

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591655

研究課題名（和文）

血管内皮増殖因子の心筋直接導入による虚血性心不全の改善

研究課題名（英文）

Direct delivery of vascular endothelial growth factor improves heart failure in rats myocardial infarction model.

研究代表者

戸口 幸治 (TOGUCHI KOJI) 和歌山県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：20549753

研究成果の概要（和文）：再生医療の一環として、遺伝子治療が行われている。しかし、遺伝子の発現までには数日間を要するために、治療の効果にタイムラグが生じ、急性疾患の治療は困難である。また、遺伝子導入により発現したサイトカインは陽的作用を有していれば、陰的作用も有している。遺伝子治療ではサイトカインの発現量が調整困難なために陽的作用はもちろん、陰的作用も発現する可能性がある。そのために、遺伝子治療では十分な効果が出ていない可能性がある。これらの欠点を改善する治療法として、蛋白質直接導入法を我々は研究してきた。今回、ラット急性心筋梗塞モデルで、心筋への血管内皮増殖因子直接導入に成功した。また、血管内皮増殖因子心筋直接導入により、心筋梗塞急性期で梗塞範囲の縮小させることが出来た。心機能が改善する可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：It was successful that direct delivery of vascular endothelial growth factor(VEGF) into myocardium in acute myocardial infarction rat model. The direct delivery of VEGF reduced the size of infarcted area in acute phase after acute myocardial infarction. And then the direct delivery of VEGF improved cardiac function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
2009年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2010年度	400,000円	120,000円	520,000円
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：急性心筋梗塞、血管内皮増殖因子、心不全、タンパク質導入、タンパク質治療

1. 研究開始当初の背景

現在、ventricular endothelial growth factor (VEGF), fibrosis growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF)などのアンジオポエチンファミリーのサイトカイン（特定機能蛋白質）を使用した心不全に対する遺伝子治療が一定の成果を挙げ、臨床応用されるに至っている。しかし、これらの治療はまだ多くの問題を抱えている。遺伝子の発現ま

では数日間を要するために、治療の効果にタイムラグが生じ、急性疾患の治療は困難である。また、サイトカインは陽的作用を有していれば、陰的作用も有している。しかし、遺伝子治療ではサイトカインの発現量が調整困難なために陽的作用はもちろん、陰的作用も発現する可能性がある。そのために、遺伝子治療では十分な効果が出ていない可能性がある。

そこで、心筋への特定機能蛋白質が導入可能であれば、数時間で蛋白質機能が発現する為、急性期治療にも対応でき、導入する蛋白質量も調節することが可能と考えられる。つまり、現在の遺伝子治療の欠点を補充可能な、新しい治療法を開発できる可能性がある。

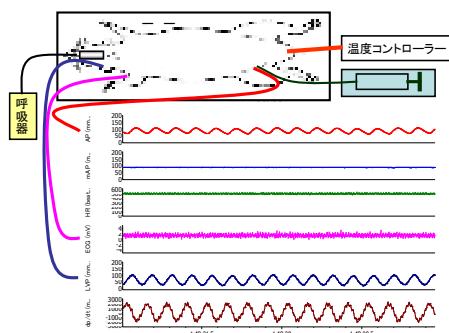
我々は、nNOSのラット生体心筋への直接導入で心筋梗塞範囲が減少することを証明した(21st European association for Cardio-thoracic Surgery, Young investigator award,)。虚血性心疾患でVEGF遺伝子の導入により血流の増加と狭心症状の改善がすでに確認されている。今回は、今までの技術を利用して、ラットのVEGF subtypeの中で最も血管新生作用の強いVEGF165蛋白質を心筋へ直接導入する。直接導入された蛋白質の作用により心筋に変化をもたらしているか、心機能に影響を与えているかを実験する。

2. 研究の目的

- (1) 特定機能蛋白質が生体心筋組織に導入可能であり、特に急性心筋梗塞下の心筋組織に導入であるかどうかを調べる。
- (2) VEGFが生体心筋組織に導入可能であり、特に急性心筋梗塞下の心筋組織に導入であるかどうかを調べる。
- (3) VEGFに導入することにより、血管新生や心機能にどのような影響を与えているかを調べる。

3. 研究の方法

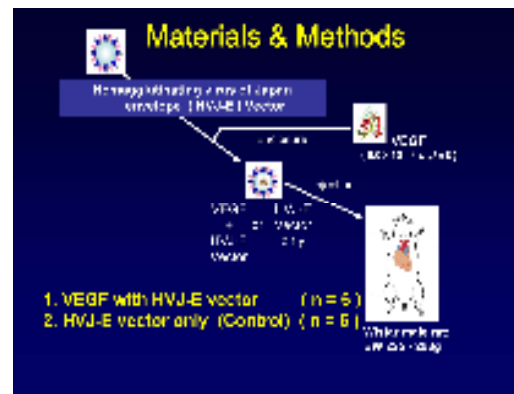
ラットに麻酔を導入し、気管切開下に挿管を行い、人工呼吸管理とする。頸動脈よりコンダクタンスカテーテルを挿入し、PVループで心機能を測定する。左前側方開胸(第5肋間)アプローチにて心臓を露出する。LADを結紮する。十分結紮出来たかは、心電図で確認する。下図に示すように実験の準備を行う。



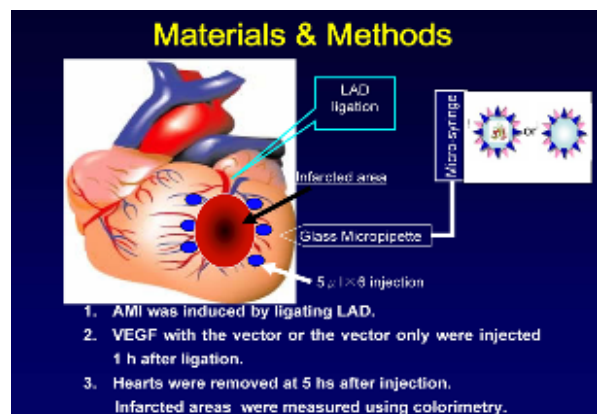
心臓の左室前壁に蛋白質の封入体を $10\mu l$ ずつ5箇所インジェクションする。インジェクションが成功したかは心電図のST変化で確認する。終了後創部を閉鎖する。封入体は、 β -gal封入体とVEGF封入体の2組とする。

i) HVJ-Eへの β -galの封入
HVJ-E (genome-one: 石原産業製) $40\mu l$ (1AU) とエンハンサー $10\mu l$ を氷上で5分間静置する。これと封入剤 $6\mu l$ 、蛋白質 $0.5\text{mg/ml} \times 10\mu l$ を混合・攪拌し、 4°C 、 10000rpm で5分間遠心し、封入を行う。これを緩衝液(PBS) $200\mu l$ とよく混合し、再度 10000rpm 、 4°C で5分間遠心すると、封入体が沈殿する。

ii) HVJ-EのVEGF165の封入
HVJ-E (genome-one: 石原産業製) $40\mu l$ (1AU) とエンハンサー $10\mu l$ を氷上で5分間静置する。これと封入剤 $6\mu l$ 、各濃度のVEGF165 (0.5mg/ml) を混合・攪拌し、 4°C 、 10000rpm で5分間遠心し、封入を行う。これを緩衝液(PBS) $200\mu l$ とよく混合し、再度 10000rpm 、 4°C で5分間遠心すると、封入体が沈殿する。これをPBS $50\mu l$ と混合する。これが下図のようになる。



HVJ-Eへ6時間、循環動態(心電図、血圧、左室内圧)を観察して記録する。心筋梗塞後これを心筋内に下図のようにインジェクションする。



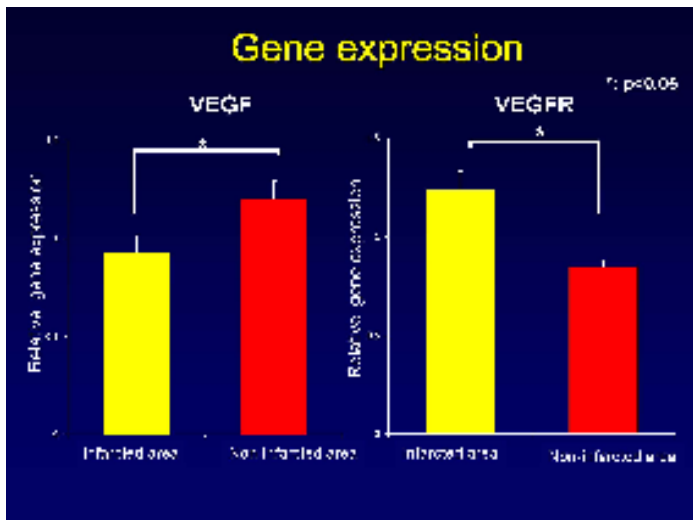
心筋梗塞後6時間で心臓を取り出す。一部を凍結保存し、一部をパラホルムアルデヒドで固定する。

- ①. 免疫染色でVEGFの存在を確認した。
- ②. real time-PCR (RT-PCR) でVEGF遺伝子量を測定した。

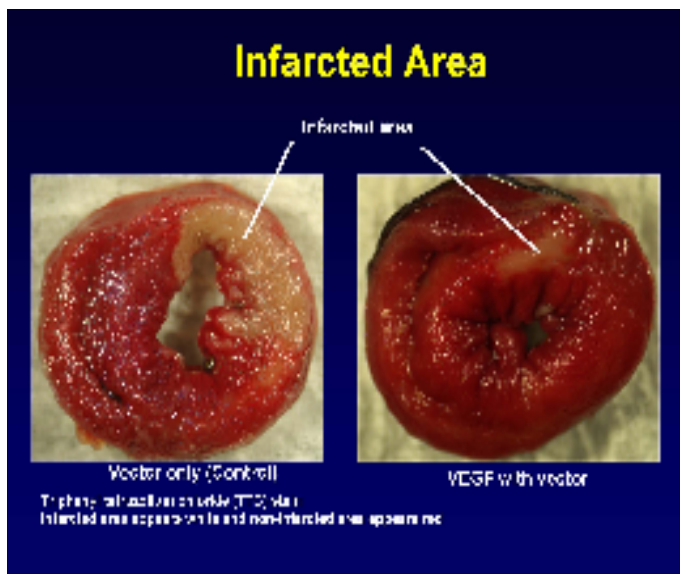
- ③. 心筋梗塞範囲測定した。
- ④. 心機能 (PV ループ、心収縮率、心機能) を解析した。

4. 研究成果

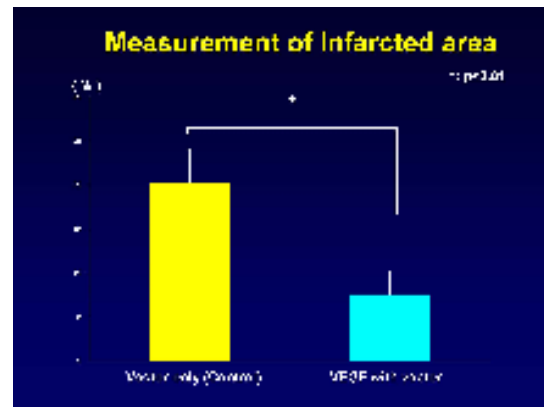
- ①. 免疫染色で VEGF が心筋内に導入できることが確認できた。
- ②. RT-PCR を行った結果、心筋梗塞範囲で非心筋梗塞より VEGF 遺伝子量が減少していた。心筋梗塞範囲で非心筋梗塞より VEGF 受容体 (VEGF receptor: VEGFR) 遺伝子量が増加していた。下図に遺伝子発現量を示す。



- ③. VEGF 導入群と β -gal 導入群とでは VEGF 群の方が、心筋梗塞範囲が小さかった。下図に典型的な心臓横断切片を示す。白色部分が梗塞部位である。著明に VEGF 群で心筋梗塞犯意が狭小であることが判る。



次図に示すように VEGF 群で梗塞部位が狭小であった。



- ④. VEGF 導入群と β -gal 導入群とでは VEGF 群の方が、心機能が良好であった。

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 0 件)
 血管内皮増殖因子直接導入による心筋梗塞の実験データを解析でき次第、心臓血管外科系の雑誌に投稿予定。

〔学会発表〕 (計 1 件)

① Masahiro Kaneko, Atsutoshi Hatada, Yoshiharu Nishimura, Shunji Uchita, Koji Toguchi, Kentaro Honda, Takeo Nakai, Hidefumi Waki, Akira Kohsaka, Yoshitaka Okamura, Masanobu Maeda. Direct transduction of vascular endothelial growth factor into cardiomyocytes reduced infarcted areas in acute myocardial infarction rats. 第 87 回日本生理学会. 2010.5-19-21. 盛岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸口 幸治 (TOGUCHI KOJI)
 和歌山県立医科大学 医学部 助教
 研究者番号: 20549753

金子 政弘 (KANEKO MASAHIRO)
 和歌山県立医科大学 医学部 学内助教
 研究者番号: 40433346

平松 健司 (HIRAMATSU TAKESHI)
 和歌山県立医科大学 医学部 講師
 研究者番号: 70221520

(2) 研究分担者

岡村 吉隆 (OKAMURA YOSHITAKA)
 和歌山県立医科大学 医学部 教授
 研究者番号: 80245076

前田 正信(MAEDA MASANOBU)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号：80181593

和気 秀文(WAKI HIDEFUMI)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：50274957

向阪 彰(KOHSAKA AKIRA)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：00458051

西村 好晴(NISHIMURA YOSHIHARU)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：70254539

畑田 充俊(HATADA ATSUTOSHI)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号：70508027

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：