

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592638

研究課題名(和文)慢性下肢虚血に対する新しい遺伝子治療システムの開発

研究課題名(英文)Development of a novel system of the gene therapy for peripheral arterial diseases.

研究代表者

武田 睦(Takeda, Atsushi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30333800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：慢性下肢虚血に対する、標的部位限定的な遺伝子治療法を開発するため、治療実験で用いる下肢虚血モデルを検討したところ、マウス下肢血管解剖の詳細は明らかにされておらず、モデル作製法と適切な標的部位について十分な検討がなされていないことがわかった。そこで、マウス下肢動脈解剖を詳細に観察して循環ネットワークの構造を明らかにするとともに、モデル作製法と最適な治療表的部位との関係について検証した。ここで得た知見は、虚血肢に対する治療実験の基礎として、将来にわたって血管再生療法の開発に寄与するものと思われる。この結果は英文紙(PlosOne)に投稿・掲載されるとともに、学位論文(医学博士)として発表した。

研究成果の概要(英文)：To develop novel gene therapies limited in targeted sites for peripheral arterial diseases, we studied the murine hindlimb ischemia model used in the treatment experiment. There it became apparent that not only appropriate therapeutic target sites in each ischemia model, but also details of vascular anatomy in murine hindlimb are not revealed and considered enough. So, clarify the structure of the vascular network, and verified the relationship between the optimal treatment sites and model fabrication method by observing in detail the murine hindlimb arterial anatomy. These observations will contribute to development of angiogenetic therapies as a basic knowledge for designing therapeutic experiment of limb ischemias into the future. These results were published in English on-line journal (PlosOne), and as a thesis (Doctor of Medicine).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：血管新生療法 下肢虚血モデル マウス下肢血管解剖

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の発展により遺伝子治療の枠組みが拡大され、虚血性疾患に対する遺伝子治療法が注目されている

われわれはプラスミドベクターとマイクロ・ナノバブルを用いた標的部位限定的な遺伝子導入法を開発し、さらに、長期間発現が持続するベクターの開発に成功した。そこで、これらを組み合わせることで慢性下肢虚血(peripheral arterial diseases)に対する遺伝子治療法の開発が可能になると考えた。

2. 研究の目的

慢性下肢虚血に対する長期発現プラスミドとナノ・マイクロバブルを用いた局所限定的な遺伝子治療法およびその評価法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

治療分子として VEGF, bFGF などの血管新生遺伝子を組み込んだ長期発現プラスミドベクターを開発し、手術的に作成したマウス下肢虚血モデルに導入して虚血状態の改善を観察する。末梢血流や血管密度の評価はレーザー Doppler 血流計や高周波超音波、マイクロ CT などで行うほか、遺伝子発現の定量法として PET などのイメージング手法も検討する。

4. 研究成果

当初我々が開発した長期発現ベクターを用い、標的部位に限定した遺伝子治療法を開発を試みたが、レポーターのみでは 100 日間以上の長期間の発現が観察されるにも関わらず、ここに VEGF や bFGF などの治療分子を組み合わせると長期発現が得られないという問題が発覚した。これに対し、プロモーターの変更や poly A の付加、multi cloning site の不要配列の削除などのベクター改良を試みたが、安定した長期発現を得るには至ら

なかった。

これと平行して、下肢虚血の治療実験で用いるマウス下肢虚血モデルを検討したところ、マウス下肢血管解剖について詳細に検証した文献は報告されておらず、モデル作製法と適切な標的部位についても十分な検討がなされていないことがわかった。そこで、まずマウス下肢動脈解剖を詳細に観察して循環ネットワークの構造を明らかにした。マウスの動脈は大腿動脈の基部で直径 0.2 mm 程

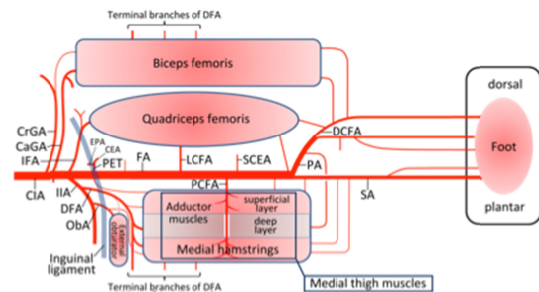
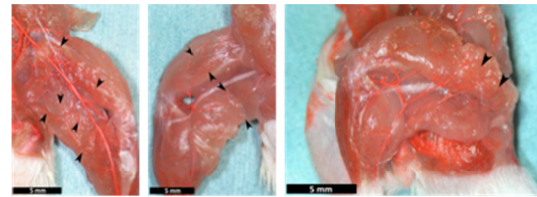


図1
下肢解剖所見および血管解剖模式図

度と非常に細い上に、解剖操作によって容易に虚脱するため観察が困難であった。そこで、血管を着色した樹脂で還流・硬化させるとともに、静脈を切除して各動脈走行と分布を観察した。観察結果は実体顕微鏡写真に撮影し、後の検証に堪えられるように記録した。その結果、これまで大腿動脈を中心とした単純なものにとらえられてきたマウス下肢動脈解剖は、実際には複数の動脈が立体的に配置された複雑なものであることがわかった(図1)。特に、これまで多くの報告において「深大腿動脈」と呼ばれてきた動脈の分布は大腿内側浅層に限局しており、深部に真の「深大腿動脈」と呼ばれるべき動脈が存在することを明らかにした。また、下肢虚血モデルにおいては大腿四頭筋、大腿二頭筋および大腿内側の筋群を介した3つの側副路が存在し得ることを明らかにし、それぞれに連結する近

位・中間・遠位の動脈路を示した。さらに、虚血モデルデザインに際して指標となる解剖学的部位を示すとともに、anatomical variation による個体差を避けるために温存すべき部位を提示した。

ついで、観察で得られた解剖知見をもとに9種類の下肢虚血モデルを作製し、それぞれの壊死範囲と末梢血流回復経過を比較した。その結果、末梢循環には、一般に最も主要な側副路と考えられていた近位後大腿動脈

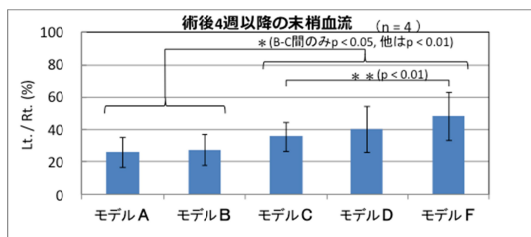


図2 各モデルの末梢血流
近位で閉塞したモデルの方が末梢血流が少ない傾向がみられた。

伏在動脈の経路よりも、大腿四頭筋・大腿二頭筋を介した経路の方が重要な働きをしている可能性が示唆された(図2)。一方、末梢の壊死範囲には、急性期における伏在動脈血流の寡多が強かかわっているものと考えられた(表1)。ここから、急性期の壊死範囲で評価する場合と、回復経過や慢性期の末梢血流で評価する場合とでは、それぞれ異なるモデルを選択すべきであると考えられた。

また、造影マイクロCTを用いてマウス下肢各部以後との血管密度を計測し、虚血作製手術前後(術前および術後4週間)における血管密度変化部位の局在を観察した。その結果、モデル作製術式のデザインによって血管密度変化(増加)部位の局在には差があることが明らかとなった(図3)。さらに、動脈解剖知見をふまえてモデルをデザインすることにより、血管密度増加の局在を制御し得ることを明らかにした。側副路における血管密度増加は、動脈閉塞による血流減少部位よりも近位に生じるが、その機序についての考察

から、治療実験において介入部位に選択すべき部位と血管密度が増加する部位とは密接に関係していることが示唆された。ここから

表1 近位で閉塞したモデルA~Dよりも、遠位で膝窩動脈を処理したモデルF・Gに強い虚血性変化を認めた

モデル	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Westvik score	0	0	0	0	0	0	0	0	0
↑	1	1	1	1	1	1	1	1	1
↑	2	2	2	2	2	2	2	2	2
↑	3	3	3	3	3	3	3	3	3
↑	4	4	4	4	4	4	4	4	4
↑	5	5	5	5	5	5	5	5	5
↑	6	6	6	6	6	6	6	6	6
↑	7	7	7	7	7	7	7	7	7
平均±SD	5.5±1.3	4.3±1.3	5.8±1.5	6.8±0.5	1.5±0.7	3.3±1.3	2.0±0.8	7.0±0.0	6.8±0.5

NS (P=0.092) * (P=0.01) ** (P=0.02)

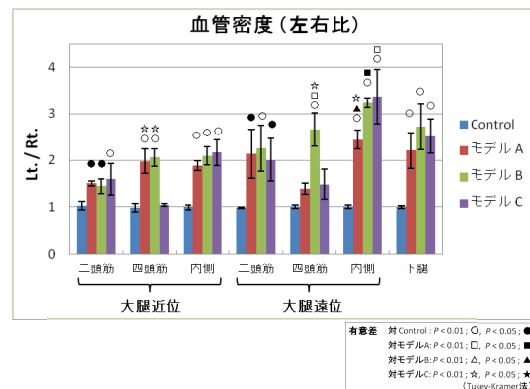


図3 虚血モデルにおける血管密度変化部位の局在
外側大腿回旋動脈を中心に作製した3つのモデルを比較すると、大腿四頭筋における血管密度増加部位に差が認められた

ら、治療介入部位は、それぞれのモデルにおける側副血流動態を十分に考慮した上で選択する必要があると考えられた。

これまでの先行研究においては、基礎となる血管解剖を明らかにしないままに、ヒトの解剖に類似したものとみなして半ば盲目的に治療実験を行っていたのが現状であった。そのため、明らかに適切ではない実験デザインを用いている報告も多数みられ、それが新しい治療法開発の足かせとなっていることも否定できない。そこで、今回我々が得た知見は、マウス下肢虚血モデルをデザインする際の助けになるばかりではなく、実験デザインや実験結果の理解や検証の土台として、虚血に対する血管再生療法の開発に将来にわたって寄与することが期待される。

これらの結果については英文紙(PlosOne)に投稿・掲載されるとともに、学位論文(医学博士)として発表した。

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 1 件)

1, Takashi Kochi, Yoshimichi Imai, Atsushi Takeda, Yukiko Watanabe, Shiro Mori, Masahiro Tachi, Tetsuya Kodama

Characterization of the Arterial Anatomy of the Murine Hindlimb: Functional Role in the Design and Understanding of Ischemia Models

PLoS One. 2013 Dec 30;8(12):e84047. doi: 10.1371/journal.pone.0084047. eCollection 2013. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1 , 高地崇, 武田睦, 今井啓道, 館正弘

マウス下肢虚血モデル作成術式による血管密度変化部位の差の検討

第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 , 2013.11.7, 新潟

2 , 高地崇, 武田睦, 今井啓道, 館正弘

音響性リポソームと高周波超音波装置による微小血流計測の試み

第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会 , 2012.10.4 , 福島

3 , 高地崇, 今井啓道, 武田睦, 館正弘

血管解剖に基づいたマウス下肢虚血モデルの作製

第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会 , 2011.10.6 , 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武田 睦 (Takeda, Atsushi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号 : 30333800