

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20890199

研究課題名（和文）

一酸化窒素合成酵素の直接導入による下肢虚血の改善

研究課題名（英文）

Does direct delivery of nitric oxide synthase improve acute limb ischemia?

研究代表

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

研究成果の概要（和文）：急性動脈閉塞ラットモデルの虚血下肢組織に一酸化窒素合成酵素直接導入に成功した。しかし、下肢動脈血流が改善するかどうかは今後検討する必要がある。我々は急性動脈閉塞に対して蛋白直接導入法が新しい治療法にな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 nitric oxide synthase into ischemic limb tissue in acute limb ischemia rat model. The type of targeted delivery system presented here should be broadly useful for administering therapeutic proteins to the acute limb ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,220,000	366,000	1,586,000
2009 年度	1,080,000	324,000	1,404,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：急性動脈閉塞、一酸化窒素合成酵素、蛋白質療法

1. 研究開始当初の背景

下肢動脈急性閉塞は早期血行再建を行わないと下肢切断となる場合がある。現在の遺伝子治療では、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。一酸化窒素合成酵素のラット生体心筋への直接導入で急性心筋梗塞範囲が減少することを証明した。この技術を応用して下肢への特定機能蛋白質が導入可能であれば、急性期治療にも対応でき、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。

2. 研究の目的

- (1) 特定機能蛋白質が生体下肢組織に導入可能であり、特に急性動脈閉塞下の下腿組織に導入であるかどうかを調べる。
- (2) 内皮型一酸化窒素合成酵素が生体下肢組織に導入可能であり、特に急性動脈閉塞下の下腿組織に導入であるかどうかを調べる。
- (3) 内皮型一酸化窒素合成酵素を急性虚血下

下腿に導入することにより、下腿の血流が改善するかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1) Hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) をベクターとして β -galactosidase (β -gal) を急性動脈閉塞ラットモデルに導入する。下腿組織に β -gal が取り込まれているか画像ソフト (Image J) を使用し解析を行う。

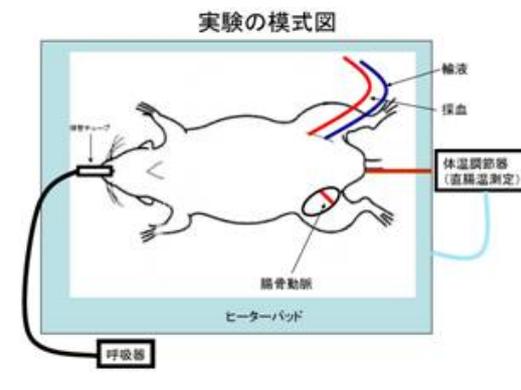
(2) (1)と同様に HVJ-E をベクターとして内皮型一酸化窒素合成酵素急性動脈閉塞ラットモデルに導入する。下腿組織に内皮型一酸化窒素合成酵素が取り込まれているか蛍光抗体法による組織染色にて確認を行う。

(3) 急性動脈閉塞ラットモデルの下肢に内皮型一酸化窒素合成酵素を導入し、レーザー血流計や温度計で血流が改善するかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) HVJ-E をベクターとして、特定蛋白質を β -gal として特定機能蛋白質が急性下肢虚血下の組織に導入可能であることを調査した。

急性動脈閉塞ラットモデルを作成する。腹腔内に麻酔薬を投与し、挿管した。左ソケイ部を切開し、大腿静脈に輸液ルートを入し、大腿動脈より圧ラインを入し、右ソケイ部を切開し、腸骨動脈を結紮した。その後、閉創した。実験の模式図を下図に示す。



β -gal のみ、HVJ-E のみ、 β -gal+HVJ-E の3種類の物質をそれぞれグループに分けて注入することにした。

注入は、結紮2時間後に行なう。 β -gal のみ、HVJ-E のみ、 β -gal+HVJ-E をそれぞれ全量 $30 \mu\text{l}$ にして6箇所にて26G針を使って注入した。

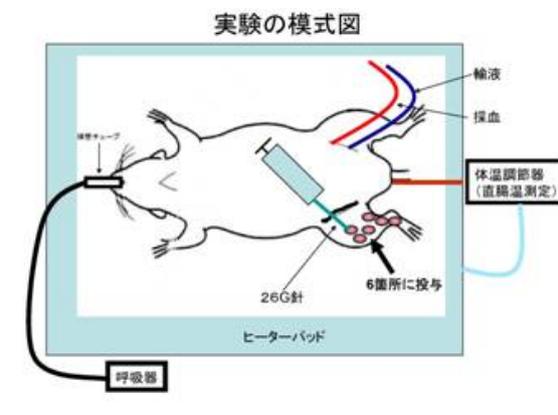
β -gal の HVJ-E への封入方法は以前より我々が行なってきた方法を使用した。この方法では心筋細胞内に β -gal が導入されることが確かであることが示されている。

封入方法を次に示す。

手順	試薬量
① HVJ-Eをマイクロチューブに封入	HVJ-E 1.0 μl
② 封入剤を添加し、氷上にて30分静置	封入剤 10 μl
③ β -galを添加・混合	蛋白質 0.5mg/10 μl
④ エンハンサーを添加・混合	エンハンサー 0.5 μl
⑤ 1000rpmで7分低速心し、上澄液を	
⑥ 精製液 40 μl 、0.4% 溶液と混合	精製液 30 μl 0.4% 溶液 10 μl

注入は、結紮2時間後に行なう。 β -gal のみ、HVJ-E のみ、 β -gal+HVJ-E をそれぞれ全量 $30 \mu\text{l}$ にして6箇所にて26G針を使って注入する。

その模式図を下図に示す。

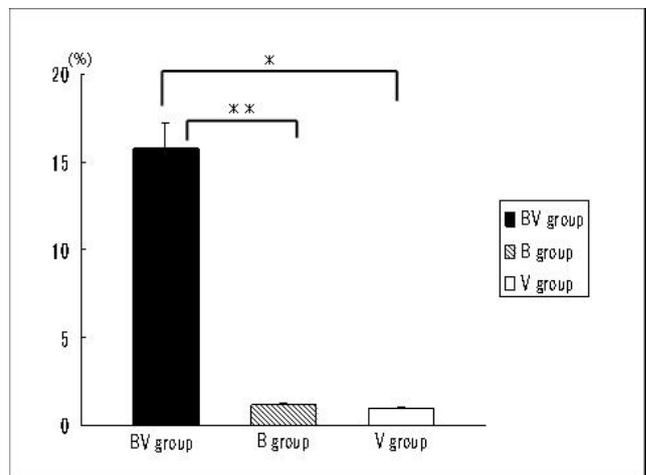


注入後6時間後に、注入周辺の組織を取り出す。

4%パラホルムアルデヒドにて固定後にX-gal染色を行なう。

細胞内の β -gal をカラーメトリーで定量的に測定を行なった。その結果を下図に示す。

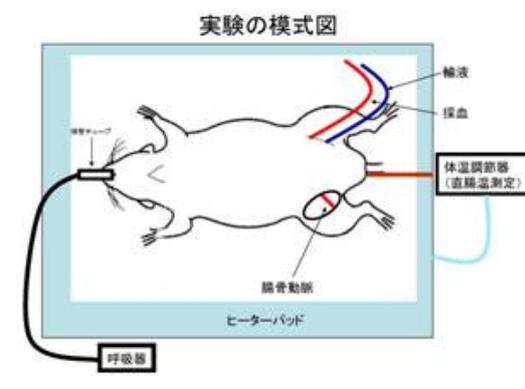
BV group は β -gal+HVJ-E を注入したグループ、B group は β -gal のみ注入したグループ、V group は HVJ-E のみである。



BV group で明らかに細胞内の β -gal が多いことが分った。このことから、虚血性下肢組織へ特定機能蛋白質が導入可能であることが示された。

(2)HVJ-E をベクターとして、一酸化窒素合成酵素が急性下肢虚血下の組織に導入可能であるかを調査した。

急性動脈閉塞ラットモデルを作成する。腹腔内に麻酔薬を投与し、挿管した。左ソケイ部を切開し、大腿静脈に輸液ルートを入し、大腿動脈より圧ラインを挿入した。右ソケイ部を切開し、腸骨動脈を結紮した。その後、閉創した。実験の模式図を下図に示す。



一酸化窒素合成酵素のみ、HVJ-E のみ、一酸化窒素合成酵素+HVJ-E の3種類の物質をそれぞれグループに分けて注入することにした。

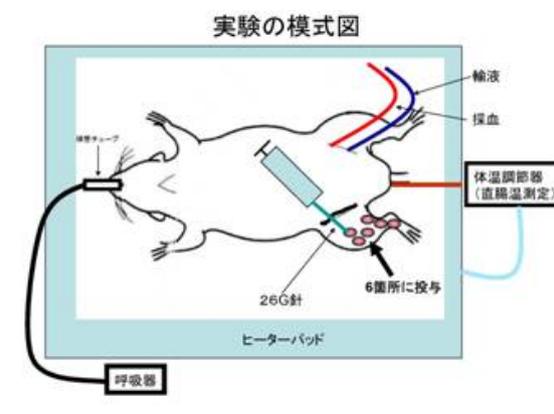
注入は、結紮2時間後に行なう一酸化窒素合成酵素のみ、HVJ-E のみ、一酸化窒素合成酵素+HVJ-E をそれぞれ全量 $40\mu\text{l}$ にして6箇所にて26G針を使って注入した。

一酸化窒素合成酵素のHVJ-Eへの封入方法は以前より我々が行なってきた方法を使用した。この方法はでは心筋細胞内に一酸化窒素合成酵素が導入されることが確実であることが示されている。

封入体の作成

手順	試薬量
① HVJ-Eをマイクロチューブに採取	HVJ-E:1AU
② 封入剤を追加し、氷上に5分間静置	封入剤: $10\mu\text{l}$
③ 一酸化窒素合成酵素を追加・混合	蛋白質: $0.5\text{mg}/\text{ml}$ $10\mu\text{l}$
④ エンハンサーを追加・混合	エンハンサー: $6\mu\text{l}$
⑤ 10000rpm・4℃で5分間遠心し、上澄液を除去	
⑥ 緩衝液 $40\mu\text{l}$ 、テトラヒドロピロブテリン溶液と混合	緩衝液: $30\mu\text{l}$ テトラヒドロピロブテリン溶液: $10\mu\text{l}$

注入は、結紮2時間後に行なう一酸化窒素合成酵素のみ、HVJ-E のみ、一酸化窒素合成酵素+HVJ-E をそれぞれ全量 $40\mu\text{l}$ にして6箇所にて26G針を使って注入した。その模式図を下図に示す。



注入後6時間後に、注入周辺の組織を取り出す。

4%パラホルムアルデヒドにて固定後に免疫学的組織染色を行なう。細胞内の一酸化窒素合成酵素をカラーメトリで定量的に測定を行なった。

その結果、一酸化窒素合成酵素+HVJ-E のグループで細胞内の一酸化窒素合成酵素が多いことが分った。

このことから、虚血性下肢組織へ特定機能蛋白質が導入可能であることが示された。そして、一酸化窒素合成酵素を使った下肢虚血への蛋白質治療が行なえる可能性を示すことが出来た。

(3)急性動脈閉塞ラットモデルを使用して、一酸化窒素合成酵素導入により下肢血流が改善するかを調べる。

現在、実験を行なっているが、測定機器の不具合で修理中のために実験を中止している。機器が修理で来次第、実験を再開し、データを発表する予定である。

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)

一酸化窒素合成酵素直接導入による下肢血流変化のデータを解析でき次第、血管外科系の雑誌に投稿予定。

〔学会発表〕(計0件)

一酸化窒素合成酵素直接導入による下肢血流変化のデータを解析でき次第、血管外科系の学会で発表する予定。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし