

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462360

研究課題名(和文)再生医療における血管新生に及ぼす血管プレコンディショニング効果の検討

研究課題名(英文)Is angiogenesis in regenerative medicine influenced by vascular preconditioning?

研究代表者

川人 伸次(KAWAHITO, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・特任教授

研究者番号：60284296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療における血管新生が周術期の血管プレコンディショニング(低酸素プレコンディショニングとリモートプレコンディショニング)に影響されるかどうかを基礎研究(in vitro & in vivo)と臨床研究を組み合わせ、様々な角度から検討した。動物実験と臨床研究により、血管プレコンディショニングの血管新生に及ぼす影響は少ないことがわかった。基礎実験により、FBS刺激により細胞遊走は増加したが、血管プレコンディショニングの細胞遊走に及ぼす影響は少ないことがわかった。血管新生に及ぼす血管プレコンディショニングの影響が解明されることにより、周術期管理法の新たな指標となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the influence of vascular preconditioning (hypoxic and remote preconditioning) on angiogenesis in animal experiments, clinical studies, and basic experiments using cultured cells. Animal experiments and clinical studies revealed the effect on angiogenesis of vascular preconditioning should be less. Basic experiments using cultured cells indicated endothelial cell migration was significantly stimulated with FBS (2% fetal bovine serum), however, vascular preconditioning did not show any significant enhancing or suppression effects on endothelial cell migration. It is hoped that a new indicator of the perioperative administration is established by the influence of vascular preconditioning which gives it to angiogenesis being elucidated.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 血管新生 周術期管理法 血管プレコンディショニング

### 1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学や分子発生学などの生命科学の進歩により、組織の発生が解明されるようになり、障害された臓器の再生が実現可能になりつつある。とりわけ血管新生は、再生医学の分野で大きな進歩を遂げ、臨床応用の段階に至った再生医療の一つである。

従来成人における血管新生は、既存の内皮細胞の増殖と遊走によるもののみであると理解されてきたが、成人の末梢血には骨髄から動員された血管内皮前駆細胞が存在し生後の血管新生に寄与することが最近明らかにされた。さらに骨髄に存在する多能性幹細胞が心筋細胞や内皮細胞に分化することが報告され、これらの幹細胞を用いた再生医療が循環器領域に応用されつつある。本邦では世界に先駆けて、閉塞性動脈硬化症やパーズジャー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生の有効性が発表され、この治療は再生医療としては初めて高度先進医療の保険適応を受けることになった。当院でも、2004年9月より単核球細胞移植を開始した。さらに最近では、虚血性心疾患に対する骨髄単核球細胞移植による血管新生療法の有効性が動物モデルとともに臨床的にも報告されるようになり、重症狭心症や虚血性心筋症の治療に新たな展開が期待されるに至っている。このように、心血管系における再生医療は基礎的研究が飛躍的に臨床へと応用されつつある。一方、血管新生促進は両刃の剣であり、悪性腫瘍の成長も促進する可能性がある。糖尿病性網膜症や悪性腫瘍治療の分野では、異常血管新生を抑制し腫瘍の縮小を図る抗血管新生療法が進んでいる。血管新生制御は現在最も重要な研究課題である。

申請者らは【研究費】平成20～22年度 科学研究費基盤研究C「再生医療における血管新生は麻酔薬及び周術期管理法に影響されるのか？」川人伸次(代表)、北畑 洋(分担)、大下修造(分担)。平成20年度270万円、平成21年度50万円、平成22年度50万円の補助を受け、各種麻酔薬及び周術期に使用される薬剤の影響を検討した。さらに【研究費】平成23～25年度 科学研究費基盤研究C「再生医療における血管新生は周術期管理法に影響されるのか？ 高血糖の影響」川人伸次(代表)、北畑 洋(分担)、松久宗英(分担)、高石和美(分担)。平成23年度310万円、平成24年度60万円、平成25年度50万円の補助を受け、血管新生に及ぼす周術期急性高血糖の影響を検討した。

一方、近年、低酸素刺激による単核球細胞の作用増強や血管機能保護(低酸素プレコンディショニング)や虚血刺激の他の部位での血管機能増強・保護作用(リモートプレコンディショニング)の報告がなされ、血管プレコンディショニングの概念が生まれた。しかしながら、周術期の急性血管プレコンディショニングの効果はまだ十分検討されてい

ない。周術期の急性血管新生制御のための血管プレコンディショニング効果の検討は国際的に評価の高いものとなりうると考え、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

血管新生に及ぼす周術期の急性血管プレコンディショニング(低酸素プレコンディショニングとリモートプレコンディショニング)効果を検討するために、ヒト培養細胞を用いた *in vitro* 研究、ラット *in vivo* モデルを用いた研究、手術中の血流遮断操作による VEGF の変動を調べる臨床研究の3種類の研究を企画した。

### 3. 研究の方法

本研究(計画)の特色は、血管新生に及ぼす周術期急性血管プレコンディショニング(低酸素プレコンディショニングとリモートプレコンディショニング)の影響を基礎研究と臨床研究を組み合わせ、様々な手法を用いて検討する点にある。まず、ヒト培養細胞を用いて低酸素刺激が細胞遊走と血管内皮細胞増殖に対する影響を評価した *in vitro* 実験、次に大動脈遮断、上肢や下肢の血流遮断を伴う手術において周術期の VEGF の変動を確認した臨床研究を行い、最後にラット *in vivo* 虚血モデルを用いて VEGF 放出を immunoassay で評価した。

#### < *in vitro* 基礎実験 >

ヒト培養細胞を用いた *in vitro* 実験を行い、低酸素刺激が細胞遊走と血管内皮細胞増殖に対する影響を評価した。コントロール群と低酸素群で、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells)を37度5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養し、BD BioCoar 血管新生システムを使用し、培養22時間後に遊走した細胞を蛍光試薬 Calcein AM で標識した後、蛍光度を測定した。細胞遊走はウシ胎児血清(FBS: Fetal Bovine Serum)を含まない培地(Negative Control)と2%FBSを含む培地(Positive Control)で比較した。また、HUVECを96穴プレートに1500 cells/wellの濃度で培養し、発色試薬 WST-8 試薬(同仁堂)を使用し、吸光度を測定することにより、0, 36, 72 時間後の細胞増殖能を測定した。

#### < 臨床研究 >

研究内容を説明し同意の得られた成人予定手術患者を対象とした。血流遮断を伴わない下腹部手術患者を対象とするコントロール群と腹部大動脈瘤手術、人工膝関節置換術等を対象とする血流遮断群で検討した。麻酔前投薬は投与せず、プロポフォル、レミフェンタニルにて麻酔導入、麻酔維持は酸素・空気・セボフルランにて行った。気管挿管・人工呼吸下に管理し、筋弛緩薬は通常量使用した。モニターは通常手術に準じ、静脈ライン、動脈ラインを確保した。麻酔導入前に採血し、以後手術中は1時間毎に手術終了時

で採血した。血流遮断群は血流遮断前後の採血も行った。VEGF enzyme-linked immunosorbent assay kit で VEGF を測定した。各群における血中 VEGF 濃度を時間ごとにプロットし、ANOVA で統計処理した。

< in vivo 動物実験 >

ラット虚血（全身・上肢下肢）モデルを作成し、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の変化を観察した。オスの Wister 系ラット (250-300 g) を吸入麻酔薬（セボフルラン）により麻酔導入・維持し、気管切開、人工呼吸管理下に大腿動静脈よりカニューレシオンし、輸液ルート、動脈圧測定・採血用とした。コントロール群は通常の酸素投与下に正常酸素分圧 (PaO<sub>2</sub> 80 mmHg 以上) を 12 時間維持した。低酸素群は血行動態を記録しながら全身性の低酸素負荷 (PaO<sub>2</sub> 50mmHg 以下) または上肢・下肢の 60 分の血流遮断を行い、12 時間麻酔維持した。2 時間毎に採血し、VEGF enzyme-linked immunosorbent assay kit を用いマイクロプレートリーダーで VEGF を測定した。

#### 4. 研究成果

< in vitro 基礎実験 >

コントロール群と低酸素群では、いずれも FBS 刺激により、細胞遊走は増加した。しかし、両群で有意な差は認められなかった。細胞増殖に関しても両群で、72 時間後の吸光度に有意な差は認められなかった。

< 臨床研究 >

臨床研究において、血流遮断群では遮断前後で血圧変動を中心に有意な呼吸・循環動態の変動が認められた。しかし、VEGF 濃度の変化に関しては、コントロール群と血流遮断群での群間比較、また群内比較においても有意な差は認められなかった。

< in vivo 動物実験 >

動物実験においても、血流遮断群では遮断前後で血圧変動を中心に有意な呼吸・循環動態の変動が認められた。特に、上肢虚血よりも下肢虚血の影響が大きかった。しかし、VEGF 濃度の変化に関しては、コントロール群と血流遮断群での群間比較、また群内比較においても有意な差は認められなかった。

< まとめ >

二十一世紀を迎え、再生医学は最先端領域の研究として高い注目を集めている。これまで再生されることはない教科書的に断定されていた神経細胞や骨格筋細胞あるいは心筋細胞についても、再生能の可能性が示され、これまで夢物語であった難治性疾患の治療に一筋の光明が導かれてきた感がある。近年の細胞核移植などの細胞工学や遺伝子解析技術の進歩によって、1997 年にはドリーに代表される哺乳類のクローン動物の誕生、1998 年のヒト胚性幹細胞(ES 細胞)株の樹立、この数年間に骨髄単核細胞による各種臓器の再生治療の試みなどが相次いでなされ、再生医学は二十一世紀初頭からの最も注目さ

れる領域になっている。

また、血管プレコンディショニングは近年の血管機能研究におけるトピックであるが、いまだ血管新生に対する明確な効果・管理方針は示されていないのが現状である。申請者らの研究グループは有効な周術期の血管機能保護、血管新生制御法の確立を目指して研究を続けてきた。今回は、周術期の急性血管新生制御のための血管プレコンディショニング効果を様々な角度から研究した。しかしながら、動物実験・臨床研究・培養細胞を用いた基礎実験により、血管プレコンディショニング(低酸素プレコンディショニングとリモートプレコンディショニング)の血管新生に及ぼす影響は少ないことがわかった。

現在手術操作による血流遮断・虚血・低酸素刺激は手術術式等のみにより選択されており、血管新生に及ぼす影響といった観点からは考慮されていない。極端に言えば、細胞移植、バイパス手術をはじめとする血管新生促進を目的とした手術・術後管理と血管新生抑制を図りたい糖尿病性網膜症や悪性腫瘍の手術・術後管理が同じ方針で行われている。血管新生に及ぼす血管プレコンディショニングの影響が解明されることにより、周術期の血管保護・血管新生制御の新たな指標となることが期待される。

#### 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 13 件)

Mita N, Kawahito S, Soga T, Takaishi K, Kitahata H, Matsuhisa M, Shimada M, Kinoshita H, Tsutsumi YM, Tanaka K: Strict blood glucose control by an artificial endocrine pancreas during hepatectomy may prevent postoperative acute kidney injury. J Artif Organs 20: 76-83, 2017 査読有

Mita N, Kawahito S, Soga T, Katayama T, Wakamatsu N, Kawahara T, Kakuta N, Hamaguchi E, Tsutsumi YM, Tanaka K, Takaishi K, Kitahata H: Anesthetic management of a patient with unruptured sinus of Valsalva aneurysm with right ventricular outflow tract obstruction. Circ Cont 37: 195-198, 2016 査読有

Hamaguchi E, Tsutsumi YM, Kume K, Sakai Y, Kakuta N, Uemura Y, Kawahito S, Tanaka K: General anesthesia of a Japanese infant with Barber-Say syndrome: a case report. JA Clinical Report 2: 11, 2016 査読有

Kawano H, Ohshita N, Katome K, Kadota T, Kinoshita M, Matsuoka Y, Tsutsumi YM, Kawahito S, Tanaka K, Oshita S: Effects

of a novel methods of anesthesia combining propofol and volatile anesthesia on the incidence of postoperative nausea and vomiting in patients undergoing laparoscopic gynecological surgery. *Braz J Anesthesiol* 66: 12-18, 2016 査読有  
Kakuta N, Kawahito S, Mita N, Soga T, Katayama T, Fukuta K, Kawano H, Tada F, Tsutsumi YM, Tanaka K, Takaishi K, Kitahata H: Role of transesophageal echocardiography during biventricular pacemaker implantation in children. *Clin Pediatr Anesth* 21: 182-185, 2015 査読有  
Kambe N, Kawahito S, Mita N, Takaishi K, Katayama T, Sakai Y, Soga T, Kawano H, Matsuhisa M, Shimada M, Kitagawa T, Kitahata H: Impact of newly developed, next-generation artificial endocrine pancreas. *J Med Invest* 62: 41-44, 2015 査読有  
Kakuta N, Kawahito S, Soga T, Mita N, Fukuda K, Wakamatsu N, sakai Y, Katayama T, Tada F, Takaishi K, Kitahata H: Role of intraoperative single-plane transesophageal echocardiography probe for infants with congenital heart disease. *Clin Pediatr Anesth* 20: 231-235, 2014 査読有  
Ito T, Azma T, Ogawa S, Kinoshita H, Kawahito S, Matsumoto N: Flow cytometric analysis for shedding of procoagulant particles provoked by calcium influx through the cell membrane in human monocytic cells. *Exp Clin Cardiol* 20: 1862-1885, 2014 査読有  
Hirose K, Kawahito S, Mita N, Takaishi K, Kawahara T, Soga T, Katayama T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Shimada M, Matsuhisa M, Kitahata H: Usefulness of artificial endocrine pancreas during resection of insulinoma. *J Med Invest* 61: 421-425, 2014 査読有  
Sakai Y, Kawahito S, Takaishi K, Mita N, Kinoshita H, Hatakeyama N, Azma T, Nakaya Y, Kitahata H: Propofol-induced relaxation of rat aorta is altered by aging. *J Med Invest* 61: 278-284, 2014 査読有  
Takaishi K, Kawahito S, Tomioka S, Eguchi S, Kitahata H: Cuffed oropharyngeal airway for difficult airway management. *Anesth Prog* 61: 107-110, 2014 査読有  
Azma T, Tuluc F, Ito T, Aoyama-Mani C, Kawahito S, Kinoshita H: Mechanisms of action of anesthetics for the

modulation of perioperative thrombosis: evidence for immune mechanisms from basic and clinical studies. *Curr Pharm Des* 20: 5779-5793, 2014 査読有

Kawahito S, Nakahata K, Azma T, Kuroda Y, Cook DJ, Kinoshita H: Protective effects of anesthetics on vascular function related to K<sup>+</sup> channels. *Curr Pharm Des* 20: 5727-5737, 2014 査読有

[学会発表](計 8 件)

Satomi S, Kawahito S, Soga T, Mita N, Kakuta N, Hamaguchi E, Takaishi K, Kitahata H, Tsutsumi YM, Tanaka K: Accuracy and reliability of continuous blood glucose monitoring during pediatric cardiopulmonary bypass, American Society of Anesthesiologists (ASA) Annual Meeting, Chicago, USA, Oct.25, 2016

Mita N, Kawahito S, Soga T, Tanaka K, Takaishi K, Kitahata H: Blood glucose control by artificial endocrine pancreas during hepatectomy prevents postoperative acute kidney injury, American Society of Anesthesiologists (ASA) Annual Meeting, San Diego, USA, Oct.27, 2015

Kitahata H, Tsutsumi Y, Aoyama T, Takaishi K, Kawahito S, Tanaka K: Role of sirtuins in cardioprotection by ischemic and anesthetic preconditioning, European Society of Anesthesiology (ESA) Annual Meeting, Berlin, Germany, June.1, 2015

Takaishi K, Kawahito S, Soga T, Otsuka R, Tsutsumi Y, Kitahata H: Effects of beta-3 adrenergic stimulation on nitric oxide production in myocardial cells of neonatal rats, European Society of Anesthesiology (ESA) Annual Meeting, Berlin, Germany, May.31, 2015

Takaishi K, Kawahito S, Mita N, Aoyama T, Otsuka R, Kitahata H: The effects of intravenous anesthetics on cell migration using cultured human umbilical vein endothelial cells, International Anesthesia research Society (IARS) Annual Meeting and International Science Symposium, Honolulu, Hawaii, March.22, 2015

Takaishi K, Kawahito S, Aoyama T, Otsuka R, Mita N, Eguchi S, Tomioka S, Kitahata H: The effects of ketamine on the release of vascular endothelial growth factor and in vitro capillary tube formation, The 7<sup>th</sup> Annual Meeting of the Federation of Asian Dental Anesthesiology Societies, 日本歯科大

学新潟生命歯学部（新潟県、新潟市），  
Oct.11, 2014

Mita N, Kawahito S, Kawahara T, Kume K, Higashijima S, Sakai Y, Katayama T, Takaishi K, Kitahata H: Usefulness of continuous blood glucose monitoring and control for patients undergoing total pancreatectomy, American Society of Anesthesiologists (ASA) Annual Meeting, New Orleans, USA, Oct.13, 2014

Mita N, Kawahito S, Kawahara T, Kume K, Higashijima S, Sakai Y, Katayama T, Takaishi K, Kitahata H: Is the continuous interstitial subcutaneous fluid glucose monitoring system useful for intraoperative glucose management, American Society of Anesthesiologists (ASA) Annual Meeting, New Orleans, USA, Oct.13, 2014

〔図書〕(計 3 件)

曾我朋宏、川人伸次：血糖管理，286 (110-113)，川名 信、蔵谷紀文(編)エビデンスで読み解く小児麻酔，克誠堂出版，東京，2016

北畑 洋、川人伸次：プラダー・ウイリー症候群，680 (623)，高崎真弓、河本昌志、木内恵子、白神豪太郎、萩平 哲(編)，まれな疾患の麻酔 A to Z，文光堂，東京，2015

箕田直治、川人伸次：レイノー症候群、レイノー病，680 (145)，高崎真弓、河本昌志、木内恵子、白神豪太郎、萩平 哲(編)，まれな疾患の麻酔 A to Z，文光堂，東京，2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

川人 伸次 (KAWAHITO, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任教授

研究者番号：60284296

(2)研究分担者

北畑 洋 (KITAHATA, Hiroshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：60161486

松久 宗英 (MATSUHISA, Munehide)

徳島大学・先端酵素学研究所・特任教授

研究者番号：60362737

高石 和美 (TAKAISHI, Kazumi)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：20325286