

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19433

研究課題名(和文)サルコペニアが下肢虚血と血管新生療法に及ぼす影響とメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the influence and mechanism of sarcopenia on lower limb ischemia and angiogenesis therapy

研究代表者

佐々木 基起(sasaki, motoki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60725026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：独自の方法で作製したサルコペニアモデルマウスは、コントロールマウスと比較して有意に下肢重量の低下が認められ、また、下肢筋肉において肉眼的・組織的に有意な萎縮が認められた。作製したサルコペニアモデルマウスとコントロールマウスに下肢虚血を加え、レーザードップラーによる血流評価を行った。結果としてサルコペニアモデルマウスで有意に血流低下が認められた。そのメカニズム解明に関しては、引き続き検証が必要である。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia model mice produced by our own method showed significantly lowering of the weight of the lower limbs as compared with the control mice. Significant atrophy was observed macroscopically and microscopically in the lower limb muscle. Subsequently, limb ischemia was added to sarcopenia model mice and control mice. Blood flow evaluation by laser Doppler was performed for each mouse. As a result, there was a significant decrease in blood flow in the sarcopenia model mice as compared with the control mice. The mechanism of blood flow reduction in sarcopenia model mice is unknown, and further examination is required.

研究分野：心臓・血管内科

キーワード：サルコペニア 血管新生 下肢虚血

1. 研究開始当初の背景

末梢血管病（閉塞性動脈硬化症や閉塞性血栓性血管炎など）で虚血状態に陥った下肢組織は、血管新生などで形成された側副血行血管路からの血液供給によって救済が図られている。本研究グループは、従来の既存治療法では病状改善が認められない虚血性末梢血管病の重症虚血肢を救済すべく、「自家骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」の臨床試験を 2000 年に開始し、その効果と安全性についても報告 (Tateishi-Yuyama et al. Lancet 2002、Saito et al. Circ J 2007、Matoba et al. Am Heart J 2008、Arima et al. JACC 2010) してきた。しかし、その症例の中には効果不十分で肢切断に至った例も存在する。

血管新生療法は、移植細胞自身が宿主組織内で脈管となる過程と、移植細胞が宿主主導による血管新生を刺激する相乗過程で側副血行路を発達させる治療法である。移植投与する細胞自身の血管新生機能が動脈硬化危険因子の影響で低下していることが血管新生療法効果を不十分なものにしてている一要因と考える仮説検証研究は古くから数多く報告されているが、細胞を移植投与する下肢組織の環境悪化を一要因と考える仮説検証研究報告は少ない。

本研究グループは最近、虚血組織内に移植された細胞自身が周囲の劣悪な環境に耐えきれずにアポトーシス（細胞死）に陥っていることを報告 (Nakayoshi et al. PLoS One 2014) したが、さらに新たな仮説として「生き残った移植細胞は宿主主導の血管新生を補完するよう宿主細胞に働きかけているにもかかわらず、宿主側に起因する何らかの理由によって反映されていない」のではないかと考えている。

重症下肢虚血で下肢切断に至った患者は運動能力が低下し、疼痛や皮膚潰瘍などで日常行動が著しく制限される。十分な運動療法も

行えず、下肢骨格筋量の減少や骨格筋力の低下状態（サルコペニア）となっていることも少なくない。松原らは最近、サルコペニアが重症下肢虚血の予後因子の一つであることを報告している (J Vasc Surg 2015)。血管新生による側副血行路形成は、虚血下肢組織内の骨格筋細胞や周辺血管の内皮細胞や周皮細胞、集積した炎症細胞などが統合的に働き合うことで実行されており、骨格筋細胞から分泌されるサイトカインや血管内皮細胞の内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS)、同細胞から放出される一酸化窒素などが血管新生調節因子として役割を果たしている (Sasaki et al. Proc Natl Acad Sci USA 2006)。

サルコペニア組織環境内では、その統合的な血管新生への働きかけが十分に機能していないかもしれない。サルコペニアな組織環境が宿主主導の血管新生に障害をもたらすものならば、血管新生療法で移植投与された細胞が宿主主導の血管新生を刺激し、その補完を試みるために送り続けている様々な細胞シグナルを受理する宿主側の細胞機構にも悪影響を及ぼしている可能性がある。この仮説が正しければ、サルコペニア状態を何らかの方法で改善することが重症下肢虚血患者の予後を改善し、血管新生療法効果の増強にもつながると考えられる

2. 研究の目的

本研究の目的は、片側下肢サルコペニアマウスモデル作製後、その患側下肢に外科手術的虚血状態を加え、その後の組織環境や血管新生反応、関連するメカニズムについて検証することである。

3. 研究の方法

サルコペニアマウスモデルの作製と表現型の評価
市販のクッションテープを使用し、C57BL6 マ

ウスの片側下肢を4週間固定する。自力での餌・水分摂取が可能な範囲で下肢活動制限を行う。非サルコペニアマウス群（コントロール）群と4週間の活動制限サルコペニアマウス群で体重・下肢重量の変化、下肢骨格筋の断面積と外周半径の変化、HE染色などによる組織学的変化（画像解析ソフトで短軸方向の筋繊維断面積を計測）を定量評価する。

サルコペニアマウス下肢虚血モデルの作製と虚血肢の血管新生評価

サルコペニアモデルマウスの大腿動脈を全身麻酔下に外科的結紮切除し、片側下肢虚血モデルを作製し、虚血下肢の血管新生経過をレーザードプラー血流測定法、免疫学的組織染色による毛細血管密度測定法などを用いて定量評価する。

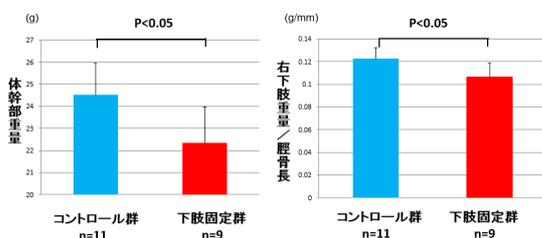
サルコペニアマウス下肢虚血組織から分泌される血管新生調節タンパク濃度評価採取した組織をLysis bufferでホモジネートし、その上清を実験用組織サンプルとする。そして血管新生にかかわる対象酵素やリン酸化酵素の発現をウエスタンブロット法で評価する。

4. 研究成果

【体幹部・下肢重量の比較】

4週間片側下肢(右)を固定し、その体幹部重量と右下肢の重量(右下肢はマウスの脛骨長さで補正)をそれぞれ、コントロールと比較したところ、下肢固定群で有意な低下を認められた。(図1)

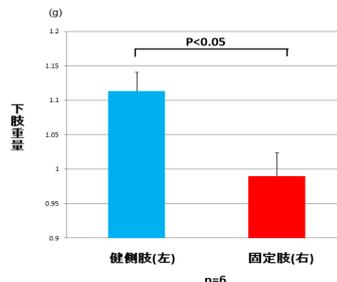
図1 体幹部・右下肢重量の比較



【固定したマウスの両下肢の重量比較】

4週間固定した足としてない足で重量比較し、固定した足で有意に重量低下を認めた。(図2)

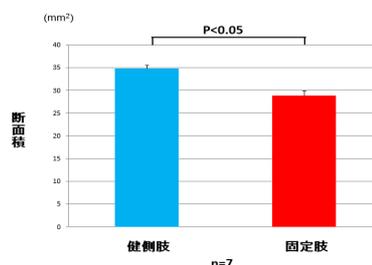
図2 固定4週間後の両下肢の比較



【下腿の断面積の測定】

両下腿を同レベルの高さで切断し、その断面の面積を比較した。固定肢で有意に低下が認められた。(図3)

図3 固定4週間後の下腿の断面積比較



【筋繊維組織面積比較】

採取した筋組織にシリウスレッド染色を行い、短軸部分の筋繊維の画像解析ソフトでエリア測定を行った。(図4)

総面積をコントロールと比較し、面積の有意な低下を認めた。(図5)

図4 下腿のシリウスレッド染色

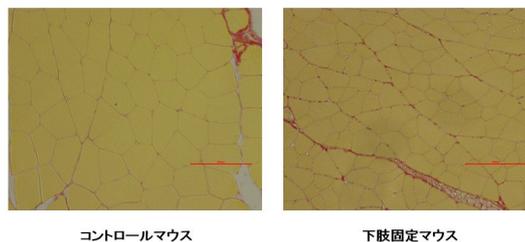
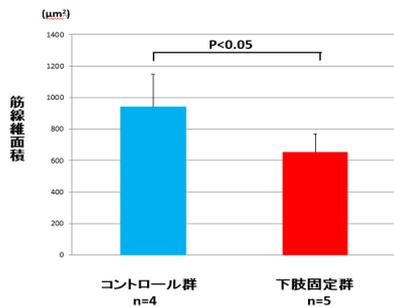


図5 筋繊維組織面積比較



【血液検査比較】

上記で作成したモデルをサルコペニアモデルとし、血液検査で肝・腎機能・総蛋白・アルブミンを測定し、コントロールと比較したところ、肝・腎機能に有意差はないが、総蛋白・アルブミンについては有意な低下がみられた。(図6・7・8)

結果からは栄養状態の低下が示唆された。

図6 肝機能(AST ALT)

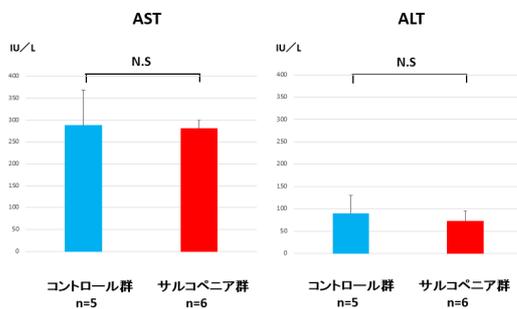


図7 腎機能(BUN Cr)

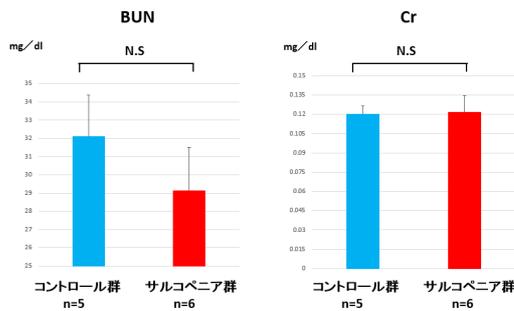
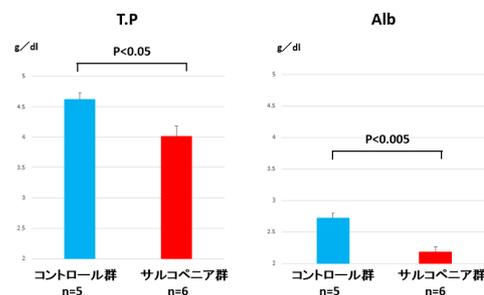


図8 総蛋白 アルブミン



【下肢虚血作製とLDBFによる血流評価】

コントロール・サルコペニアモデルマウスにおいて、双方に右下肢虚血を加えて、レーザードップラーによる血流評価(LDBF)を行った。虚血作製後、7日後までは血流は有意差なく低下していたが、14日後においては、サルコペニア群で有意に血流の低下を認めた。(図9・10)

図9 LDBF 画像

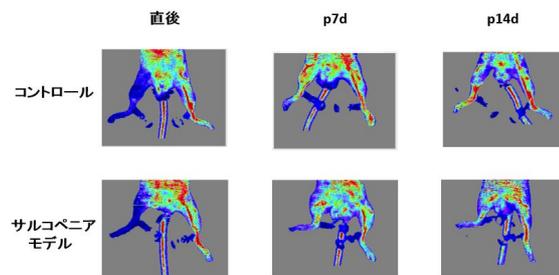
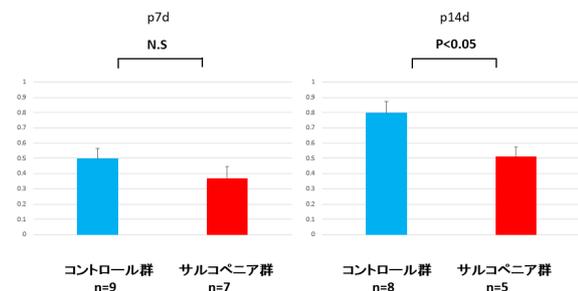


図10 LDBF 評価 p7d p14d



【下肢虚血肢における毛細血管密度評価】

上記結果をふまえ、虚血作製後 14 日目のサンプルを用いて CD31 蛍光染色による毛細血管密度評価を行った。(図11)

しかし、有意な差は得られなかったが、サルコペニア群で低下傾向が認められた。(図12)

図11 CD31 蛍光染色

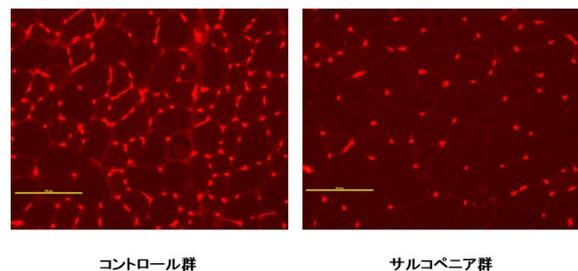
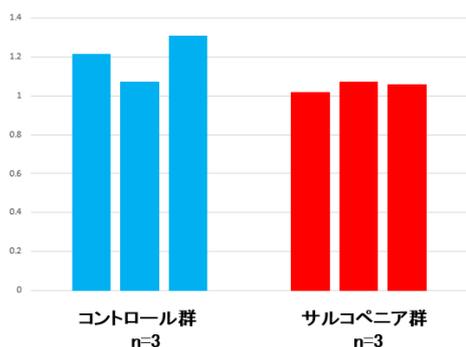


図 12 毛細血管密度評価



毛細血管密度については、有意な低下が実験からはえられておらず、さらに実験をする必要があると考えている。

【ウエスタンブロットによる蛋白評価】

得られた組織から、IL-1, VEGF, Cytochrome-C, IGF-1, IL-6, など血管新生にかかわる蛋白やウエスタンブロットで評価を現在施行中であり、現時点では有意な結果が得られていない。引き続き、検証していく。

まとめ

独自に考案した方法で、下肢重量を低下・萎縮したサルコペニアモデルのマウスを作製し、そのマウスに対して、下肢虚血を加えた。LDBF による血流評価については、有意な低下が認められており、血管新生反応が乏しくなるなんらかの因子がサルコペニアには存在することが考えられる。

その要因として、まずは血管新生にかかわる蛋白発現の低下に注目し現行で実験中である。

今後、発現低下の蛋白が認められた場合、サルコペニアモデルマウスに何らかの改善効果を加え(特に運動)、同蛋白の推移などに着目し、さらに血管新生反応の改善が認められれば、新たな治療標的として確立することができる可能性がある。

引き続き研究を継続していく。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 基起 (SASAKI MOTOKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 60725026

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()