

## 論文の内容の要旨

論文題目 「血管新生の促進による皮弁生着向上効果の検討」

指導教員 高戸毅教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 藤原夕子

### I 緒言

組織再建において皮弁移植術は最も重要な手術法の一つであり、出来るだけ安全で確実な皮弁の移動が望まれる。そのため、作製した皮弁の壊死を予防し生着面積を向上させるため、これまで数多くの努力がなされてきた。最近では、血管新生療法を皮弁生着向上に利用した実験報告が注目を集めている。血管新生療法とは、「血管新生を誘導することにより、側副血行路の発達を促し虚血部に対する血行を改善する治療法」であり、もともとは虚血性心疾患や重症虚血

肢の領域で研究されてきた方法である。皮弁の領域においても、血管新生療法を利用して皮弁の局所循環を改善することができれば皮弁の生着向上が期待できるため、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) や血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) などの血管新生因子を利用した研究が行われるようになった。これまでの研究により、虚血皮弁モデルにおける血管新生療法の有用性が明らかになりつつあるが、血管新生療法の選択や用いる血管新生因子の種類およびその投与部位などに関して、更なる検討が必要であると考えられている。

これまで、虚血皮弁モデルの recipient bed (皮弁下床) に遺伝子導入法や徐放性 DDS 製剤を用いて bFGF を投与し、皮弁の生着が向上するかを検討した報告はない。そこで本研究では、プラスミド筋注による遺伝子導入法にエレクトロポレーションを併用する方法 (第II章) と徐放性 DDS 製剤の酸性ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィア (acidic gelatin hydrogel microspheres: AGHMs) を用いる方法 (第III章) の2つのアプローチ法を用いて、ラット虚血皮弁の recipient bed に bFGF を投与し、皮弁生着向上に対する効果を検討した。

## II bFGF の遺伝子導入によるラット皮弁生着向上効果の検討

### 1. エレクトロポレーション法とは

本研究では、ラット虚血皮弁モデルに bFGF 遺伝子を導入する方法として、プ

ラスミド DNA の筋注にエレクトロポレーションを併用する方法を用いた。プラスミド DNA の筋注による遺伝子導入法は、筋細胞が周囲の外来性遺伝子を自発的にとりこみ、その遺伝子を発現することができるという特色を利用している。この方法は比較的安全な方法であるが、遺伝子導入効率が低いという欠点を有するため、本研究ではエレクトロポレーション法を併用した。エレクトロポレーション法とは、電気刺激により細胞膜に一時的に穴を開け、外来性遺伝子の取り込みを増加させることにより遺伝子導入効率を高める方法である。

## 2. 方法

200-250g オス SD ラットの右側僧帽筋胸部及び広背筋背部に、コントロールプラスミド pCAZ3 もしくはシグナル配列付ヒト bFGF 遺伝子を組み込んだ発現プラスミド pCacchbFGFcs23 を筋注し、エレクトロポレーションを施行することにより遺伝子を導入した。実験群としては、pCAZ3 筋注群 (LacZ-E<sup>-</sup>)、pCacchbFGFcs23 筋注群 (FGF-E<sup>-</sup>群)、pCAZ3 筋注にエレクトロポレーションを併用した群 (LacZ-E<sup>+</sup>群)、pCacchbFGFcs23 筋注にエレクトロポレーションを併用した群 (FGF-E<sup>+</sup>群) の 4 群で実験を行った。遺伝子導入を行った 2 日後に、深腸骨回旋動脈を血管茎とする axial 型の皮弁を作製し、さらにその 7 日後に、皮弁壊死率、皮弁血管造影、組織学的評価を用いて皮弁生着に関する評価を行った。

## 3. 結果

FGF-E<sup>+</sup>群の壊死面積は、他の 3 群に比較し有意に小さかった。また、FGF-E<sup>+</sup>群は、他の 3 群に比較して有意に高い血管造影スコアを示し、皮弁肉様膜内の

血管密度の増加を認めた。LacZ-E群、FGF-E群、LacZ-E<sup>+</sup>群の間では有意差は認められなかった。

### Ⅲ 酸性ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィアを用いた bFGF タンパク徐放によるラット皮弁生着向上効果の検討

#### 1. 酸性ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィアとは

酸性ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィア (acidic gelatin hydrogel microspheres: AGHMs) は、局所に bFGF を持続投与するために開発された材料である。bFGF タンパクを含ませた AGHMs を生体に投与すると、AGHMs は徐々に溶解しながら含有していた bFGF を放出するため、局所に持続的に bFGF を投与することが可能になる。

#### 2. 方法

200-250g オス SD ラットの右側背部に、深腸骨回旋動脈を血管茎とする axial 型の皮弁を挙上した。その後実験群を 8 つに分類し、皮弁頭側 recipient bed の筋膜下 1mm (右側僧帽筋胸部及び広背筋背部) に①300  $\mu$ l PBS (PBS 群)、②bFGF 15 $\mu$ g in 300  $\mu$ l PBS (FGF15 群)、③bFGF 50 $\mu$ g in 300  $\mu$ l PBS (FGF50 群)、④bFGF 150 $\mu$ g in 300  $\mu$ l PBS (FGF150 群)、⑤PBS 含有 AGHMs in 300  $\mu$ l PBS (PBS-AGHMs 群)、⑥bFGF 15 $\mu$ g 含有 AGHMs in 300  $\mu$ l PBS (FGF15-AGHMs 群)、⑦bFGF 50 $\mu$ g 含有 AGHMs in 300  $\mu$ l PBS (FGF50-AGHMs 群)、⑧bFGF 150  $\mu$ g 含有 AGHMs in 300  $\mu$ l PBS (FGF150-AGHMs 群) のいずれかの溶液を筋注後、皮弁を元の位置に縫合した。皮弁作製後 7 日目に、皮弁壊死率、皮弁血管造影、組織学的評価

を用いて皮弁生着に関する評価を行った。

### 3. 結果

FGF150-AGHMs 群と FGF50-AGHMs 群では、コントロールの PBS-AGHMs 群に比較し有意に皮弁壊死率が減少していた。AGHMs を使用しなかった群では、有意に皮弁壊死率が減少した群はなかった。また、FGF150-AGHMs 群では、FGF150 群よりも有意に皮弁壊死率が減少していた。

血管造影に関しては FGF150-AGHMs 群が、PBS-AGHMs 群及び FGF15-AGHMs 群に比較し有意に血管量の増加を示した。AGHMs を使用しなかった群では、有意に血管量が増加した群はなかった。また FGF150-AGHMs 群は、FGF150 群よりも有意に血管量が増加していた。

血管密度に関しては、FGF150-AGHMs 群において、PBS-AGHMs 群及び FGF15-AGHMs 群に比較し有意に肉様膜内血管密度が増加していた。AGHMs を使用しなかった群では、有意に血管密度が増加した群はなかった。また FGF150-AGHMs 群では、FGF150 群よりも有意に血管密度が増加していた。

## IV 考察

本研究では、ラット虚血皮弁の血行を改善し生着を向上させることを目的として、bFGF を 2 つの手法を用いてデリバリーした。ひとつはプラスミド DNA の筋注にエレクトロポレーションを併用する遺伝子導入法、もう一つはタンパク徐放システムである AGHMs を利用する方法である。プラスミド筋注法は、

比較的安全で簡便な方法であるが遺伝子導入効率が低いという欠点があるため、本研究ではエレクトロポレーション法を併用した。bFGF プラスミドの筋注にエレクトロポレーションを併用した時のみ皮弁の生着が有意に向上しており、エレクトロポレーションの有効性が示唆された。一方の bFGF 含有 AGHMs は、重症虚血肢や虚血性心疾患に利用した場合、側副血行路が形成され虚血組織の血流が改善することが報告されている。本研究の結果から、虚血皮弁モデルにおいても AGHMs を利用した bFGF 投与が有効であることが示唆された。

血管新生因子の投与部位に関しては、**recipient bed** を選択した。虚血皮弁モデルに血管新生因子を用いたこれまでの実験では、皮弁内を投与部位に選択した報告が多い。一方、**recipient bed** は皮弁の生着に重要な働きを果たすと考えられているものの、血管新生因子の投与部位に利用した報告はほとんどなかった。本研究において、**recipient bed** への血管新生因子の投与が皮弁生着を向上させたことから、**recipient bed** が血管新生因子投与部位の選択肢のひとつとして適切であることが示唆された。

また、血管新生因子としては bFGF を選択した。血管新生には *vasculogenesis*、*angiogenesis*、*arteriogenesis* の 3 つの過程があることが知られている。**Recipient bed** と皮弁間に新しい血管構築を引き起こすには *angiogenesis* により **recipient bed** と皮弁間に微小血管網を形成し、その後 *arteriogenesis* により機能する血管に成熟

していくという2つの過程が必要になると思われる。これまで、bFGFとVEGFが血管新生因子として最もよく使用されてきたが、VEGFは主にangiogenesisに効果的であるため、angiogenesisとarteriogenesisの両方を促進するbFGFの方が、より本研究に適切な血管新生因子であると考えられる。

## V 結語

ラット虚血皮弁モデルのrecipient bedに対し、bFGFプラスミドDNAの筋注にエレクトロポレーションを併用した遺伝子導入法とAGHMsを用いたbFGFタンパク徐放システムの2つの方法を利用することにより、皮弁の生着が向上することが示された。