

冠動脈の発生・発達解析から発展させた虚血心筋への  
新生血管誘導法の開発

(課題番号 17591354)

平成17, 18年度科学研究費補助金 (基盤研究C)  
研究成果報告書



平成19年3月

研究代表者 上野敦子

(東京女子医科大学循環器内科学講座 助手)



冠動脈の発生・発達の解析から発展させた虚血心筋への  
新生血管誘導法の開発

(課題番号 17591354)

平成17, 18年度科学研究費補助金 (基盤研究C)  
研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 上野敦子

(東京女子医科大学循環器内科学講座 助手)

## 目次

はしがき .....	1
1. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表 .....	3
2. 研究成果	
1. この度の研究計画及び成果の概要 .....	5
2. ミズオオトカゲとグリーンイグアナの心臓の観察からのTransmyocardial perfusionに関する一考案 .....	9
3. 冠動脈の発生と発達に関する最近の知見 .....	13
4. 軽量で開閉可能な家兎耳介観察窓の開発 .....	19
3. 参考論文	
1. 女性の心血管疾患一次予防における低用量アスピリンについての ランダム化試験 .....	23
2. 心臓リハビリテーションとジェンダー .....	27
3. 虚血性心疾患の心臓リハビリテーションにおける喫煙者の心理的因子 .....	31
4. 末梢血白血球,血小板活性化指標より不安定プラークの安定化を 評価しえた不安定狭心症 .....	37
5. 心臓リハビリテーションの工夫 心臓リハビリテーションにおける 早期歩行患者教育の工夫 .....	41
6. 脂質代謝および炎症反応による虚血性心疾患の疾患管理 .....	45
7. 動脈穿刺部止血材料(バソシール)による経皮的冠動脈形成術後の の試み .....	49
8. Benefit of bilateral over single internal mammary artery grafts for multiple coronary artery bypass graftingSuperiority of bilateral internal thoracic artery grafting .....	55
9. Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes .....	63
10. Coronary artery bypass with only in situ bilateral internal thoracic arteries and right gastroepiploic artery .....	71
11. Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting .....	77
12. Chronic expanding intrapericardial hematoma after pericardial paracentesis .....	83
13. Journal of Artificial Organs 2005: the year in review .....	87
14. Local injection of a sustained-release antiandrogen formulation into a target prostatic site: an experimental study .....	95
15. Corrosion of stainless steel sternal wire after long-term implantation .....	101

近年、メタボリックシンドロームという言葉がメディアに盛んに登場するようになった。高トリグリセリド血漿、低 HDL 血症、耐糖能異常、高血圧などの症候を来し、動脈硬化が進展し脳卒中や虚血性心疾患を来しやすい病態である。この概念が提唱され我々医療従事者が意識するようになったのは、最近のことである。メディアに取り上げられることにより、より広く一般に知れ渡り関心をもたれ、我々医療従事者がその改善、予防を指導しやすくなったことは、日頃惑わされやすい患者さん達を相手に辟易していることを考えると、数少ないメディアの恩恵なのかもしれない。

2006 年の医療保険制度の改革で、心臓リハビリテーションに対する保険料が上げられ、適応も広げられた。高齢化社会の日本では、疾患の治療に対する医療費が莫大になってきていることから考えると、再発予防ということを目的の一つに挙げ、効果を上げている心臓リハビリテーションを普及しようという考えは当然の流れといっている。

虚血性心疾患における運動療法の概念が我が国で最初に提唱されたのは、1956 年のことである。しかし、実際に早期離床・早期退院のいわゆる早期リハビリテーションが行われるようになったのは、米国で早期リハビリテーションにより入院期間が短縮されたことの影響が大きい。さらに、我が国で心臓リハビリテーションが保険医療に組み込まれることになったのは 1983 年のことであるが、我が国に心臓リハビリテーションが普及するのは、虚血性心疾患の再灌流療法など再血行再建が普及されてきた 1990 年代になったからのことである。保険適応になって 14 年。今回の保険適応拡大でこれまでの狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患、開心術後に加え、心不全、大血管疾患、閉塞性動脈硬化症が新たに適応となり、これらの疾患のさらなる予後改善が期待される。

運動という人間本来の生理的行動が見直されている一方、分子生物学、サイトカインなどの免疫学、血管新生などの再生医学、遺伝子学など医学はさらに新しい分野へと発展している。しかし今現在、血管新生についてはなかなか結果が出せていない。そこで、血管新生についてさらに研究を進めていくことが必要であると考え、我々は血管新生研究に取り組んでいる。また、最先端の研究をしていく中で、どれか一つというのではなく、様々な分野での医療を組み合わせ、ヒトという複雑な生き物に相對していきたいと思うこの頃である。

1. 研究課題名：研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

冠動脈の発生・発達の解析から発展させた虚血心筋への新生血管誘導法の開発  
研究課題番号 17591354

【研究組織】

研究代表者 上野敦子（東京女子医科大学循環器内科助手）  
分担研究者 富澤康子（東京女子医科大学心臓血管外科助手）

【研究経費】

平成 17 年度	2,200 千円
平成 18 年度	1,300 千円
計	3,500 千円

【研究発表】

学術雑誌、他

1. 上野敦子, 村崎かがり. 【話題の論文】女性の心血管疾患一次予防における低用量アスピリンについてのランダム化試験. 血栓と循環;13:335-337, 2005.
2. 長山雅俊, 角口亜希子, 黛江里子, 伊達利恵, 石井典子, 大野加代子, 中野七重, 鈴木佐和子, 上野敦子, 平敦子, 高林和佳子, 住吉徹哉, 濱本紘, 細田瑛一. 脂質代謝および炎症反応による虚血性心疾患の疾患管理. 心臓リハビリテーション;10(2):233-236, 2005.
3. 佐藤章, 富澤康子, 小森万希子, 高田勝美 軽量で開閉可能な家兎耳介観察窓の開発、呼吸と循環、55:359-362, 2007
4. Murakami Y, Yokoyama M, Okano T, Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Kurosawa H. A novel synthetic tissue-adhesive hydrogel using a crosslinkable polymeric micelle. J Biomed Mater Res A, Sep 29;80A(2):421-427, 2007
5. Goya N, Gotanda K, Sasaki T, Okada M, Tomizawa Y, Toma H. Local injection of a sustained-release antiandrogen formulation into a target prostatic site: an experimental study. BJU Int, Jan;99(1):202-206, 2007.
6. 富澤康子, 百瀬直樹：日本人工臓器学会 第2回人工心肺トラブルシミュレーション ウェットラボアンケート調査結果報告、体外循環技術、34:48-56, 2007年
7. Tomizawa Y, Hanawa T, Kuroda D, Nishida H, Endo M. Corrosion of stainless steel sternal wire after long-term implantation. J Artif Organs. 2006;9:61-66.
8. Sawa Y, Horiuchi T, Kishida A, Masuzawa T, Mizuguchi K, Nishimura M, Okoshi T, Shinzato T, Tatsumi E, Tomizawa Y, Watanabe H. Journal of Artificial Organs 2005: the year in review. J Artif Organs. 2006;9:1-7.
9. 富澤康子： 人工心肺を用いた体外循環に関する心臓外科医の安全対策、【人工心肺操作コース】、胸部外科 Up to Date 2006, Postgraduate Course, 第59回日本胸部外科学会 定期学術集会 p198-203

10. 富澤康子, 四津良平, 百瀬直樹, 安野誠, 又吉徹, 南茂, 見目恭一, 神谷勝弘. 【体外循環を安全に行うためのシミュレーション教育】 体外循環のトラブルシミュレーション ウェットラボの経験. 人工臓器;35(1):233-236, 2006
11. Sughiura T, Nishida H, Ishitoya H, Tomizawa Y, Saito S, Endo M, Kurosawa H. Chronic expanding intrapericardial hematoma after pericardial paracentesis. J Card Surg, 21:491-493, 2006.
12. Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. J Artif Organs 2005; 8:137-42.
13. 富澤康子: 医師と技士の教育と連携はどうあるべきか、特集「体外循環」、人工臓器、34:238-240, 2005
14. 富澤康子. 人工血管開発の課題と展望. In: 許俊鋭, 斉藤明, 赤池敏宏, eds. 人工臓器・再生医療の最先端. 先端医療シリーズ 37. 東京: 先端医療技術研究所; 2005:122-125.
15. Komori M, Tomizawa Y, Takada K, Ozaki M. A single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber. Anesth Analg 2005; 100:830-4.
16. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Uezono S, Nishiyama K, Ozaki M. Effects of Colloid Resuscitation on Peripheral Microcirculation, Hemodynamics, and Colloidal Osmotic Pressure During Acute Severe Hemorrhage in Rabbits. Shock 2005; 23:377-382.
17. Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Kurosawa H. Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting. Circulation 2005; 112:I299-303.
18. Tomizawa Y. Endothelialization and functional neointima on vascular grafts in humans. Ann Thorac Surg 2005; 79:1465.
19. Sato M, Endo M, Tomizawa Y, Nishida H. Left ventricular true aneurysm with pseudoaneurysm detected five years and nine months following repair for oozing type free wall rupture. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 53:147-9.

#### 学会発表

1. 保坂元子, 高木厚, 新井光太郎, 作田晶子, 栗原朋宏, 鈴木香里, 長嶋道貴, 上野敦子, 山口淳一, 新井清仁, 石塚尚子, 鶴見由紀夫, 笠貫宏. 心筋コントラストエコー, 経胸壁ドプラー超音波および心筋MRIで評価し得た, たこつぼ心筋症の1例. Journal of Cardiology;45(5):232-233, 2005.
2. 鈴木太, 長嶋道貴, 新井清仁, 保坂元子, 栗原朋宏, 山口淳一, 上野敦子, 石井康宏, 高木厚, 鶴見由紀夫, 萩原誠久, 笠貫宏. 頭蓋内腫瘍生検後に頸静脈血栓症および肺血栓塞栓症を発症した一例. 脈管学;45(10):776, 2005.
3. 関口治樹, 長嶋道貴, 高木厚, 保坂元子, 新井清仁, 栗原朋宏, 山口淳一, 上野敦子, 石井康宏, 鶴見由起夫, 石塚尚子, 笠貫宏, 市川健一郎. 高齢で発見された非典型的BWG症候群の一例. Circulation Journal;69(Suppl.II):841, 2005.

## この度の研究計画及び成果の概要

東京女子医科大学循環器内科 上野敦子

### はじめに

ここでは本研究の全貌の大まかな理解のために、研究計画および成果のエッセンスを簡単に説明する。同時にこの研究を始めるにあたっての背景、社会的意義や位置づけについても明らかにしておきたい。そうすることによって、この研究の意義および成果の意味を浮き彫りにすることができ、また、この研究により導かれた論文、さらに我々の参考論文を読むに際して、一層深い理解が得られると思われる。

### 研究の背景および目的

血管新生因子による虚血心筋への血管新生療法を Yanagisawa-Miwa が雑誌 *Science* に 1992 年に報告してから、虚血心筋への新生血管の誘導が興味を持たれた。現在では、心筋梗塞後の心臓に血管新生因子をプロテインとして局所注入しても、あるいは遺伝子導入を行っても、血管新生は起こらないあるいは起こりにくいことが知られている。すなわち冠動脈の発生および発達を十分に理解したうえで、*molecular biology*, *genetics* そして *morphology* の基礎の上に成立する血管新生療法でなければ成功しないことは明らかである。なぜなら、*regional specification*, *cell differentiation*, *morphogenesis* および *growth* が大きな鍵を握っているからである。近年、冠動脈の発生と発達についての研究報告が多くみられるようになったが、まだ解決せねばならない問題は山積している。

本研究では、発生学的に心血管形成機序を学び、冠動脈の発生・発達を理解し、虚血性心筋への新生血管誘導療法の可能性を検討することを計画した。本研究を行うことにより、臨床の現場で問題となっている外科的血行再建術では再建できない細小血

管の領域を治療する糸口がつかめる可能性があると考えた。

冠動脈は横中隔 *septum transversum* 由来の *proepicardial organ (PEO)* 組織から形成されることは明らかにされたが、冠血管の発生について分子レベルでのメカニズムの研究は始まったばかりであり、冠動脈の血管新生は他の血管系と異なるのか、また同じシグナル分子が働くのか、PEO 上皮細胞が心臓に遊走を促す因子は何か、心外膜から産生されるシグナル分子が何か、それらのシグナルは他の部位での上皮-間葉転換システムとの違い、間葉細胞の制御方法、など解明されていない項目が多数ある。そのため、その解明を試み、心臓への新生血管の誘導法を開発するきっかけをつかむことを計画した。過去から使用されてきた発生・発達を解明するためのモデル生物を駆使し、最先端の分子生物学的技術および手法を用いて、冠動脈の発生と発達に関しての十分な知識を持って、虚血心筋へ新生血管を導く方法を開発することを考えた。

### 学術的な特色、独創的な点及び予想される結果と意義

①冠動脈は横中隔由来の *proepicardial organ (PEO)* に由来することを含め、生物発生学的に心血管形成の機序を解明する。②ニワトリ胚およびマウス胎仔を用いて正常発生の初期の段階における領域の特異化から冠動脈の発生・発達を解明する。③ PEO 細胞の接着、遊走、方向性を制御している細胞接着因子に注目する。特に *VCAM-1*、 $\alpha 4$  *integrin* が重要であると考えてた。④ニワトリ胚にウズラ PEO を移植するキメラ胚に蛍光マーカーを用いる細胞標識法を用い細胞の動向を観察する。これにより PEO の広がりが見ることが出来る。⑤近位冠動脈口開口/

形成の解析を細胞死を組織学的染色にて行う。以上を本研究の特徴と考えた。

## 国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

発生初期の heart tube は心筋層と心内膜層の2層から構成される。1909年に Kurkiewicz が心外膜は静脈洞領域から発生すると報告した。以前は、心筋と心外膜は原始心臓管の外上皮 outer epithelium である共通の源から生じるとされていた。すなわち、Manasek FJ および Ho E らの研究がなされるまでは outer epithelium は心筋心外膜層 myoepicardium または epimyocardium とされたが、その後、ニワトリ胚およびマウス胎仔の観察から心外膜は静脈洞付近の proepicardial organ (PEO) から生じることが明らかになった。しかし、冠血管を構成する細胞はすべて心外膜由来かどうか、細胞系譜分化の決定時期および決定因子、原始細胞の制御方法、冠動脈の開口部位が大動脈にのみ接続する機序などを含め、明らかにされていない事項は多い。

血管新生および血管形成メカニズムの研究は著しく進んでいるにもかかわらず、臨床に役立てるほどには至っていない。虚血心筋への新生血管の誘導では細胞治療が研究されているが、こちらは臨床応用が機序の解明よりも先に行われており、試行錯誤を繰り返しているにすぎない。我々の研究は心血管形成機序の解明ばかりでなく、冠動脈の発生・発達からの虚血心筋への新生血管誘導法の開発をめざし、興味ある知見が得られるものと期待した。

## 本研究の着想に至った経緯

冠動脈の走行を Indian ink を用いて観察し、また心筋内を走行する冠動脈を可視化するために筋肉を透明化する技術の開発、冠動脈口の開口が細胞死から起こることが免疫染色によりしめされている(宮川-富田幸子、冠疾誌、2004)。PECAM などの接着因子の関与を示したり、ニワトリ胚にウズラ PEO 細胞を用いたキメラ心臓を作成、

ニワトリ胚における proepicardial organ の観察、マウス胎仔の冠動脈の走行およびウズラ胚子の冠動脈などの検討により(宮川-富田幸子、冠疾誌、2004)、一層理解が深まっている。

## 研究計画

平成 17、18 年度の2年間での研究を計画した。

- 1 発生学的検討：冠動脈は無脊椎動物、および両生類(イモリ、サンショウウオ、ウシガエル)にはないが、ヒト、は虫類、鳥類にはある。魚類には冠血管がある種類と無い種類があり、ゼブラフィッシュにはある。冠動脈の走行にも種により特徴があり、鳥類では中隔枝は右冠動脈から分岐する。は虫類の心筋の形態および冠動脈についての検討(富澤康子、冠疾誌 1998)された。
- 2 冠動脈評価①【adult 脊椎動物】：マウスの冠動脈の走行、分岐の評価。麻酔下に開腹し、後大静脈よりヘパリン生食を灌流したのち、開胸して立体顕微鏡下に大動脈起始部から圧をかけて注射器で Indian ink を注入した後、心臓をホルマリンで固定し、エタノールで徐々に脱水し、最後にサリチル酸メチルと安息香酸ベンジル(1:1)溶液で筋肉を透明化する。
- 3 冠動脈評価②【脊椎動物の胎仔および鳥類の胚】：冠動脈の鋳型を作成し、発生段階の冠動脈の走行および分岐を観察する。樹脂の硬さの選択種類が多い Microfil (Flow Tech, Inc., MA, USA) の黄色を使用する。これは specific gravity: 1.04, viscosity, centipoise 25, Gel time 90 分の性質を持つ。作成方法は妊娠マウスの子宮から胎仔マウスを摘出し、臍帯血管からヘパリン生食水を注入し灌流した後、臍帯血管に Microfil を注射針を用いて注入する。筋肉の透明化は 2. と同じ。鳥類の胚においても注入法は原則として同じである。この方法では胎仔でも臍帯血管から樹脂を注入する



ために施行可能である。しかし、大血管と冠動脈の連続性がでてくるまで、冠動脈には注入されない。

4 **Proepicardial organ の観察①【キメラ心臓に蛍光マーカの使用】**：冠動脈は横中隔由来の proepicardial organ (PEO)に由来するが、生物発生的に観察し、心血管形成の機序を解明を試みる。ニワトリ心にウズラ PEO を Manner J (Anat Rec, 255: 212, 1999)の方法にて移植したキメラ心臓を作成する。Mitotracker を蛍光マーカとして用いる細胞標識法を行い、細胞の動向を評価する。孵卵7日目にウズラ PEO 細胞がニワトリ胚の心室後壁に広がっているのを観察し、実体普通顕微鏡での観察と同時に、実体蛍光顕微鏡での観察を行い蛍光マーカの移動が観察されている(宮川-富田幸子、冠疾誌、2004)。

5 **Proepicardial organ の観察②【ニワトリ胚を用いて】**ニワトリは 20-21 日で孵化するが、PEO 出現は 3 日(Hamburger and Hamilton stage; HH16-17)、PEO の心筋接着は 3 日(HH18)、冠血管新生は 3.5-4 日(HH21-23)、心外膜完成は 5 日(HH26)、冠動脈-大動脈壁の開口は 6.5 日(HH29-30)で起こるということが Tomanek RJ (Cardiovasc Res, 31 Spec :E46, 1996)および Reese DE (Circ Res, 91: 761, 2002)により明らかにされた。これらの stage を参考にする。Hamburger and Hamilton stage (HH)16 胚(約 2 日胚、)および 17 胚(約 3 日胚)の proepicardial organ を中心に、また心房と心室の間に索状の proepicardial organ に注目した。

6 **冠動脈口の形成過程の観察**：大動脈と血管のリモデリングに apoptosis が重要な役割を果たす。そこで、大動脈周囲に分布する盲端血管が大動脈中膜に侵入し、大動脈の内皮細胞と連結するのに apoptosis を伴っている過程を示すために、① Indian ink で冠動脈内腔を染色して、また②試料を走査電子顕微鏡的に、そして③細胞接着因子を染色して観察

する。ニワトリ胚における冠動脈の形成過程を観察するために、Indian ink で染色した孵卵 7.5 日目では多数の毛細管と、その中に太い代表血管が大動脈と接続していた。ウズラ胚における冠動脈の形成の観察では PEO 細胞の接着、遊走、方向性を制御している細胞接着因子に注目した。特に VCAM-1、 $\alpha 4$  integrin が重要であると考えた。孵卵 10 日目に PECAM 染色すると太い冠血管が形成されてくるのが観察できる。また侵入した毛細管は血流により血管平滑筋が充実し、径が太くなるという経過をとる。

7 **虚血心筋への新生血管誘導法の開発**：器官形成と再生の過程では再生のための細胞の供給源が重要である。更新する組織に幹細胞が重要な役割を果たすと考えた。

## 研究成果と参考論文

この報告書の研究成果 2 としてまとめた「ミズオオトカゲとグリーンイグアナの心臓の観察からの Transmyocardial perfusion に関する一考案」は虚血性心疾患であっても外科的に治療できない症例における新生血管誘導を考えるきっかけとなった。冠動脈の発生は未だ解明されていない因子が多い領域で、「冠動脈の発生と発達に関する最近の知見」として最近の研究の方向性を示した。さらに創傷治癒における血管新生を観察するために、ネジで開閉可能にした REC を開発し、今まで、組織が脆くて組織学的評価が不可能であった血管芽の観察を行えるようにし「軽量で開閉可能な家兎耳介観察窓の開発」にまとめた。今後の新しい知見が期待される。

参考論文は本研究を進めていく上で重要であった循環器内科、心臓血管外科および人工臓器領域からの論文をあつめた。循環器内科領域からは「女性の心血管疾患一次予防における低用量アスピリンについてのランダム化試験」、「心臓リハビリテーションとジェンダー」、「虚血性心疾患の心臓リハビリテーションにおける喫煙者の心理

的因子]、「末梢血白血球,血小板活性化指標より不安定プラークの安定化を評価しえた不安定狭心症]、「心臓リハビリテーションの工夫心臓リハビリテーションにおける早期歩行患者教育の工夫]、「脂質代謝および炎症反応による虚血性心疾患の疾患管理]、「動脈穿刺部止血材料(バソシール)による経皮的冠動脈形成術後の試み」などの論文を重要であると考え選んだ。

虚血性心疾患の外科治療において、最近動脈グラフトの使用が増加している。内胸動脈の使用において2本と1本の使用での予後を比較して、「Benefit of bilateral over single internal mammary artery grafts for multiple coronary artery bypass grafting Superiority of bilateral internal thoracic artery grafting」をまとめた。さらに、糖尿病における動脈グラフトを使用しての血行再建術について検討し「Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes」とした。動脈グラフトの使用は利点が多くin situグラフトで検討したときの生存率を比較し「Coronary artery bypass with only in situ bilateral internal thoracic arteries and right gastroepiploic artery]、「Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting」の2つの論文とした。心臓血管外科での症例報告ではあるが、大変珍しい血腫症例を経験し「Chronic expanding intrapericardial hematoma after pericardial paracentesis」にまとめた。血腫には古いところと新しいところがあり、古い組織の間に出現した新しい血球を観察した。日本における人工臓器の開発はまだまだ発展しており「Journal of Artificial Organs 2005: the year in review」をreviewとしてまとめたが、中には世界的な研究が多数報告されている。

共同研究も最近は充実している。泌尿器科の医師とは前立腺肥大症を局所治療により治療し、ホルモンの全身投与による合併症を減らす試みを動物実験にておこない「Local injection of a sustained-release

antiandrogen formulation into a arget prostatic site: an experimental study」にまとめた。人工臓器の多くに金属が多く使われているが、30年も体内に植え込まれていた標本を摘出して観察することは稀である。摘出されても廃棄物として捨てられることがほとんどであるステンレスの胸骨ワイヤーを分析し「Corrosion of stainless steel sternal wire after long-term implantation」にまとめた。この結果では、アレルギー反応などなく植え込まれていたステンレスの表面は腐食していたが、それほど強くなく、強度に影響しないと思われた。

### まとめ

この度は『冠動脈の発生・発達の解析から発展させた虚血心筋への新生血管誘導法の開発』の研究を行ったが未だ解明されていない部分は多数あり、さらに研究を進めていきたい。