

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10649

研究課題名(和文)音響性リポソームと超音波による血管新生療法の開発と最適な治療部位の解明

研究課題名(英文)Development of angiogenic therapy using acoustic liposomes and ultrasound and elucidation of optimal treatment site

研究代表者

高地 崇 (Kochi, Takashi)

東北医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：60770188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：急性虚血の壊死範囲を縮小することを目標とした場合には、膝窩動脈と伏在動脈の交通を遮断することで、中等度の壊死性変化を惹起するモデルが適しており、慢性虚血の末梢血流増加を目標とした場合には、大腿動脈の部分切除により、長期の末梢血流減少が得られつつ、壊死は小範囲にとどまるモデルが適していると考えられた。

また、側副路の局在から、治療実験における最適な介入部位は、動脈遮断部位よりも近位から、側副血流が主動脈に再流入するまでの区間の骨格筋であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症下肢虚血(CLI)に対する血管新生療法の開発が期待されている。CLIに対する血管新生療法の目標には、急性虚血による壊死の回避や、慢性虚血肢の末梢血流の増加などの目標が想定されるが、その開発にあたっては、それぞれの目標に応じた適切な動物モデルと治療介入部位の組み合わせが必要である。本研究により、急性虚血と慢性虚血などの異なる病態に準じた動物モデルの作製が可能であること、また、それぞれのモデルに適した治療介入部位が明らかになり、今後の重症下肢虚血に対する血管新生療法開発に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：From this study, it is suggested that when the goal is to reduce the necrosis area of acute ischemia, a model that causes moderate necrotic changes by blocking the communication between the popliteal artery and the saphenous artery is suitable. And when aiming to increase peripheral blood flow in chronic phase, a model in which necrosis remains in a small range while long-term peripheral blood flow reduction is obtained by partial resection of the femoral artery is suitable.

Also, from the localization of the collateral vessels, it became clear that the optimal intervention site in the treatment experiment is the skeletal muscle in the section from the region proximal to the arterial blockage site until the collateral blood flow re-enters the main artery.

研究分野：形成外科

キーワード：重症下肢虚血 血管新生療法

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、閉塞性動脈硬化症などによる末梢動脈疾患 (PAD)の患者は増加の一途をたどっている。特に壊疽や潰瘍などを合併する重症下肢虚血 (CLI) に対しては血行再建術が原則とされているが、手術不能例や再閉塞例も多く、本邦だけでも年間 3000 人以上が下肢切断を余儀なくされている。

これに対し、近年、手術不能症例にも対応可能な新しい治療法として血管新生療法が注目され、遺伝子治療や細胞療法、衝撃波療法などの研究が進められている。これまでの報告では、いずれの手法も一定の効果が示唆されているものの、動物モデルにおける急性期虚血からの回復や、一時的な末梢血流増加にとどまっており、臨床治験にまで歩を進めているものはわずかである。さらに、遺伝子治療や細胞療法については、ゲノム化や癌化などの潜在的なリスク、および倫理的な問題が、臨床応用に向かう際の大きな障壁となっている。

体内でマイクロバブルを破碎した際に生じる衝撃圧によって、血管増生が促されることが知られている。申請者らは圧電素子を面振動させた高次モードの超音波装置(特願 2006-109894、国際特許 PTC/JP2001/057878)を開発し、リン脂質二重膜で構成されるリポソームバブルを投与したのちに超音波を照射することで、期待する標的部位で効率的にバブルを破碎する手法を確立してきた。この手法は非侵襲的であるばかりではなく、全身への影響や癌化などのリスクを負うことなく、標的部位に繰り返し施行できるなど、多くの利点を有している。さらに、この手法は遺伝子導入や細胞集積、あるいは薬剤の効率的導入にも有用であることが明らかにされており、将来的にこれらの手法と組み合わせることも可能である。

リポソームは、リン脂質二重膜で構成された小胞であり、ドラッグデリバリーに応用されて、化学療法剤などと組み合わせて臨床用にも市販されている。これと八フッ化プロパン (C3F8) ガスを混ぜて超音波処理を施すと、二重膜の内腔に期待を取り込んだバブル (音響性リポソーム) が得られる (図 1)。マイクロバブルは超音波造影剤として知られ、臨床用に市販されているものもあるが、これらは総じて高価 (1~2 万円/vial) であることが、基礎研究が進みにくい状況の背景となっている。これに対し、我々が用いている音響性リポソームは、破碎による効果においては市販のマイクロバブルと同等でありながら、1ml あたり 100 円以下と非常に安価であり、基礎研究のみならず、将来的な臨床応用においても非常に有用であると思われる。

## 2. 研究の目的

慢性下肢虚血性疾患に対する非侵襲的な新しい治療法としての、マイクロバブルと超音波による血管新生療法の開発にむけて、実験に用いる動物モデルおよび実験デザインの最適化、および治療導入部位選択の指針の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

マウス下肢の栄養動脈 (前・後殿動脈、腸骨大腿動脈・深大腿動脈など) について選択的血管造影 CT を撮影し、各側副経路の局在および各血管領域の境界を明らかにする。また、異なる術式で作製した下肢虚血モデルに対しても選択的血管造影を行い、各側副経路の末梢循環に対する寄与度および制限部位を明らかにすることで、治療介入すべき部位を特定する。

## 4. 研究成果

我々が過去に明らかにしたマウス下肢血管解剖知見 (PLoS One. 2013 Dec 30;8(12):e84047.) に基づき、以下の 9 つの下肢虚血モデルを作製した。

モデル A: 外側大腿回旋動脈 (LCFA) 起始部の近位で大腿動脈を離断

モデル B: LCFA 起始部を含めて大腿動脈の一部を切除

モデル C: LCFA 起始部と近位後大腿動脈 (PCFA) 起始部との間で大腿動脈を離断

モデル D: PCFA および浅後腹壁動脈 (SCEA) の起始部を含めて大腿動脈の一部を切除

モデル E: SCEA 起始部と膝窩動脈 (PpA)・伏在動脈 (SA) 分岐部との間で大腿動脈を離断

モデル F: PpA・SA 分岐部を切除

モデル G: PpA・SA 分岐部の遠位で伏在動脈を離断

モデル H: PpA・SA 分岐部の遠位から SA の前/後枝分岐部直上までの SA を切除

モデル I: SCEA 起始部の遠位から SA の前/後枝分岐部直上までの大腿動脈および SA 切除

### (1) 虚血重症度評価

各モデルにおける、モデル作製後 2 週間までの肉眼的な虚血変化を評価した。評価の指標には Westvik score (Westvik TS. *et. al.* J Vasc Surg. 2009 Feb;49(2):464-73.) を用いた。

結果を表 1 に示す。

大腿動脈の離断もしくは部分切除をおこなったモデル A ~ E では、軽度の虚血性変化を認めたと著明な壊死は生じなかった。そのなかでも、大腿動脈の離断のみの群と部分切除した群とのあいだには有意差が検出された。また、伏在動脈に操作を加えたモデル F ~ I では、膝窩動脈の血流を温存したモデル G、H にはほとんど変化を認めなかったのに対し、膝窩動脈を閉塞したモデル F、I では壊死をとまなう虚血性変化が生じ、統計的有意差が検出された。

表 1

モデル		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Westvik score ↑	severe									
	1									1
	2									2
	3		1		1		3			1
	4	1	2	1	2					
	5	1		1			1			
	6	1	1		1	2			1	
mild										
7	1		2			2		3	3	
平均±SD		5.5±1.3	4.3±1.3	5.8±1.5	4.3±1.3	6.8±0.5	3.3±1.3	7.0±0.0	6.8±0.5	2.0±0.8

(2)慢性期末梢血流評価

モデル作製手術後の末梢血流経時変化では、膝窩動脈より近位で大腿動脈を遮断したモデルでは約 4 週間かけて回復したのに対し、膝窩動脈を温存したモデルでは術直後から末梢血流減少は観察されなかった。( ( 図 1 ) )

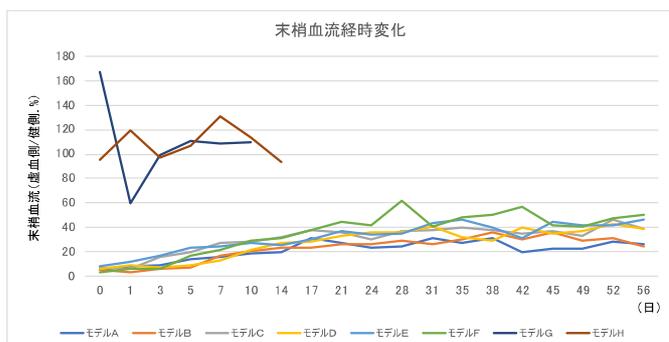


図 1

モデル作製手術後 4 週以降に安定した末梢血流減少状態が得られた 6 モデルについて、末梢血流量を計測して比較した。( 図 2 ) いずれのモデルも末梢血流は 30~50%程度に減少した状態で安定していたが、より近位で大腿動脈を処置したモデルの方が末梢血流が少ない傾向が見られた。大腿動脈を遮断したのみのモデルと、大腿動脈からの分岐を含めて部分切除したモデルとの間には明らかな差は見られなかった。

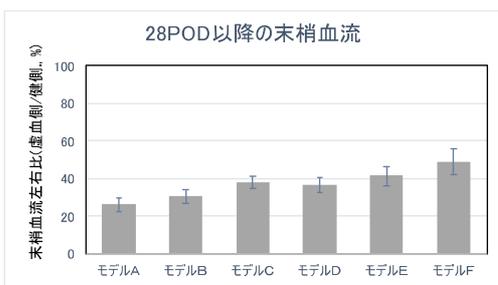


図 2

(3)血管密度変化部位の局在

造影 CT による血管密度計測の結果、側副路形成に伴う血管密度の変化は動脈遮断部位よりも近位から、側副路を経た血流が再度主幹動脈に流入する区間に生じ、その局在は大腿動脈およびその分岐の処理によって異なることが示された。( 図 3 )

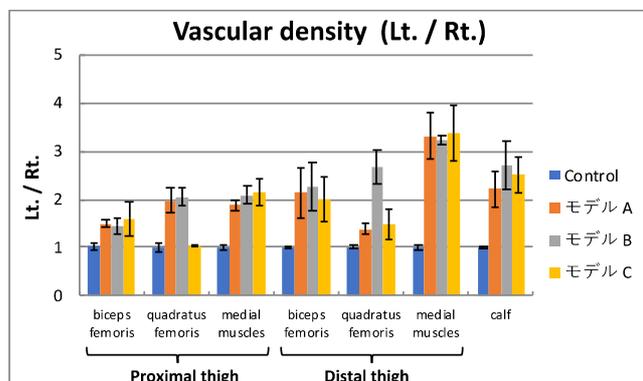


図 3

#### (4)結論

急性虚血の壊死範囲を縮小することを目標とした場合には、膝窩動脈と伏在動脈の交通を遮断することで、中等度の壊死性変化を惹起するモデルが適しており、慢性虚血の末梢血流増加を目標とした場合には、大腿動脈の部分切除により、長期の末梢血流減少が得られつつ、壊死は小範囲にとどまるモデルが適していると考えられた。

また、側副路の局在から、治療実験における最適な介入部位は、動脈遮断部位よりも近位から、側副血流が主動脈に再流入するまでの区間の骨格筋であることが明らかとなった。

本研究により、急性虚血と慢性虚血などの異なる病態に準じた動物モデルの作製が可能であること、また、それぞれのモデルに適した治療介入部位が明らかになり、今後の重症下肢虚血に対する血管新生療法開発に大きく寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 権太浩一、高地崇、館一史	4. 巻 10
2. 論文標題 皮膚腫瘍切除後欠損に対する人工真皮移植単独による再建において治癒日数に影響する因子の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 創傷	6. 最初と最後の頁 142-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11310/jsswc.10.142	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 館一史、中務秀一、竹中由衣、権太浩一、高地崇
2. 発表標題 Free StyleリブレProによる遊離皮弁移植後血流モニタリングの経験
3. 学会等名 日本マイクロサージャリー学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科 形成外科学分野 <a href="http://www.prs.med.tohoku.ac.jp/">http://www.prs.med.tohoku.ac.jp/</a>
--

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
研究分担者	今井 啓道  (Imai Yoshimichi)  (80323012)	東北大学・医学系研究科・准教授    (11301)	