

主論文の要旨

Zinc deficiency impairs ischemia-induced angiogenesis

〔 亜鉛欠乏が血管新生に与える影響についての検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 血管外科学分野

(指導：古森 公浩 教授)

鶴岡 琢也

【緒言】

末梢動脈疾患 (PAD) は進行性のアテローム性動脈硬化症であり、世界中で PAD の患者数が増加している。その中でも包括的高度慢性下肢虚血 (CLTI) の患者は、時として救命のために四肢の切断を必要とし、QOL の低下だけでなく寿命の低下も引き起こす。PAD は、身体活動低下、栄養過剰および低栄養など、生活習慣の問題によって発症するが、近年その中でも、微量元素の影響が注目されている。特に亜鉛は、多くの生理学的機能に關与する重要な必須微量元素であり、亜鉛欠乏は血管系を含む様々な発達に影響を及ぼす。しかし、PAD における亜鉛欠乏が血管新生に与える影響やメカニズムはいまだ明確ではない。今回、我々はその機序解明のため、1) 基礎研究：マウス虚血肢モデルを用いた動物実験によって亜鉛欠乏が血管新生能に与える影響を検討し、2) 臨床研究：CLTI 患者の血清亜鉛濃度と患肢の微小循環との関係を検討した。

【対象及び方法】

1) 基礎研究：野生型マウス (C57/BL6) に亜鉛欠乏食を週令 3 週より投与し、亜鉛欠乏モデルを作成。亜鉛欠乏 (ZD) 群と対照 (Control) 群について、週令 10 週で左大腿動脈を結紮し、虚血肢を作成。虚血後の血管新生能について、レーザードップラー法 (LDBF) によって虚血肢/健肢の血流を比較し、内転筋の筋線維中の毛細血管密度を CD31 免疫染色にて定量評価した。また、活性酸素種 (ROS) の検出を目的としてジヒドロエチジウム (DHE) 染色と血中 D-ROM 濃度を測定し、血清ニトロチロシンを ELISA で定量化した。筋組織中の NADPH oxidase (Nox) のサブユニット (Nox2、p22phox、p47phox、p67phox) および血管内皮増殖因子 (VEGF) を RT-PCR で解析した。亜鉛欠乏状態における抗酸化剤投与の影響を検討するため、ZD 群へアポシニンを経口投与して、LDBF および筋線維中の毛細血管密度を比較した。

2) 臨床研究：当院で 2012 年 5 月から 2016 年 3 月までの間に初回血行再建術目的で入院加療を行った下肢閉塞性動脈硬化症の CLTI 患者 51 人について、後ろ向きに検討した。患肢の微小循環の指標として足部の皮膚還流圧 (SPP) を使用し、亜鉛濃度を含む術前の採血データ、内服薬、併存疾患を調査した。

【結果】

ZD 群は Control 群と比較して、LDBF にて測定した虚血肢/健肢血流比が有意に低下していた。虚血肢の毛細血管密度も、ZD 群が有意に低かった。また、ZD 群は虚血組織の筋線維における DHE の発現は増加し、血中 D-ROM 濃度、血清ニトロチロシン濃度のいずれも有意に上昇した。虚血肢内転筋の RT-PCR の解析の結果、Nox のサブユニットはいずれも ZD 群で有意に増加し、VEGF の発現は低下した。ZD 群へアポシニンを経口投与することで、LDBF 測定における虚血肢血流、及び、毛細血管密度が改善した。

臨床研究において、CLTI 患者の血清亜鉛レベルは、患肢の SPP と正の相関を認めた ($r=.538$, $p<.001$)。多変量回帰分析では、CLTI 患者の血清亜鉛レベルが SPP と有意

に相関していることも明らかとなった ($p=0.001$)。

【考察】

今回我々の基礎研究では、野生型マウスにおいて、(1)亜鉛欠乏は虚血肢作成後の下肢血流回復率の低下と関連した、(2)亜鉛欠乏は ROS の増加と関連した、(3)Nox 阻害剤であるアポシニンの経口摂取によって下肢血流回復率が改善した、という結果が得られた。さらに、臨床研究においては CLTI 患者の亜鉛濃度と SPP の間に正の相関を認めた。それらの結果は、亜鉛が虚血環境下にある筋組織において、血管新生の調節因子として機能していることを示唆している。CLTI などの虚血性疾患の患者では、側副血管形成や血管新生を促進する治療が重要な意義を持つ。亜鉛補充はそれら虚血性疾患の治療に役立つ可能性がある。

亜鉛は抗酸化酵素の活性化、フリーラジカルの除去に重要な役割を果たすといわれており、亜鉛の予防的投与によって生体内の酸化ストレスを減少させ、グルタチオンやスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の増加を認めたという過去の報告もある。今回の研究では、亜鉛欠乏が虚血筋組織中の血管新生能の低下と関係し、虚血筋組織中および血中の ROS を増加させるという結果が得られた。さらに Nox 阻害剤の経口投与による血流改善効果を認めた。すなわち、亜鉛欠乏下では虚血組織における ROS が増加し、血管新生を障害する可能性があると考えられた。

また、本研究では、臨床において CLTI 患者の血中亜鉛濃度と SPP の正の相関を認めた。一般的に SPP 30mmHg 未満の状態では創傷治癒が期待できないとされており、さらに、我々は以前に、CLTI 患者において亜鉛欠乏が下肢動脈バイパス術後の救肢率の低下と関連していることを示している。これらのデータは、血中亜鉛レベルが CLTI の重症度を反映している可能性があることを示している。亜鉛欠乏症について報告されている様々なガイドラインでは、血中亜鉛濃度が 60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 未満で亜鉛欠乏症と定義され、60-80 $\mu\text{g}/\text{dL}$ は潜在性亜鉛欠乏症とされている。今回の調査対象となった 51 人の CLTI 患者では、平均亜鉛濃度は 62.3 \pm 16.9 $\mu\text{g}/\text{dL}$ と低い傾向を認めた。本研究では SPP のみが血中亜鉛濃度と相関しており、アルブミンを含めたその他データとの相関は認めなかった。栄養失調は亜鉛欠乏の要因となるものの、我々の結果は、CLTI の病状に関連する様々な要因が栄養状態よりも亜鉛欠乏によって影響を受ける可能性があることを示唆している。CLTI 患者にとって、栄養状態改善のために牡蠣や豚レバーなど亜鉛含有量が多い食品を積極的に摂取することが望ましい可能性があり、血中亜鉛濃度が極端に低い場合には、亜鉛製剤による補充療法が有益な可能性がある。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、血中亜鉛濃度を一点でしか測定しておらず、経時的変化を評価していない。第二に、亜鉛補充による効果が検討できておらず、亜鉛補充によって血管新生能が改善するかどうか、また CLTI 患者の予後を改善することができるかどうか調べられていない。第三に、CLTI 患者の筋組織サンプルを採取していなかったため、ヒトにおける血中亜鉛濃度と血管新生能との直接比較ができなかった。最後に、今回対象とした CLTI 患者のサンプルサイズが小さく、手術方法

など治療法や予後への影響が十分に検討できなかった。

【結論】

亜鉛欠乏は酸化ストレスを増大させることにより、虚血筋組織における血管新生能を低下させた。亜鉛の摂取を含む栄養学的アプローチは、虚血肢の予防または治療に役立つ可能性がある。亜鉛の予防効果や有用性については、今後の大規模研究でさらに検討していく必要がある。