

# 論文要旨

## Repeated thermal therapy up-regulates endothelial nitric oxide synthase and augments angiogenesis in a mouse model of hindlimb ischemia

〔 温熱療法は、下肢虚血モデルマウスにおいて内皮型一酸化窒素合成酵素を強発現させ、血管新生を促進する 〕

赤崎 雄一

【序論および目的】 内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)から産生される一酸化窒素(NO)は、血管新生において様々な役割を担っている。一方、我々はハムスターにおいて温熱療法が動脈において eNOS を強発現させると報告した。そこで我々は、下肢虚血モデルマウスにおいて、温熱療法が血管新生を促進するかどうかを検討した。

【材料および方法】 アポリポrotein E (apo E)欠損マウスは高脂血症を呈し、血管新生が起こりにくく、下肢虚血による血管新生のモデルとして使用されている。このマウスの左下肢大腿動静脈の近位側から遠位側までを結紮後抜去し下肢虚血モデルを作成した。下肢虚血マウスはコントロール群と温熱療法群に分け、温熱療法群は遠赤外線乾式サウナ装置で41℃・15分間加温後、34℃・20分間の保温を追加し、これらを1日1回、5週間施行した。虚血作成後35日まで経時的にレーザードプラ計を用い下肢血流を測定し、測定値は虚血肢と非虚血肢の血流比で表した。ウエスタンブロット法でマウス下肢における eNOS と血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を検討した。虚血下肢における新生血管を評価するために、血管内皮を CD31 で免疫組織化学染色し血管密度を求めた。次に温熱療法による血管新生における eNOS の関与を検討するため apo E 欠損マウスに下肢虚血を作成し、NO 合成阻害剤である  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を投与し、温熱療法による血管新生における eNOS の関与を検討した。さらに、eNOS 欠損マウス(eNOS-KO)に下肢虚血を作成し eNOS の関与を検討した。

【結果】 温熱療法群ではコントロール群に比べ、下肢血流は改善し(温熱療法群 vs. コントロール群:  $0.79 \pm 0.04$  vs.  $0.54 \pm 0.08$ ,  $P < 0.001$ )、血管新生が促進された(温熱療法群 vs. コントロール群:  $757 \pm 123/\text{mm}^2$  vs.  $416 \pm 20/\text{mm}^2$ ,  $P < 0.01$ )。虚血下肢における VEGF の発現は、コントロール群と温熱療法群で差を認めなかったが、eNOS の発現は、温熱療法群でコントロール群に比較し増加していた。L-NAME 投与により温熱療法の血流改善作用は抑制され(温熱療法 vs. 温熱療法+L-NAME 群:  $0.80 \pm 0.06$  vs.  $0.45 \pm 0.07$ ,  $P < 0.001$ )、また血管新生促進作用も抑制された(温熱療法 vs. 温熱療法+L-NAME 群:  $757 \pm 123/\text{mm}^2$  vs.  $423 \pm 24/\text{mm}^2$ ,  $P < 0.01$ )。

さらに、eNOS 欠損マウスでは温熱療法による血流改善はみられず(eNOS-KO コントロール群 vs. eNOS-KO 温熱療法群:  $0.40 \pm 0.08$  vs.  $0.42 \pm 0.08$ )、血管新生促進は認められなかった(eNOS-KO コントロール群 vs. eNOS-KO 温熱療法群:  $357 \pm 20/\text{mm}^2$  vs.  $350 \pm 20/\text{mm}^2$ )。

#### 【考察】

我々は、下肢虚血モデルマウスを用いて、温熱療法による血管新生作用の機序を検討した。温熱療法により虚血下肢における血流、血管密度、eNOS 蛋白の発現が増加した。さらに NO 合成阻害剤 L-NAME 投与により治療効果が障害され、NO が温熱療法による血管新生に重要な役割を担っていると考えられた。さらに、温熱療法は eNOS 欠損マウスの虚血下肢における血流、血管密度を増加させず、eNOS が温熱療法による血管新生において重要な因子であると考えられた。

NO は血管新生を促進する。eNOS 欠損マウスでは血管新生が抑制され、一方 eNOS 過剰発現マウスでは血管新生が促進されることが報告されている。また eNOS プラスミドの筋肉内注射により虚血下肢の血管新生が促進されることが報告されている。

eNOS は VEGF の下流で血管新生に関与していると考えられている。温熱療法は心拍出量を増加させ、血流増加により血管壁における「ずり応力」が増大することにより eNOS 発現を促進させると我々は考えている。温熱療法は虚血下肢における VEGF の発現を増加させなかったが、その下流に存在する eNOS 発現を増加させ、血管新生を促進した。従って、温熱療法は VEGF 自体を増やすことはないが、温熱療法の血管新生には虚血により発現する VEGF の存在は必要と考えている。

高コレステロールは側副血行の発達を阻害する。高コレステロールを呈するウサギや apoE 欠損マウスを用いた実験で、虚血下肢における血管新生が減弱することが報告されている。さらに、高コレステロール食を与えたラットの虚血下肢では血管新生は阻害され、その機序として NO 活性の低下が考えられ、NO 供与体である L-arginine 投与により、高コレステロールにより阻害された血管新生が回復したとの報告もある。この論文において我々は、温熱療法が高脂血症を呈する apoE 欠損マウスの eNOS を増加させ、虚血下肢の血管新生を促進させることを証明した。

eNOS の活性化と内因性の NO の生成は、血管新生を誘導する手段となりうる。温熱療法による eNOS 発現の増加は、遺伝子治療に比べると安全で安価であり、血管新生を促進する手段として優れた治療法である。今後、温熱療法は臨床において閉塞性動脈硬化症の新しい治療法として期待される。

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 626 号	氏名	赤崎 雄一
審査委員	主査	坂田 隆造	
	副査	坂本 泰二	宮田 篤郎

## Repeated thermal therapy up-regulates endothelial nitric oxide synthase and augments angiogenesis in a mouse model of hindlimb ischemia

(温熱療法は、下肢虚血モデルマウスにおいて内皮型一酸化窒素合成酵素を強発現させ、血管新生を促進する)

内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) から産生される一酸化窒素 (NO) は、血管新生において様々な役割を担っている。一方、心不全発症ハムスターの動脈において、温熱療法は eNOS を強発現させることが報告されている。本研究では下肢虚血モデルマウスにおいて、温熱療法が血管新生を促進するかどうかを検討している。

アポリポrotein E (apo E) 欠損マウスは高脂血症を呈し、血管新生が起こりにくい。本研究では、このマウスに下肢虚血モデルを作成し、マウスをコントロール群と温熱療法群に分け、温熱療法群は遠赤外線乾式サウナ装置で 41°C・15 分間加温後、34°C・20 分間の保温を追加し、これらを 1 日 1 回、5 週間施行している。虚血作成後 35 日まで経時的にレーザー Doppler 計を用い下肢血流を測定し、ウエスタンブロット法で下肢における eNOS と血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を検討している。虚血下肢における新生血管を評価するために、血管内皮を CD31 で免疫組織化学染色し血管密度を求めている。次に温熱療法による血管新生の機序を解明するため apo E 欠損マウスに下肢虚血を作成し、NO 合成阻害剤である  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を投与し、温熱療法による血管新生における eNOS の関与を検討している。さらに、eNOS 欠損マウスに下肢虚血を作成し eNOS の関与も検討している。

本研究で得られた新知見は以下の 4 点である。

1. 温熱療法群ではコントロール群に比べ、下肢血流は改善し、血管新生が促進された。
2. 虚血下肢における VEGF の発現は、コントロール群と温熱療法群で差を認めなかったが、eNOS の発現は、温熱療法群でコントロール群に比較し増加していた。
3. L-NAME 投与により温熱療法による血管新生促進作用が抑制された。
4. eNOS 欠損マウスでは温熱療法による血管新生は抑制された。

以上により、温熱療法は下肢虚血モデルマウスにおいて eNOS を強発現させ、血管新生を促進することが証明された。

本研究は、温熱療法による血管新生作用とその機序を解明し、閉塞性動脈硬化症に対する温熱療法の有効性に関し、いくつかの基礎的知見を提供した。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 626 号	氏名	赤崎 雄一
審査委員	主査	坂田 隆造	
	副査	坂本 泰二	宮田 篤郎

主査および副査の3名は、平成18年6月20日、学位請求者 赤崎 雄一君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 通常の野生型マウスを用いて虚血を作った場合は、どのような結果になるか？  
 (回答) 野生型マウスでは、4~5週間で健常側とほぼ同様の血流に改善します。

質問2) 温熱療法の開始時期は、今回は虚血作成直後より行っているが、虚血作成後時間をおいてから温熱療法を行うと効果はどうか？  
 (回答) 虚血作成後時間をおいてからの温熱療法の効果は検討していません。今回の結果から、温熱療法による血管新生の機序において、血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現が必要であると考えられます。従って、VEGF の発現が強い虚血作成早期の方が、より効果が高いと思われます。

質問3) 一酸化窒素 (NO) と VEGF のクロストークについて、一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の遺伝子治療では VEGF が上昇するとの報告もあるが、今回の結果との違いについてはどう考えるか？  
 (回答) そのような報告はありますが eNOS のトランスジェニックマウスでは VEGF は上昇していないとの報告もあり意見が分かれています。今回の実験では eNOS が増えても VEGF が増えていないことから、我々は eNOS が VEGF を増やすことはないと考えています。

質問4) VEGF 存在下で温熱療法を行うと、相互作用で血管新生を促すと考えられるか？  
 (回答) 今回の結果において、VEGF が発現している虚血部位で eNOS 発現が増強すると血管新生が促進されたことから、遺伝子治療などで VEGF を強発現させた状態で温熱療法を行えば、更に効果があるのではないかと考えられます。今後検討していく予定です。

質問5) shear stress により eNOS が増加することは確かめられているか？  
 (回答) 心不全で shear stress が低下することで eNOS 発現が低下することは報告されています。我々は以前に、心不全発症ハムスターに温熱療法を行い eNOS 蛋白と eNOS mRNA が増加していることを報告しており、shear stress の増加が eNOS を増加させると考えています。

質問6) NO 産生が増加することにより CD34 陽性幹細胞が増加するとの報告があるが、温熱療法により NO 産生が増加すると、CD34 陽性幹細胞は何%ぐらい増加すると考えられるか？  
 (回答) 実験ではフローサイトメーターを用い、臨床では taqman PCR を用いて、現在検討中です。臨床では、2例の結果が出ていますが、温熱療法前に比べて4倍ぐらいに増加しています。今後、症例を増やして検討したいと思ひます。

質問 7) 温熱療法の温度設定は、どのように決めたか？

(回答) 臨床における温度設定は、深部体温が 1℃上昇するように設定されています。臨床と同様にマウスの深部体温を測定し、深部体温が 1℃上昇するように温度条件を設定しています。

質問 8) 臨床での血管新生の評価法は、どのような方法で検討しているか？

(回答) ABPI (ankle brachial pressure index)、pain score、6 分間歩行、レーザードプラ計、サーモグラフィ、経皮的酸素分圧、潰瘍サイズ、血管造影などで評価しています。

質問 9) 血中の NO 濃度はタイムコースで測定していないか？もっと早くに上がっていないか？35 日目にした根拠はあるのか？

(回答) 今回は 35 日目しか測定していませんが、もっと早い時期に NO が上がっている可能性もあります。今回は、レーザードプラ計を用いた血流測定で血流の改善がプラトーになった時点が 35 日目頃であり、その時点で NO 測定を行いました。

質問 10) 肝細胞増殖因子 (HGF) の遺伝子治療による効果と比較して、温熱療法の効果はどの程度の効果があるか？

(回答) 実験では比較できていませんが、これまでの臨床結果からは、ほぼ同等の効果が示唆されます。持続効果としては細胞治療や遺伝子療法では効果が徐々に低下することが報告されていますが、温熱療法を継続することでその効果は持続します。その点で温熱療法は優れていると思われます。

質問 11) 閉塞性動脈硬化症 (ASO) と Buerger 病では、温熱療法は同等の効果があるか？違うならば、何が原因で違うのか？

(回答) ASO については効果があることを十数例の症例で確かめられていますが、Buerger 病については、現時点で 4 例しか行っておらず、まだ同等の効果が得られると判定できていません。病気の原因、年齢などが違うので、効果に差があるのかもしれない。細胞治療においても、Buerger 病に対する治療効果は ASO に対する効果に比べると劣ると言われています。細胞治療、遺伝子療法、温熱療法のいずれにしても増加する血管は小さい毛細血管です。ASO においては、毛細血管新生により血流が増加し、閉塞していた血管に血流が再開すると考えています。Buerger 病では、おそらく血管がアポトーシスで途絶してしまうため、温熱療法を含め血管新生は効果が弱いのではないかと考えています。

質問 12) 温熱療法により eNOS の発現が増加する機序は、どのように考えるか？

(回答) 温熱療法により心拍出量が増え、血管における shear stress が増加し、その結果 eNOS 発現が増強すると考えています。

質問 13) NO が増えて血管新生が起こるメカニズムは、どのように考えているか？NO が増えるだけでは血管新生を起こさないのか？

(回答) 今回の結果から、VEGF の存在下で NO 産生が増加することにより、血管新生が促進されたと考えています。健常肢では温熱療法により NO 産生が増加しても血管新生が起こらないため、VEGF の存在しないところでは、NO 産生が増加するからという理由だけで血管新生を起こすことはないと考えられます。つまり温熱療法は、VEGF の存在下で eNOS が活性化されることにより血管新生を起こすと考えています。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。