

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790508

研究課題名 (和文) 重症虚血肢に対する PUVA 療法の有効性についての検討

研究課題名 (英文) The efficacy of the PUVA therapy for critical limb ischemia

研究代表者 東條 大輝 (TOJO TAIKI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：70327344

研究成果の概要：本研究の目的は、皮膚科臨床で実地応用されている紫外線療法が、他に有効な治療法のない重症虚血肢に対する新しい血管新生療法として有用か否かについて明らかにすることである。

大腿動脈結紮除去によって作成されたマウス下肢虚血モデルにおいて、下肢切断率、潰瘍形成率、レーザードップラーを用いた血流回復の評価、マイクロソフエアを用いた血流量半定量、ならびに血管新生評価のための免疫組織学的微小血管数定量など基礎的データを収集し、これら基礎的データをもとに、同モデルを用いて紫外線照射の効果を検討したが、紫外線照射による効果は個体差が大きく、現在のところ一定の傾向が得られておらず、今後照射量や照射法などさらなる条件調節が必要と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	0	1,700,000
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	150,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管新生

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症に対する治療は、従来の外科的バイパス術に加え、ペリフェラル・インターベンションが著しい発展を見せている。しかしながら、従来の薬物療法でコントロールが不良で、かつ、手術やインターベンションの適応とならない重症虚血肢症例に対しては、患肢の切断という、

患者にとって QOL (quality of life, 生活の質) を著しく損なう手段しか残されていない。近年、このような重症虚血肢に対する治療として、血管内皮前駆細胞、骨髄・末梢単核白血球移植などが注目され、臨床応用が開始されているものの、その効果は未だ確立されたものではない。

申請者らはマウスを用いた実験で、虚血肢においては活性酸素種の産生が著明に亢

進んでいること、活性酸素種スカベンジャーの持続投与や、細胞内活性酸素種の主な産生源であるNAD(P)HオキシダーゼのサブユニットであるNOX2のノックアウトが、虚血肢における血管新生反応を遅延させることを報告した。これらの事実は活性酸素種が虚血肢における血管新生に重要な役割を果たしていることを強く示している。

2. 研究の目的

これまでに申請者は活性酸素主が虚血肢における血管新生反応の重要なメディエーターであることを報告した (Tojo T, et al. *Circulation*. 111: 2347-55, 2005.)。一方で紫外線が細胞内活性酸素産生を増加させることが知られている。本研究の目的は、紫外線照射が重症虚血肢に対する新しい血管新生療法として有効かどうか、動物モデルを用いて検討することである。

3. 研究の方法

① 動物モデル作成

8-9 週齢の C57BL/6J マウスを、ketamine (87 mg/kg) および xylazine (13 mg/kg) の腹腔内投与にて麻酔。局所を剃毛した後、右大腿動脈直上の皮膚を約 1cm 切開し、皮下脂肪や結合組織を丁寧に剥離して大腿動脈を露出した。神経や静脈を温存しながら 5-0 絹糸を用いて大腿動脈中枢側と遠位側の 2 か所を結紮し、血流を遮断。両結紮部位間の動脈を剥離除去して下肢虚血を作成。

② 血流評価

- a) 結紮前、直後、3 日後、1 週後に ketamine (87 mg/kg) および xylazine (13 mg/kg) の腹腔内投与にて麻酔下に局所を剃毛した後、レーザー Doppler を用いた下肢血流の評価を行った。
- b) 下肢虚血作成 1 週後にレーザー Doppler 解析後、マウスを屠殺し、左室心尖部にカニューレーションして、15 μ m polystyrene latex microspheres を定圧還流した後、左右大腿筋を摘出。DMSO 溶液で組織を融解し、フィルターで microsphere を回収し、吸光度計を用いて、局所血流量の半定量を行う。
- c) 下肢虚血作成 1 週後、マウスを屠殺。左室心尖部にカニューレーションし、10%ホルマリンを用いて組織を還流固定した後、左右大腿筋

を摘出。OCT コンパウンドを用いて凍結包埋した組織より、7- μ m 薄切標本を作成。血管新生評価のための biotinylated *Griffonia simplicifolia* lectin を用いた血管内皮特異的免疫組織染色を施行。顕微鏡下で capillary density を評価した。

③ 切断肢回避率評価

全実験動物における虚血・非虚血肢の状況を屠殺前に評価した。

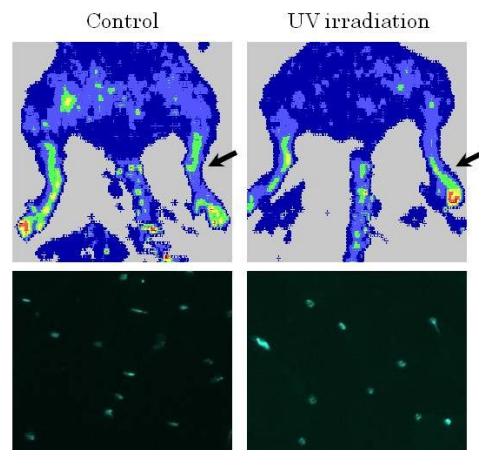
④ 内皮細胞遊走実験

培養正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を 8 μ m ポアサイズのポリカーボネート膜上に 8 時間培養し、膜外へ遊走する細胞をカウントすることで内皮細胞の遊走能に及ぼす紫外線の効果を評価した。

4. 研究成果

従来の大腿動脈結紮除去によって作成されたマウス下肢虚血モデルにおいては、臨床で経験される重症虚血肢症例のような、組織壊死や潰瘍形成などの所見が得にくいなどの問題点があり、より臨床像に近いモデルが必要とされていた。そこで我々は結紮部位をより中枢側に置いた広範囲虚血肢を作成。これにより比較的臨床像に近い病態を示すモデルを開発することに成功した。

図1 レーザー Doppler による血流評価と免疫組織学的 capillary density 評価



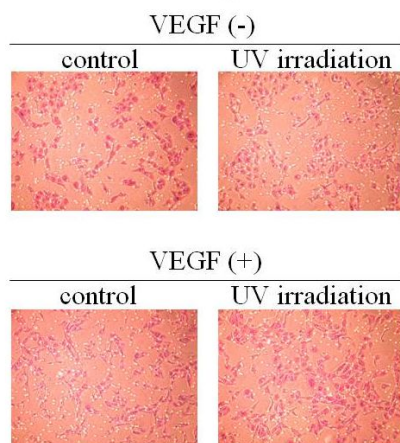
同モデルを用いて行った検討では、紫外線照射による効果は個体差が大きく、レーザー Doppler、microsphere による血流評価や、免疫組織学的検討による新生血管数での評価上、現在のところ一定の傾向が

得られていない (図 1)。

また、切断肢回避率でも有意差を認めなかった。

内皮細胞遊走実験においても HUVEC 遊走能に対する影響は認められなかった (図 2)。

図2 HUVEC migration assay



上記結果より、UV 照射量や照射法などさらなる条件調節が必要と考えられた。

今後、至適条件のさらなる追及の他、血管新生の新しい分子生物学的機序を明らかにするため、培養血管内皮細胞ならびに骨髄由来幹細胞において、皮膚科基礎研究領域で行われる UV irradiator を用いた紫外線照射法を用い、アンジオテンシン系の細胞内情報伝達機構に及ぼす影響について、主に活性酸素種を介した側面からアプローチした実験検討を行って行きたいと考えている。

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 5 件)

1. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Izumi T. Beyond cholesterol lowering: pleiotropic effects of bile acid binding resins against cardiovascular disease risk factors in patients with metabolic syndrome. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008 Oct;6(4):271-81. Review. (査読あり)
2. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Kosugi R, Aoyama N, Niwano S, Kurokawa S, Izumi T. Effect of colestimide on reduction of body weight and waist circumference in metabolic syndrome

patients with cardiovascular risk factors. *Vasc Disease Prevention*. 2008; 5 (3): 183-189. (査読あり)

3. Nagai R, Izumi T, Kurabayashi M, Daida H, Tojo T, Hasegawa A, Miyauchi K, Hayashi D, Kohro T, Okada Y, Yamazaki T; JCADII Investigators. Rationale and design of a study to examine lower targets for low-density lipoprotein-cholesterol and blood pressure in coronary artery disease patients. *Circ J*. 2008 Apr;72(4):515-20. Rationale and design of a study to examine lower targets for low-density lipoprotein-cholesterol and blood pressure in coronary artery disease patients. *Circ J*. 72 (4): 515-520, 2008. (査読あり)
4. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Kim HW, Hilenski L, Patrushev NA, Zhang L, Fukai T, Ushio-Fukai M. IQGAP1 mediates VE-cadherin-based cell-cell contacts and VEGF signaling at adherence junctions linked to angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Sep;26(9):1991-7. (査読あり)
5. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Shioi T, Masuda T, Inomata T, Izumi T. Central neurotransmitter, alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) is upregulated in patients with congestive heart failure. *Intern Med*. 2006 Jul;45(7):429-34. (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

1. 佐藤大輔、森口昌彦、深谷英平、竹内一郎、竹端均、東條美奈子、東條大輝、和泉徹: DES 再狭窄に対し DES 再留置を行った治療成績の検討。第 34 回日本心血管インターベンション学会関東甲信越地方会、第 6 回日本心血管カテーテル治療学会東日本地方会、合同地方会、2009 年 5 月 9 日、東京、大手町サンケイプラザ。
2. Minako Yamaoka-Tojo, Taiki Tojo, Rie Kosugi, Naoyoshi Aoyama, Tohru Izumi. Impact of Weight Loss on Atherogenic Systemic Inflammation: Circulating Interleukin-18 in Patients with Metabolic Syndrome. The 73st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (日本循環器学会総会), Osaka, Japan (2009.3).

3. 西成真琴、竹端均、深谷英平、佐藤大輔、竹内一郎、東條大輝、森口昌彦、猪又孝元、青山直善、和泉徹：当院で経験した超遅発性ステント内血栓症の一例。第21回心臓性急死研究会、2008年12月20日、品川、東京コンファレンスセンター。
 4. Hidehira Fukaya, Hisahito Shinagawa, Daisuke Sato, Mototsugu Nishii, Ichiro Takeuchi, Hitoshi Takehana, Minako Yamaoka-Tojo, Taiki Tojo, Masahiko Moriguchi, Naoto Fukuda, Toshiro Kurosawa, Tohru Izumi. The Incidence of Stent Thrombosis of Drug Eluting Stent in our Hospital. 第8回日本心血管カテーテル治療学会学術集会、2008年11月24日、京都、国立京都国際会館。
 5. 竹内一郎、深谷英平、品川弥人、西井基継、佐藤大輔、竹端均、東條大輝、森口昌彦、和泉徹：当院におけるPES関連ステント血栓症の現状とその臨床背景。第33回日本心血管インターベンション学会関東甲信越地方会、第5回日本心血管カテーテル治療学会東日本地方会、合同地方会、2008年11月1日、東京、大手町JAホール。
 6. Taiki Tojo, Masahiko Moriguchi, Mototsugu Nishii, Minako Yamaoka-Tojo, Naoto Fukuda, Toshiro Kurosawa, Tohru Izumi. Correlation between chronic kidney disease and angiographic severity of coronary artery disease. The 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Interventional Cardiology. 第17回日本心血管インターベンション学会学術集会、2008年7月4日、名古屋、名古屋国際会議場。
 7. 東條大輝：当院の心臓カテーテル患者におけるCKDの現状。第56回神奈川循環器講演会。2007年12月15日、横浜、関内新井ホール。
 8. 品川弥人、森口昌彦、福田直人、成毛崇、東條大輝、和泉徹：Filtrapの使用下でno reflowを生じ、フィルター回収後も改善を認めなかった狭心症の一例。日本心血管カテーテル治療学会第4回東日本地方会（北海道・東北・関東甲信越合同地方会）、2007年11月10日、東京、大手町サンケイプラザ。
 9. Inomata H, Yamaoka-Tojo M, Urao N, Tojo T, Mckinney R, Fukai T, Ushio-Fukai M. IQGAP1 promotes ROS-dependent PDGF receptor signaling from caveolae/lipid rafts to focal adhesions: role in vascular migration. AHA 2007, NOV 6 2007, Orlando, FL. USA. (Circulation, 116 (16) Suppl: II236-II237).
 10. Inomata H, Yamaoka-Tojo M, Urao N, Tojo T, Patrushev NA, Fukai T, Ushio-Fukai M. Functional Expression of IQGAP1 in vasculature: role in reactive oxygen species-dependent PDGF signaling and vascular migration. Experimental Biology 2007 (May 2 2007): Late-Breaking Abstracts, Washington (FASEB. 200; 21: 1b427).
 11. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Aoyama N, Kosugi R, Machida Y, Izumi T. Circulating interleukin-18 is a specific biomarker to distinguish metabolic syndrome (MetS) patients from pre-MetS conditions. The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (日本循環器学会総会), Kobe, Japan (2007.3).
- [図書] (計 1件)
1. 東條大輝. 心不全を予防する 一発症させない再発させないための診療ストラテジー VI. 疾患別の予防的介入 3. 糖尿病に介入する. 中山書店, 東京, 2006: 258-26.
- [その他]
http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~med_2/top/
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 東條 大輝 (TOJO TAIKI)
 北里大学・医学部・助教
 研究者番号：70327344