

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790697

研究課題名（和文）衝撃波照射による心筋再生・血管新生療法の基礎的検討

研究課題名（英文）Elucidation of the basic mechanism of angiogenesis and cardiomyocyte regeneration induced by the external shockwaves.

研究代表者

武田 守彦（TAKEDA MORIHIKO）

東北大学・病院・助教

研究者番号：30375084

研究成果の概要（和文）：培養細胞（血管内皮細胞）及び実験動物（ラット）を用いて、体外衝撃波照射の治療効果を検討する実験を施行した。培養血管内皮細胞に衝撃波を照射すると、血管内皮増殖因子の発現亢進が認められた。しかし、培養・照射条件の設定が困難であり、今後も検討が必要と思われた。慢性心不全の疾患モデルラットを作成し、心臓に体外衝撃波を照射すると、照射群において左室収縮力の改善傾向と生存率の改善傾向、有意な毛細血管密度の増加を認めた。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that the shockwave treatment applied to cultured human umbilical vein endothelial cells up-regulated mRNA expression of vascular endothelial growth factor, although further studies are required to determine the optimal condition of the shockwave treatment. Extracorporeal shockwave therapy applied to a rat experimental model of chronic heart failure induced a tendency to improve a left ventricular contractile function and a survival rate as well as a significant increase of capillary density in myocardium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：体外衝撃波治療法、血管新生、慢性心不全

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会や糖尿病患者の増加に伴い、従来の治療法（カテーテル手術、冠動脈バイパス術）の適応とならない重症の冠動脈病変を有する虚血性心疾患患者が増加している。このような症例では慢性心筋虚血のため、心機能は低下し心室拡大（心室リモデリング）が起こり、最終的には重症の心不全へと病態が進む。予後不良な病態であり、新た

な治療法の確立が望まれている。さらに、非虚血性心疾患（弁膜症、心筋症など）に関しても、薬物療法の進歩により生命予後が改善しつつある反面、高齢の患者数は今後増加し続けることが予想されている。心不全は慢性的に経過し、治癒することは殆ど無いため、治療に難渋する例が多い。また、慢性心不全患者が急性増悪を繰り返すたび、活動度は低下し、患者本人や介護者の生活の質が著し

く低下することも多い。

近年、虚血性心疾患患者の心室リモデリング抑制と心機能改善を目指して、血管新生促進分子の遺伝子や骨髄単核球細胞・血管内皮前駆細胞などの未分化細胞の心臓への移植が試みられ、有効性が報告されている。しかし、これらの治療法では、開胸し直視下に遺伝子・細胞を虚血心筋に注入するため、臨床応用する際には侵襲性が高く、繰り返し行うことは困難である。

これに比し、体外衝撃波療法は、体内の結石(尿管結石など)の破碎治療として広く普及しており保険適応もある安全な治療法であるが、研究協力者の下川は、心筋虚血に対する非侵襲性の体外衝撃波療法を開発した。尿路結石破碎治療に用いられている出力の約 10%の低出力の衝撃波を体外から虚血心筋に照射すると、冠動脈の血管新生が効率よく誘導され心筋虚血が著明に改善されることを、ブタ慢性虚血モデル、次いで重症狭心症患者で既に確認している。治療に伴う副作用も認めなかった。我々は東北大学医学部倫理委員会の承認を得て、重症狭心症患者を対象に、臨床研究を開始した。

しかしながら、低出力衝撃波治療による心筋虚血の改善機序には、血管新生効果に加えて、血管平滑筋や心筋に対する細胞保護効果も考えられているものの、詳細な作用機序は不明である。心臓病に対する低侵襲衝撃波治療法を普及させるためには、基礎研究による詳細な作用メカニズムの解明が不可欠と考えられる。本研究により、体外衝撃波療法による心筋虚血改善作用、心機能改善作用の詳細な作用機序が解明されれば、体外衝撃波療法が信頼性の高い治療法として普及し、重症虚血性心疾患患者の生命予後や生活の質を改善することが期待される。さらに、非虚血性心疾患による慢性心不全への有効性が確認できれば、大多数の心疾患患者への治療応用が期待され、難治性心不全に対する有効な治療オプションの一つとなりうると考えられる。

## 2. 研究の目的

低出力衝撃波治療による心筋虚血改善作用・心機能改善作用の分子生物学的機序の解明を第1の目的とする。特に衝撃波照射の、心筋細胞に直接与える効果及び骨髄由来細胞の心筋組織内への動員促進効果の有無を解明する。さらに、心筋症に代表される、心筋破壊の進んだ慢性心不全状態

に対する心筋再生・血管新生治療としての衝撃波治療の応用の可能性について実験動物を用いて検討することを第2の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた *in vitro* 実験系での遺伝子及び蛋白発現の検討: HUVEC を 24 時間培養した後、衝撃波を照射する。照射後 24 時間で mRNA、蛋白を抽出して、血管新生への関与が報告されている血管内皮増殖因子(VEGF)をはじめ、種々のサイトカインとその受容体の発現を RT-PCR 法や DNA マイクロアレイ法、ウェスタンブロット法にて検証する。

(2) 心不全モデルラットを用いた体外衝撃波照射の慢性心不全改善作用の検討:

慢性心不全の疾患モデルラットとして、ダール食塩感受性高血圧ラットを使用した、高血圧性心肥大による心不全モデルを作成する。このモデルは、8 週齢より高食塩食を開始すると 16 週齢前後で著明な高血圧・左室肥大を発症し、23 週齢前後で心不全を発症する。心不全発症前後の時期に心臓に対し体外衝撃波照射を行い、経時的に心エコーによる心機能評価を行うとともに、生存期間を解析し、生存曲線を作成する。また、心組織を採取し、免疫染色を施行し血管密度を算出し、衝撃波照射が心筋内血管新生を誘導するか否か検討する。

## 4. 研究成果

培養細胞(HUVEC)及び実験動物(ラット)を用いて、体外衝撃波照射の治療効果を検討する実験を施行した。

(1) *in vitro* 実験として、HUVEC をシリコン皿上に培養し、小型衝撃波発生装置を用いて照射を行った。mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて解析を行ったが、照射後の VEGF 発現量の上昇を認めることも多かったが、実験毎のばらつきが大きく、再現性に乏しいことが分かった(図1)。原因として衝撃波発生装置の焦点深度の問題で、一層の培養細胞に一定のエネルギーが照射されていない可能性が考えられた。一層の培養細胞に確実に衝撃波を照射可能とする、特殊な培養チャンバーを本学工学部と共同開発(図 2)し、それを用いて実験を継続したが、培養細胞の損傷が激しく VEGF 遺伝子の up-regulation は再現性に乏しかった。単層の培養系での衝撃波照射実験継続は困難と考え、当初

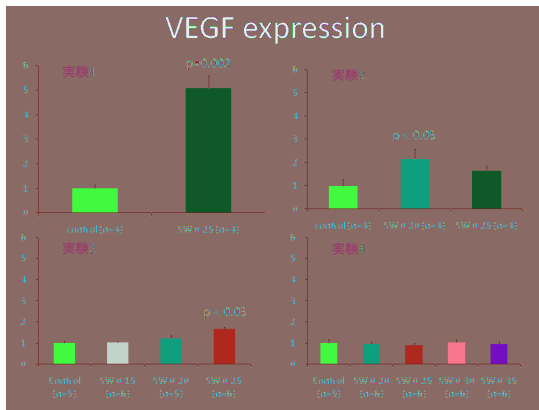


図 1. HUVEC の培養系に衝撃波(SW)を 0.15-0.35mJ/mm<sup>2</sup> にて照射し、VEGF 遺伝子の発現を検討した。VEGF 遺伝子は誘導される傾向にあったが、実験毎のデータのばらつきが大きかった。

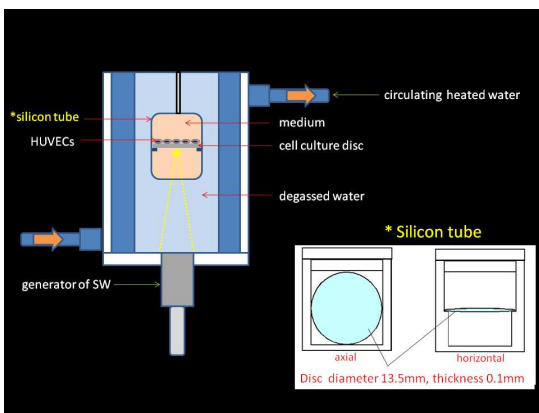


図 2. 我々が工学部と共同開発した特殊培養チャンバー

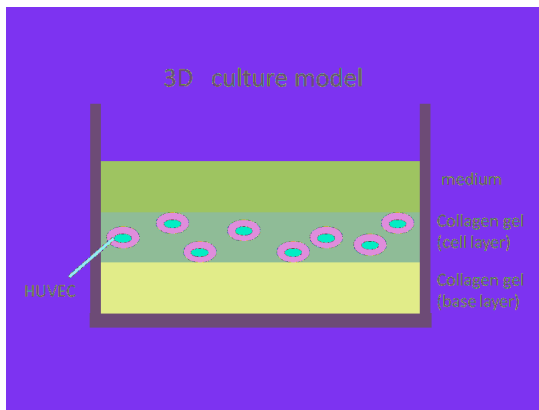


図 3. 3D 培養モデルの確立

の方針を変更し、より生体の血管構造に近づけるためコラーゲンゲル内に立体的に HUVEC を培養する系を作成した。ゲル内の HUVEC に向けて衝撃波を照射した後、HUVEC のみを遠心分離し、mRNA 及び蛋白を抽出する実験系を確立した(図 3)。しかしそれでも VEGF 遺伝子の up-regulation は安定して再現されず、原因として衝撃波照射の恩恵を受ける細胞数が培養細胞数全体に占める

割合が小さく、衝撃波の効果が埋没してしまっている可能性が考えられた。この問題を解決すべく、図 3 の培養系の複数箇所に衝撃波照射を可能とする特殊な培養チャンバーを開発した(図 4)。現在予備実験を施行中である。

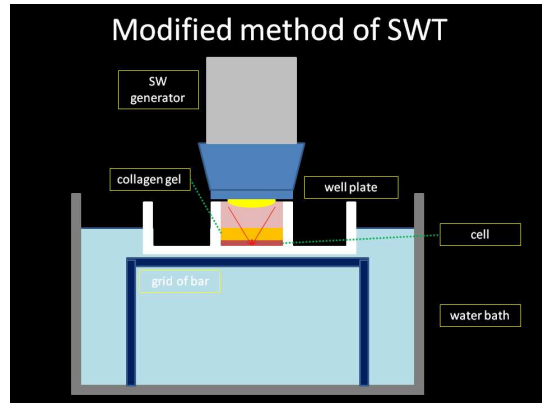


図 4. 3D 培養系の広範囲に衝撃波照射を可能とする培養チャンバー

(2) *in vivo* 実験として、まず preliminary 実験を行った。正常成獣 Wister ラットに全身麻酔導入後、心臓に対し様々な出力にて体外衝撃波を照射した。48 時間後に心臓を摘出し、蛋白を抽出しウェスタンブロット法を施行したところ、VEGF の蛋白発現量が上昇していた。VEGF の上昇が得られる、最も低い衝撃波の出力を治療量と定めた。この結果を受け、次に慢性心不全の疾患モデルラットとして、ダール食塩感受性高血圧ラットを使用し、高食塩食を負荷することにより、高血圧性心肥大から心不全に至るモデルを作成した(図 5)。

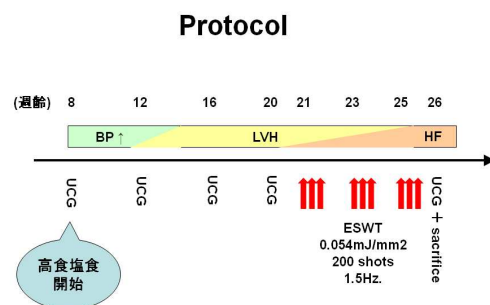


図 5. 心不全モデルラットを用いた *in vivo* 実験系プロトコール。BP:血圧, LVH:左室肥大, HF:心不全, UCG:心エコー

うっ血性心不全を発症する 21-25 週齢前後の時期に衝撃波照射(0.054mJ/mm<sup>2</sup>, 200 発)を 3 クールに分けて施行し、経時的に心エコーによる左心機能、及び生存期間を解析したところ、有意差には至らなかったものの、衝撃波照射群におい

て左室収縮力の改善傾向と生存率の改善傾向を認めた(図 6)。また、血清中脳性ナトリウム利尿ペプチド値も照射群において低い傾向を認めた(200 ± 12pg/ml vs 297 ± 52pg/ml, p=0.08)。

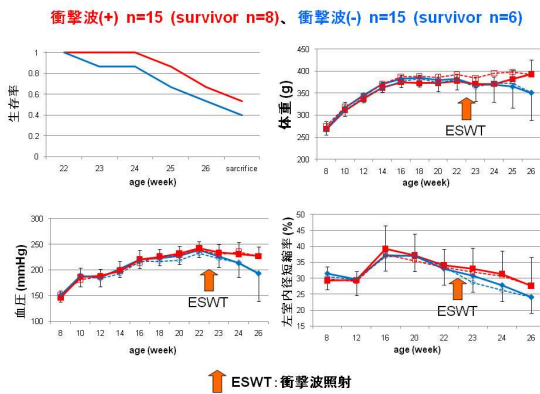


図 6. ラット心不全モデルにおいて、衝撃波照射群では左室収縮力及び生存率の改善傾向を認めた。

ラット心組織を採取し、血管内皮を認識する抗 CD34 抗体にて免疫染色を行い、血管密度を検討したところ、照射群において有意に血管密度が高い結果が得られた(図 7)。

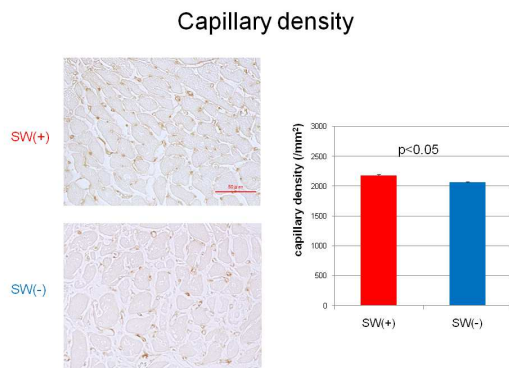


図 7. 照射群(SW(+))および非照射群(SW(-))の心筋内毛細血管密度。照射群が有意に高かった。

以上の結果より、ダール食塩感受性高血圧ラットを用いて作成した圧負荷心不全モデルにおいては、体外衝撃波照射が心機能を改善させ生存率を改善させる可能性があること、少なくともその機序の一つとして、衝撃波により心筋内で血管新生が誘導される可能性があることが示唆された。

## 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)

[その他]

ホームページ等

東北大学循環器内科ホームページ

<http://www.cardio.med.tohoku.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

武田 守彦(TAKEDA MORIHIKO)

東北大学・病院・助教

研究者番号:30375084

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

### (4)研究協力者

羽尾 清貴(HAO KIYOTAKA)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生

菊地 翼(YOKU KIKUCHI)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生