

厚生科学研究費補助金
長寿科学研究事業

高齢者血管病に対する遺伝子治療ならびに内皮前駆細胞移植療法の開発
臨床応用を目指した基礎研究

平成12年度総括・分担研究報告書

主任研究者 江 頭 健 輔

平成13（2001）年4月

目次

1. 総括研究報告書	1 - 3 ページ
2. 分担研究報告書	
1) 動脈硬化に対する抗Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 遺伝子治療の有用性の検証 江頭健輔	4 ページ
2) 抗monocyte chemoattractant protein-1遺伝子治療による バルーン傷害後狭窄反応の抑制 江頭健輔	5 ページ
3) 臨床応用可能な新規遺伝子導入ベクターの開発とそれを用いた 我国独自の血管壁遺伝子治療法の確立 米満吉和、居石克夫	6 ページ
4) 研究成果の刊行に関する一覧表	7 ページ
5) 研究成果の刊行物・別刷	7 ページ

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

高齢者血管病に対する遺伝子治療ならびに内皮前駆細胞移植療法の開発
—臨床応用を目指した基礎研究—

主任研究者 江頭 健輔
九州大学大学院医学系研究科心臓血管病態制御学講座 循環器内科学 講師

研究要旨（概要）：

本研究の目的は、「高齢者血管病」の新たな治療体系を確立し、実際に臨床応用可能な臨床治験プログラム（遺伝子治療、骨髄由来内皮前駆細胞など）を構築し社会への貢献を目指すことである。本研究では、将来の医療を担う新しい治療法として期待されている遺伝子治療法や内皮前駆細胞移植法を活用して、高齢者血管病の新しい治療戦略の確立を目指す。このような新規治療戦略が21世紀を担う次世代医療として開発されれば、再生医学・医療の実践が促進され、社会ならびに国民の保険・福祉に対する貢献も極めて大きい。

本研究計画は以下の点からなる。1）我国独自の新規遺伝子の単離・機能解析を行うこと、2）我が国独自の新規ベクターの臨床応用を目指す、3）遺伝子導入法や骨髄細胞移植法などの新しい技術を活用して新規治療システムを構築すること、などである。

平成12年度は以下の成果を得た。1）機能が不明な遺伝子を2個単離し、全長塩基配列を同定した（未発表）。2）我々は、国産センダイウィルスベクターの開発に成功し、アデノウィルスベクターより優れた点があることを報告した（Nature Biotech 2000）。3）変異型 MCP-1 遺伝子を用いて抗 MCP-1 遺伝子治療が可能なことを独自に考案した（FASEB J 2000）。4）骨髄由来内皮前駆細胞移植療法により「心筋梗塞サイズが縮小する」ことを報告した（2001年1月学会発表）。

A. 研究目的

動脈硬化・血栓症に陥った血管の再生修復を目指す新たな治療システム（例、遺伝子治療、骨髄細胞移植など）の構築は我が国の医療・医学的だけでなく社会的にも早急に推進すべき重要課題である。本研究の目的は、「高齢者血管病」の新たな治療体系を確立し、実際に臨床応用可能な臨床治験プログラム（遺伝子治療、骨髄由来内皮前駆細胞など）を構築し社会への貢献を目指すことである。

B. 研究方法・計画ならびに研究結果

以下の4項目について研究する計画である。

1. “血管内皮細胞特異的に発現する新規遺伝子（日の丸遺伝子）の単離と機能解析”

我々は、subtraction hybridization 法を用いて血管内皮 NO 産生抑制によって増加する2個の新規遺伝子の単離に成功し、全長塩基配列を同定した。そのうちの一つは、心臓の発生分化に関与することが知られている転写因子 CSX の下流にある新規転写因子であった。

2. 新規遺伝子ベクターの開発と安全性試験

我々は、国産センダイウィルスの特性を明らかにした（Nature Biotech 2000、FASEB J 2001）。この新規センダイベクターは、1）遺伝子発現時間はアデノウィルスより数倍長く、2）繰り返し投与が可能である、など点で優れている。

3. 遺伝子治療戦略の確立

我々は、1）変異型 MCP-1 遺伝子（7ND mutant）が MCP-1 によって誘導される単球の遊走能を dominant-negative inhibitor として特異的に抑制すること、2）動物実験では骨格筋や皮下に導入したのち循環血中に分泌されること、3）分泌された変異型 MCP-1 は単球ならびにリンパ球の MCP-1 受容体（CCR2）に結合し炎症病巣への単球浸潤を著明に抑制できること、4）生体内導入によって明らかな副作用はないこと、などを明らかにした。

平成13年2月、臨床プロトコール「変異型 MCP-1 遺伝子を用いた抗 MCP-1 遺伝子治療法 ―冠動脈血管形成術後再狭窄の抑制を目指した臨床研究―」を九州大学医学部倫理委員会に申請した。

さらに、好中球の走化性に関与する IL-8 受容体をブロックできる変異型 IL-8 の作成に成功したの平成13年度の研究において抗 IL-8 遺伝子治療の有用性を検討する。VEGF 受容体、TNF α 受容体、TGF- β 受容体、NF- κ B 機能を阻止できる遺伝子などを、それぞれの遺伝子を開発した研究者から分与してもらっているので、これらのサイトカインの役割を生体レベルで明らかにする準備は整っている。

4. 骨髄由来内皮前駆細胞移植療法による治療的血管新生

昨年度、内皮前駆細胞移植によって移植細胞が血管新生ならびに細胞壊死の抑制に貢献すること、この効果が VEGF を介していること、などを、心筋梗塞モデル（冠

動脈結紮)や下肢虚血モデル(大腿動脈結紮)などを用いて明らかにした。

平成13年2月、臨床プロトコール「虚血性臓器障害に対する骨髓由来自家内皮前駆細胞移植療法」が九州大学医学部倫理委員会で承認された。

C. 考察ならびに結論

1. 新規遺伝子の単離に成功した。この遺伝子は既知のものであったがその機能は不明である。したがって、今年度は研究計画に記載した方法を用いて機能解析を行う。心臓の発生に重要な役割を果たす遺伝子である可能性がある。
2. センダイウィルスベクターの特徴を解析し、既存のアデノウィルスベクターと比較して、導入効率ならびに発現時間が長いことが明らかとなった。アデノウィルスで見られる毒性(例、炎症)は認めなかった。これらの知見はセンダイウィルスが血管壁遺伝子治療に有用なベクターであることを示唆する。
3. 変異型 MCP-1 遺伝子導入により生体レベルで遠隔臓器の MCP-1 受容体が抑制できた。この抗 MCP-1 遺伝子治療によって、高コレステロール食負荷による動脈硬化が抑制されプラーク安定化の指標が増加した。さらに、バルーン傷害後再狭窄反応モデルにおいて内膜肥厚ならびに陰性リモデリングが抑制されることが明らかとなった。この遺伝子治療法がヒト再狭窄の遺伝子治療法となりうることを示唆された。今後安全性に関する研究を進めていきたい。
4. 細胞移植の臨床研究は平成13年度には開始される予定である。実験研究成果は未発表であり、今後更なる研究を進めていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

変異型 MCP-1 遺伝子導入を用いて抗 MCP-1 遺伝子導入が可能なことを平成11年度に特許として出願した。

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 九州大学医学部 附属病院 循環器内科 江頭健輔

動脈硬化に対する抗 Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)遺伝子治療の有用性の検証

【研究要旨】本研究の目的は、この変異型 MCP-1 遺伝子を用いた抗 MCP-1 遺伝子治療法が動脈硬化に対する新規の治療戦略となるかどうかを明らかにすることである。ApoE欠損マウスモデルに 7ND 遺伝子あるいは対照遺伝子 (β galactosidase) の遺伝子導入を行い、高脂肪食 (western diet) を投与した。6週後に動脈硬化病変を評価したところ、動脈硬化病変が約30%抑制された。本研究により高コレステロール食負荷による動脈硬化の発生機序における MCP-1 の重要性が示された。我々の抗 MCP-1 遺伝子治療が動脈硬化の新しい遺伝子治療になる可能性が示唆された。

【緒言】

動脈硬化は血管壁の慢性炎症性疾患と認識されている。とくに、単球/マクロファージの接着・侵入が重要な役割を果たすとされている。

Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)は単球浸潤を特異的に制御するケモカインであることから、動脈硬化の成因との関連が注目されている。しかし、MCP-1が動脈硬化治療のターゲットとなるかどうかは不明である。

我々はヒト MCP-1 遺伝子の N 末端の 2-8 番目のアミノ酸を欠損した変異型 MCP-1(7ND)が MCP-1 受容体の dominant negative inhibitor として作用すること、7ND 遺伝子導入によって遠隔臓器の MCP-1 依存性炎症 (単球浸潤) を著明に抑制できることを明らかにした。昨年、この新しい抗 MCP-1 遺伝子治療法を用いて慢性の一酸化窒素産生抑制ラットモデルにおける冠血管の再構築(冠動脈中膜肥厚、線維化)が防止されることを明らかにした。

そこで本研究の目的は、高コレステロール血症を自然発症しヒトと類似した動脈硬化病変が発生する ApoE 欠損マウスを用いて、我々の抗 MCP-1 遺伝子治療が有効かどうかを明らかにすることである。

【方法】ApoE 欠損マウスに高脂肪食 (western diet) を負荷し進行性動脈硬化病変を作成した。これらのマウスに 7ND 遺伝子あるいは対照遺伝子 (β galactosidase) を高脂肪食負荷前と負荷 3週間後に、大腿骨格筋に注入した。遺伝子発現は少なくとも3週間は持続することを確認した。高脂肪食負荷6週後に動物を殺し、上行大動脈の動脈硬化病変を評価した。免疫組織化学法を用いて、MCP-1 発現部位を検討した。病理組織学的解析によって、内膜肥厚の程度ならびに内膜内のコンポーネント (単球・マクロファージによる炎症面積、脂質沈着面積、平滑筋面積、コラーゲン面積) を検討した。

【結果】

MCP-1 発現は、内膜細胞と内膜に浸潤した単球に認められた。

対照群と比較して、7ND 遺伝子投与によって、血管壁内への単球・マクロファージの侵入が30-40%減少した。これに伴って、動脈硬化の程度 (内膜肥厚) は、約30%抑制された。

さらに、動脈硬化病変内のコラーゲン増加、平滑筋増加、脂質沈着減少、炎症減少、が観察された。これらの指標からプラーク安定化インデックス {(コラーゲン+平滑筋) / (脂質沈着+炎症)} を計算すると、7ND 遺伝子投与群が有意に大きかった。

7ND 遺伝子投与は血清脂質には影響を与えなかった。

【考察】

本研究により高コレステロール血症による動脈硬化の分子機構に MCP-1 を介する単球マクロファージの接着侵入が重要な役割を果たすことが明らかとなった。7ND 遺伝子導入の抗動脈硬化作用が血清脂質の変化によってもたらされる可能性は否定された。

さらに、7ND 遺伝子導入によってプラーク安定化が促進されることも示唆された。このことは、MCP-1 を介する炎症がプラーク不安定化に貢献することを示唆するものである。

本研究により、この抗 MCP-1 遺伝子治療が動脈硬化の新しい遺伝子治療になる可能性が示唆された。今後、霊長類での有用性を確認し、臨床研究の実施に結びつけたい。

参考文献

Ni WH, Egashira K, Kitamoto S, Kataoka C, Koyanagi M, Inoue S, Imaizumi K, Akiyama C, Nishida K, Takeshita A. A New Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Inhibits Atherosclerosis in ApoE-knockout Mice. Circulation 4月号印刷中。

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

抗 monocyte chemoattractant protein-1 遺伝子治療によるバルーン傷害後狭窄反応の抑制

主任研究者 九州大学医学部附属病院 循環器内科 江頭健輔

【要旨】バルーンによる血管傷害後早期に monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現が増加する。本研究の目的は、バルーン傷害後狭窄反応に対する抗 MCP-1 遺伝子治療法の有用性を実証することである。高コレステロール食負荷ウサギ総頸動脈バルーン傷害モデルを作成した。遺伝子導入群で有意に血管壁へのマクロファージ浸潤が抑制され、新生内膜形成抑制・内膜/中膜比減少・陰性リモデリング抑制が観察された。本研究により、再狭窄反応の病態において MCP-1 が必須の役割を果たすことが明らかとなった。この遺伝子治療法がヒト再狭窄の遺伝子治療法となりうることが示唆された。

【目的】

バルーン血管形成術後の再狭窄は新生内膜肥厚と陰性リモデリング（血管収縮）によって生じるが、その分子機序は不明である。バルーンによる血管拡張後早期に monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現が増し単球・マクロファージの血管壁内進入が生じることが明らかにされている。また、この炎症性変化が狭窄の成立に関与する可能性が示唆されている。しかし、この点を証明した研究はない。最近我々は変異型 MCP-1 遺伝子導入によって MCP-1 による炎症が阻止されることを発見した。そこで本研究の目的は、この新しい方法を用いてバルーン傷害後血管狭窄反応に対する MCP-1 の役割を実証することである。

【方法】

高コレステロール食負荷 2 週間投与後、ウサギ右総頸動脈を露出し同外頸動脈より Fogarty catheter を挿入しバルーン傷害モデルを作成した。手術の 3 日前、右大腿筋内に変異型 MCP-1 遺伝子(500 μ g+electroporation 法、n=9)あるいは、PBS(PBS+electroporation 法、n=8)を筋注した。手術 4 週間後に、頸部エコーを施行した。3日後、7日後、28日後に病理組織学的検索を行った。

【結果】

1. マクロファージ浸潤の抑制効果：内膜・中膜のマクロファージ比率 (RAM11 陽性細胞数/全細胞数) は、7ND 群 (28日後、25 \pm 5%、22

\pm 0.1%) で、PBS 群 (28日後、33 \pm 0.3%、51 \pm 0.1%) と比較して有意に少なかった。2. 新生内膜抑制効果：内膜面積は PBS 群 0.65 \pm 0.02mm²、7ND 群 0.39 \pm 0.04mm² であり、7ND 群で有意に小さく内膜肥厚が抑制されていた。内膜/中膜比も 7ND 群で有意に小さかった (7ND 群：0.7 \pm 0.06、PBS 群：1.1 \pm 0.12)。3. 陰性リモデリング抑制効果：エコーでの血管内径は、7ND 群 2.1 \pm 0.04mm、PBS 群 1.7 \pm 0.04mm であり、7ND 群で PBS 群に比し有意に広がった。

【考察】

変異型 MCP-1 遺伝子導入による MCP-1 活性の抑制により、高コレステロール血症ウサギのバルーン傷害後再狭窄モデルの内膜肥厚ならびに陰性リモデリングは著明に抑制され、狭窄が防止された。本研究により、バルーン傷害後再狭窄反応の病態において MCP-1 が必須の役割を果たすことが明らかとなった。この新規遺伝子治療法がヒト血管形成術後再狭窄の遺伝子治療法となりうることが示唆された。

【参考文献】

Egashira K, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats. FASEB J 2000; 14: 1974-1978.

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業） 分担研究報告書

臨床応用可能な新規遺伝子導入ベクターの開発とそれを用いた我国独自の血管壁遺伝子治療法の確立

分担研究者 米満吉和、居石克夫 九州大学大学院医学研究院病理病態学

A. 研究目的

血管壁に対する遺伝子導入技術は、血管形成術後再狭窄に対する新しい治療法としても注目されているが、現在の遺伝子導入ベクターは多くの問題を抱えるため臨床応用されていない。実験的に好成績を上げてアデノウイルスベクターは、遺伝子導入に最低30分以上の血流遮断を要し、免疫原性が高いなどの欠点を有している。我々は最近、ヒトに病原性を持たないセンダイウイルスのベクター開発に成功し、種々の細胞における極めて高い遺伝子導入、発現効率を得ることに成功した。本研究では、全く新しいこの（SeV）の血管壁細胞に対する遺伝子導入特性を詳細に検討した。

B. 研究方法

クローン化 SeV ゲノムに種々の reporter 遺伝子（luciferase、核移行シグナル付加 lacZ）を挿入、細胞内ウイルス再構成により目的の組み換えウイルスを得た。培養血管平滑筋細胞と、下肢静脈瘤患者より採取したヒト大伏在静脈（器官培養法）に対する種々の導入法による遺伝子導入効率、発現レベルを検討した。

（倫理面への配慮）ヒト血管壁は済生会福岡総合病院、福岡市民病院より供与頂き、遺伝子導入実験の目的のみで、他への使用（遺伝子解析など）はしない旨を説明し、書面による承諾を得たものを用いた。

C. 研究結果

1. 遺伝子発現の安定性に関する検討

対数増殖期の血管平滑筋細胞、COS7 細胞とも初期の遺伝子発現が1～2ヶ月は安定に維持された。これは感染細胞が増殖亢進せず、また特に傷害も受けず増殖しつつ、安定に遺伝子を発現していることを示す。また、confluent にした血管平滑筋細胞に同様に感染させたものでも、少なくとも1ヶ月は安定な遺伝子発現を認めた。

2. ウイルス接触時間と感染効率に関する検討

培養血管平滑筋細胞、ヒト大伏在静脈ともに1分のウイルス液との接触のみで、2日間接触させたものの約

1/3の遺伝子発現を得た。一方、アデノウイルスの場合、30分間までの接触時間では低い導入効率しか得られず、

60分以上の接触にてほぼ2日間の接触に近い値を得た

（約30倍以上）。

3. ヒト大伏在静脈への遺伝子導入

内腔よりウイルスを満たした場合（10分間）、0 mmHg にて90%以上の血管内皮細胞、20%弱の外膜の細胞への遺伝子導入が可能であり、圧の上昇に伴い外膜への効率も上昇した（300 mmHg で36%）。一方、内皮細胞を傷害した場合は、血管壁への浸透は改善されず、肥厚内膜、中膜への導入もわずかであった（300 mmHg にて5%）。

肥厚内膜が損傷していた症例では肥厚内膜への遺伝子導入は低かったものの（2.2%）、中膜への遺伝子導入効率は著明に上昇した（40%）。

D, E. 考察と結論

アデノウイルスベクターと同様、肥厚内膜による中膜平滑筋細胞への低浸透率は、今後投与方法などにより改善すべき問題点である。一方、遺伝子発現の安定性、短時間での感染の成立という本ベクターの特徴は、アデノウイルスなど既存のベクターの問題点をクリアーする知見であり、血管壁遺伝子治療に有用と思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Masaki I, et al. Recombinant Sendai Virus-mediated Gene Transfer to Vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J* (in press)
2. Yonemitsu Y, et al. Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nature Biotech* 18: 970-973, 2000.

4) 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Egashira K, et al	Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats.	<i>FASEB J</i>	14	1974-1978	2000
Yonemitsu Y, et al.	Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus.	<i>Nature Biotech</i>	18	970-973	2000

5) 研究成果の刊行物・別刷

次のページ以降に論文別刷りを添付します。

20000234

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。