

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18412

研究課題名(和文)フコイダンによる脂肪幹細胞再生能促進を介した新規下肢虚血治療の開発

研究課題名(英文)Development of a novel treatment for lower limb ischaemia via promotion of fat stem cell regenerative capacity by fucoidan.

研究代表者

森田 真紀(MORITA, Maki)

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60838407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：虚血肢の血流に対するモズクHMWFまたはアカモクHMWFの虚血前後処理の影響を調べるためにモズクHMWFの血管新生効果をアカモクHMWFと比較した。コントロール群、虚血前後のモズクHMWF処理群、虚血前後のアカモクHMWF処理群のLDBFを解析した。モズク群のLDBFは、コントロール群やアカモク群よりも高く、虚血肢の毛細血管密度に対するモズクHMWFおよびアカモクHMWFの虚血前後投与の効果としては28日目の虚血肢の筋の毛細血管を抗CD31抗体で免疫染色したもので比較検討しても同様の結果が得られた。これを虚血前後投与群と虚血後のみ投与群で比較検討すると虚血前後投与群で明らかな血流回復を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢をはじめ、喫煙や糖尿病など生活習慣病をリスクファクターとするPADの治療法としては主に抗血小板薬などを用いた薬物療法、血管内治療、バイパス術などの手術療法が選択されているが、いずれも高侵襲であり治療が奏功しないケースも数多く存在する。元々効果が知られている再生医療の一つである脂肪組織由来幹細胞の使用や健康食品として知られるフコイタンを摂取することによって血流改善が得られることが証明できたことは、より低侵襲で血流不全の諸症状に対し対処できる方法が存在することが明らかとなったという意味で、非常に意義深い研究であったと考える。

研究成果の概要(英文)：The angiogenic effects of mozuku HMWF were compared with those of red mullet HMWF to determine the effects of pre- and post-ischemic treatment with mozuku HMWF or red mullet HMWF on blood flow in the ischaemic limb. The LDBF of the control group, the mozuku HMWF-treated group before and after ischaemia, and the akamoku HMWF-treated group before and after ischaemia were analysed. The LDBF of the mozuku group was higher than that of the control and akamoku groups, and similar results were obtained when comparing the effect of pre- and post-ischaemic administration of mozuku HMWF and akamoku HMWF on capillary density in the ischaemic limb by immunostaining muscle capillaries of the ischaemic limb on day 28 with anti-CD31 antibody. Comparison of the pre- and post-iscovery group with the post-iscovery only group showed a clear recovery of blood flow in the pre- and post-iscovery group.

研究分野：形成外科

キーワード：血流不全 フコイダン 脂肪組織由来幹細胞 モズク アカモク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢をはじめ、喫煙や糖尿病など生活習慣病をリスクファクターとする PAD の治療法としては主に抗血小板薬などを用いた薬物療法、血管内治療、バイパス術などの手術療法が選択されているが、いずれも高侵襲であり治療が奏功しないケースも数多く存在する。また、PAD 患者の多くは多数の合併症を有することから治療適応外とされ、救命のため下肢大切断を余儀なくされる。下肢大切断後の生命予後は非常に悪い。これらの問題を解決するため、近年では ADSCs を用いた新たな治療法の開発が進められている。ADSCs は皮下脂肪組織に大量に存在する組織幹細胞であり、吸引脂肪から酵素処理により容易に単離され、血管への分化と血管新生因子の産生を介して血管新生を促進する。我々は最近、ADSCs シートが梗塞心臓の血管新生を促進することを報告した (Adachi, Morita et al. Circ J 2019.)。一般に幹細胞を用いた血管新生は移植されるホスト側の危険因子等の環境因子が重要であり、その後の血管新生効果に重要な影響を与えることが知られている。また我々は遮断薬が ADSCs の血管新生能を消去することを報告している (同文献参照)。併用薬剤との組み合わせが ADSCs の血管新生能を増強するためには重要である。以上から ADSCs の血管新生能を増強できる物質の探索は喫緊の課題である。フコイダンはモズク由来の多糖体で、種々の免疫賦活作用、抗凝血作用や抗炎症作用の他、抗がん作用も知られる。その一方で、抗がん剤の副作用軽減効果、すなわち正常細胞の細胞死を抑制する効果が報告されており、これは種々の幹細胞の増殖促進能に寄与する可能性を示唆している。我々はフコイダン経口投与による下肢虚血の改善や血管新生の促進効果を明らかにしてきたが、その詳細なメカニズムは不明であるため、フコイダンの経口投与が組織の成長因子やタンパクの発現に伴って ADSCs の増殖を促進する効果があるかを検討することとした。

2. 研究の目的

- (1) フコイダン摂取マウスの血管片を採取した血管新生測定モデルを作成することで、摂取したサンプルが下肢虚血改善に及ぼす効果を検証すること
- (2) フコイダン摂取マウスの血管片を採取した血管新生測定モデルが血管新生因子や各種サイトカインに及ぼす効果を検証すること

3. 研究の方法

C57BL/6J マウス (雄、8-10 週齢) は 20-25 g を CREA Japan (日本、大阪) より購入した。実験計画書 (18-Y-23) は、鳥取大学医学部動物実験委員会の承認を得ている。実験手順および解析は盲検下で行われた。一部の実験では、体重 200-250 g の Lewis ラット (雄 8-10 週齢) を使用した。

(1) 片側後肢虚血モデルの作製

C57BL/6J マウス (雄、8~10 週齢) に既報の方法で片側後肢虚血を誘発した。0 日目に塩酸キシラジン (5 mg/kg; Bayer, Tokyo, Japan) および塩酸ケタミン (80 mg/kg; Sankyo Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) を腹腔内に注入して麻酔した後、右外腸骨動脈近位を 8-0 シルク (MEAR Medic, Chiba, Japan) で結紮した。

(2) モズク HMWF またはアカモク HMWF の経口投与

マウスを 4 群のうちの 1 群に割り付けた。対照群 (n=7) には 0 日目から 28 日目まで (虚血後) 生理食塩水を投与した。モズク投与前後群 (n=6) には -7 日から -1 日まで (虚血前) 80 mg/kg/日, 0 日から 28 日まで (虚血後) 400 mg/kg/日モズク HMWF4) を投与した。アカモク投

与前後群 (n=3) には、アカモク HMWF を 7 日目から 1 日目 (虚血前) まで 80 mg/kg/日、0 日目から 28 日目 (虚血後) まで 400 mg/kg/日投与した。モズク投与後群 (n=3) には、虚血後 0 日から 28 日まで 400 mg/kg/日モズク HMWF を投与した。モズク HMWF およびアカモク HMWF は経口投与した。

(3)レーザー Doppler 血流解析

術後 0, 7, 14, 21, 28 日に、レーザー Doppler 血流 (LDBF) 分析器 (Permed, Stockholm, Sweden) を用いて下肢の血流を測定した。補足図 1 に示すように、Doppler 信号は、カーソルで描かれた筋領域の微小血管灌流の指標とした。LDBF は 1 分間隔で 3 回測定し、平均値を考慮した。測定結果は、未治療肢の血流に対する割合で表した。

(4)毛細血管密度の測定

28 日目に虚血肢から内転骨格筋を分離し、Tissue-Tek 4593 Optimal Cutting Temperature compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) に包埋し、液体窒素中でスナップ凍結した。各標本の凍結切片 (厚さ 8 μm) を作製した。切片を CD31 に特異的な抗体 (BD Biosciences, San Diego, CA) とともに 2 時間インキュベートし、バイオスズで標識してアビジン-ビオチン複合体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) により検出した。標識された細胞は血管内皮細胞として検出された。毛細血管密度は、骨格筋繊維あたりの CD31 陽性特徴の数として算出された。横切片から無作為に選んだ 3 フィールドを 1 動物につき分析した。

(5)化学物質

オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) 由来のフコイダンはサイズ排除クロマトグラフィーにより、このフコイダンの平均分子量は 300kDa であると推定された。フコスの含有量は約 36% (w/w) で、硫酸基は全フコイダンの 14% (w/w) であった。粉末中の水分量は 12.8% (w/w) であった。アカモク HMWF は、株式会社水産キムラヤの同施設で、同じ製造方法で抽出された。平均分子量は 80kDa であった。フコース含量は約 15% (w/w)、硫酸基は 10% (w/w) であった。粉末の水分量は 8.9% (w/w) であった。

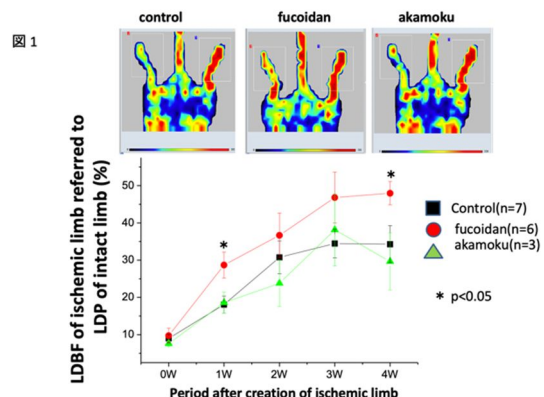
(6)統計解析

データは StatView 5.0 (SAS Inc., NC, USA) を用いて処理した。すべての値は、平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で表される。グループ間の比較は、一元配置分散分析と多重比較のためのポストホックテストによって分析された。グループ間の血流回復を反復測定 ANOVA で評価した。2 群間の比較には Student's t-test を用いた。P<0.05 は有意とみなされた。

4. 研究成果

(1)虚血肢の血流に対するモズク HMWF またはアカモク HMWF の虚血前後処理の影響

もずく HMWF の血管新生効果をアカモク HMWF と比較するために、コントロール群 (n=7)、虚血前後のモズク HMWF 処理群 (n=6)、虚血前後のアカモク HMWF 処理群 (n=3) の LDBF を解析した。図 1 は、28 日目のコントロール群、モズク群、アカモク群の虚血肢 (右側) の代表的な LDBF を示したものである。モズク群の LDBF は、コントロール群やアカモク群よりも高かった。図 1 に示す折れ線グラフは LDBF 実験における術後 0 日目から 28 日目までの時間依存



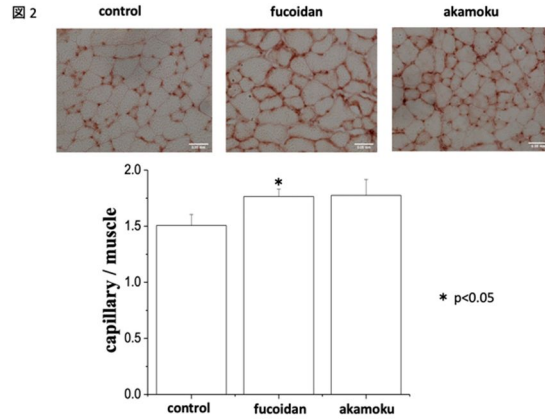
的な血流回復を示したものである。モズク群では、虚血後 7 日目と 28 日目の血流回復が、他の 2 群に比べ有意に高かった。

モズク群では他の 2 群に比べ、虚血後 7 日目と 28 日目の血流回復が有意に高かった。アカモク群では、この期間中改善は見られなかった。

(2) 虚血肢の毛細血管密度に対するモズク HMWF およびアカモク HMWF の虚血前後投与の効果

図 2 は、28 日目の虚血肢の筋の毛細血管を抗 CD31 抗体で免疫染色したものである(上段：左からコントロール群, モズク群, アカモク群)。

毛細血管密度は、コントロール群に比べモズク群で増加した。モズク群ではコントロール群に比べ毛細血管密度の増加が認められたが、アカモク群では増加しなかった。複数の実験から得られた下段の棒グラフでは、モズク群 (1.76 ± 0.07) の毛細血管密度は、対照群 (1.51 ± 0.10) およびアカモク群 (1.38 ± 0.08) より有意に高かった ($P < 0.05$)。

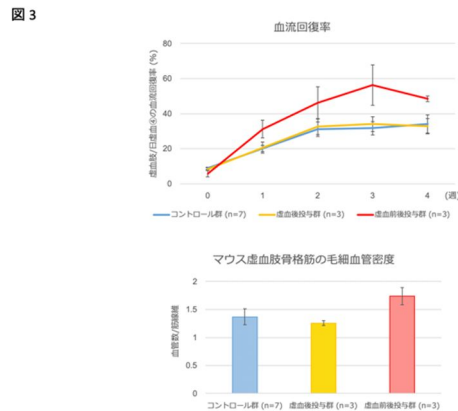


(3) 虚血肢の血流および毛細血管密度に対する虚血前後モズク HMWF 処理の効果

図 3 に示すように、コントロール群 (n=3), 虚血前後モズク HMWF 処理群 (n=3), 虚血後モズク HMWF 処理群 (n=3) の間で LDBF と毛細血管

密度を比較検討した。上段の折れ線グラフにおいて、虚血肢の灌流は、コントロール群および虚血後モズク HMWF 投与群と比較して、1 週間目および 4 週間目に虚血前後モズク HMWF 投与群で有意に増加した。

虚血前後のモズク HMWF 投与群では、虚血肢の毛細血管密度が他の 2 群に比べ増加した(下段棒グラフ)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maki Morita	4. 巻 -
2. 論文標題 Angiopgenetic effects of high molecular weight fucoidan in a mouse ischemic limb model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vascular Failure	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田 真紀、井上 由美子、陶山 淑子、野津 智美、福岡 晃平、遠藤 祐輔、八木 俊路朗、久留 一郎
2. 発表標題 下肢虚血モデルマウスへの高分子フコイダン前投与における血管新生効果の検討
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------