

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590860
 研究課題名（和文） 重症閉塞性末梢動脈疾患に対するミッドカイン（MK）
 補充血管新生治療法の開発
 研究課題名（英文） Therapeutic agent for occlusive peripheral vascular disease.

研究代表者
 堀場 充(HORIBA MITSURU)
 名古屋大学・環境医学研究所・准教授
 研究者番号：40345913

研究成果の概要：

閉塞性動脈硬化症の動物モデルである、腸骨動脈の結紮・除去マウスに対し、MK 蛋白を持続投与したところ虚血下肢の血流量が増加し、切断率が減少した。組織切片では MK 投与による新生血管の増加が認められた。さらに培養内皮細胞において、MK 蛋白添加による管腔形成の促進が認められた。ウエスタンブロットでは *in vivo*、*in vitro* ともに MK による ERK、Akt の活性亢進が認められた。これらの事より MK は下肢虚血において血管新生を促進し病態悪化の予防に有効である事が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：血管病態学

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化を基礎疾患とする閉塞性動脈硬化症 (ASO) やバージャー病 (TAO) などの血管疾患は食生活の欧米化や高齢化の進行と共に増加しつつある。本邦での慢性虚血肢の発生率は年間 10 万人あたり 50～

100 人であり、60～70 歳男性のうち 5%前後が間欠性跛行の症状を有している。そのうち 50～75%は無治療で経過観察が可能であるものの、年間 1%が下肢切断の適応であるとされている。近年の薬物治療や手術治療、インターベンション治療の進歩に

もかかわらず、重症虚血肢患者は下肢切断を余儀なくされる事により生活の質が著しく障害される上、このような重症患者は生命予後も不良で5年生存率が50%との報告がある。重症閉塞性末梢動脈疾患に対する有効な治療法の開発は重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では下肢虚血モデルにおける MK 蛋白補充および MK 遺伝子強制発現による新しい血管新生治療法開発の可能性を探るとともに、血管新生作用に対する MK のシグナル伝達系解明など分子生物学的なメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

MK による血管新生能の確認: マウス皮下にマトリゲル等細胞基質とともに MK 蛋白を投与し、その基質内への血管浸潤の程度を bFGF、VEGF など他の血管新生因子との間で比較検討する。また血管内皮系の細胞培養実験において細胞による管腔形成の程度についても同様に MK と他の血管新生因子との比較解析を行う。

マウス下肢虚血モデルの作成と MK 投与による血流改善の評価: マウス腸骨動脈の結紮、除去により下肢虚血モデルを作成する。虚血下肢の内転筋に対して MK 蛋白を含有した蛋白徐放剤および MK 発現アデノウイルスを筋肉内注射し、レーザードップラー計にて経時的に血流量を測定することで MK の治療効果を判定する。また新生血管の機能評価については組織酸素分圧の測定を行うとともに、形態学的にも詳細に解析し、病的血管発生の有無について確認する。MK 蛋白を持続発現するための徐放剤および MK 発現アデノウイルスについては前述した心筋障害

慢性期モデルの実験にて既にその実用性と効果を確認している。

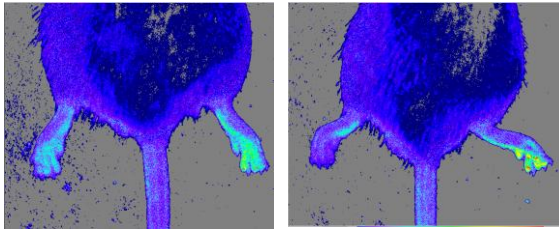
血管新生に与える MK の分子生物学的メカニ

ズム解明: 上記の培養細胞および虚血下肢組織を採取し血管新生関連因子と MK との関係を PCR 法、Western blotting 法、免疫組織染色法などにて解明する。さらに血管内皮前駆細胞など新生血管形成に重要な細胞と MK 分布の関連性についても解析を加え、細胞移植との併用についての可能性も探求する。

4. 研究成果

MK による血管新生能の確認: マウス皮下にマトリゲル等細胞基質とともに MK 蛋白を投与し、その基質内への血管浸潤の程度を bFGF、VEGF など他の血管新生因子との間で比較検討した。さらに血管内皮系の細胞培養実験において細胞による管腔形成の程度についても同様に MK と他の血管新生因子との比較解析を行った。その結果 MK 蛋白はマトリゲル内血管形成、細胞の管腔形成とも bFGF、VEGF と同等の効果を示した。

マウス下肢虚血モデルの作成と MK 投与による血流改善の評価: マウス腸骨動脈の結紮、除去により下肢虚血モデルを作成する。虚血下肢の内転筋に対して MK 蛋白を含有した蛋白徐放剤および MK 発現アデノウイルスを筋肉内注射し、レーザードップラー計にて経時的に血流量を測定することで MK の治療効果を判定した。また新生血管の機能評価については組織酸素分圧の測定を行うとともに、形態学的にも詳細に解析し、病的血管発生の有無について確認した。

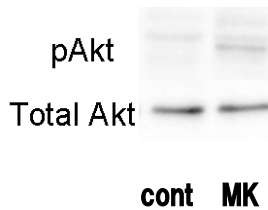


WT

MKK

血管新生に与える MK の分子生物学的メカニ

ズム解明：上記の培養細胞および虚血下肢組織を採取し血管新生関連因子と MK との関係を PCR 法、Western blotting 法、免疫組織染色法を用いて解析したところ、MK 投与により、ERK および Akt が活性化されることが判明した。



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 4 件)

①武藤貴雄、安井健二、植田典浩、堀場 充、神谷香一郎、児玉逸雄
ICH-E14 に基づいた心毒性治験のための QT 計測システム 2007. Japanese Journal of Electrocardiology Vol.27 No.1 査読無

② Muto Takao, Ueda Norihiro, Opthof Tobias, Ohkusa Tomoko, Nagata Kozo, Suzuki Shinsuke, Tsuji Yukiomi, Horiba Mitsuru, Lee Jong-Kook, Honjo Haruo, Kamiya Kaichiro, Kodama Itsuo, Yasui Kenji.

Aldosterone modulates If current through gene expression in cultured neonatal rat ventricular myocytes.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Nov;293(5):H2710-8. 査読無

③ Mitsuru Horiba, Muto Takao, Ueda Norihiro, Opthof Tobias, Keiko Miwa, Mayumi Hojo, Lee Jong-Kook, Kamiya Kaichiro, Kodama Itsuo, Kenji Yasui.

T-type Ca²⁺ channel blockers prevent cardiac cell hypertrophy through an inhibition of calcineurin-NFAT3 activation as well as L-type Ca²⁺ channel blockers. Life Science 2008 Mar 12;82(11-12):554-60. 査読無

④ Takenaka H*, Horiba M*, Ishiguro H, Sumida A, Hojo M, Usui A, Akita T, Sakuma S, Ueda Y, Kodama I, Kadomatsu K. Midkine prevents ventricular remodeling and improves long-term survival after myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 Feb;296(2):H462-9. Epub 2008 Dec 5. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

① HARADA Masahide, TSUJI Yukiomi, SUMIDA Arihiro, HOJO Mayumi, KAMIYA Kaichiro, KODAMA Itsuo, HORIBA Mitsuru: Midkine prevents cardiac remodeling in rabbit congestive heart failure through its anti-apoptotic effect. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation 2009.3.22(Osaka, Japan)

② SUMIDA Arihiro, HORIBA Mitsuru, ISHIGURO Hisaaki, TAKENAKA Hiroharu, HARADA Masahide, UEDA Norihiro, LEE Jong-Kook, KAMIYA Kaichiro, KADOMATSU Kenji, KODAMA

Itsuo: MK gene transfer causes amelioration of cardiac remodeling after myocardial infarction. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation 2009.3.21(Osaka, Japan)

③SUMIDA Arihiro, HORIBA Mitsuru, ISHIGURO Hisaaki, TAKENAKA Hiroharu, UEDA Norihiro, LEE Jong-Kook, MUROHARA Toyoaki, KADOMATSU Kenji, KODAMA Itsuo: Midkine gene transfer ameliorates ischemic cardiomyopathy through enhancements of neovascularization via Akt/PI3 kinase and ERK pathways and anti-apoptosis by regulating Bcl-2 and bax. American Heart Association Scientific Sessions. 2008.11.10 (New Orleans, LA, USA)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：一酸化窒素合成酵素活性化剤
発明者：堀場、門松、児玉、村松、石黒、竹中、住田
権利者：名古屋大学
種類：
番号：PCT/JP2008/000815(WO)
出願年月日：2008. 4. 8
国内外の別：国際出願

名称：非虚血性心筋障害に対する医薬
発明者：堀場、門松、原田、竹中、石黒、住田、蝶野

権利者：名古屋大学

種類：

番号：特願 2008-284918

出願年月日：2008. 11. 6

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀場 充 (HORIBA MITSURU)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：40345913

(2) 研究分担者

児玉 逸雄 (KODAMA ITUO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：30124720

門松 健治 (KADOMATSU KENJI)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80204519