

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390245

研究課題名（和文） 次世代型血管新生療法の開発を目的とした側副血行路発達メカニズムの分子病理的検討

研究課題名（英文） Molecular pathological analyses of collateral augmentation for a development of novel angiogenic therapy

研究代表者

宮田 哲郎 (MIYATA TETSUROU)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70190791

研究成果の概要（和文）：

本研究では、まずラビット虚血肢モデルを独自の手法で検討することにより、虚血肢の尾骨大腿筋に分布する後臀動脈の末梢が、細動脈ネットワークの状態から側副血行路に発達して行く過程を分子病理学的に明らかにした。これに基づき、塩基性線維芽細胞増殖因子や骨髄単核球をラビット虚血肢の尾骨大腿筋に選択的にデリバリーする実証実験を行い、血管新生療法において効果的な側副血行路発達を達成するには、デリバリーターゲットの選択が重要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we first assessed a process of collateral augmentation in the rabbit model of limb ischemia. After an excision of the left femoral artery, main route of collateral vessels was developed between the left inferior gluteal artery and the left popliteal artery, which was located in the left coccygeo-femoral muscle. Based on the findings, we selectively administrated basic fibroblast growth factor (bFGF) or bone marrow mononuclear cells (MN) to the left coccygeo-femoral muscle or the left adductor muscle at 28 days after femoral artery removal. At 28 days after administration of bFGF or MN, limb ischemia after the delivery to the coccygeo-femoral muscle were significantly improved as compared with those to the adductor muscle, suggesting that selection of delivery target was an important factor to promote effective collateral augmentation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学・再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 側副血行路の発達誘導は血管新生療法における重要な作用機序のひとつである

血管新生を促すことによって虚血部への

血流を改善する血管新生療法は、慢性虚血肢に対する新しい治療法として注目を集めている。末梢動脈は、その機能により血管床の一部を構成する”end-artery”型の細い動

脈と、そこへ血液供給する導管の役割を果たす”conduit artery”型の太い動脈の二種類に大別できる。慢性四肢虚血の主因疾患である閉塞性動脈硬化症では、このうち”conduit artery”型の太い動脈が主に侵され、虚血組織内の血管網は比較的に保たれることが知られている。したがって、この病態を改善するには、虚血組織内の血管網に対して血流を供給する新たな道筋である側副血行路を発達させることが必要となる。

(2) 側副血行路発達のメカニズムには不明の点が多い

生体は本来、虚血に対する防御機構として側副血行路を発達させるメカニズムを有している。そして、側副血行路の雛形は、細い動脈の連絡網として様々な形で生体内に用意されていることが知られている。この細い動脈の連絡網を側副血行路に発達させるのが、血管の拡大・成熟を促すarteriogenesisと呼ばれる血管新生の一形式である。血管新生療法では、発達不十分な側副血行路に対してさらにarteriogenesisを促進し、十分に機能する側副血行路に発達させることが求められる。Arteriogenesisは、血管壁への「ずり応力」の上昇がトリガーとなり、マクロファージの遊走とそれに続く様々な生理活性物質の放出により誘導されると考えられているが、未だ全容は解明されていないの現状である。

(3) 発達途上の側副血行路に直接アプローチできる研究技法の保持

側副血行路発達のメカニズムに不明の点が多い理由としては、発達段階にある側副血行路に直接アプローチできる研究技法が一般化していないことがあげられる。しかし、応募者らは、血管新生療法の研究を通じ、ラビット虚血肢モデルにおいてほぼ必ず側副血行路に発達する内腸骨動脈の枝があることを経験的に知っており、予備検討の結果、この動脈は尾骨大腿筋を貫く後臀動脈であり、容易にサンプリングが可能であることを明らかにしていた。この知見を生かせば、発達途上の側副血行路の任意の部位に任意のタイミングで再現性良くアプローチすることが可能となるため、側副血行路研究の強力な武器になると考え本研究を計画した。

2. 研究の目的

申請時における目的は、以下の4点であった。

(1) 発達途上の側副血行路の生物学的特性を明らかにする (in vivo 研究)

ラビットの大腿動脈を切除して下肢慢性虚血状態を作成した後、後臀動脈が側副血行路に発達していく経過を、全長にわたって経時的に組織学的な検討を加え、側副血行路発達の特性を明らかにする。また、側副血行路発達とhypoxiaとの関連を検討するため、側副血行路発達の舞台である尾骨大腿筋におけるhypoxiaの程度と分布を解明する。

(2) さまざまなレベルの低酸素状態における血管関連細胞の動態を解明する (in vitro 研究)

尾骨大腿筋で観察された様々なレベルのhypoxia環境下でマクロファージや血管平滑筋などを培養し、形態学的観察や分子生物学的検討によりその動態の変化を検討する。

(3) 側副血行路の発達メカニズムを分子病理学的に検討する (in vivo 研究)

1、2の結果を参考にして、側副血行路の部位や発達段階ごとに、生理活性物質や増殖因子などの発現パターンやシグナル伝達などの特性を明らかにし、in vivoでの側副血行路発達のメカニズム解明に資する。

(4) 側副血行路発達を合理的に促進する方法の開発 (in vivo 研究)

3で得られた結果をもとに、側副血行路を効果的に発達させる方法を考案し、その実証実験をラビットモデルにおいて実施する。

3. 研究の方法

(1) 発達途上の側副血行路の生物学的特性

ラビットにおいて、内腸骨動脈の枝である後臀動脈は尾骨大腿筋のメジャーな栄養血管であり、膝窩動脈から尾骨大腿筋に分布するマイナーな枝と細動脈レベルでネットワークを形成している。慢性虚血肢状態になると、この細動脈のネットワークを中心にarteriogenesisの機転がはたらい側副血行路に発達する。

① 発達途上にある側副血行路の経時的な組織学的検討

ラビット慢性虚血肢モデルの側副血行路である後臀動脈の経時変化を、複数の観察ポイントを定めて組織学的に検討した。発達途上の側副血行路と一口に言っても、その部位により口径差による「ずり応力」のかかり方は異なるし、周囲のhypoxiaの状況も異なるはずである。従って、発達する側副血行路において複数の観察ポイントを定めて、その部分でどのような組織学的変化がおきているのかを調べる必要があると考えた。タイムポイントとしては、虚血作成前、作成後2、7、

14 日とした。また内容としては、HE 染色による通常の観察に加え、各種細胞マーカーに対する免疫染色によるマクロファージ等炎症細胞集積の分析、抗 Ki-67 染色による増殖機転の発生の有無を検討した。

②発達途上にある側副血行路の周囲における hypoxia 環境測定

前項でも触れたが、発達途上の側副血行路は部位によって様々なレベルの hypoxia にさらされていることが予想された。どの程度の hypoxia かは明確にしておく必要があるため、虚血作成後の尾骨大腿筋の様々な部分における組織酸素分圧を経時的に測定した。組織酸素分圧測定には、針型プローブによる組織酸素分圧測定装置を用いた。

(2) さまざまなレベルの低酸素状態における血管関連細胞の動態

前項 (1) ②でのラビット尾骨大腿筋の組織酸素分圧測定の結果、筋内の部位や虚血作成からの時間経過によって様々なレベルの hypoxia 環境が誘導されることが明らかになった場合、それぞれのレベルの hypoxia により細胞成分がどのような影響を受けるのかを in vitro で検討することとしていた。組織酸素分圧測定によって得られた様々な酸素分圧に対応した酸素濃度で、arteriogenesis において中心的な役割をはたすと考えられるマクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞を培養し、増殖因子の発現やプロテアーゼ活性の変化を調べる予定であった。

(3) 側副血行路の発達メカニズムを分子病理学的検討

ラビット慢性虚血肢モデル作成後、2、7、14 日に虚血側の尾骨大腿筋を採取し、その全長を前項 (1) ①で得られた所見を参考にして、中枢から末梢に向かい 4 分割し、それぞれについて分子病理学的な検討を加えた。まずサンプル組織片の免疫染色により MCP-1 発現と bFGF レセプター発現を検討した。また、組織片のホモジネート溶解液を用いて、ELISA 法により VEGF 発現を、ヘパリンビーズを用いた濃縮サンプルのウェスタンブロットにより bFGF 発現を、免疫沈降サンプルのウェスタンブロットにより FGF レセプターの発現を検討した。

(4) 側副血行路を合理的に促進する方法の開発

前項 (1) ①と (3) の結果から、ラビット慢性虚血肢モデルにおいては、後臀動脈の分布する尾骨大腿筋に arteriogenesis を促すものをデリバリーすれば、症状の改善につながる側副血行路を合理的に発達させられることが示唆された。逆に言えば、同じ大腿部に位置していても尾骨大腿筋以外の筋に

デリバリーした場合には、効率的な側副血行路の発達は見込めないことが見込まれる。Arteriogenesis を促すものとしては、bFGF タンパクまたは骨髄単核球をデリバリーする実験計画を立てた。

① bFGF タンパクの選択的デリバリー実験

日本白色ラビット (オス、3kg) の左大腿動脈を全切除して 28 日間おくことにより慢性虚血肢を作成する。尾骨大腿筋の位置は、臀部を剃毛することにより皮膚から透見することができる。尾骨大腿筋の位置を特定した後、その中心線に沿って等間隔に 3 か所マーキングした。bFGF タンパク (フィブラスト、科研製薬) は、100 μ g を PBS 1ml に溶解した (FGF 溶液)。実験群としては次の 3 群を設定した。なお、左大内転筋は、尾骨大腿筋と同じく大腿部の主要な筋である。

B-FGF 群: 尾骨大腿筋マーキング部に FGF 溶液を筋注し、左大内転筋 3 か所に PBS 1ml を筋注。

D-FGF 群: 尾骨大腿筋マーキング部に PBS 1ml を筋注し、左大内転筋 3 か所に FGF 溶液を筋注。

PBS 群: 尾骨大腿筋マーキング部及び大内転筋 3 か所に PBS を 1ml ずつ筋注。

筋注後 28 日目に、下腿血圧比、左内腸骨動脈血流量測定 (安静時及びパパペリン投与後)、左内腸骨動脈選択的動脈造影を実施した。動脈造影の所見は、アンギオグラフィックスコアを用いて定量化した。同様の実験を他のラビットで実施し筋注後 2 日目と 7 日目に尾骨大腿筋を回収し、免疫組織学的検討で Ki-67 陽性細胞密度、MCP-1 陽性細胞密度、FGF レセプター陽性血管密度を測定した。また、筋組織の溶解液から抗 FGF レセプター抗体を用いた免疫沈降法で、FGF レセプターの発現とリン酸化を検討した。

② 骨髄単核球の選択的デリバリー実験

左大腿動脈を切除して 28 日間おくことにより慢性虚血肢を作成したラビットを用いて以下の 3 つの実験群を作成した。骨髄単核球は、腸骨から採取し PBS に浮遊させたものを用いた (単核球液)。

B-MN 群: 尾骨大腿筋マーキング部に単核球液を筋注し、左大内転筋 3 か所に PBS 1ml を筋注。

D-MN 群: 尾骨大腿筋マーキング部に PBS 1ml を筋注し、左大内転筋 3 か所に単核球液を筋注。

PBS 群: 尾骨大腿筋マーキング部及び大内転筋 3 か所に PBS を 1ml ずつ筋注。

筋注後 28 日目に、下腿血圧比、左内腸骨動脈血流量測定、左内腸骨動脈選択的動脈造影を上記と同様に実施した。

4. 研究成果

研究成果には未発表のものが含まれているため結果の概要のみ記載する。

(1) 側副血行路発達の生物学的特性に関する検討

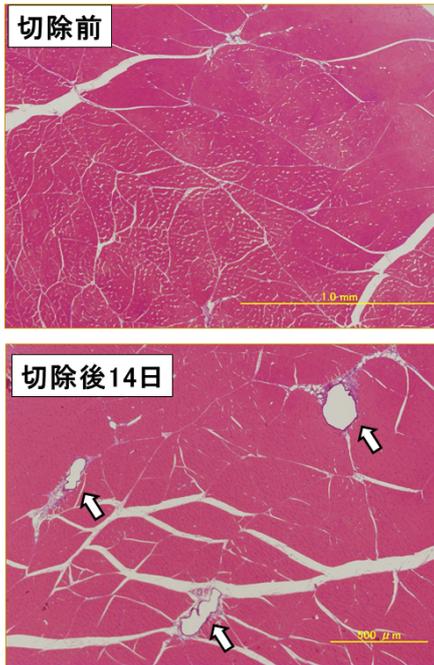
① 発達途上にある側副血行路の経時的な組織学的検討

大腿動脈を切除後2日目には後臀動脈周囲に炎症細胞浸潤が認められ、表面マーカーの検討からマクロファージよりはリンパ球がメインであることが明らかになった。ラットを用いた従来の研究ではマクロファージの浸潤がメインであるとの発表があり、種により浸潤する炎症細胞が異なる可能性が示唆された。また7日目において後臀動脈壁の内膜及び中膜でKi-67陽性細胞の増加を認め、arteriogenesis 機転の誘導による活発な細胞増殖が惹起されていることが示された。動脈径に関しては、有意な拡大を14日目より認めた。動脈径の拡大は、尾骨大腿筋をその長軸沿いに四分割したうちの中枢側から3番目の筋サンプルに多く認められた(図1)。

図1

ラビット慢性虚血モデルにおける側副血行路の発達[HE染色]

切除後14日目では、筋間に細動脈の拡大(矢印)が認められる。



これは後臀動脈の末梢と膝窩動脈末梢が細動脈レベルでネットワークを形成しているエリアに相当し、側副血行路の発達をダイレクトに示す所見と考えられる。これらより、リンパ球をメインとした炎症細胞浸潤→動脈壁細胞の細胞増殖→動脈径の拡大といった順番で側副血行路の発達が進むことが明

らかになった。

② 発達途上にある側副血行路の周囲におけるhypoxia環境測定

モデル作成後における後臀動脈周囲筋組織の酸素分圧を測定した。しかし、骨格筋組織の酸素分圧は、健常肢の筋肉においても予想以上に低値(約5%)であり、慢性虚血状態にすることによってやや低下するものの大きな低下を認めることができなかった。この結果は、研究担当者にとって想定外のものであったが、側副血行路発達において経路周囲におけるhypoxiaの関与は少ないと考えざるを得ないと判断した。したがって、項目(2)の研究の実施は断念することとした。

(2) さまざまなレベルの低酸素状態における血管関連細胞の動態解明

項目(1)②の結果を受けて実施せず。

(3) 側副血行路発達メカニズムの分子病理学的検討

大腿動脈を切除後2日目及び7日目の尾骨大腿筋を採取し、筋の長軸沿いに四分割してそれぞれのサンプルを検討した。項目(1)①の結果において四分割した尾骨大腿筋のうち中枢側から3番目の筋サンプルで側副血行路の発達が最も強く、また本検討でもこのサンプルにおいて最も有意な所見が得られたため、以下にはこのサンプルによる結果を示す。

大腿動脈切除後2日目の病理組織所見においてMCP-1陽性細胞数の増加、FGFレセプター1陽性血管密度の有意な増加を認めた。またタンパク発現としてbFGF、VEGFの発現増加も認められた。切除後7日目には、これらの所見は鎮静化した。以上より、項目(1)①で示した結果とあわせると、側副血行路の発達には次のようなメカニズムを想定することができる。

Step-1: 大腿動脈切除により血流の迂回路である後臀動脈末梢の周囲に炎症性細胞が浸潤する。炎症性細胞の浸潤にはMCP-1が関与しそうである。

Step-2: 浸潤した炎症細胞よりbFGFやVEGFなどの血管新生因子が放出され、且つ細動脈におけるFGFレセプターの発現が誘導される。

Step-3: Arteriogenesis機転が誘導され、細胞脈が成長・成熟し側副血行路へと発達する。

(4) 側副血行路を合理的に促進する方法の開発

① bFGF タンパクの選択的デリバリー実験

筋注後28日目での評価では、下腿血圧比、左内腸骨動脈血流量測定(安静時及びパパペリン投与後)、左内腸骨動脈選択的動脈造影から算出したアンギオグラフィックスコアのすべてにおいてB-FGF群はD-FGF群と比べ

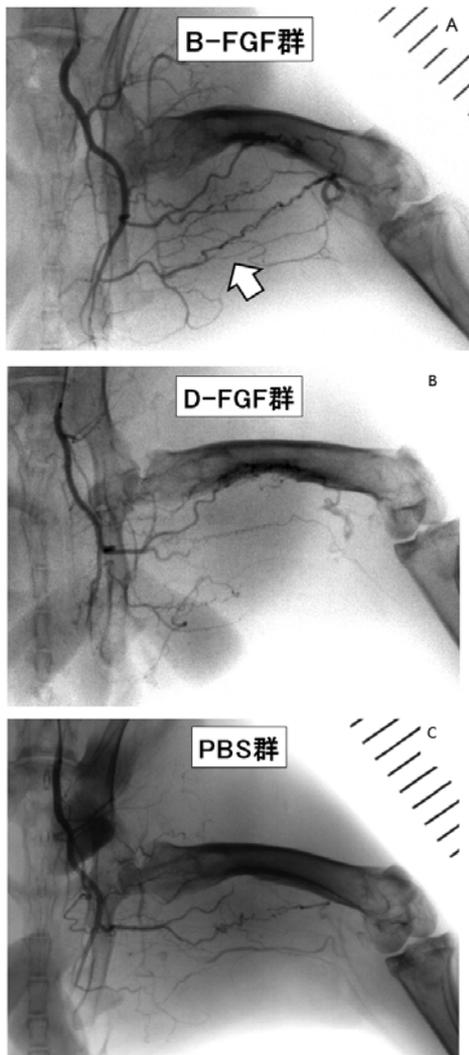
有意な改善を得た（図2）。また下腿血圧比と安静時内腸骨動脈血流量では、D-FGF 群はPBS 群より有意に高値であった。一方、筋注後2日目における尾骨大腿筋の組織学的検討では、Ki-67 陽性細胞密度、MCP-1 陽性細胞密度、FGF レセプター陽性血管密度のすべてでB-FGF 群はD-FGF 群と比べて有意に高値であったが、D-FGF 群とPBS 群の間には有意な変化は認められなかった。筋組織溶解液を用いた検討では、これも筋注後2日目において、B-FGF 群で他群と比較し明らかなFGF レセプターの発現上昇とリン酸化を認めた。

これらの結果より、同じ大腿部に位置する主要筋肉であっても、尾骨大腿筋にデリバリーした場合に著明な治療効果が得られ、大内転筋へのデリバリーによる効果は限定的で

図2 bFGFタンパクの選択的デリバリー実験

投与後28日目の左内腸骨動脈選択的動脈造影

B-FGF群は、D-FGF群やPBS群と比べ明らかに側副血行路(矢印)が発達している。



②骨髄単核球の選択的デリバリー実験

筋注後28日目の下腿血圧比、左内腸骨動脈血流量測定（安静時及びパパペリン投与後）、左内腸骨動脈選択的動脈造影の検討では、B-MN 群はD-MN 群と比べ有意な改善を得た。また、下腿血圧比とアンギオグラフィックスコアにおいてD-MN 群はPBS 群より有意に高値であった。結果的には、骨髄単核球デリバリーでもbFGF デリバリーと同様に、尾骨大腿筋へのデリバリーが最も治療効果があることが示された。

以上の二実験により、効果的に側副血行路を発達させるには、治療物質のデリバリーターゲットの選択が重要であることが示唆された。従来の血管新生療法の開発研究においては、デリバリーする治療物質やデリバリーのためのキャリアの研究がメインであり、本研究のようなデリバリーターゲットの選択に注目した研究は少なかった。従って、本研究で得られた知見は、より効果的な血管新生療法を開発するための新たな切り口を提供するものといえよう。より治療効果に優れた血管新生療法開発は、重傷虚血肢患者のQOLや生命予後の劇的な改善に直結するためその意義は極めて高い。

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6件）すべて査読あり

1. Nakayama A, Miyata T(3/9), et al, Predictors of mortality after emergency or elective repair of abdominal aortic aneurysm in a Japanese population. Heart and Vessels, 2012, 10.1007/s00380-012-0319-5
2. Nakayama A, Miyata T(3/12), et al, Inverse association between the existence of coronary artery disease and progression of abdominal aortic aneurysm. Atherosclerosis. 222: 2012, 278-83, 10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.031
3. Kagaya H, Koyama H, Miyata T(9/9), et al, Impact of polyplex micelles installed with cyclic RGD peptide as ligand on gene

- delivery to vascular lesions. *Gene Therapy*. 19: 2012, 61-69, 2012. 10.1038/gt.2011.74.
4. Nagayoshi M, Koyama H, Miyata T(5/6), et al, Enhanced Neovascular Formation in a Novel Hydrogel Matrix Consisting of Citric Acid and Collagen. *Annals of Vascular Diseases*. 4: 2011, 196-203, 10.3400/avd.oa.11.00017
 5. Shigematsu H, Miyata T(5/12), et al. Transfection of human HGF plasmid DNA improves limb salvage in Buerger's disease patients with critical limb ischemia. *International Angiology*, 30: 2011, 140-149, <http://www.minervamedica.it/en/journals/international-angiology/article.php?cod=R34Y2011N02A0140>
 6. Hoshina K, Miyata T(6/6), et al. A retrospective study of intravascular ultrasound use in patients undergoing endovascular aneurysm repair: its usefulness and a description of the procedure. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 40: 2010, 559-563, 10.1016/j.ejvs.2010.07.018

[学会発表] (計 3 件)

1. Koyama H, Selective and Sustained Delivery of bFGF for the Development of Collateral Vessels The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery, July, 2, 2010 Kyoto, Japan
2. 西山綾子, 宮田哲郎ら, 浅大腿動脈閉塞時の側副血行路の解剖学的検討, 第 52 回 日本脈管学会総会, 2011 年 10 月 20 日, 岐阜県岐阜市
3. 根本 卓, 宮田哲郎ら, 自家単核球細胞を用いた血管新生療法におけるデリバリー・ターゲットの重要性, 第 12 回 日本

再生医療学会総会, 2013 年 3 月 23 日, 神奈川県横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 哲郎 (MIYATA TETSUROU)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70190791

(2) 研究分担者

重松 邦広 (SHIGEMATSU KUNIHIRO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20215966

岡本 博之 (OKAMOTO HIROYUKI)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号: 60348266

保科 克行 (HOSHINA KATSUYUKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90571761

小山 博之 (KOYAMA HIROYUKI)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 10241994