



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Repeated phlebotomy augments angiogenesis to improve blood flow in murine ischemic legs(内容の要旨(Summary))
Author(s)	川村, 一太
Report No.(Doctoral Degree)	博士(再生医科学) 甲第833号
Issue Date	2010-07-21
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/36568

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本籍)	川 村 一 太 (岐阜県)		
学位の種類	博 士 (再生医科学)		
学位授与番号	甲第 833 号		
学位授与日付	平成 22 年 7 月 21 日		
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Repeated phlebotomy augments angiogenesis to improve blood flow in murine ischemic legs		
審査委員	(主査) 教授 竹 村 博 文		
	(副査) 教授 高 見 剛	教授 森 田 啓 之	

論文内容の要旨

瀉血による治療は19世紀には広く行われていたが、今日ではヘモクロマトーシスなどのごく限られた疾病に用いられているのみである。一方、瀉血は貧血を誘発し、組織の低酸素を来たす事で、血管再生作用を有する hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1 α) を活性化する。主にこの活性化により血中エリスロポエチン濃度が上昇するが、近年エリスロポエチンは直接的に、また血管内皮前駆細胞 (EPC) を誘導することにより間接的にも血管再生作用を有する事が知られている。そこで我々は、計画的な瀉血は内因性の HIF-1 α やエリスロポエチンを活性化し、虚血組織の血管再生を誘導すると考え、マウスの虚血下肢モデルを用いて計画的瀉血による血流改善の有無をみた。

【対象と方法】

9週齢のオス BALB/c マウスの右大腿動脈起始部を結紮した後、無作為に control 群 (n=7) と phlebotomy 群 (n=8) に振り分けた。phlebotomy 群では、結紮直後および1, 2, 3週後に毎回 200 μ l の血液を瀉血し、4週後まで観察した。sham 群 (n=8) では右大腿動脈起始部に糸を通過のみさせた。また、結紮直後から wortmannin (PI3K 阻害剤) (control:n=7, phlebotomy:n=9), L-NAME (eNOS 阻害剤) (control:n=9, phlebotomy:n=9), AMD3100 (CXCR4 拮抗薬) (control:n=8, phlebotomy:n=9) を投与し、同様に4週後まで観察する各阻害試験も行った。下肢血流は Laser Doppler imaging により、虚血下肢 (右) / 非虚血下肢 (左) 下肢血流比を計測した。

【結果】

ヘモグロビン値は phlebotomy 群において軽度ながら有意な低下を認めた (phlebotomy: 14.4 \pm 0.2 g/dl, control: 15.7 \pm 0.2 g/dl, sham: 15.6 \pm 0.2 g/dl)。下肢血流比は control 群と比し phlebotomy 群で2週後から有意に改善し、4週後まで継続した。免疫染色では、control 群と比し phlebotomy 群では有意に虚血下肢中の CD31 陽性細胞の増加すなわち血管新生の増加を認めたが、 α -smooth muscle actin は増加を認めなかった。血清エリスロポエチンは、phlebotomy 群でのみ他の2群と比し有意な増加を認めた。虚血下肢中の HIF-1 α および VEGF は、sham 群と比し control 群で有意な増加を認め、更に phlebotomy 群では他の2群と比し有意な増加を認めた。phospho-Akt および phospho-eNOS レベルは、phlebotomy 群において他の2群と比し有意な上昇を認めた。また、末梢血中に動員された EPC は phlebotomy 群のみで増加してい

た。wortmannin, L-NAME および AMD3100 による各種阻害試験では、各々ほぼ完全に瀉血による血流改善効果をブロックした。

【考察】

本研究の結果から、計画的な瀉血はマウスの虚血下肢の血流改善効果を有することが判明した。この血流改善は毛細血管の発達によるものであり、その機序は以下であると推測された。まず瀉血により生じた貧血が虚血下肢の低酸素状態に更なる影響を及ぼす事で、虚血下肢中の HIF-1 α 活性を来たし、活性化した HIF-1 α により虚血下肢中の VEGF や血中エリスロポエチン濃度の上昇など、様々な血管再生因子が誘導される。これらはいずれも PI3K/Akt pathway を活性化することで血管再生作用を来たす。また、エリスロポエチンはそれ自体が血管再生作用を有すると同時に、骨髄から末梢血への EPC 動員を誘導する作用を有する。Akt/eNOS pathway も同様に骨髄から末梢血への EPC 動員に重要な役割を果たしている事が知られているが、更に EPC の発現が eNOS の活性化に影響を与えているとの報告もある事から、これらは非常に複雑な相互作用をしながら血管再生作用を発揮していると考えられ、今回の各種阻害試験結果からも、各シグナルや EPC が複雑に相互作用している事が示唆される。

本研究の結果は2つの重要なメッセージを有していると考えられる。まず初めは、虚血モデルを用いた動物実験に於いて、頻回の採血はデータに何らかの影響を与える可能性があるため、慎重なプロトコール作成が必要である事。そしてもう1つは、計画的な瀉血は閉塞性動脈硬化症患者における血管再生療法の1選択肢となり得るという事である。本研究の瀉血量は1回につき成人で約500ml程度に相当し、貧血の出現も軽度である。従って、適応患者の選択には十分な慎重さを要するものの、瀉血自体は非常に安価で手技も容易である事から、臨床への適応も十分検討に値するものと考えられる。

【結論】

計画的な瀉血は、マウス虚血下肢モデルに於いて Akt/eNOS pathway の活性化および末梢血中 EPC の増加により、血流改善効果を有する。

論文審査の結果の要旨

申請者 川村一太は、計画的な瀉血が虚血下肢の血流を改善させることを見出し、そのメカニズムに、末梢血中の内皮前駆細胞増加ならびに虚血部位での Akt/eNOS 経路の活性化が関与することを明らかにした。本研究は、循環器病学の臨床面のみならず基礎研究面にも影響を及ぼす斬新かつ重要な知見を有するものと認める。

[主論文公表誌]

Itta Kawamura, Genzou Takemura, Hiromitsu Kanamori, Toshiaki Takeyama, Tomonori Kawaguchi, Akiko Tsujimoto, Kazuko Goto, Rumi Maruyama, Takatomo Watanabe, Takeru Shiraki, Takuma Aoyama, Takako Fujiwara, Hisayoshi Fujiwara, Shinya Minatoguchi : Repeated phlebotomy augments angiogenesis to improve blood flow in murine ischemic legs.

American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 299, 372-378 (2010)