

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592292

研究課題名(和文)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－

研究課題名(英文)Is angiogenesis in regenerative medicine influenced by perioperative management methods? -effect of hyperglycemia-

研究代表者

川人 伸次(KAWAHITO, Shinji)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：60284296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生に及ぼす周術期管理法、特に血糖管理の影響を培養細胞を用いた基礎実験、動物実験、臨床研究において検討した。動物実験と臨床研究により、急性高血糖の血管新生に及ぼす影響は少ないこと、培養細胞を用いた基礎実験により、急性高血糖は血管新生を抑制する可能性もあることがわかった。血管新生に及ぼす血糖管理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 perioperative management methods, especially glycemic control on angiogenesis in animal experiments, clinical studies, and basic experiments using cultured cells. Animal experiments and clinical studies revealed the effect on angiogenesis of acute hyperglycemia should be less, however, basic experiments using cultured cells indicated hyperglycemia tended to inhibit angiogenesis. It is hoped that a new indicator of the perioperative administration is established by the influence of glycemic control which gives it to angiogenesis being elucidated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：再生医療 血管新生 周術期管理法 血糖管理

1. 研究開始当初の背景

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。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。

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。我々は【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。

一方、近年、短時間の周術期管理法が術後短期の合併症軽減のみならず、長期予後を左右するという驚くべき研究報告が相次いでいる。その中で、患者の長期予後に大きな影響を及ぼす因子の一つに周術期の血糖管理がある。2001年にVan den BergheらがICUでの厳格な血糖コントロールが長期予後を大きく左右するという報告(Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al.: Intensive insulin therapy in critically ill patients. N Engl J Med 345:1359-1367, 2001.)は、周術期の血糖管理方針に関して大きな転換をもたらした。

周術期の強化インスリン療法は周術期医学におけるトピックであるが、いまだ明確な管理方針は示されていないのが現状である。NICE SUGARの報告(The NICE-SUGAR Study Investigators: Intensive versus

conventional glucose control in critically ill patients. N Engl J Med 360:1283-1297, 2009)以来、さらに混乱は続いている。申請者らの研究グループは術中の強化インスリン療法の確立を目指して研究を続け成果を上げてきた実績があり、また現在は血糖連続モニター・自動制御システム(人工膵臓)を用いてより簡便・安全な周術期の血糖管理法を研究中である。急性高血糖の血管新生に及ぼす影響と最適な周術期血糖管理法の確立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管理法、特に血糖管理の影響に焦点を当て、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、長時間手術中に血糖管理法の違いによるVEGFの変動を調べる臨床研究の3種類の研究を企画した。

現在手術時の血糖管理方針は患者の状態、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。本研究の最終目的は、血管新生に及ぼす急性高血糖の影響を解明することにより、周術期の血糖管理方針の新たな指標を作成することである。

3. 研究の方法

本研究の特色は、周術期の高血糖が血管新生に及ぼす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、正常ヒト皮膚繊維芽細胞と臍帯静脈血管内皮細胞から構成された血管新生キットを用いたin vitro実験、次にラットin vivo高血糖モデルを用いてVEGF放出をimmunoassayで評価する。最後に臨床研究において従来の血糖管理法群と血糖連続モニター・自動制御システム(人工膵臓)を用いた強化インスリン療法群を設定し、周術期のVEGFの変動を確認した。

<ヒト培養細胞を用いたin vitro実験>

ヒト培養細胞を用いて血糖値の違いによる管腔形成初期段階として枝分かれした管腔ネットワークの差を直接観察し定量評価した。

正常血糖環境モデル

細胞培養: 正常ヒト皮膚繊維芽細胞と臍帯静脈血管内皮細胞から構成された血管新生キット(クラボウ バイオメディカル社製)を用いた。各ウェル中で両細胞を最適濃度で共培養し、正常血糖環境モデル(血糖値150mg/dl以下)を作成した。10日間培養し、管腔形成初期段階として枝分かれした管腔ネットワークを形成させ、血管新生観察・定量

システム（倒立型顕微鏡、顕微鏡デジタルカメラ、制御・解析用パソコン、血管新生定量ソフトウェアから構成される）（新規購入）を用いてネットワークを観察した。血管新生の抑制または亢進作用は形成された管腔を管腔染色キットで染色し、スコアリング用グリッドレンズでスコアリングして管腔形成の差として確認し、正常血糖環境と高血糖環境で比較した。また、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）存在あるいは非存在下の血管新生に与える静脈麻酔薬（プロポフォール、ミダゾラム）の影響も検討した。

高血糖環境モデル

細胞培養：正常ヒト皮膚繊維芽細胞と臍帯静脈血管内皮細胞から構成された血管新生キット（クラボウ バイオメディカル社製）を用いた。各ウェル中で両細胞を最適濃度で共培養し、高血糖環境モデル（血糖値 300 mg/dl 以上）を作成し、以下、正常血糖環境モデルと同様に行った。

<ラットを用いた in vivo 実験>

ラット高血糖モデルを作成し、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の変化を観察した。

正常血糖値群

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ーションし、輸液ルート、動脈圧測定・採血用とした。人工呼吸器・麻酔装置（平成 20～22 年度：基盤研究(C)の研究費で購入）を使用し、血行動態を記録しながらブドウ糖負荷せず、必要に応じインスリン投与し、正常血糖（血糖値 150 mg/dl 以下）を 12 時間維持した。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（平成 20 年度～22 年度：基盤研究(C)の研究費で購入）で VEGF を測定した。12 時間測定後にラットを安楽死させた。

高血糖値群

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、正常血糖値群と同様に気管切開、人工呼吸管理下に大腿動静脈よりカニューレーションし、輸液ルート、動脈圧測定・採血用とした。血行動態を記録しながらブドウ糖負荷し、高血糖（血糖値 300 mg/dl 以上）を 12 時間維持した。以下、正常血糖値群と同様に行い、12 時間までの血中 VEGF 濃度をプロットし、ANOVA で統計処理した。

<臨床研究>

これまでの in vitro, in vivo の実験結果を、臨床で確認した。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、手術侵襲、手術時間がほぼ一定で呼吸・循環の変動が少ない下腹部手術（手術時間 5-6 時間予定）を選択した。

従来療法群

麻酔前投薬は投与せず、propofol, remifentanyl 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、術後は ICU 入室時、翌日朝に採血した。血糖値 150-200 mg/dl を目標に 30-60 分ごとに血糖値測定し、インスリンを用手投与した。VEGF enzyme-linked immunosorbent assay kit で VEGF を測定した。

強化インスリン療法群

麻酔前投薬は投与せず、propofol, remifentanyl 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。人工臓腑（血糖連続モニター・自動制御システム：日機装社製）を用いて血糖値 100-150 mg/dl を維持し、以下、従来療法群と同様に行った。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。

<統計>

結果は平均値±標準偏差値で示し、分散分析及び post-hoc test (Scheffe test) を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

<ヒト培養細胞を用いた in vitro 実験>

正常血糖環境モデルにおいて、プロポフォール（10, 50 μ M）培養 3 日および 10 日後の新生血管の管腔面積、管腔長、管腔交差点数、細管本数に影響を与えなかった。50 μ M ミダゾラムは、VEGF 存在下の培養 3, 10 日後の血管新生を全ての項目で有意に抑制した。一方、VEGF 非存在下では、50 μ M ミダゾラムは培養 3 日後の管腔面積、管腔長、細管本数を有意に促進したが、培養 10 日後には影響を与えなかった。1, 10 μ M ミダゾラムは血管新生のほとんどの項目に影響を与えなかった。血糖値 300 mg/dl 以上の高血糖環境モデルにおいては、正常血糖環境モデルに比べて血管新生を抑制する傾向が示された。

<ラットを用いた in vivo 実験>

正常血糖値群と高血糖値群で体温、呼吸・循環動態に有意な変化はなかった。正常血糖値群は血糖値 150 mg/dl 以下、高血糖値群は血糖値 300 mg/dl 以上に維持できた。両群間で VEGF 測定値に有意な変化はなかった。

<臨床研究>

従来療法群と強化インスリン療法群で、体温、呼吸・循環動態に有意な変化はなかった。従来療法群はインスリン用手投与により血糖値 150-200 mg/dl に維持された。強化インスリン療法群は人工臓腑を用いた術中管理法を確立し、血糖値 100-150 mg/dl に維持することが可能となった。両群間で VEGF 測定値に有意な変化はなかった。

<まとめ>

平成 20～22 年度：基盤研究(C)の in vitro 研究においては放出された VEGF を測定して

血管新生効果を評価した。今回は正常ヒト皮膚繊維芽細胞と臍帯静脈血管内皮細胞から構成された血管新生キットを用いて各ウェル中で両細胞を最適濃度で 10 日間培養し、管腔形成初期段階として枝分かれした管腔ネットワークを形成させ、血管新生観察・定量システムを用いてネットワークを直接観察した。血管新生の抑制または亢進作用は形成された管腔を管腔染色キットで染色し、スコアリング用グリッドレンズでスコアリングして管腔形成の差として確認する方法を確立した。この方法の確立により、血管新生効果を直接観察・定量評価できるようになった。

また、臨床研究においては人工臓器を用いた術中強化インスリン療法の技術を確立した。この周術期管理技術は血管新生研究のみならず、今後、様々な血管機能研究に応用できる可能性が示唆された。

In vitro 研究により、プリポフォールは血管新生に影響を与えないことが示唆された。高濃度ミダゾラムは血管新生を抑制する一方、VEGF 非存在下には早期の血管新生を促進する可能性が示唆された。また、低濃度ミダゾラムは in vitro 血管新生に影響を与えないことが示唆された。

In vitro 研究、in vivo 研究、臨床研究により周術期の急性高血糖が血管新生効果に及ぼす影響は少なく、やや抑制する可能性もあることが示唆された。血管新生制御の観点からも、周術期血糖管理の重要性が再検討される必要がある。今後は更に、低酸素刺激による血管プレコンディショニング効果や遠隔プレコンディショニング効果などが血管新生に及ぼす作用も検討する予定である。

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)

Takaishi K, Kawahito S, Tomioka S, Eguchi S, Kitahata H: J wave after induction of anaesthesia using propofol in a patient with early repolarization. *Anaesthesia* 69: 170-175, 2014 査読有

Hirose K, Hirose M, Tanaka K, Kawahito S, Tamaki T, Oshita S: Surgical indication and perioperative management of severe anorexia nervosa. *Br J Anaesth* 112: 246-254, 2014 査読有

Minonishi T, Kinoshita H, Hirayama M, Kawahito S, Azma T, Hatakeyama N, Fujiwara Y: The supine to prone postural change induces modification of endotracheal tube cuff pressure accompanied by the tube displacement. *J Clin Anesth* 23: 28-31, 2013 査読有

Takaishi K, Kawahito S, Kitahata H: Local anesthetics inhibit nitric oxide production and L-arginine uptake in cultured bovine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 704: 58-63, 2013 査読有

Okada T, Kawahito S, Mita N, Matsuhisa M, Kitahata H, Shimada M, Oshita S: Usefulness of continuous blood glucose monitoring and control for patients undergoing liver transplantation. *J Med Invest* 60: 205-212, 2013 査読有

Soga T, Kawahito S, Oi R, Kakuta N, Katayama T, Wakamatsu N, Takaishi K, Yamaguchi K, Izaki H, Kanayama H, Kitahata H, Oshita S: Recent less-invasive circulatory monitoring during renal transplantation. *J Med Invest* 60: 159-163, 2013 査読有

Kakuta N, Kawahito S, Mita N, Kambe N, Kasai A, Wakamatsu N, Katayama T, Soga T, Tada F, Kitaichi T, Kitagawa T, Kitahata H: Usefulness of central venous oxygen saturation monitoring during bidirectional Glenn shunt. *J Med Invest* 60: 272-275, 2013 査読有

Kawahito S, Higuchi S, Mita N, Kitagawa T, Kitahata H: Novel blood sampling method of an artificial endocrine pancreas via the cardiopulmonary bypass. *J Artif Organs* 16: 508-509, 2013 査読有

Hama-Tomioka K, Kinoshita H, Nakahata K, Kondo T, Azma T, Kawahito S, Hatakeyama N, Matsuda N: Role of neuronal nitric oxide synthase, oxidative stress and propofol in N-methyl-D-aspartate-induced dilation of cerebral arterioles. *Br J Anaesth* 108: 21-29, 2012 査読有

Kawano T, Yamazaki F, Chi H, Kawahito S, Eguchi S: Dexmedetomidine directly inhibits vascular ATP-sensitive potassium channels. *Life Sci* 90: 272-277, 2012 査読有

Kinoshita H, Matsuda N, Iranami H, Ogawa K, Hatakeyama N, Azma T, Kawahito S, Yamazaki M: Isoflurane pre-treatment preserves ATP-sensitive K⁺ channel function in the human artery exposed to oxidative stress caused by high glucose. *Anesth Analg* 115: 54-61, 2012 査読有

Kawahito S, Kawano T, Kitahata H, Oto J, Takahashi A, Takaishi K, Harada N, Nakagawa T, Kinoshita H, Azma T, Nakaya Y, Oshita S: Molecular mechanisms of the inhibitory effects of clonidine on vascular adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesth*

Analg 113: 1374-1380, 2011 査読有
Kawano H, Hamaguchi E, Kawahito S,
Tsumi YM, Tanaka K, Kitahata H,
Oshita S: Anaesthesia for a patient
with paraneoplastic limbic
encephalitis with ovarian teratoma:
relationship to anti-N-methyl-D-
aspartate receptor antibodies.
Anaesthesia 66: 515-518, 2011 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

Mita N, Kawahito S, Kakuta N, Kume K,
Takaishi K, Kitahata H: Continuous
blood glucose monitoring during
cardiopulmonary bypass for children,
American Society of Anesthesiologists
(ASA) Annual Meeting, San Francisco,
CA, USA, Oct.13, 2013

Mita N, Kawahito S, Kakuta N, Kume K,
Takaishi K, Kitahata H: Intraoperative
application of the artificial
endocrine pancreas, American Society
of Anesthesiologists (ASA) Annual
Meeting, San Francisco, CA, USA,
Oct.12, 2013

Takaishi K, Kawahito S, Mita N,
Tatsuishi T, Eguchi S, Kitahata H: The
effects of intravenous anesthetics on
in vitro angiogenesis and cell
proliferation, European Society of
Anesthesiology (ESA) Annual Meeting,
Barcelona, Spain, Jun.2, 2013

Mita N, Kawahito S, Takaishi K,
Kitahata H, Oshita S: Impact of the
newly developed, next-generation
artificial endocrine pancreas,
American Society of Anesthesiologists
(ASA) Annual Meeting, Washington DC,
USA, Oct.16, 2012

Takaishi K, Kawahito S, Nakamura D,
Tatsuishi T, Eguchi S, Kitahata H: The
effects of intravenous anesthetics on
the release of vascular endothelial
growth factor and angiogenesis,
European Society of Anesthesiology
(ESA) Annual Meeting, Paris, France,
Jun.10, 2012

Kawahito S, Kitahata H, Okada T, Hirose
K, Oshita S: Continuous blood glucose
monitoring and control for patients
undergoing hepatic resection,
American Society of Anesthesiologists
(ASA) Annual Meeting, Chicago, USA,
Oct.15, 2011

〔図書〕(計 4 件)

廣瀬佳代、川人伸次：III 心血管作動薬
の使用法，4. カルシウム拮抗薬，348
(160-169)，5. カリウムチャネル開口薬，
348 (170-178)，土田英昭（編），-For

Professional Anesthesiologists- 心血
管作動薬，克誠堂出版，東京，2013

川人伸次，島田光生，北畑 洋：肝移植
の血糖管理，271 (145-151)，花崎和弘
(編)臨床に役立つ最新 血糖管理マニ
アル，医学図書出版，東京，2012

Kitahata H, Kawahito S: Chapter 21.
Contrast Echo Method. In: Omoto R,
Konstadt S, Orihashi K (ed),
Transesophageal Echocardiography 2nd
Edition, 447 (354-369), Shindan-to-
Chiryō Sya, Tokyo, JAPAN, 2012

川人伸次，北畑 洋：第 1 章 基礎・準
備編 1. プローブの選択と安全な挿入
法 .147(12-18)，岡本浩嗣，外須美夫(編)
経食道心エコー 撮り方，診かたの基本
とコツ 改訂新版，羊土社，東京，2011

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/masui_totsu/ikyoku/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川人 伸次 (KAWAHITO, Shinji)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60284296

(2)研究分担者

北畑 洋 (KITAHATA, Hiroshi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：60161486

松久 宗英 (MATSUHISA, Munehide)

徳島大学・糖尿病臨床・研究開発センタ
ー・特任教授

研究者番号：60362737

高石 和美 (TAKAISHI, Kazumi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：20325286