

冠状動脈等微小血管病変に対する

血管吻合術不要の新術式「バイオバイパス」の確立に関する研究

所属機関：近畿大学医学部奈良病院 心臓血管外科

研究者名：西脇 登

《研究の概要》

重症びまん性冠動脈病変が増加しており、DES 時代になり更に増加すると予想される。バイパス困難な重症病変を有する症例に対し、我々は、新たなる治療手段としてバイオ CABG を考案した。すなわち虚血心筋部位に bFGF 徐放化シートを貼付して血管新生を促し、更に心外血流源として右胃大網動脈を含む有茎大網で虚血部位を被覆する事により、外科的血管吻合不要のバイパスが作成可能であると考えた。慢性心筋虚血モデルをもちいて同仮説の証明をする事を今回の研究目的とした。

ウサギ慢性心筋虚血モデルにおいて、組織学的に血管径 $50 \mu\text{m}$ 以上の側副血管を認め、血管造影にていわゆる濃染像ではなく、可視可能な側副血行路を認めた。さらに、局所心機能を改善するに、十分な生理的心筋血流を回復することができた。

さらに、分子生物学的手法を用いて、単一の **growth factor** 投与に比較して、バイオ CABG において、心外血流源としての胃大網動脈からの **shear stress** により、血管新生 (**angiogenesis**) より生理的な側副血行路形成である血管形成 (**arteriogenesis**) が促されている事を証明した。

以上の動物実験による研究結果を踏まえ、現在、京大倫理委員会承認され、安全性・有効性ともに期待されるが、これらを確認すべく京大病院にて臨床試験を開始している。

共同研究者の氏名及び所属機関名

| | | |
|-------|-------------------------|---|
| 西脇 登 | 近畿大学医学部奈良病院 心臓血管外科教授 | 研究総括 |
| 鷹羽 浄顕 | 京都大学医学部 心臓血管外科大学院生 | 心機能評価及び血管造影による側副血行路 発達評価、その他手術手技全般 |
| 根本慎太郎 | 京都大学医学部 心臓血管外科助手 | Colored Microsphere 法による血流量評価、 免疫組織染色による組織学的評価 |
| 伊藤 裕 | 京都大学医学部 臨床病態医科学助教授 | Western Blotting 法及び RT-PCR 法を用い た分子生物学的評価 |
| 米田 正始 | 京都大学医学部 心臓血管外科教授 | MRI を含む生理学的心機能評価 |

研究報告

I 研究目的

近年の虚血性心疾患に対する治療の発達にも関わらず、重症冠動脈疾患では、病変がびまん性で末梢に及んでいるため、冠動脈バイパス術などの従来の治療法の適応不可能な症例が増加して来ている。このような重症冠動脈疾患患者に、新たなる治療手段として、増殖因子を局所投与する血管新生療法を応用し、無数の側副血行を作ることによって血管吻合術不要の術式を開発応用することが必要である。我々はこのコンセプトを“Bio-CABG”と名付けている。

具体的には虚血心筋部位に血管増殖因子の1つである塩基性繊維芽細胞増殖因子 basic fibroblast growth factor (bFGF) を投与し、局所での血管新生を促し、新生血管への心外血流源として、虚血部位心外膜に大網を被覆し、側副血行による血流増加をはかる血管吻合術不要のバイパスを作成する術式である。

現在、その機序は十分に解明されていないものの、増殖因子の血管新生効果は明らかであるが、増殖因子の単独投与では、血管新生効率が悪く、何らかの手段により対象領域に安全で確実に増殖因子を分配する方法の開発が待ち望まれていた。また、大網組織は臨床的にも組織修復及び感染治療に有効な組織であり、人工心肺の開発以前には、狭心症の外科治療として、虚血心筋に有茎大網組織を移植していた。さらに、大網は心外血流源としての右胃大網動脈を有し、更に増殖因子の1つである血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) を分泌することが明らかとなっており、虚血心筋の血管新生においても有用な組織と考えられる。

ゼラチンを利用した bFGF 除放化シートを対象虚血心外膜に貼付し血管新生作用の持続性と効率性を高め、更に有茎大網組織を被覆することで血管新生促進効果+心外血流源の確

保により局所血流を増加させ、血管吻合術不要のバイパス作成が可能であり、虚血心筋の心機能を改善し得るという仮説を立てた。この仮説を元にウサギ急性心筋梗塞モデルにおいて検討を行い、良好な結果を得た。上記のウサギ急性心筋梗塞モデルを使った検討では左冠動脈回旋枝結紮にて急性心筋梗塞を作成した後、bFGF(100 μ g)シートを梗塞部位に貼付しかつ有茎大網組織で被覆した群は4週間後の心臓超音波検査により有意に心機能の改善を認め、さらに梗塞領域の広がり減少も認めた。Ex vivo 血管造影検査では胃大網動脈から心筋に広がる良好な側副血行路を認めた。加えて、免疫組織学的手法により新生血管数の有意な増加を認めた。これにより Bio-CABG の有効性と共に関臨床応用への展望が示唆された。(Ueyama K, et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004 Jun; 127(6): 1608-15.) この結果をふまえ、急性心筋梗塞とは心筋の状態の違う、臨床に多くみられる慢性心筋虚血モデルをもちいて同仮説の証明をする事を今回目的とした。また、慢性心筋虚血モデルにおいて同仮説が証明されれば、臨床的にみても低侵襲であるため、重症冠動脈疾患に対し、有力な治療手段となりうる術式であると考えている。

II 研究計画および材料と方法

研究計画

ウサギ慢性心筋虚血モデルを用いて Bio-CABG の治療的効果の評価およびその機序に関する研究を、以下の方法にて行なった。

研究方法

1) ウサギ慢性心筋虚血モデルの作成

日本白色ウサギに対し、全身麻酔下に左第四肋間にて開胸し、**ameroid constrictor** を左回旋枝に装着する事により、慢性心筋虚血モデルを作成した。モデル作成4週間後に治療群として、以下の3群に分けた。さらに4週間後に、各群の治療効果を以下の方法により評価した。

Group F : bFGF(100 μ g) シートを心筋虚血部に貼付

Group FG : bFGF(100 μ g) シートを心筋虚血部に貼付し有茎大網組織で被覆

Group N : 無治療群

2) 心核磁気共鳴検査 (Cardiac Cine MRI) を用いた局所心機能改善効果の評価

Siemens Sonata 1.5-Tesla 臨床用 MRI を用いて、pentobarbital による静脈麻酔下に、乳頭筋レベルにおける cine MRI 短軸像を撮像した。さらに、modified center line method により左回旋領域の局所壁運動評価である %wall thickening を測定し、治療前後における局所心機能を評価した。

3) Colored Microsphere 法を用いた左回旋枝領域での心筋局所血流量の評価

全身麻酔下に、左第三肋間開胸後、左房より直径 15 μm の colored microsphere を投与し、左回旋枝領域での心筋局所血流量を測定した。さらに、Group FG において、胃大網動脈遮断前後における、左回旋枝領域での心筋局所血流量の変化を同時に測定した。

4) 胃大網動脈からの側副血行路発達評価

以下の方法にて、側副血行路発達を評価した。

(a) 選択的血管造影による胃大網動脈からの側副血行路発達評価

Group FG において、全身麻酔下に左総頸動脈より、カテーテル挿入し、選択的に胃大網動脈を造影した。

(b) αSMA に対する免疫組織染色にて治療領域の新生血管数を評価

犠牲死後、左回旋枝領域の血管径 50 μm 以上の新生血管数を αSMA に対する免疫組織染色を行い評価した。

(c) Corrosion Cast による側副血行路発達の 3 次元的評価

5) 分子生物学的手法による側副血行路発達機序の解明および評価

(a) Western blotting 法

Group FG において、被覆大網組織からの各種 Growth factor の経時的タンパク質発現を評価した。

(b) RT-PCR 法

Arteriogenesis の分子生物学的指標である、左回旋枝領域心筋組織における MCP-1 おび eNOS の mRNA 発現を評価した。

III 研究成果

1) Bio-CABG による心機能改善効果

(a) 経胸壁心エコー

治療 4 週間後の心機能評価として、心エコー FS 値において Bio-CABG 群 (Group FG) は有意な心機能回復を示した。(Group FG: 32 ± 6 vs. Group F: 28 ± 4 , $p < 0.01$, Group N: $20 \pm 3\%$)

(b) Cine MRI (図 1.)

短軸像より左回旋領域の局所壁運動評価である % wall thickening において、Bio-CABG 群 (Group FG) は、有意な局所心機能回復を示した。(Group FG: 47 ± 6 vs. Group F: $34 \pm 4\%$, $p < 0.01$, Group N: $25 \pm 3\%$)

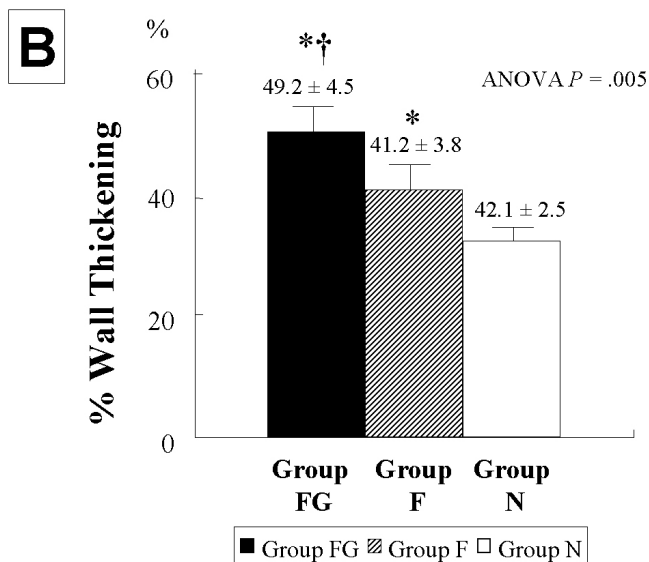
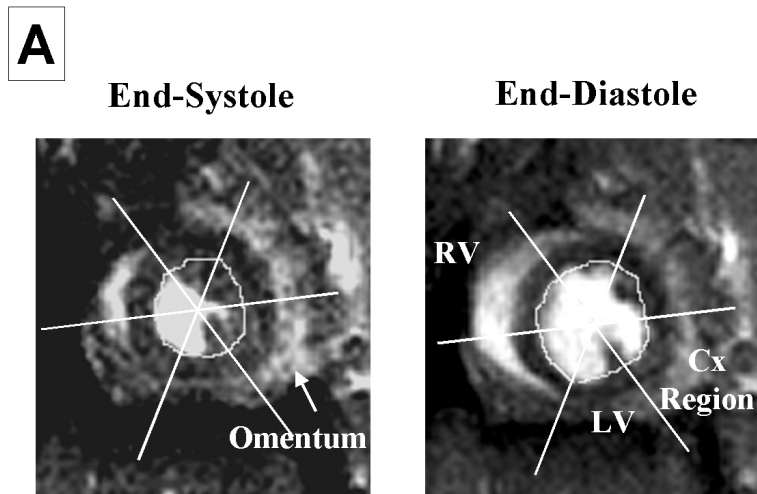


図 1.

- A. Cine MRI における乳頭筋レベルにおける左室短軸像
 B. 左回旋領域の局所壁運動評価である%wall thickening

2) Bio-CABG による虚血部位における心筋血流量の増加

Bio-CABG 群 (Group FG) は、虚血部位である回旋枝領域の有意な局所心筋血流量の増加を認め (Group FG: 2.83 ± 0.72 vs. Group F: 2.25 ± 0.51 ml/min/g, $p < 0.01$)、さらに Bio-CABG 群 (Group FG) において、胃大網動脈を遮断する事により、有意な心

筋血流量の減少を認めた。(遮断前: 2.83 ± 0.72 vs. 遮断後: 1.93 ± 0.59 ml/min/g, $p < 0.01$) (図 2.)

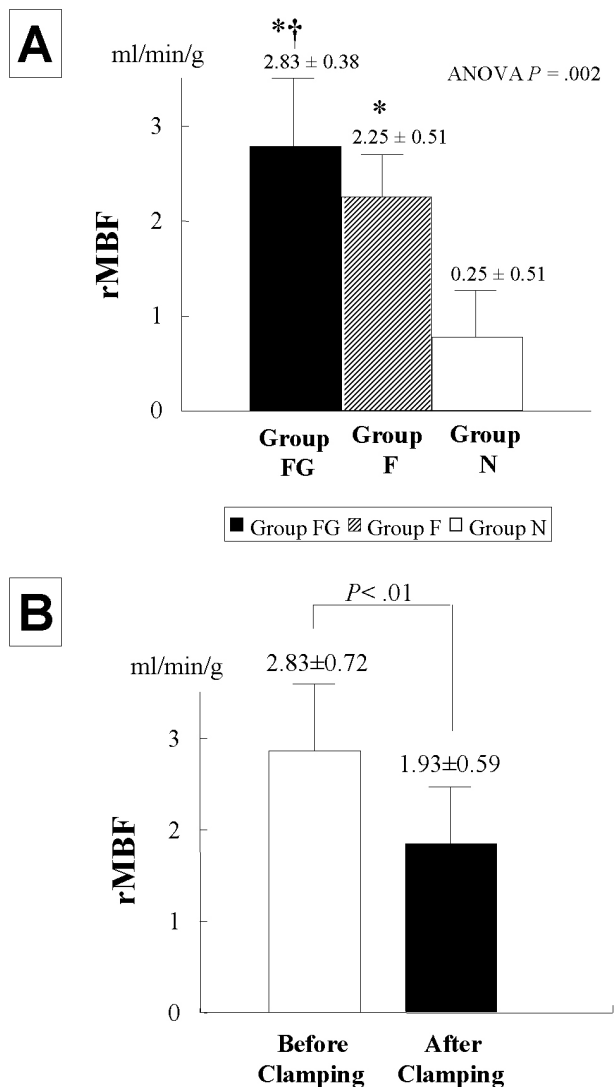


図 2.

A: Colored Microsphere 法による虚血部位である回旋枝領域の有意な局所心筋血流量

B: Bio-CABG 群 (Group FG) における、胃大網動脈を遮断前後の、回旋枝領域の心筋血流量の変化

3) Bio-CABG による胃大網動脈からの側副血行路発達評価

(a) 選択的胃大網動脈造影 (図 3.)

Bio-CABG 群 (Group FG) において、選択的に胃大網動脈を造影した所、胃大網動脈から閉塞冠動脈へ”to and flo”を示す可視可能な側副血行路を認めた。

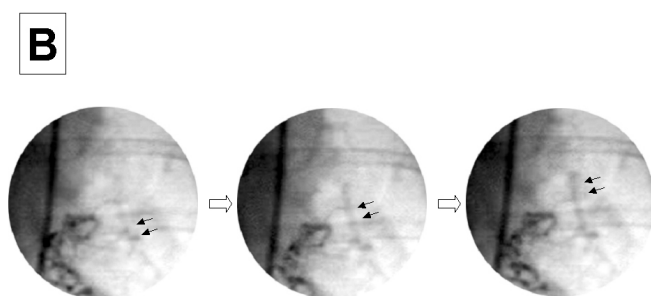
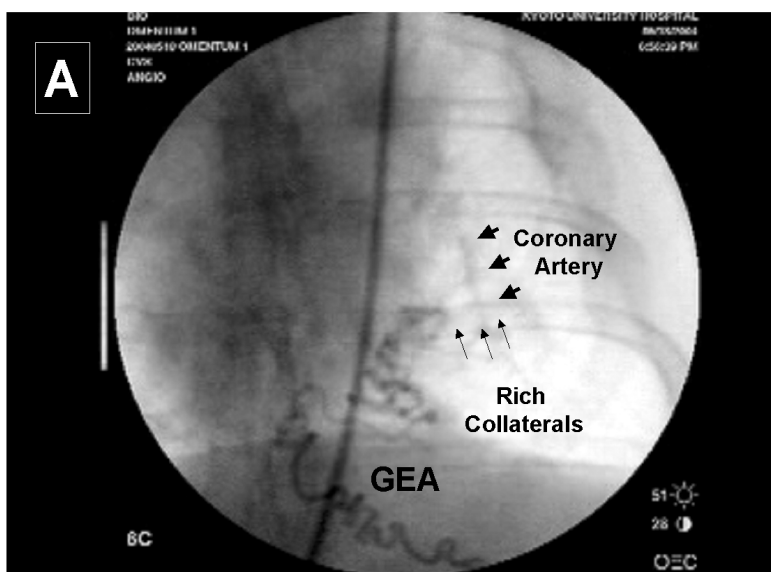


図 3.

A: 選択的胃大網動脈造影像

B: Bio-CABG 群 (Group FG) における胃大網動脈から閉塞冠動脈へ”to and flo”を示す可視可能な側副血行路

(b)免疫組織染色による新生血管数評価

Bio-CABG 群 (Group FG) において、血管径 $50 \mu\text{m}$ 以上の arteriole と考えられる側副血管数の有意な増加を認めた。

(c) Corrosion Cast による側副血行路 (図 4.)

Bio-CABG 群 (Group FG) において Corrosion Cast を作成し、走査電子顕微鏡 (SEM) にて、胃大網動脈から閉塞冠動脈への側副血行路の血管径を測定すると、 $150 \mu\text{m}$ 以上であった。

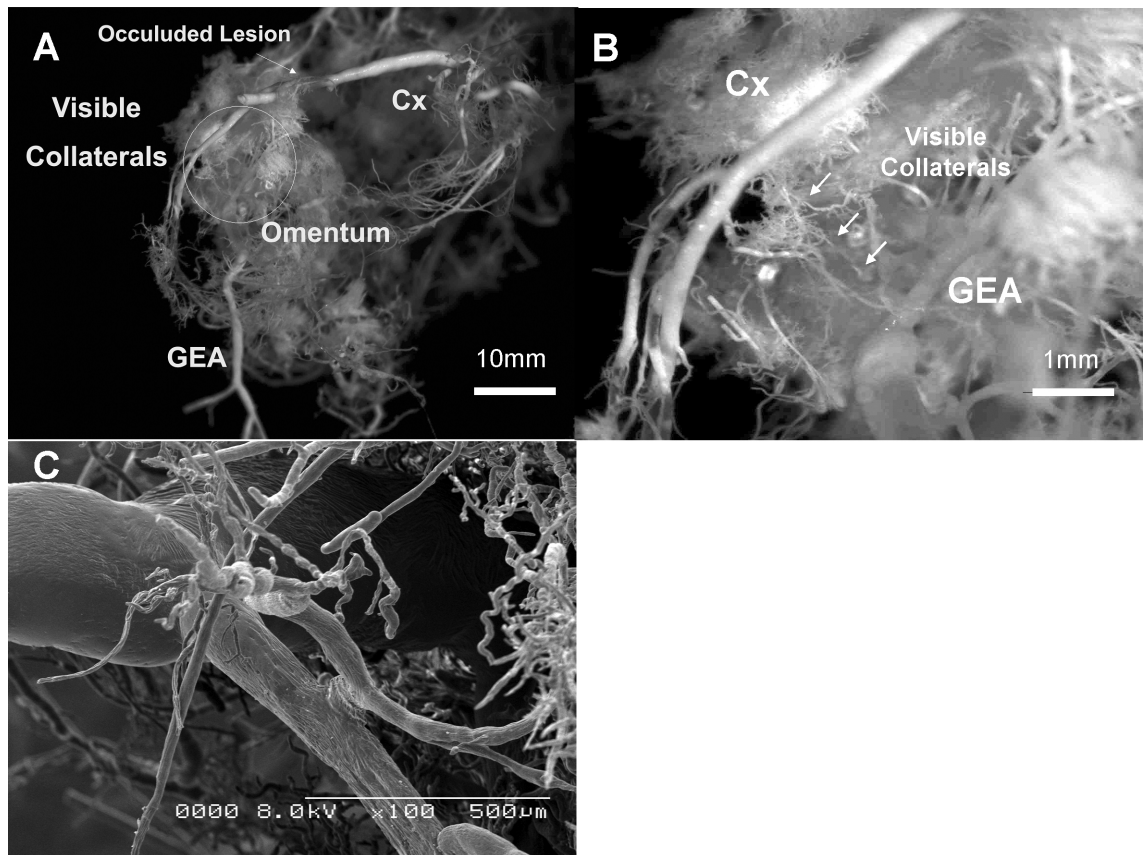


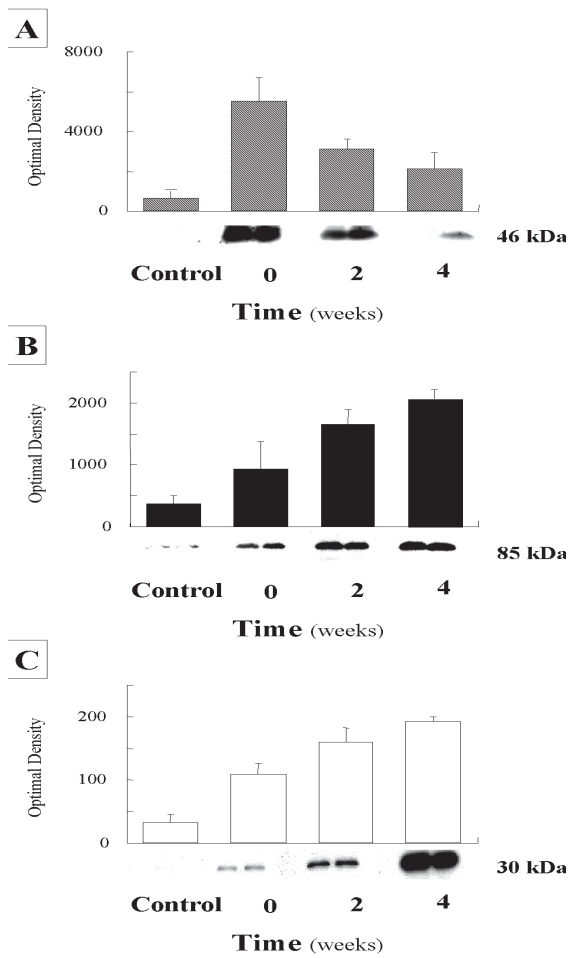
図 4.

- A: Collosion Cast による側副血行路全体像
- B: 胃大網動脈からの側副結血管の拡大図
- C. 走査電子顕微鏡(SEM)による、胃大網動脈から閉塞冠動脈への側副血行路

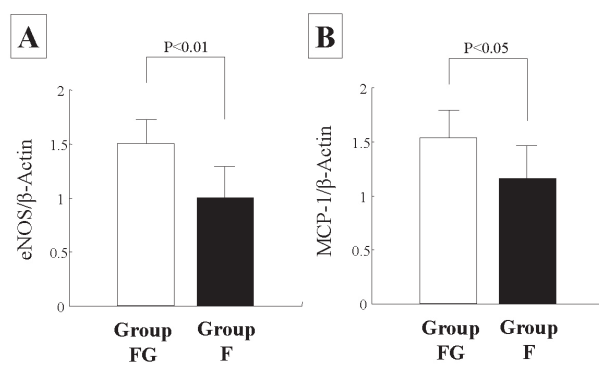
4) 分子生物学的手法による側副血行路発達機序の解明

(a) Bio-CABG 群 (Group FG) における、被覆大網組織からの各種 Growth factor の経時的分泌

Western blotting 法により、被覆大網よりの増殖因子の経時的分泌変化を検討した所、VEGF の分泌は、Bio-CABG 治療後 1 週間にて、最大となり、一方、HGF、PDGF-BB の分泌は、治療後 4 週間にて、最大となった。以上より、Bio-CABG 群において、被覆大網組織からの各種 Growth factor の経時的かつ相乗的効果により、単一の growth factor 投与と比較して、血管新生 (angiogenesis) より生理的な側副血行路形成である血管形成 (arteriogenesis) が促されていると推測された。



(b) 左回旋枝領域心筋組織における MCP-1 おび eNOS の mRNA 発現



Arteriogenesis の分子生物学的指標である、左回旋枝領域心筋組織における MCP-1 おび eNOS の mRNA 発現は、Bio-CABG 群 (Group FG) において有意に上昇していた。

IV 考察

本研究により、従来の治療法である PCI 及び CABG の適応外であった重症冠動脈病変を有する患者群に対し、Bio-CABG は有効な治療手段となり得ると考えられた。その機序として、単一の growth factor 投与に比較して、心外血流源としての胃大網動脈からの shear stress により、血管新生 (angiogenesis) より生理的な側副血行路形成である血管形成 (arteriogenesis) が促されている事が、示唆される。

現在、京大倫理委員会承認され、安全性・有効性ともに期待されるが、これらを確認すべく京大病院にて臨床試験を開始している。

V 研究成果の発表

1. 鷹羽浄顕、米田正始

DES 時代の再生医療

Coronary Intervention Vol.3 No.5 2004

2. 新井善雄、丸井 晃、田畑泰彦、米田正始

生体吸収性材料からの bFGF 徐放システムによる血管新生

J Jpn Coll Angiol,2005,45:145-150

3. Takaba K, Jiang C, Saji Y, Nemoto S, Ikeda T, Urayama S, Azuma T, Hokugo H, Tsutsumi S, Tabata Y, Komeda M.

Biologic Coronary Artery Bypass Grafting : A Combination of Omental Flap And Growth Factor Therapy Induces Arteriogenesis And Provides Excellent Myocardial Perfusion in Chronic Ischemic Myocardium

J Thorac Cardiovasc Surg (投稿中)

4. Takaba K, Miyashita K, Itoh H, Ikeda T, Nishiwaki N, Tabata Y, Nakao K, Komeda M

Mechanism of Arteriogenic Activity Induced by “Biologic Coronary Artery Bypass Grafting”: A Combined Therapy Involving Omental Flap And Controlled Release Growth Factor.

Eur J Cardiothorac Surg (投稿中)