

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09261

研究課題名(和文)重症下肢虚血における組織障害因子の解明と新たな救肢治療法の開発

研究課題名(英文) Inducible nitric oxide synthase, highly expressed in the ischemic limb of chronic limb-threatening ischemia, is involved in increasing the rate of amputation-free survival after toe amputation

研究代表者

土田 憲 (Ken, Tsuchida)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60816403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は非虚血下肢群と比較して、虚血性壊死群の切断趾にiNOSおよびCD34が有意に発現することを示した。また、虚血性壊死群の切断趾において、血管内皮細胞外に発現したiNOSが、損なわれた血管内皮機能の一部を代償している可能性が示唆された。さらに、血管内皮細胞外に発現したiNOSが産生するNOはCLTI患者に良好な臨床転帰をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

包括的高度慢性下肢虚血(CLTI)に対する新たな血流改善法の開発が期待されているが、血行再建のみがCLTIにおけるエビデンスのある治療となっている理由の一つとして、組織障害のメカニズムが解明されていないことが挙げられる。研究の結果からCLTI群の切断趾においてiNOSおよびCD34の合計輝度値がControl群と比較して有意に高い一方で、血管内皮細胞内での発現に差を認めなかったことから、血管内皮細胞外でのiNOSおよびCD34の発現量に差がある可能性が示唆された。また血管内皮細胞外に発現したiNOSにより生成されるNOはCLTI群に良好な臨床転帰をもたらす可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that inducible nitric oxide synthase (iNOS) and CD34 were highly expressed in the ischemic amputated limbs of patients with chronic limb-threatening ischemia compared to the malignant amputated limbs of patients with orthopedic malignant tumors, but no difference was observed in the expression levels of neural NOS and endothelial NOS. Furthermore, within the cohort of patients with chronic limb-threatening ischemia, the group with high iNOS expression exhibited better amputation-free survival rate after toe amputation than the group with low iNOS expression, suggesting that iNOS plays an important role in increasing amputation-free survival rate.

研究分野：血管外科

キーワード：包括的高度慢性下肢虚血 CLTI 一酸化窒素 NO CLI 下肢閉塞性動脈硬化症 下肢末梢動脈疾患 LEAD

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease : PAD) は冠動脈以外の末梢動脈に病変を生じる疾患の総称であり、欧州心臓病学会/欧州血管外科学会 (European Society of Cardiology / European Society for Vascular Surgery : ESC/ESVS) の2017年のガイドラインでは下肢末梢動脈疾患を lower extremity arterial disease (LEAD) と称している (1)。CLTI は動脈硬化性 LEAD に含まれるが、動脈病変に加え、感染、神経障害、腎機能障害などが CLTI の病態を複雑化させている。慢性的な虚血をもたらす原因として代表的なものは動脈硬化性病変であり、CLTI の原因の大半を占めている。動脈硬化性病変は病理学的に粥状硬化と中膜硬化に大別され、特に中膜硬化は主に糖尿病によって形成され、下腿の動脈に好発するとされている (2)。日本では CLTI の約 70-80%が糖尿病を患っているという報告もあり (3)、糖尿病は CLTI のリスク因子の中でも最も重要である (4) (図 1)。CLTI 患者は、糖尿病、高血圧、慢性腎臓病、冠動脈疾患、脳血管疾患など様々な併存疾患を有しており (1)、予後は不良で 3 年生存率は約 50%である (5)。有病率は先進国、発展途上国問わず男女共に加齢に伴い増加しており (図 2)、治療に長い時間を要する上、医療費の増大も問題となっている (4, 6)。

薬物療法、高圧酸素療法、空気圧圧迫療法、脊髄刺激療法、細胞療法、遺伝子療法などの CLTI に対する非血行再建治療は治療効果のエビデンスが弱く、その使用は限定されている (1, 4) ため、バイパス手術や血管内治療 (Endovascular therapy : EVT) などの血行再建術がエビデンスのある唯一の治療法である (2)。しかし、バイパス手術は全身麻酔が必要であり、高齢で併存疾患を多く抱える CLTI 患者にとって負担が大きい。また、EVT は局所麻酔で施行でき低侵襲だが、特に下腿の病変に対して行う EVT は再狭窄率が高く、3 か月以内に約 80%の患者が再狭窄を起こし、約 40%の患者が再閉塞を起こすとの報告もある (7)。血行再建を行わなければ 20~30% は 1 年以内に大切断が必要となり (8)、血行再建を行っても術後 1 年以内の切断率は 10%程度と報告されている (9)。また、大切断が行われた際には歩行機能が失われる患者は多く、患者の生活の質 (Quality of Life : QOL) が著しく低下する (10)。このように CLTI 患者の治療はリスクが高く、患者に与える負担も大きい。ため、侵襲なく血流を改善・維持させる新たな治療法の開発が望まれるが、血行再建術以外の治療法は確立されていない。その理由として、虚血による組織障害のメカニズムが解明されていない点が挙げられる。CLTI における虚血性障害の保護因子または障害因子を解明することで、新たな治療法の手がかりを得られる可能性がある。

CLTI における組織障害を動脈硬化と血管新生という側面から考えると、次のような筈が考えられる。CLTI を含め、動脈硬化性疾患において血管が狭窄・閉塞すると血流が低下し、組織灌流も低下する。その結果、組織への栄養や酸素の供給不足が起こり、組織障害を引き起こす。組織障害の創傷治癒過程で血管新生が起こることは知られているが、動脈硬化を起こした血管の内膜内でも血管新生は起こるとされており、血管リモデリングに関連すると考えられている。このような血管新生の CLTI における役割はほとんど解明されておらず、CLTI における組織障害と血管新生との関連を調べることで、CLTI における組織障害の理解を深めることができると考え、研究対象とする血管新生関連因子の候補を考えた。本研究では、一酸化窒素 (nitric oxide : NO) と CD34 に着目した。これらの因子はいずれも CLTI に関連する研究が進んでいないため、新規性の面からも適すると考えた。

NO は、生物のシグナル伝達メディエーターとして世界で初めて認められたガス状分子であり、血管内皮細胞から産生され血管内皮機能を調節している。細胞において L-アルギニンが L-シトルリンへと変換される時に同時に生成され (図 3)、この反応を触媒するのが一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase : NOS) である。NO は生体組織中での半減期が 3~6 秒と非常に短く (11,12)、定量が困難である。そのため NOS の発現量を評価することで、NO の産生量を予測する方法が一般的である。NOS には 3 種類のアイソフォームがあり、nNOS、eNOS、および iNOS と呼ばれている (13,14) (表 1)。nNOS および eNOS は定常状態で発現しており、構成型 NOS とも呼ばれる。一方、iNOS の発現はリポ多糖やさまざまな炎症性サイトカインによって誘導される (15,16)。基本的にはすべて血管内皮細胞で産生されるが、nNOS と iNOS はそれぞれ神経細胞、マクロファージでも産生される。

CLTI を含め、虚血性疾患と NO や NOS に関しては多くの研究があるが、生体に及ぼす NOS の機能に関しては一定の見解がない。例えば、eNOS のシグナル伝達経路に関連して、ラットの後肢虚血モデルにおいて PI3K-Akt 経路の活性化とその後の eNOS 活性の増加により NO 産生が増加して血管新生が促進され (17,18)、組織灌流が増加するという報告があるが、これは生体に対する eNOS のポジティブな側面を示している。一方ラットの心臓の虚血再灌流モデルにおいて、赤血球に存在する eNOS が再灌流後の回復に悪影響を与えることも報告されており (19)、こちらは生体に対し eNOS がネガティブに作用する側面を示している。このように、NOS-NO が組織に与える影響には相反する作用があると考えられている。

CD34 抗原は、分子量 110 kDa の単鎖膜貫通リン酸化糖タンパク質である。この抗原は、血管内皮前駆細胞や多能性幹細胞などの未熟な幹細胞で高度に発現され、分化するにつれて消失す

る。臨床的には造血前駆細胞の初期マーカーであり (20)、CD34 を発現する細胞を CD34 陽性細胞と称する。CD34 陽性細胞は細胞治療や造血幹細胞移植に利用されている (21-23)。また CD34 は上皮細胞、血管内皮細胞、間質細胞に発現する細胞表面のシアロムチンであり、細胞の接着を促進し炎症が起こっている組織において炎症細胞の動員を誘導し血管新生を促進させると報告されている (24)。

NOS や CD34 はそれらの多様な機能の中の一つとして、血管新生に関連する因子と考えられる事から CLTI の組織においても発現し、血流改善に機能していると推察した。本研究では、CLTI 症例の虚血組織における 3 種類の NOS と CD34 の発現レベルを評価するために、CLTI に対する下肢救済治療中に大切断または小切断術を受けた患者 29 名 (CLTI 群) と Control 群として整形外科悪性腫瘍によって下肢切断を受けた患者 10 名の組織を採取した。

## 2. 研究の目的

現在、血行再建のみが CLTI におけるエビデンスのある治療となっている理由の一つとして、CLTI 患者の組織障害のメカニズムが解明されていないことが挙げられる。本研究では、虚血組織で起こる血管新生にフォーカスし、関連因子として知られる一酸化窒素(nitric oxide: NO) や CD34 に着目した。NO は生体内での半減期が非常に短く定量化が困難であることから、NO の生成過程において触媒としての機能を果たす一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase : NOS) の発現を調べるのが一般的であるため、本研究では CLTI 患者の切断趾における NOS および CD34 の発現や臨床転帰との関係性を評価し、CLTI 患者の虚血障害のメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

前向きコホート研究のために、当院で救肢治療を行う過程で大切断または小切断術を受けた CLTI 患者 29 名 (CLTI 群) と、整形外科悪性腫瘍によって下肢切断を受けた患者 10 名 (Control 群) の組織を収集した。CLTI 群および Control 群の採取組織における神経性 NOS (neuronal NOS : nNOS)、内皮性 NOS (endothelial NOS : eNOS)、誘導性 NOS (inducible NOS : iNOS)、および CD34 をマーカー因子として注目した。これらの因子の発現を評価するために、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB)、蛍光色素、高輝度蛍光ナノ粒子 (Phosphor Integrated Dots : PID) による免疫染色を順次行った。

DAB 染色は定量性が低いため、CLTI 群と Control 群の違いを定量的に評価することが困難であることが予想された。そのため、より定量性の高い方法として蛍光色素や PID による免疫染色を行うことにした。免疫蛍光染色で評価する項目を以下の 2 つとした。1 つは、3 種類の NOS および CD34 が発現している血管内皮面積である。この面積を算出するため、血管内皮に高発現する CD31 と各因子をそれぞれ 2 重染色し、共局在部位を明らかにすることで各因子が血管内皮へ局在する面積を算出した。もう 1 つは観察した視野内の全ての領域における各 NOS および CD34 の合計輝度値である。さらに以上の蛍光画像解析に加え、切断趾における NOS および CD34 の発現と臨床転帰との関係性を検証するため、足趾切断後の救肢生存率と合計輝度値との関連の有無について Kaplan-Meier 法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

DAB 染色では、CLTI 群と Control 群の違いを定量的に評価することができなかった。また PID 染色では、CLTI 群の組織に対し非特異反応を抑制することができず、結果を評価する段階まで進めなかった。そのため、蛍光色素による免疫染色で得られた画像データを元に解析を行った。CLTI 群と Control 群の間で、3 種類の NOS および CD34 を発現する血管内皮の総面積において有意差は認められなかった。しかし、合計輝度値において iNOS ( $p < 0.01$ ) と CD34 ( $p = 0.02$ ) に関して、両群の間で有意差を認めた。さらに、足趾切断後の救肢生存率に関して、iNOS の合計輝度値の四分位点 25% の値を基準に CLTI 群を高発現群と低発現群に分けた時、上位 25% の高発現群では低発現群に比べ有意に生存率が高かった ( $p < 0.01$ )。

CLTI 群の切断趾において iNOS および CD34 の合計輝度値が Control 群と比較して有意に高い一方で、血管内皮細胞内での発現に差を認めなかったことから、血管内皮細胞外での iNOS および CD34 の発現量に差がある可能性が示唆された。また CLTI 患者における iNOS と救肢生存率の関係から、血管内皮細胞外に発現した iNOS により生成される NO は CLTI 群に良好な臨床転帰をもたらす可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirokazu Takahashi, Daijiro Akamatsu
2. 発表標題 Inducible nitric oxide synthase, highly expressed in the ischemic limb of chronic limb-threatening ischemia, is involved in increasing the rate of amputation-free survival.
3. 学会等名 European Society of Vascular Surgery 2024 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

英文論文を作成済みである。一度、European journal of vascular and endovascular surgeryに投稿したがrejectされたため現在再投稿準備中である。
--

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	後藤 均  (Hitoshi Goto)  (00400333)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師   (11301)	
研究分担者	赤松 大二朗  (Daijiro Akamatsu)  (40420012)	東北大学・医学系研究科・准教授   (11301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	藤島 史喜  (Fumiyoshi Fujishima)  (40451596)	東北大学・医学系研究科・准教授    (11301)	
研究分担者	多田 寛  (Hiroshi Tada)  (50436127)	東北大学・医学系研究科・准教授    (11301)	
研究分担者	権田 幸祐  (Kosuke Gonda)  (80375435)	東北大学・医学系研究科・教授    (11301)	
研究分担者	綿貫 宗則  (Munenori Shimanuki)  (90451575)	東北大学・大学病院・講師    (11301)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関