

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号:14301

研究種目:基盤研究(C)

研究機関:2009~2011

課題番号:21591796

研究課題名(和文) 多血小板血漿徐放によるカクテル血管新生療法

研究課題名(英文) Therapeutic angiogenesis using sustained release of platelet-rich plasma from biodegradable gelatin hydrogel

研究代表者 丸井 晃(MARUI AKIRA)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号:60402859

研究成果の概要(和文):

我々は血小板を濃縮した多血小板血漿 Platelet-Rich Plasma: PRP を血管新生療法に応用した。PRP はさまざまな血管新生因子・組織再生因子を含んでいることを確認し、ゼラチンを化学架橋したゼラチンハイドロゲルを用いた DDS による血管新生療法を確立した。ゼラチンハイドロゲルによる血管新生療法は虚血下肢モデルにおいて成熟した血管新生効果を示し、また糖尿病病態モデルにおいても優れた血管新生効果を示した。この技術は自己細胞を使用することからも臨床応用が期待でき、今後虚血下肢に対する再生医療として有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文):

We used platelet-rich-plasma (PRP) as a novel method for therapeutic angiogenesis of limb ischemia. We showed that PRP contains several potent angiogenic growth factors such as SDF-1, PDGF-BB, VEGF, and bFGF. In addition, sustained release of PRP from biodegradable gelatin hydrogel facilitated angiogenesis both in normal and diabetic murine ischemic limb. This technique may be a promising option for therapeutic angiogenesis in the clinical settings.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医学

科研費の分科・細目:医学

キーワード:血管新生治療、多血小板血漿、増殖因子

1. 研究開始当初の背景

下肢切断を免れない重症下肢虚血の患者に対する治療として血管新生療法が近年注目を浴びている。従来の血管新生療法の多くの VEGF や bFGF などの単独の血管新生因子を用いて行われてきたが、生体内での血管新生は様々な増殖因子の相互作用により成り立っており、単一増殖因子での方法での限界が報告されている。特に糖尿病や高脂血症を合併する症例では有効性が不十分であり、より効果的な血管新生療法の開発が急務であった。

2. 研究の目的

我々は血小板を濃縮した多血小板血漿 Platelet-Rich Plasma: PRP に着目した。PRP はさまざまな血管新生因子・組織再生因子を含んでおり、ゼラチンハイドロゲルを用いた DDS を確立し、我々は PRP から放出されるさまざまな増殖因子を徐放化させ、その相乗効果による成熟した血管新生を目的とする。またこれらの効果を糖尿病・高脂血症などの動物モデルでも検証する。

3. 研究の方法および4. 研究の成果

<PRP 局所徐放による虚血下肢での血管新生効果>

(方法)

PRPはC57BL/6マウスから10mLの末梢血を採取し2400rpm・10分・20℃にて遠心して採取した。まずPRPおよびplatelet-poor plasma (PPP)に含まれる増殖因子の濃度を比較した。

次いでマウスの右外腸骨動脈、大腿動静脈、回旋動静脈を結紮・離断し、下肢虚血マウスモデルを作成した。それをランダムに4群に分け、10mgのゼラチンハイドロゲルのみを虚血肢に筋注したコントロール群(C)、100ugの血小板乏血漿(platelet-poor plasma [PPP])をゼラチンにハイドロゲルを含浸し虚血肢に筋注した群(PPP)、100ugのPRPを生食に溶かし虚血肢に筋注した群(PRP-sol)、100ugのPRPをゼラチンハイドロゲルに含浸し虚血肢に筋注した群(PRP-sr)の4群とした。なお、我々は成長因子の徐放担体としてゼラチンハイドロゲルを用いた。

(結果)

PRP-sr群は他の群と比べ、成長因子であるSDF-1、DGF-BB、VEGF、bFGF、IGF-1全てにおいて有意差を持って増加が認められた。またPRP-sr群は、虚血組織への灌流、血管密度、血管成熟度においても、他群より有意差を持って増加していることが認められた

<糖尿病下肢虚血モデルに対するPRPの局所徐放投与療法>

(方法)

ストレプトゾトシンによって誘発された糖尿病性のマウスを使用し、マウスの右外腸骨動脈、大腿動静脈、回旋動静脈を結紮・離断し、下肢虚血マウスモデルを作成した。それをランダムに4群に分け(各群それぞれ10匹)、10mgのゼラチンハイドロゲルのみを虚血肢に筋注したコントロール群(C)、100ugの血小板乏血漿(platelet-poor plasma(PPP))をゼラチンにハイドロゲルを含浸し虚血肢に筋注した群(PPP)、100ugのPRPを溶媒に溶かし虚血肢に筋注した群(PRP-sol)、100ugのPRPをゼラチンハイドロゲルに含浸し虚血肢に筋注した群(PRP-sr)の4群とした。なお、我々は成長因子の徐放担体としてゼラチンハイドロゲルを用いた。

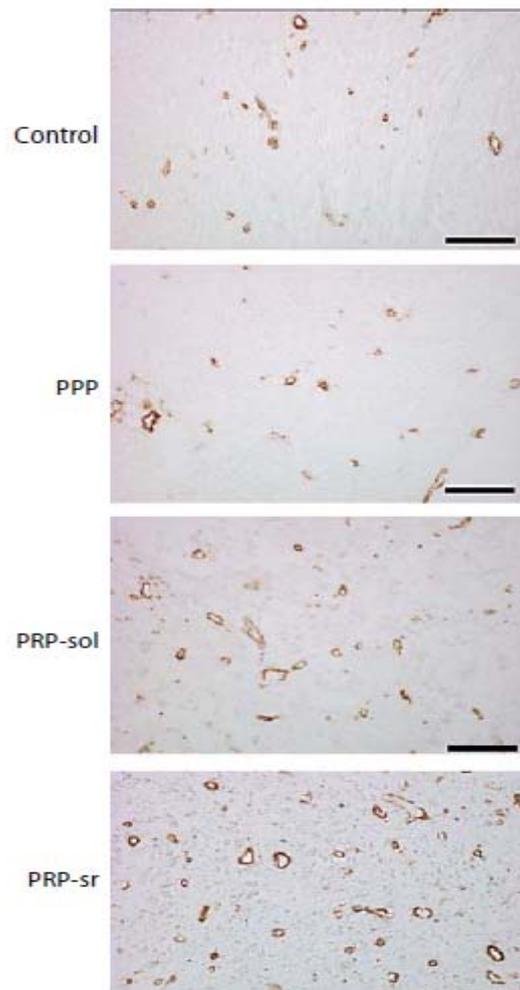
評価は投与4週間後に行った。評価法は、レーザー・ドップラー・パーフュージョン・イメージング(LDPI)による血液評価、vWF

抗体による血管密度測定、抗平滑筋アクチン抗体による血管密度測定を行い、またSDF-1、DGF-BB、VEGF、bFGF、IGF-1の血管増殖にかかわる成長因子の測定も行った。

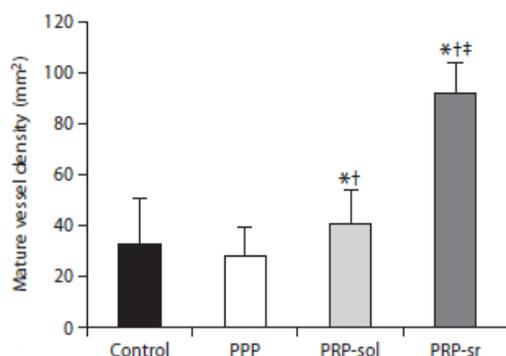
(結果)

PRP-sr群は他の群と比べ、成長因子であるSDF-1、DGF-BB、VEGF、bFGF、IGF-1全てにおいて有意差を持って増加が認められた。またPRP-sr群は、虚血組織への灌流、血管密度、血管成熟度においても、他群より有意差を持って増加していることが認められた(図1、図2)。

(図1) vWF抗体による血管密度測定(術4W後)



(図 2) vWF 抗体による血管密度測定(術 4 W 後)



(考察)

今回の研究は我々が調べうる限り、ストロプトゾトシンにより誘発された糖尿病性マウスモデルにおいて下肢阻血を作成後、PRPの徐放により血管内皮細胞増殖と血管形成を調べた唯一の研究である。

PRPは様々な脈管形成成長因子を含んでいるとされている。今回の研究結果からは、虚血肢を持つ糖尿病性マウスにおいて、PRPは高い有効性を持つ様々な血管形成成長因子を刺激し、虚血組織への灌流改善、血管増殖を促進することで治療効果が認められたと結論づけることができる。また、過去の我々の研究から、コラーゲンの誘導体であるゼラチンにPRPを含浸させることにより、血小板活性化を起動させることができる。

PRPは、自家移植が可能であるため、臨床応用する場合でも抗体形成や感染などの危険に対し特別な考慮は必要ではない。また、現在PRPは整形外科や形成外科で臨床応用されており、骨または軟組織治療にもPRPの有効性を示す文献も出てきている。しかし、文献によってはPRPの効果が乏しいものもある。これは、我々の研究でも同様だったが、PRP単体の投与のみだと、急速な分解により効果が乏しくなる可能性があるため、ゼラチンハイドロゲルに含浸し投与することで、PRPを徐放化させ、持続的に効果を発揮することで臨床的に有効となるかもしれない。

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 8 件)

- 患者まで届く再生医療 生体吸収性担体を用いた重症下肢虚血に対する血管新生療法 丸井晃, 田畑泰彦, 柳茂樹,

山本雅哉, 米澤淳, 桂敏也, 手良向聡, 横出正之, 清水章, 中尾一和, 坂田隆造 再生医療 10 巻 1 号 Page37-44

- 下肢血管新生療法の臨床応用 丸井晃, 坂田隆造 日本医事新報 4553 号 Page62-63
- 【疾患治療とドラッグデリバリーシステム】 細胞増殖因子徐放化による血管新生治療 山本雅哉, 丸井晃, 坂田隆造, 田畑泰彦 細胞 44 巻 2 Page64-67
- Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. Remote Postconditioning may Attenuate Ischaemia-Reperfusion Injury in the Murine Hindlimb Through Adenosine Receptor Activation. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2010;40:804-9
- Bir SC, Esaki J, Marui A, Sakaguchi H, Kevil CG, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y, Sakata R. Therapeutic Treatment with Sustained-Release Platelet-Rich Plasma Restores Blood Perfusion by Augmenting Ischemia-Induced Angiogenesis and Arteriogenesis in Diabetic Mice. J Vasc Res. 2010;48:195-205.
- Bir SC, Esaki J, Marui A, Yamahara K, Tsubota H, Ikeda T, Sakata R. Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse. J Vasc Surg 2009;50:870-879.
- Esaki J, Sakaguchi H, Marui A, Bir SC, Arai Y, Huang Y, Tsubota H, Kanaji T, Ikeda T, Sakata R. Local sustained release of prostaglandin E1 induces neovascularization in murine hindlimb ischemia. Circ J. 2009;73:1330-6.
- Bir SC, Fujita M, Marui A, Hirose K, Arai Y, Sakaguchi H, Huang Y, Esaki J, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M : New therapeutic approach for impaired arteriogenesis in diabetic mouse hindlimb ischemia. Circ J. 2008;72(4):633-40

[学会発表] (計 14 件)

- 熊谷基之, 丸井 晃, 田畑泰彦, 武田崇秀, 山本雅哉, 米澤 淳, 池田隆文, 桂 敏也, 川上浩司, 横出正之, 清水章, 坂田隆造 bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる 重症下肢虚血に対する血管新生療法 第 1 回 DDS 徐放化再生医療研究会 2011.12.3. 東京
- 丸井晃, 玄丞然, 坂田隆造 臨床を目標とした高分子バイオマテリアルの DDS 新規バイオマテリアル"LYDEX"を用いた心臓血管外科領域における DDS 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 2011.11.22. 京都市
- 丸井 晃 ゼラチンハイドロゲルによ

る DDS を応用した心血管再生医療
-From bench to bedside- 第 4 回北和脈管
疾患連携の会 2011.9.3. 奈良市

4. 小田基之、丸井 晃、武田崇秀、坂田隆造 重症下肢虚血に対する血管新生療法の間報告 第 11 回比叡山ワークショップ 2011.6.4. 京都市
5. Marui A, Tabata Y, Sakata R. Biomaterial-based Regenerative Therapy in Cardiovascular Field. 1st Meeting of Asia-Pacific Federation of Inflammation and Regeneration. 2011.6.2 Kyoto
6. 丸井晃, 田畑泰彦, 柳茂樹, 山本雅哉, 米澤淳, 桂敏也, 横出正之, 清水章, 坂田隆造 bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる血管新生療法の長期成績および医薬品市販化・保険診療化の試み 第 39 回日本血管外科学会学術集会 2011.4.21. 那覇市
7. 丸井晃, 田畑泰彦, 柳茂樹, 山本雅哉, 米澤淳, 桂敏也, 清水章, 坂田隆造 心血管 トランスレーショナルリサーチ (TR) 医薬品市販化・保険診療化を目指した試み 第 41 回日本心臓血管外科学会学術集会 2011.2.23. 東京都
8. 丸井 晃、柳 茂樹、坂田隆造 bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる 下肢血管新生療法 文部科学省橋渡し研究支援推進プログラム平成 21 年度成果報告会「コラーゲン由来物質などによる新規 DDS を用いた治療法の開発」 2010.3 東京都
9. Tsubota H, Marui A, Miwa S, Nakata T, Minakata K, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Remote postconditioning may attenuate ischemia-reperfusion injury in a murine hind limb through activation of adenosine receptors. American Heart Association, Scientific Sessions 2009 2009.11.14-20 Orlando, USA
10. Tsubota H, Bir SC, Marui A, Esaki J, Tabata Y, Fujita M, Ikeda T, Sakata R. platelet rich plasma (PRP) の除放による血管新生治療 第 39 回日本心臓血管外科学会学術集会 2009.4.22-24 富山県
11. Bir SC, Fujita M², Hirose K, Marui A, Arai Y, Sakaguchi H, Esaki J, Huang Y, Ikeda T, Tabata Y³, Komeda M: New Therapeutic Approach for Impaired Arteriogenesis in Diabetic Mouse Hindlimb Ischemia. セロトニン研究会(京都), 2008.2
12. Bir SC, Marui A, Esaki J, Yamahara K, Tsubota H, Fujita M, Tabata Y, Ikeda T: Sustained Release of Platelet-Rich Plasma, Cocktail of Potent Angiogenic Cytokines, Restores Blood Perfusion by

Recruitment of Bone Marrow Derived Hematopoietic stem Cells in the Mouse Hind Limb Ischemia. American Heart Association Scientific Sessions 2008.11.8-12, New Orleans, The US

13. Bir SC, Akira Marui, Esaki J, Tsubota H, Fujita M, Tabata Y, Ikeda T: An Evolving Approach of Therapeutic Angiogenesis with Sustained Release of Platelet-Rich Plasma in Diabetic Mouse Hind Limb Ischemia. American Heart Association Scientific Sessions 2008.11.8-12, New Orleans, The US
14. Bir SC, Akira Marui, Jiro Esaki, Hisashi Sakaguchi, Yoshio Arai, Keiichi Hirose, Tadashi Ikeda, Yasuhiko Tabata, Masatoshi Fujita, FAHA, ; Masashi Komeda: A Novel Therapeutic Angiogenesis With Sustained Delivery Form Of Platelet-Rich Plasma In Mouse Hind limb Ischemia Model. ACC Annual Scientific Session 2008.3.29-4.1, Chicago, The US

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyoto-cvs.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸井 晃 (MARUI AKIRA)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60402859

(2) 研究分担者

三和 千里 (MIWA SENRI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：10359812