

論文の内容の要旨

論文題目　ブタ慢性心筋虚血モデルにおける、塩基性線維芽細胞増殖因子の
冠状動脈内徐放投与による側副血行路増生についての検討

指導教員　高本 眞一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻 心臓外科

縄田 寛

背景

心臓外科・循環器内科領域に於いて虚血性心疾患は主要な治療対象の一つであり、外科的には冠動脈バイパス術が、内科的には経皮的冠動脈形成術が広く行われている。しかしながら、一部の患者では従来のアプローチでは虚血心筋への血行再建が困難な場合がある。そういった治療抵抗性の虚血性心疾患は拡張型心筋症様の虚血性心筋症へと推移し、心移植の適応にすらなりうる。しかし日本における移植医療の現状は特に心臓に関して非常に厳しい。この現状で、自らの虚血心筋への血流の回復、そしてその結果得られるであろう心機能改善をもたらさうものとして、側副血行の発達を促す「血管再生治療」あるいは「治療的血管新生 (therapeutic angiogenesis)」の概念が 1990 年代より活発化してきた。この「血管新生 (angiogenesis)」は「血管が生えること」を広く意味するが、研究の発展から次の 3 つの用語がより厳密な表現として用いられる。すなわち、「**vasculogenesis** (脈管新生/血管発生/血管形成: 血流中に血管の前駆細胞が存在し、その細胞が血管新生の場所に運ばれてその細胞が分化することで血管が新しく作られる過程)」、狭義の「**angiogenesis** (血管新生: 血管が延びていく場所で、周囲の細胞が脱分化し、増殖して血管ができる過程)」、**「arteriogenesis** (動脈形成: 内皮変化に加え、壁細胞の遊走とリモデリングを伴い、より成熟した血管が出来ること)」である。

治療的血管新生に際しては、①投与する血管新生促成因子の種類、②それを投与する経路と期間の選定が大きな鍵を握る。投与する因子としては **arteriogenesis** を促進し、かつ **angiogenesis** を促進する能力を持つ塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が有力な候補としてあげられる。投与経路としては、「ドナー動脈」という概念が提唱されている。血管新生療法における虚血組織への豊富な血液供給を達成するためには、増生した側副血管は大きな容積と成熟した壁構造を持ち、血流と連絡がなくてはならないが、「ドナー動脈」とは、そうした十分な血流を有し、虚血組織の近傍に位置し、側副血行の発達をもたらす能力を有する血管を指し、投与の理想的なターゲットである。

二宮らは、慢性虚血心筋に対する機能的な側副血行路増生のために、ブタ慢性心筋虚血モデルにおいて *ex vivo* 遺伝子導入を行って経冠動脈的に bFGF を投与し、側副血行発達効果を示した。すなわち、アデノウイルスに bFGF 遺伝子を導入し、あらかじめ当該動物の皮下組織から採取し培養した自己線維芽細胞に同アデノウイルスを感染させた。これを経カテーテル的に冠動脈内投与し、4 週間後の側副血行の発達を確認した。自己線維芽細胞が冠動脈内に捕捉され、bFGF 遺伝子が発現してその生成物である bFGF が冠動脈末梢に作用し、側副血行の発達を促したものと考えられた。しかしながらこの手法には、臨床応用にあたって①清潔操作による細胞培養の確実性、②アデノウイルスを感染させることの倫理的問題、③遺伝子発現の安定性、に関して問題を有していた。

このため、本研究では近年の医用工学の発達から生み出されたドラッグデリバリーシステムの一手法として、酸性ゼラチンハイドロゲル (Acidic gelatin hydrogel: AGH) を用いた方法を採用することとした。このハイドロゲルを微粒子状にしたものが酸性ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィア (Acidic gelatin hydrogel microsphere: AGHM) であり、この AGHM に bFGF を高濃度で染みこませ、これを標的部位に投与する方法をとった。組織内にとどまったり血管壁に捕捉されたりした AGHM は、生体吸収性材料であるので、これが徐々に分解されるうちに、bFGF が緩徐に組織内に放出される。AGHM は清潔環境下での安定供給が可能で、生体吸収性であることから投与の際の倫理的問題はクリアされやすく、作成時の架橋を操作することで生体吸収速度を設定することが可能であるため徐放効果が安定している。

目的

この研究は、慢性虚血心筋における機能的な側副血行路を発達させるための戦略として、AGHM を用いてピンポイントで持続的な薬物投与を行うこと、さらに経路として先述の「ドナー動脈」経由の投与方法の有効性を検証するものである。薬物として bFGF を用いた蛋白治療の形を取り、ブタの慢性心筋虚血モデルを作成して行った。

方法

平均 29 μm の AGHM を作成し、生体吸収期間を約 14 日に設定した。予め 50 μg のヒト遺伝子組換え bFGF を 30 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解して高濃度 bFGF 液を作成、これを 1.5mg の乾燥 AGHM に浸透させることにより、bFGF 含浸 AGHM を作成した。他方で、対照の AGHM として、PBS のみを浸透させたものを作成した。これらの AGHM は生体内投与前に PBS を加え 2.5ml の浮遊液とした。

プロトコルの初日 (Day 0)、体重 27~31kg のオスの LW \times D 家畜豚に対し、全身麻酔下に、左第 3 肋間より胸腔内に至り、心膜小切開、左冠動脈回旋枝根部に内径 2.5mm の金属リングつきアメロイドコンストリクターを装着、留置する。またベースラインの心機能を評価するために心臓超音波検査を行った。22 頭の豚に対してこの手技を施して左冠動脈回旋枝領域の慢性虚血モデルを作成し、14 頭が耐術し、8 頭が AGHM の投与前に死亡した。

28 日後 (Day 28)、耐術した 14 頭の豚をランダムに 7 頭ずつに分け、一方の群を bFGF 群、他方の群を Control 群とした。カテーテルを右の総頸動脈から右冠動脈入口部へ挿入。bFGF 群の豚には bFGF 含浸 AGHM 浮遊液を、Control 群の豚には PBS 含浸 AGHM 浮遊液を、右冠動脈内に緩徐注入した。血清 CK-MB を AGHM 注入直後と注入後 24 時間で測定し、一連の操作に起因する心筋傷害を評価した。

AGHM 投与前後の心機能、側副血行の発達、心筋血流量を評価するために Day 28 およ

び Day 56 に心臓超音波、冠動脈造影、電気機械的マッピング (Electromechanical mapping: EMM、NOGATM システム) を行った。Day 56 には染料マイクロスフィアを用いた左室心筋の組織血流量測定、および組織学的検討を行った。

bFGF 含浸 AGHM の注入による影響の検証のため、3 頭の健康な豚の左冠動脈前下行枝に緩徐に bFGF 含浸 AGHM 2.5ml を注入した。心電図変化を検証し、1, 3, 5, 7, 10 日後の血液サンプルから、ELISA 法で血清 bFGF 濃度と CK-MB レベルを測定した。10 日後に動物を安楽死させ、心筋組織を切除摘出した。パラフィンの横切標本をヘマトキシリン・エオジン染色し病理学的に検討した。P<0.05 で統計学的有意差ありとした。

全ての豚が AGHM 浮遊液の注入後の 28 日間を生存し、2 頭で一過性の ST-T 変化が観察されたものの重篤な合併症はみられなかった。

結果

bFGF 群と Control 群とでアメロイドコンストリクター装着前の左室駆出率に有意差はなかった。Day 28 にあっても両群間の駆出率に有意差はなかった。これに対し、Day 56 では bFGF 群の駆出率は Control 群の駆出率よりも有意に良好であった。

bFGF 群と Control 群とでアメロイドコンストリクター装着前の左室後壁厚に有意差はなかった。Day 28 には両群とも Day 0 と比して有意に壁厚の減少を認めたが、群間の後壁厚に有意差はなかった。Day 56 では bFGF 群では Day 28 に比して有意に壁厚が増加した。冠動脈造影で左回旋枝の完全閉塞を AGHM 投与前に確認した。Day 56 における Rentrop score は bFGF 群に於いて Day 28 のものよりも有意に高かった。しかし、Control 群では、有意な上昇は見られなかった。

電気機械的マッピングデータ収集箇所の数値は 66±16 箇所であった。bFGF 群では、部位ごとの検討で、Day 28 に比して Day 56 で心基部後壁の LLS が有意に高値であった。心基部側壁の LLS は Day 56 で高い傾向が見られた。左室壁全体での検討では、bFGF 群において、Day 28 に比し Day 56 の LLS が有意に大きく、UpV に関しては有意差を認めなかった。一方、Control 群において LLS と UpV の両方で、Day 28 と Day 56 との間に有意差を認めなかった。切除された左室心筋の重量は bFGF 群と Control 群とで有意差はなかった。虚血領域(左回旋枝領域)では、局所血流量は bFGF 群では Control 群よりも有意に大きく、非虚血領域では、両群間に差はなかった。

α SMA と vWF の二重染色によって arteriole は bFGF 群で多い傾向にあり、venule と capillary は bFGF 群で有意に多かった。

正常豚の左冠状動脈に bFGF 含浸 AGHM を投与したところ、経過を通じて CK-MB の血清レベルに有意な上昇は見られなかった。1 日、10 日後の心筋の組織では心筋に捕捉された AGHM を認め、明らかな炎症細胞の浸潤や線維化は AGHM の周りには確認できない。

結論

本研究では bFGF 含浸 AGHM を豚の心筋虚血モデルのドナー動脈に注入することを通じ、bFGF の冠動脈内徐放投与の有効性を検証した。この AGHM は冠動脈内に注入して安全であったし、右冠動脈から左回旋枝領域への側副血行を有意に増加せしめ、虚血心筋の血液灌流と心機能回復をもたらした。この方法は臨床における難治性の虚血性心疾患に対する有望な方法論となりうると考えられる。