

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20756

研究課題名（和文）分極ハイドロキシアパタイトを用いた下肢虚血に対する血管新生効果について

研究課題名（英文）Angiogenic effect of local injection of hydroxyapatite electret to the hind limb ischemia

研究代表者

山口 純司（Junji, Yamaguchi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科 疾患生理機能解析学分野・助教

研究者番号：80964709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：現在の下肢虚血治療における課題を克服すべく、安価に大量生産できる荷電粒子である分極ハイドロキシアパタイト（Hydroxyapatite electret, HAE）の局所注射の効果を検討した。HAE投与にて下肢脱落率は低下し、血流が温存され、走行距離も長くなった。HAEの局所注射が下肢虚血の治療として有効である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により確認されたHAEの局所注射による下肢虚血からの保護効果は、安価な治療を提供するという社会的問題の解決にも寄与する可能性があり、その発展性は大きい。また、下肢虚血だけでなく様々な虚血性疾患で応用可能な可能性があり、今後の基礎的研究に寄与する意義のある成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：To overcome the challenges in current treatments for limb ischemia, we investigated the effects of locally injecting hydroxyapatite electret (HAE), a charged particle that can be inexpensively mass-produced. HAE administration resulted in a decreased rate of limb auto-amputation, preserved blood flow, and increased running distance. These findings suggest that local injection of HAE may be an effective treatment for limb ischemia.

研究分野：循環器内科学

キーワード：下肢虚血 ハイドロキシアパタイト 生体材料 荷電

1. 研究開始当初の背景

下肢虚血に対しては、一般的にはまず血管拡張剤・血小板凝集抑制剤、経皮的血管形成術・バイパス術、血管リハビリテーションなどの標準治療が行われるが、それに抵抗性を示すことも少なくない。そのような背景から、再生医療が開発され、有効性がランダム化・前向き試験で多数報告されてきており、我が国でも先進医療や保険診療として受けることができる。再生医療には遺伝子治療と細胞治療があり、遺伝子治療としては肝細胞増殖因子 (HGF) を発現するプラスミドを下肢筋肉細胞内に取り込ませる治療や線維芽細胞増殖因子 (FGF) 遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターを用いた治療があり、どちらも下肢切断率の改善効果までは見られないものの、安静時疼痛や潰瘍の改善効果を認めると報告されている (Shigematsu et al. Gene Ther 2010 / Yonemitsu et al. Mol Ther 2013)。細胞治療としては自家骨髄単核球細胞や CD34 陽性細胞を用いた治療があり、これらも安静時疼痛改善効果を認めるものの、下肢切断率については報告により評価が分かれており、さらに研究が進行中である (Kawamoto et al. Stem Cells 2009 / Kondo et al. Circ J 2018)。このように再生医療は、下肢の切断率の改善を除いては有効性が報告されているものの治療にかかる費用が高額であることは解決すべき重大な課題と認識されてきた。

低価格である治療の選択肢の一つとして、以前から電気刺激やパルス磁場による血管新生療法が国内外で研究されてきた。電気刺激やパルス磁場は HIF1 -CXCL12/VEGF シグナル経路を介した血管新生を促進し、下肢虚血、心筋梗塞の両者で有効であることが動物実験で証明されている (Li et al. Am J Transl Res 2015 / Peng et al. Circ J 2020) が、電気刺激は皮膚障害の懸念があり、パルス磁場は中枢神経系への影響があり、また大きな装置が必要であることなどの問題があり、臨床応用にはまだ至っていない。

ハイドロキシアパタイトは生体適合性に優れ、骨や歯の材料として最も頻繁に使用されている生体材料の一つである。また電氣的に中性であり、熱と電圧をかけることで常温で安定した荷電状態となり、これを分極ハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite electret, HAE) と呼ぶ。HAE は主に歯や骨において血管新生を伴う骨新生促進作用を有するとされている (Kobayashi, et al. J Biomed Mater Res A 2007)。しかし軟部組織に対する報告は少なく、ウサギの頸動脈の機能性血管内皮再生促進作用が報告されている (Nagai, et al. Life Sci 2008) 程度であり、虚血組織での効果は未だほとんど検討されていない。我々は以前に心筋梗塞モデルマウスに対する HAE の有効性を報告したが、同様の効果が下肢虚血モデルマウスで得られるか確認することが本研究の目的である。下肢虚血に関して HAE の有効性は今まで検討されておらず本研究は独自性を持つといえる。また、心筋梗塞と異なり下肢虚血では局所注射が容易であることから、本研究結果で有効性が示されれば臨床応用研究につなげて、再生医療が必要な患者に低価格の治療を提供できる可能性を持つ。

2. 研究の目的

本研究では、下肢虚血における HAE の局所注射の有効性の検証を行い、さらにその分子機構を解明することで、現在の下肢虚血治療の課題を克服すべく安価な治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、下肢虚血モデルマウスにおける HAE の局所注射の血管新生効果および救肢率改善効果を検討するため、次の実験を行う。10-12 週令の BALB/cAJ マウスを対象とし、麻酔下で片側大腿動脈および浅大腿動脈、深大腿動脈を結紮・切断して下肢虚血モデルマウスを作成する。直後に虚血領域の下肢 4 カ所に対して、PBS (Control 群)、1 μ g/ μ L の HAE (HAE-1 群)、3 μ g/ μ L の HAE (HAE-3 群) あるいは 10 μ g/ μ L の HAE (HAE-10 群) を注射し、レーザー血流計での血流評価、トレッドミルによる運動能の評価および血管新生に関連する遺伝子発現の定量的 PCR 検査を行った。

4. 研究成果

4 - 1. 視覚的評価

図 2 で示す通り、Control 群では下腿脱落が 3/6 (50%) 見られたのに対し、HAE-1 群で 1/6 (17%)、HAE-3、HAE-10 群では見られなかった。また、壊死なしは Control 群で 1/6 (17%)、HAE-1 群で 4/6 (67%)、HAE-3 群で 2/6 (33%)、HAE-10 群で 5/6 (83%) と HAE 投与にて濃度に関わらず壊死が少ない傾向が見られた。

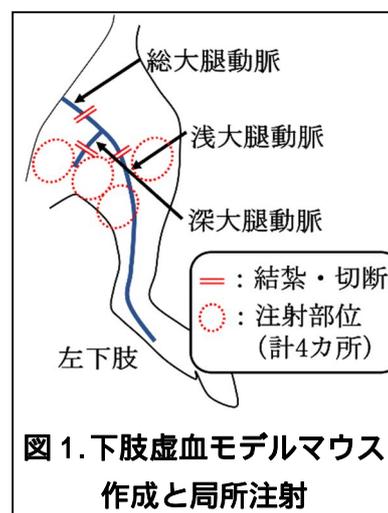


図 1. 下肢虚血モデルマウス作成と局所注射

4 - 2 . 運動能

術後 14 時点でトレッドミルでの運動能評価を行った(図 3A)。トレッドミル検査にあたっては、検査 5 日前より毎日 10 分ずつ慣らし歩行を行った。

トレッドミル検査では、Control 群が最も短い総走行距離を示し、次いで HAE-1 群、HAE-3 群、HAE-10 群の順であった(図 3B)。

4 - 3 . レーザー血流計

術前、術直後、術後 3,7,10 日にレーザードップラー血流計による大腿部の血流評価を行った(図 4A)。

術後 14 日時点のレーザードップラー値が PBS 群に比べて HAE-3 群および HAE-10 群で有意に高かった(それぞれ $p=0.03$ 、 $p<0.01$)。

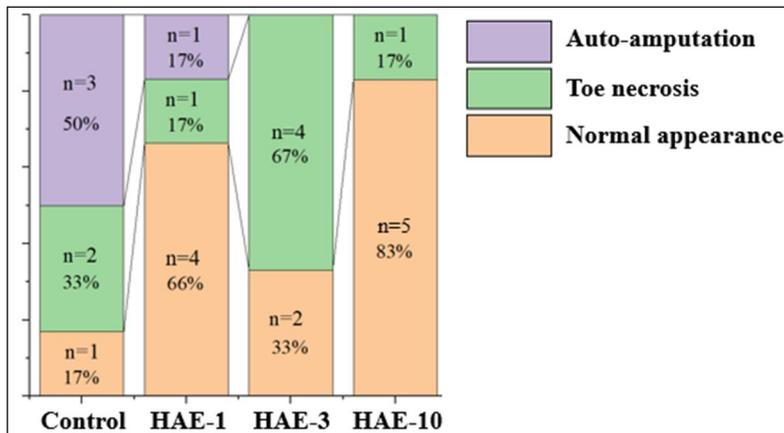


図 2. 術後 14 日時点での視覚的評価

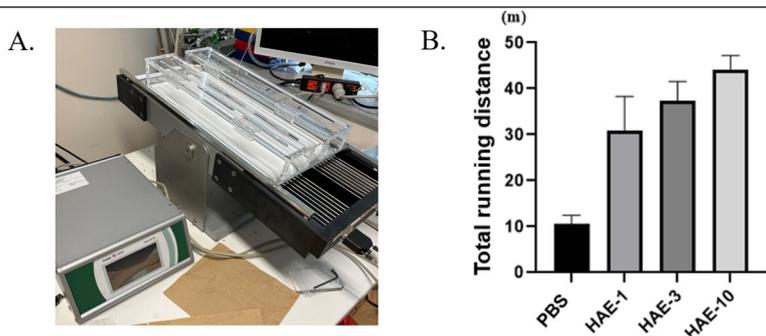


図 3. トレッドミル機器(A) と術後 14 日時点での走行距離(B).

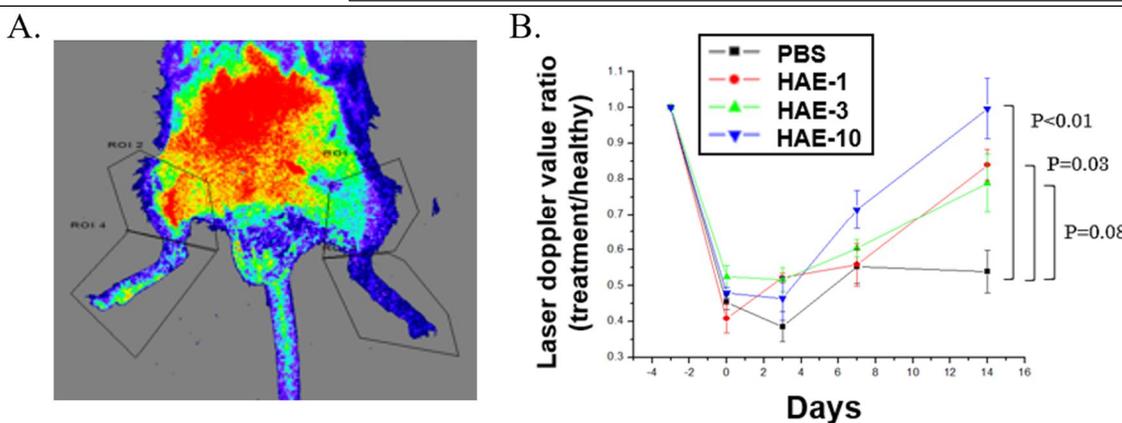


図 4. (A). 術後 1 日のコントロール群のレーザードプラ血流の代表的画像。

(B). レーザードップラー値の推移 (術前、術後 0, 3, 7, 14 日後).

4 - 4 . 定量的 PCR 結果

次に、大腿部の組織を採取し、血管新生に關与する *Vegf*、*Hif1a*、および *Cxcl12* について定量的 PCR 検査を行った。我々の以前の心筋梗塞での検討と異なり、*Vegf*、*Hif1a*、および *Cxcl12* の発現レベルは、各群間で有意な差は見られなかった(図 5)。

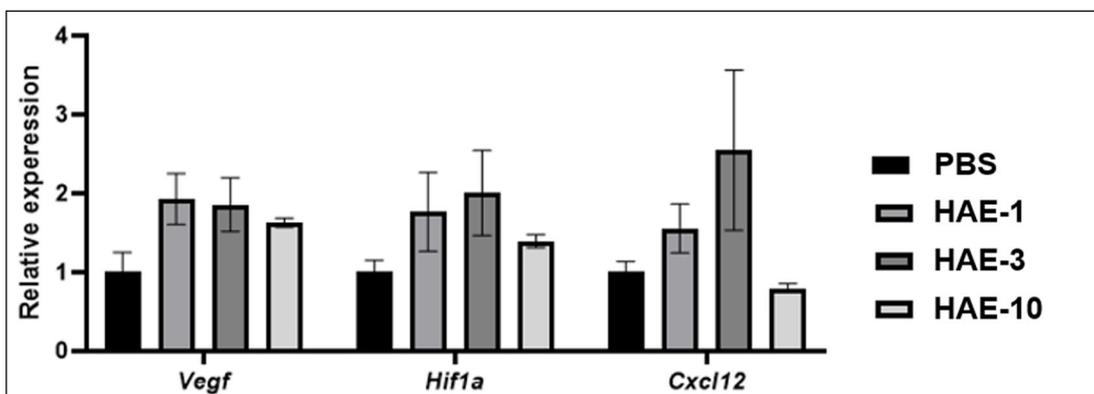


図 5. 術後 14 日の大腿部組織の定量的 PCR 結果

4 - 5 . 結果のまとめ

本研究では下肢虚血急性期における HAE の局所注射の効果を検討した。その結果、視覚的所見・運動能・血流評価において HAE 局所注射にて温存される所見が見られた。HAE は非常に安価に作成が可能であり、今後下肢虚血の治療として医療費を抑制しつつ多くの患者に活用できる可能性があり、更なる発展が期待される。

しかしながら、今回の検討ではその分子機構については不明なままであり、今後さらなる検討が必要である。また、HAE 以外の生体親和性の高い荷電を持つ粒子も骨再生領域で開発されてきており、今後他の材料についての検討も必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 The effect of half-normal saline irrigation on lesion characteristics in temperature-flow-controlled ablation. | 4. 巻 0 |
| 2. 論文標題 Ikenouchi T, Takigawa M, Goya M, Yamaguchi J, Martin CA, Yamamoto T, Negishi M, Kawamura I, Goto K, Shigeta T, Nishimura T, Takamiya T, Tao S, Miyazaki S, Sasano T | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of interventional cardiac electrophysiology : an international journal of arrhythmias and pacing | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10840-023-01678-7 | 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Effect of reference electrode on intracardiac electrograms: Close indifferent electrode vs Wilson central terminal. | 4. 巻 0 |
| 2. 論文標題 Yamamoto T, Takigawa M, Shigeta T, Martin CA, Yamaguchi J, Amemiya M, Ikenouchi T, Negishi M, Kawamura I, Goto K, Nishimura T, Takamiya T, Tao S, Miyazaki S, Goya M, Sasano T | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Heart rhythm | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrthm.2024.03.002 | 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Impact of baseline pool impedance on lesion metrics and steam pops in catheter ablation. | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Takigawa M, Yamamoto T, Amemiya M, Martin CA, Ikenouchi T, Yamaguchi J, Negishi M, Goto K, Shigeta T, Nishimura T, Tao S, Miyazaki S, Goya M, Sasano T | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of cardiovascular electrophysiology | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jce.15964 | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Safety verification of a novel irrigation catheter with flexible tip of laser-cut kerfs and contact force sensor. | 4. 巻 46 |
| 2. 論文標題 Yamaguchi J, Takigawa M, Goya M, Yamamoto T, Ikenouchi T, Iwakawa H, Negishi M, Goto K, Shigeta T, Nishimura T, Takamiya T, Tao S, Miyazaki S, Sasano T | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Pacing and clinical electrophysiology : PACE | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pace.14868 | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Superiority of the Combination of Input and Output Parameters to the Single Parameter for Lesion Size Estimation. | 4. 巻 87 |
| 2. 論文標題 Iwakawa H, Takigawa M, Yamaguchi J, Martin CA, Goya M, Yamamoto T, Amemiya M, Ikenouchi T, Negishi M, Kawamura I, Goto K, Shigeta T, Nishimura T, Takamiya T, Tao S, Miyazaki S, Watanabe H, Sasano T | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society | 6. 最初と最後の頁 0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-23-0574 | 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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Junji Yamaguchi, Kensuke Ihara, Kosuke Nozaki, Akiko Nagai, Tetsuo Sasano |
| 2. 発表標題 Local injection of Hydroxyapatite electret for hind limb ischemia. |
| 3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Design & Engineering by Joint Inverse Innovation for Materials Architecture (DEJI2MA-3) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Junji Yamaguchi, Masateru Takigawa, Tasuku Yamamoto, Takashi Ikenouchi, Kentaro Goto, Takatoshi Shigeta, Takuro Nishimura, Susumu Tao, Shinsuke Miyazaki, Masahiko Goya, and Tetsuo Sasano |
| 2. 発表標題 In vivo Lesion Characteristics of Single vs. Double Radiofrequency Applications of Very High-power and Short-duration Ablation |
| 3. 学会等名 The 88th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (JCS2023) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 倉田 農、山口 純司、松沢 優、柿沼 晴、井原 健介、範 沁濤、魏 来、 NYO ZIN LEI MON、川尻 紘平、新田 義一、中釜 瞬、岩宮 賢、前嶋 康浩、笹野 哲郎 |
| 2. 発表標題 酸化ストレス負荷下において心筋細胞より放出される細胞外小胞の持つ脂肪分化調整機構について |
| 3. 学会等名 第270回 日本循環器学会関東甲信越地方会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 倉田農、山口純司、井原健介、松沢優、柿沼晴、笹野哲郎 |
| 2. 発表標題 酸化ストレス負荷心筋細胞由来の細胞外小胞による脂肪分化抑制効果 |
| 3. 学会等名 第27回日本心不全学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
| | |