血流に有意差を認めなかったが 14 日目では Cil 群では有意に血流増加が認められ、シロスタゾールが血管新生促進に働いていることが推測された (図 1)。

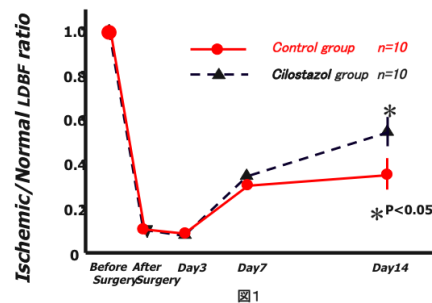
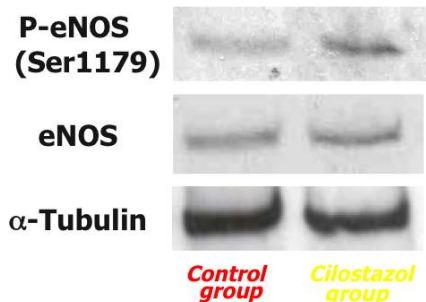


図1

また、NO 合成酵素阻害剤である NG-nitro-L-arginin methyl ester を連日 20mg/kg 連日投与した群では、Cil 群、Ctr 群ともに血管新生が抑制されることが確認できた。(2) Cil 群では Ctl 群と比較し、 $\alpha$ -Tubulin、Total の eNOS では 2 群間に差を認めなかったが、Ser1177 のリン酸化 eNOS はシロスタゾール群で増加していることが下図のように判明した。



Western immunoblots with the indicated antibodies on postoperative day 5

## 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 10 件)

1. Sato T, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K:

Immunohistochemical properties in the patients with Buerger's disease -Possible role of Plasminogen Activator Inhibitor-1(PAI-1) for preservation of vessel wall architecture:

Cardiovascular Pathology, in press, 2010 査読有

2. Niimi K, Kobayashi M, Narita H, Yamamoto K, Komori K:  
Evaluation of the Efficacy of Venous Thromboembolism Prophylaxis Guideline Implementation in Japan: Surg Today, 40: 1129-1136, 2010 査読有
3. 古森公浩:  
血管外科領域におけるトランスレーショナルリサーチ-Nitric Oxide とセロトニン-  
第38回日本血管外科学会学術総会ランチョンセミナー記録集  
Angiology Frontier Vol.9 No.3, 90(304)-95 (309), 2010 査読有
4. Yamanouchi D, Komori K:  
Eicosapentaenoic Acid as the Gold Standard for Patients With Peripheral Artery Disease? - Subanalysis of the JELIS Trial -  
Circulation Journal Vol.74 No.7, 1298-1299, July 2010 査読有
5. 森前博文, 古森公浩:  
重症下肢虚血に対する外科的治療戦略  
新・心臓病診療プラクティス 血管疾患を診る・治す 15, 232-234, 2010 査読有
6. 小林昌義, 古森公浩:  
動脈硬化に対する細胞移植療法  
Therapeutic angiogenesis for the patients with peripheral arterial disease  
総合臨床 VOL.58 NO.8: 1817-1819, 2009 査読有
7. Kodama A, Komori K, Kajikuri J, Itoh T:  
Chronic treatment of hydroxytryptamine type 2a receptor antagonist sarpogrelate hydrochloride modulates the vasoreactivity of serotonin in experimental rabbit vein grafts:  
J Vasc Surg, 50, 617-25, 2009 査読有
8. Kodama A, Komori K, Hattori K, Yamanouchi D, Kajikuri J, Itoh T:  
Sarpogrelate hydrochloride reduced intimal hyperplasia in experimental rabbit vein graft:  
J Vasc Surg, 49z(5), 1272-81, 2009 査読有
9. 杉本昌之, 古森公浩:  
特集 重症虚血肢に対する診療指針  
重症虚血肢の疫学, 合併疾患, 生命予防について  
Angiology Frontier Vol.7 No.2: 11-15, 2008 査読有
10. 古森公浩:  
序文とまとめ
- 一心血管病に対する再生医療-  
脈管学:47: 475, 2008 査読有
- [学会発表] (計 27 件)
1. Hori A, Shibata R, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K  
Cilostazol Causes Angiogenesis Mediated Through the Enhancement of Nitric Oxide Production in the ischemic Hindlimb of Mouse  
The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery, June 29-July 2, 2010, The Westin Miyako, Kyoto, Japan
2. Komori K  
Current Status of Therapeutic Angiogenesis for the Patients with Peripheral Arterial Disease in Japan  
The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery, June 29-July 2, 2010, The Westin Miyako, Kyoto, Japan
3. Komori K  
Differences in the Endothelial Function and Morphological Modulation between the Canine Autogenous Vein and Arterial Grafts Endothelium and Intimal Thickening  
The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 14-18, 2010, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan
4. Hori K, Shibata R, Narita H, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K  
Cilostazol Causes Angiogenesis Mediated through the Enhancement of Nitric Oxide Production in the Ischemic Hindlimb of Mouse  
2010 Vascular Annual Meeting, June 10-13, 2010, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA
5. 小林昌義, 森崎浩一, 前川卓史, 玉井宏明, 高橋範子, 森前博文, 井原努, 堀昭彦, 成田裕司, 山本清人, 古森公浩  
血行障害による下肢潰瘍/壊疽に対する治療戦略とその成績  
第38回日本血管外科学会総会 2010年5月20-22日 大宮ソニックシティ・パレスホテル大宮
6. 堀昭彦, 森崎浩一, 前川卓史, 玉井宏明, 高橋範子, 森前博文, 井原努, 成田裕司, 小林昌義, 山本清人, 古森公浩  
当科における血管新生療法治療成績の検討と今後の展望

- 第 38 回日本血管外科学会総会 2010 年 5 月 20-22 日 大宮ソニックシティ・パレスホテル大宮
7. 小林昌義, 森崎浩一, 前川卓史, 玉井宏明, 高橋範子, 森前博文, 井原努, 堀昭彦, 成田裕司, 山本清人, 古森公浩  
血行障害による下肢潰瘍/壊疽に対する治療戦略とその成績  
第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 8 日-10 日名古屋国際会議場
  8. 堀昭彦, 森崎浩一, 前川卓史, 玉井宏明, 高橋範子, 森前博文, 井原努, 成田裕司, 小林昌義, 山本清人, 古森公浩  
マウス虚血肢モデルに対するシロスタゾールの血管新生効果について  
第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 8 日-10 日名古屋国際会議場
  9. 古森公浩  
末梢動脈疾患の最新の治療戦略 -新しい治療ガイドラインを踏まえて-  
第 15 回関東甲信越セロトニン研究会, 2010 年 1 月 30 日, 経団連会館
  10. Komori K  
THERAPEUTIC ANGIOGENESIS FOR THE PATIENTS WITH PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE  
The 10th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery, October 14-17, 2009, BEXCO, Busan, Korea
  11. Kodama A, Tamai H, Idetsu A, Morimae H, Hori A, Narita H, Kobayashi M, Yamamoto K, Kajikuri J, Itoh T, Komori K  
SARPOGRELATE HYDROCHLORIDE MODULATES THE EXPRESSION OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE TYPE 2A AND TYPE 1B RECEPTORS IN EXPERIMENTAL RABBIT VEIN GRAFTS  
10th MOVD 2009, 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation, June 1-3, 2009, Hotel Taikanso Matsushima, Miyagi, Japan
  12. 小林昌義, 玉井宏明, 出津明仁, 森前博文, 児玉章朗, 堀昭彦, 成田裕司, 山本清人, 古森公浩  
下肢血行障害による下肢潰瘍/壊疽に対する治療法とその成績  
第 37 回日本血管外科学会総会 2009 年 5 月 13-15 日 名古屋国際会議場
  13. 成田裕司, 古森公浩, 山本清人, 小林昌義, 堀昭彦, 児玉章朗, 森前博文, 出津明仁, 玉井宏明  
当科における下肢虚血に対する無侵襲診断について  
第 37 回日本血管外科学会総会 2009 年 5 月 13-15 日 名古屋国際会議場
  14. Kodama A, Tamai H, Idetsu A, Morimae H, Hori A, Narita H, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K  
Sarpogrelate Hydrochloride Modulates the Expression of 5-Hydroxytryptamine Type 2A and Type 1B Receptors in Experimental Rabbit Vein Grafts  
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2009, April 29-May 1, 2009, Omni Shoreham Hotel, Washington, USA
  15. 児玉章朗, 玉井宏明, 出津明仁, 森前博文, 堀昭彦, 成田裕司, 小林昌義, 山本清人, 古森公浩  
ウサギ自家静脈グラフトにおけるセロトニンレセプター発現の検討-塩酸サルポグレラート投与の効果-  
第 109 回日本外科学会定期学術集会 2009 年 4 月 1 日-4 日 福岡国際会議場
  16. 成田裕司, 玉井宏明, 出津明仁, 森前博文, 児玉章朗, 堀昭彦, 小林昌義, 山本清人, 古森公浩  
塩酸サルポグレラートによるウサギ自家静脈グラフト内膜肥厚抑制効果  
第 109 回日本外科学会定期学術集会 2009 年 4 月 1 日-4 日 福岡国際会議場
  17. 小林昌義, 玉井宏明, 出津明仁, 森前博文, 児玉章朗, 堀昭彦, 成田裕司, 山本清人, 古森公浩  
血行障害による壊/潰瘍の治療経験について:  
第 1 回東海創傷治療フォーラム 2009 年 1 月 30 日 科研製薬株式会社名古屋支店
  18. 児玉章朗, 玉井宏明, 出津明仁, 森前博文, 堀昭彦, 成田裕司, 小林昌義, 山本清人, 古森公浩  
ウサギ自家静脈グラフトモデルにおけるセロトニンレセプターの検討-サルポグレラート塩酸塩投与の効果-  
第 16 回東海セロトニン(5-HT<sub>2</sub>)研究会 2009 年 1 月 24 日 名古屋クレストンホテル
  19. Yamamoto K, Morimae H, Narita H, Kobayashi M, Komori K  
Clinical outcome of endovascular therapy for the patients with peripheral arterial disease.  
The 5th Meeting of the Japanese-German

Society for Vascular Surgery, August 27-29,  
2008, Toba, Japan

20. 小林昌義, 玉井宏明, 出津明仁, 森前博文,  
児玉章朗, 堀昭彦, 山本清人, 古森公浩  
下肢血行障害による下肢潰瘍/壊疽に対す  
る治療法とその成績  
第 14 回血管内治療学会総会 2008 年 7 月  
25 日-26 日 アルカディア市ヶ谷
21. Kodama A, Idetsu A, Sugimoto M, Ihara T,  
Niimi K, Narita H, Kobayashi M, Yamamoto  
K, Itoh T, Komori K  
Sarpogrelate Hydrochloride Reduced Intimal  
Hyperplasia in Experimental Rabbit Vein  
Graft-Possible Involvement of Enhancement  
of Nitric Oxide (NO) Production  
VASCULAR ANNUAL MEETING 2008 June  
5-8, 2008, San Diego
22. 井原努, 出津明仁, 杉本昌之, 新美清章,  
児玉章朗, 成田裕司, 上遠野由紀, 小林昌  
義, 山本清人, 古森公浩  
当院での細胞移植療法の臨床成績と遺伝  
子治療とのハイブリッド治療効果  
第 108 回日本外科学会定期学術集会 2008  
年 5 月 15 日-17 日 長崎ブリックホール
23. 成田裕司, 出津明仁, 杉本昌之, 井原努,  
児玉章朗, 新美清章, 上遠野由紀, 小林昌  
義, 山本清人, 古森公浩  
ステント再狭窄と Midkine との関連について-  
高脂血症ウサギのステント再狭窄モデルで  
の検討-  
第 108 回日本外科学会定期学術集会 2008  
年 5 月 15 日-17 日 長崎ブリックホール
24. 山本清人, 出津明仁, 杉本昌之, 井原努,  
新美清章, 児玉章朗, 成田裕司, 上遠野由  
紀, 小林昌義, 古森公浩  
重症虚血肢における血管内治療の役割  
第 36 回日本血管外科学会学術総会 2008  
年 4 月 16 日-18 日 アルカディア市ヶ谷
25. 新美清章, 出津明仁, 杉本昌之, 井原努,  
児玉章朗, 成田裕司, 上遠野由紀, 小林昌  
義, 山本清人, 古森公浩  
閉塞性動脈硬化症患者の生命予後と予測  
関連因子  
第 36 回日本血管外科学会学術総会 2008  
年 4 月 16 日-18 日 アルカディア市ヶ谷
26. 成田裕司, 出津明仁, 杉本昌之, 井原努,  
児玉章朗, 新美清章, 上遠野由紀, 小林昌  
義, 山本清人, 古森公浩  
下肢末梢動脈瘤の検討  
第 36 回日本血管外科学会学術総会 2008  
年 4 月 16 日-18 日 アルカディア市ヶ谷

27. 古森公浩  
閉塞性動脈硬化症の手術における pit fall と  
対策  
第 36 回日本血管外科学会学術総会 2008  
年 4 月 16 日-18 日 アルカディア市ヶ谷

〔図書〕(計 2 件)

1. 古森公浩  
PAD の分類(Fontaine 分類と Rutherford 分  
類)  
南山堂 PCI EVT: 181-182, 2010
2. 古森公浩  
TASC II の診断プロセス  
南山堂 PCI EVT: 185-191, 2010

〔その他〕

ホームページ等

[www.vasc Surg.jp](http://www.vasc Surg.jp)

[www.med.nagoya-u.ac.jp/hospital/1385/1391/s\\_kekkangeka.html](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/hospital/1385/1391/s_kekkangeka.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 昌義 (KOBAYASHI MASAYOSHI)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60329381

##### (2) 研究分担者

古森 公浩 (KOMORI KIMIHIRO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 40225587  
山本 清人 (YAMAMOTO KIYOHITO)  
名古屋大学医学部附属病院・講師  
研究者番号: 10298359

##### (3) 連携研究者 なし ( )

研究者番号: