

厚生科学研究研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
血管新生と血管保護療法の開発に関する研究  
(H12-再生-006)

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 永井 良三

平成 13 (2001) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 血管新生と血管保護療法の開発に関する研究  
永井良三

### II. 分担研究報告

- 1. 血管新生と血管保護療法の開発に関する研究  
永井良三
- 2. 虚血肢に対する治療的血管新生を目的とした新しい遺伝子治療実用化に関する研究  
宮田哲郎
- 3. 高血圧・心筋梗塞の発症・治療感受性遺伝子の診断システム構築に関する研究  
山崎 力
- 4. 血管新生と血管保護療法の開発に関する研究  
佐田政隆
- 5. 血管再生及び保護に関する研究  
森下竜一
- 6. 細胞移植を応用した新しい血管再生療法の開発  
室原豊明
- 7. 血管新生制御療法の開発－抗腫瘍血管新生分子の遺伝子導入による癌の退縮  
上野 光
- 8. 骨髄細胞移植による末梢性血管疾患(慢性閉塞性動脈化症・ビュルガー病)・虚血性心疾患(狭心症・心筋梗塞)への血管再生治療  
松原弘明

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

血管新生と血管保護療法の開発に関する研究

主任研究者 永井良三 東京大学大学院医学系研究科（循環器内科）教授

研究要旨 虚血性疾患に対する新規治療法として、（１）自家骨髄移植による血管新生療法を開発し臨床治験を開始した。（２）遺伝子導入による血管新生の促進と抑制療法を開発した。肝細胞増殖因子を用いた血管新生療法は近日中に臨床応用開始予定である。（３）スタチン系の薬剤ならびにプロスタサイクリンが血管新生を促進することを明らかにその分子機構を解明した。（４）遺伝子を用いた各種の血管保護療法を開発した。E2F デコイを用いた血管形成術後の再狭窄予防に関する臨床治験を開始した。また老化関連遺伝子 *klotho* が血管内皮保護作用を持つことを明らかにした。

永井良三  
東京大学大学院医学研究科・循環器内科、教授  
宮田哲郎  
東京大学大学院医学研究科・血管外科、講師  
山崎 力  
東京大学医学部薬剤疫学講座、助教授  
佐田政隆  
東京大学医学部附属病院・循環器内科、医員  
森下竜一  
大阪大学大学院医学系研究科・遺伝子治療部、助教授  
室原豊明  
久留米大学循環器病研究所、講師  
上野 光  
産業医科大学医学部病態医化学、教授  
松原弘明  
関西医科大学第二内科、助教授

A. 研究目的

血管新生は、虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症、癌、糖尿病性網膜症などの病態形成に密接に関与する。近年、この考えを基にして、血管再生や血管新生の面から難治性疾患に対する治療法が提唱されるようになった。血管新生・再生だけでなく、血管内皮保護も動脈硬化予防と循環障害改善に重要である。そこで本研究は、血管新生・再生・保護を制御する細胞を経カテーテル的に心内膜側から投与する方法を開発し、ヒト虚血性心疾患への適用を検討する。

(2) 遺伝子導入による血管新生の促進と抑制療法

A. HGF による血管新生療法

血管医学の展開をはかり、これを応用した虚血性心疾患、血行再建術後再狭窄、閉塞性動脈硬化症、心筋症、癌などに対する新しい治療法の開発を目的とする。本研究の成果は、虚血性疾患の患者の生命予後、QOL を改善すると考えられる。また、従来から行われてきたバイパス手術や経皮的血管形成術といった高額医療の代替療法として普及し、医療費の削減に貢献すると期待される。

B. 研究方法

(1) 骨髄細胞移植による血管新生療法

骨髄細胞、末梢幹細胞、臍帯静脈血から内皮前駆細胞を単離し、内皮細胞への分化制御法を開発する。また、このような内皮前駆細胞が血管新生促進性サイトカインを分泌する機序を解明する。さらに、虚血組織の血管新生を促進するために最適な骨髄細胞移植法を開発する。大型動物で有効性と安全性を確認したうえで、下肢閉塞性動脈硬化症に対して臨床治験を行う。また、ブタ心筋虚血モデルにおいて、内皮前駆

動物実験を基に閉塞性動脈硬化症とバジュー病に対するヒト臨床試験の準備中である。また、非ウイルス性新規遺伝子導入方法ならびに HGF の血管新生作用を増強する薬物療法を開発し、治療法の有効性と安全性を向上させる。

## B. bFGF を発現する自己細胞の樹立と血管新生療法

動物の自己線維芽細胞にアデノウイルスを用いて分泌型 bFGF を導入する。細胞を増殖後、虚血下肢と虚血心筋の局所に注入、血流改善作用を検討する。

## C. 可溶性受容体による腫瘍血管新生抑制療法

血管新生因子受容体のうち細胞外領域のみの可溶性受容体を発現するアデノウイルスベクターを製作する。ヌードマウスへの癌細胞移植モデルを用いて、腫瘍血管新生抑制効果を検討する。

## (3) 遺伝子およびアンチセンスを用いた血管保護療法

### A. E2F および NFκB デコイによる再狭窄予防

E2F と NFκB デコイによる血管再狭窄防止効果を大型動物で確認後、臨床例に適用する。

### B. 平滑筋形質転換因子 BTEB2 のアンチセンスと抑制薬を用いた血管形成術後の再狭窄予防

血管平滑筋細胞の活性化因子 BTEB2 のアンチセンスによる血管形成術後の再狭窄防止法を開発する。BTEB2 拮抗薬は蛋白構造を決定後、分子デザインにより開発する。

### C. Fas リガンド遺伝子を用いた再狭窄予防

Fas リガンドを血管病変導入すると内皮細胞を抑制せずに平滑筋細胞のアポトーシスを誘導する。全身への影響の少ないベクターを開発し、大動物を用いて効果と副作用を検討し、臨床応用を目指す。さらに移植臓器の保護に対しても効果を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究では既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いて検討する。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的問題はない。ヒトへの臨床試験は各大学の倫理委員会で承認されたうえで試行する。遺伝子を用いた臨床試験では、厚生労働省と文部科学省で審議を行い認可を得てから施行する。また、患者から書面でのインフォームドコンセントを得る。

## C. 研究結果

### (1) 骨髄細胞移植による血管新生療法

幸原と松原は、血管内皮前駆細胞を豊富に含有する自己骨髄単核球の虚血臓器（下肢・心筋）への自家移植により血管新生が増強することを動物モデルで確認した。移植骨髄単核球細胞は新生血管の構成細胞に分化するだけでなく、血管新生効果を持つ種々の炎症性サイトカインを豊富に分泌することも見いだした。所属大学倫理委員会の承認を受けたのち、慢性閉塞性動脈硬化症患者に対する「自家骨髄単核球細胞移植による末梢性血管疾患への血管新生治療」の臨床治験を開始した。現在までに関西医科大学において7例、久留米大学において1例施行した。適用は内科的・外科的血行再建術の困難な安静時疼痛・壊死の存在する Fontaine 分類 III-IV の症例であった。患者腸骨より骨髄液を採取し単核細胞を分離・濃縮の後、虚血下肢に筋肉内注射を行なった。移植3週間後には下肢血流改善効果とともに安静時疼痛は消失した。

骨髄細胞移植は、虚血疾患患者に対する有効な血管再生医療と考えられる。今後、効果の持続性、骨髄細胞の他の間葉系細胞への分化、有効注入細胞数を評価する予定である。下肢虚血疾患患者で安全性と治療効果が確認されれば、虚血性心疾患患者へ適応を拡大する予定である。

### (2) 遺伝子導入による血管新生の促進と抑制療法

森下は、虚血臓器への HGF 遺伝子導入が血管新生を促進することを確認した。臨床応用に関しては厚生労働・文部科学両省において審査中である。また、マイクロバブルと超音波を用いてプラスミド DNA の遺伝子導入効率が劇的に上昇すること、プロスタサイクリンが HGF の血管新生作用を増強することを見出した。このような発見は臨床において、より有効で安全な第二世代の血管新生療法を可能にすると考えられる。

宮田は bFGF 遺伝子を導入した線維芽細胞の移植が血管新生を促進することを見出した。

上野は血管新生因子の可溶性受容体の遺伝子導入が腫瘍増殖を抑制することを確認した。

### (3) 遺伝子およびアンチセンスを用いた血管保護療法

森下は、転写因子 E2F に対するおとり型核酸医薬（デコイ）投与が平滑筋細胞の増殖による新生内膜形成を抑制することを動物モデルで確認した。平成 12 年 4 月から閉塞性動脈硬化症に対して血管拡張術を施行した 5 症例に E2F デコイの投与を行った。安全性が確認されており、全症例とも再狭窄が認められていない。今後は、冠動脈形成術後の再狭窄予防に適応を拡大し、安全性と有効性を検討する予定である。

永井、山崎は老化関連遺伝子 Klotho 遺伝子の内皮細胞に対する保護作用を明らかにした。また、BTEB 2 のアンチセンスアデノウイルスベクターを作製し、その血管保護作用を動物実験で検討中である。

佐田は、Fas リガンド遺伝子が傷害後血管狭窄や移植後動脈硬化症を抑制することを確認した。また、高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤が虚血後の血管新生を促進することを確認した。また、その効果が内因性一酸化窒素合成酵素の活性化によることを明らかにした。

#### D. 考察

今年度の研究計画はほぼ達成できた。骨髄細胞移植による血管新生療法ならびに E2F デコイを用いた血管保護療法は臨床治験を開始した。また、遺伝子を用いた血管新生療法ならびに血管保護療法の開発に関しても前臨床実験として有望な結果が得られており、臨床試験準備中である。

骨髄細胞移植による血管新生療法は世界で初めての臨床治験であり、世界的に注目されている。今後、下肢閉塞性動脈硬化症に対する骨髄細胞移植血管新生療法を継続し、長期的効果を評価する。また、多施設治験を行いその有効性と安全性を確認する。

また、カテーテルを用いた E2F デコイの生体内投与は世界で初めての試みである。下肢での良好な治療成績をもとに E2F デコイ法は冠動脈形成術後の症例に応用する。

HGF 遺伝子を用いた血管新生療法は厚生労働

省・文部科学省の認可が得られ次第、臨床試験を開始する予定である。

食生活の欧米化に伴い、虚血性疾患患者数は日本においても増加している。本研究による血管新生、血管保護療法の開発は虚血性疾患の患者の生命予後、QOL を改善するばかりでなく医療費の削減に貢献すると期待される。

#### E. 結論

虚血疾患の新規治療法として血管新生療法、血管保護療法を考案し、その有用性を実験で証明した。また、そのうちの二治療法を末梢血管疾患に対して世界に先駆けて臨床治験を開始した。現在までに有望な結果が得られており、今後、心疾患治療への応用が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表 41 件

原著論文による発表 1 件

それ以外の発表 16 件

そのうち主なもの

##### 論文発表

正木浩哉、松原弘明、他 2 人。閉塞性動脈硬化症、日本臨床、第 59 巻・1 号・141-146

##### 学会発表

小和瀬桂子、倉林正彦、相原康、関口賢一、内山強、大山裕子、永井良三 平滑筋形質変換誘導因子 BTEB2 は組織因子・PDGF 遺伝子発現を正に調整する。(2000 年 日本循環器学会学術総会、大阪)

##### 2) 海外

口頭発表 15 件

原著論文による発表 22 件

それ以外の発表 3 件

そのうち主なもの

##### 論文発表

1. Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, Sakamoto H, Hoshino Y, Kanda T, Yokoyama T, Shimomura Y, Iijima H, Ohyama Y, Nagai R. Homeobox protein hex induces SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the

- cAMP-responsive element. *Circ Res.* 88: 52-58, 2001
2. Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, Hasegawa A, Sakamoto H, Okamoto E, Kowase K, Manabe I, Suzuki T, Nakano A, Takase S, Wilcox JN, Nagai R. Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles show implications as a predictive factor for restenosis. *Circulation* 102:2528-34, 2000
3. Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda S, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R, Kurabayashi M. Transforming growth factor- $\beta$ /Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells *Circ Res.* 88:30-36, 2000
4. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R. Circulating oxidized low density lipoprotein levels; a biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2243-7, 2000
5. Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, Omata M, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. A Mouse Model of Vascular Injury that Induces Rapid Onset of Medial Cell Apoptosis Followed by Reproducible Neointimal Hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2097-2104, 2000
6. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima YI, Kurabayashi M, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 276: 767-772, 2000
7. Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Ogata M, Nishimatsu H, Moriyama N, Oh-hashii Y, Morita H, Ishikawa T, Nagai R, Yazaki Y, Matsushima K. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* 105:1345-52, 2000
8. Matsushita H, Morishita R, Aoki M, Tomita N, Taniyama Y, Nakagami H, Shimozato T, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T. Transfection of antisense p53 tumor suppressor gene oligodeoxynucleotides into rat carotid artery resulted in abnormal growth of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101:1447-1452, 2000
9. Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, Yamamoto K, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T. Hypoxia induced endothelial apoptosis through NF $\kappa$ B-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of importance of NF $\kappa$ B in endothelial cell regulation. *Circ Res* 86:974-981, 2000
10. Takayama K, Ueno H, Nakanishi Y, Sakamoto T, Inoue K, Shimizu K, Oohashi H, Hara N. Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of VEGF receptor into a remote organ. *Cancer Res.* 60: 2169-2177, 2000

#### 学会発表

Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Sumino H, Kurabayashi M, Kuro-o M, Nabeshima YI, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple atherogenic risk factor syndrome. AHA scientific sessions 2000, New Orleans.

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

「血管新生療法用医薬組成物」特願 2000-388624 (森下)

「インビボ遺伝子導入組成物」特願 500520905 (森下)

「骨髄単核球細胞の分離、濃縮方法及び血管再生剤」平成 12 年 12 月 4 日 特許出願 (松原)

「血管内狭窄部拡張機能付きガイドワイヤー」特願 2000-175983 (佐田)

「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」特願 2000-175993 (佐田)

血管新生と血管保護療法の開発に関する研究

分担研究者 永井良三 東京大学大学院医学系研究科（循環器内科）教授

研究要旨

平滑筋細胞の脱分化形質転換に転写因子 BTEB2 が中心的役割を担っていることを明らかにした。BTEB2 の機能調節機構を解明するため、BTEB2 の転写活性に対するアセチル化の影響を検討した。また、BTEB2 と相互作用する因子を同定した。BTEB2 に対するアンチセンスベクターならびに DNA 酵素を作製し、BTEB2 を標的とした血管保護療法の開発を試みている。また、老化関連遺伝子 Klotho が血管内皮機能障害を改善することを明らかにすると同時にその細胞内情報伝達経路を解明した。Klotho 蛋白もしくは遺伝子の効果的な生体内投与法に関する研究を行った。

A. 研究目的

平滑筋細胞脱分化促進因子 BTEB2 の核内相互作用因子を単離、同定し、その転写制御機構を解析する。また、BTEB2 の転写活性に対するアセチル化の影響を検討する。BTEB2 機能を阻害するベクター、薬剤を開発する。

老化関連遺伝子 Klotho の血管内皮細胞への保護作用を検討しその分子機序を解明する。また、Klotho 発現ベクターならびに組換え型蛋白産生システムを確立する。

B. 研究方法

(1-1) BTEB2 の転写活性に対するアセチル化の影響に関する検討

BTEB2 発現プラスミドを用いて、共トランスフェクションした胎児型ミオシン重鎖ならびに組織因子のプロモーター活性化能を測定する。この実験系においてアセチル化剤の効果を評価する。

を確立する。また、BTEB2 の三次元構造を決定したうえで、その拮抗薬を開発する。

(2-1) Klotho 遺伝子を用いた血管保護療法の開発

内皮機能障害を伴う高脂血症ラットの大腿筋に Klotho 発現アデノウイルスベクターを筋肉注射する。大動脈を摘出し、アセチルコリンを用いて内皮依存性弛緩反応を測定する。

ヒト内皮細胞にアデノウイルスベクターを用いて

(1-2) BTEB2 相互作用因子の同定

酵母 Two-Hybrid 法にて、BTEB2 の DNA 結合領域 DNA をエサ(bait)としてヒト白血球 cDNA ライブラリーをスクリーニングする。

また、BTEB2 を大腸菌に発現させ、カラムを用いて精製する。この組換え型 BTEB2 に C2/2 細胞の核抽出液を結合させ、imidazole を用いて溶出する。二次元電気泳動ゲルの銀染色を施行し、特異的スポットを切り出す。TOF-MS/MS システムによりアミノ酸配列を決定する。

(1-3) BTEB2 機能抑制療法の開発

BTEB2 の発現を低下させる手段としてアンチセンスアデノウイルスベクター、DNA 酵素を作製する。細胞を用いてその有効性を確認したうえで、血管病に対する遺伝子治療法

Klotho 蛋白を過剰発現させる。血清除去後のアポトーシスに対する抑制効果を評価する。また、その細胞内情報伝達系を検討する。

(2-2) Klotho ベクター、蛋白の開発

全構造のうち各種の機能部位を欠失させた Klotho 蛋白を発現するアデノウイルスベクターを作製する。発現した Klotho 蛋白の活性を測定し、機能マッピングを行う。また、バキュロウイルス発現

システムを用いて組替え型 Klotho 蛋白を作製し、血管保護療法の開発に応用する。

(倫理面への配慮)

本研究では既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いて検討する。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

## C. 研究結果

### (1-1) BTEB2 の転写活性に対するアセチル化の影響

BTEB2 のアセチル化は胎児型ミオシン重鎖ならびに組織因子のプロモーター活性化能を増強した。また、その作用は co-activator p300 によって相乗的に亢進した。

### (1-2) BTEB2 相互作用因子の同定

酵母 Two-Hybrid 法による検索により、BTEB2 相互作用因子として DNA トポイソメラーゼ II 結合蛋白、MAPKKK をはじめとして計 19 個のクローンを単離した。

また、組み換え型 BTEB2 と試験管内で結合する蛋白を抽出した。TOF-MS/MS システムによりアミノ酸配列を決定したところ、数種類の因子を同定した。

各因子の結合による BTEB2 の機能制御の意義を現在解析中である。

### (1-3) BTEB2 機能抑制療法の開発

BTEB2 の発現を制御する手段として BTEB2 に対するアンチセンスアデノウイルスベクターならびに DNA 酵素を作製した。細胞を用いた *in vitro* の系でその有効性を確認した。現在血管病治療への応用を *in vivo* モデルで検討中である。また、BTEB2 の三次元構造を決定し、拮抗薬を開発中である。

### (2-1) Klotho 遺伝子を用いた血管保護療法の開発

内皮障害を有するマルチプルリスク症候群のモデルとして OLETF ラットを用いた。Klotho 発現アデノウイルスベクターを大腿筋に注射したところ、障害された内皮機能が改善した。

また、ヒト臍帯静脈内皮細胞に Klotho 蛋白を過剰発現させたところ、血清除去に伴うアポトーシスが抑制された。また、この効果は蛋白リン酸化酵素 Akt の活性化によることを解明した。現在、その活性化の機序を検討中である。

### (2-2) Klotho ベクター、蛋白の開発

バキュロウイルスシステムを用いて、昆虫細胞 (Sf9 細胞) に Klotho 蛋白を発現することに成功した。現在その精製法を確立しつつある。また、各種の変異型 Klotho 発現アデノウイルスベクターを作製した。その解析をとおして、現在機能マッピングを行っている。

## D. 考察

BTEB2 による転写制御にそのアセチル化が重要であることを明らかにすると同時に、BTEB2 の相互作用因子を同定した。また、BTEB2 に対するアンチセンスアデノウイルスベクターや DNAzyme を開発した。平滑筋細胞形質転換因子である BTEB2 の機能制御機構を解明した。その機能への介入は今後有効な血管保護療法の開発に貢献すると期待される。

老化関連遺伝子 Klotho の血管内皮保護作用を解明した。今後、Klotho 遺伝子もしくは蛋白を用いた血管保護療法へと発展が期待できる。

## E. 結論

平滑筋細胞の脱分化形質転換に重要な転写因子 BTEB2 の機能調節機構を解明した。BTEB2 を標的とした血管保護療法を開発中である。また、老化関連遺伝子 Klotho の血管内皮保護作用を解明した。Klotho 遺伝子もしくは蛋白の有効な投与法を検討中である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, Sakamoto H, Hoshino Y, Kanda T, Yokoyama T, Shimomura Y, Iijima H, Ohyama Y, Nagai R.



- Homeobox protein hex induces SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP-responsive element. *Circ Res.* 88: 52-58, 2001
2. Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, Hasegawa A, Sakamoto H, Okamoto E, Kowase K, Manabe I, Suzuki T, Nakano A, Takase S, Wilcox JN, Nagai R. Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles show implications as a predictive factor for restenosis. *Circulation* 102:2528-34, 2000
  3. Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda Si, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R, Kurabayashi M. Transforming growth factor-ss/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells *Circ Res.* 88:30-36, 2000
  4. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R. Circulating oxidized low density lipoprotein levels; a biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2243-7, 2000
  5. Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, Omata M, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. A Mouse Model of Vascular Injury that Induces Rapid Onset of Medial Cell Apoptosis Followed by Reproducible Neointimal Hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2097-2104, 2000
  6. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Yi, Kurabayashi M, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 276: 767-772, 2000
  7. Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Ogata M, Nishimatsu H, Moriyama N, Oh-hashii Y, Morita H, Ishikawa T, Nagai R, Yazaki Y, Matsushima K. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* 105:1345-52, 2000
2. 学会発表
1. 小和瀬桂子、倉林正彦、相原康、関口賢一、内山強、大山裕子、永井良三 平滑筋形質変換誘導因子 BTEB2 は組織因子・PDGF 遺伝子発現を正に調整する。(2000年 日本循環器学会学術総会、大阪)
  2. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Sumino H, Kurabayashi, H, Kuro-o M, Nabeshima Yi, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple atherogenic risk factor syndrome. AHA scientific sessions 2000, New Orleans.
- G. 知的所有権の出願・取得状況  
特になし

虚血肢に対する治療的血管新生を目的とした  
新しい遺伝子治療実用化に関する研究

分担研究者 宮田 哲郎 東京大学大学院医学系研究科（血管外科）講師

研究要旨 本研究は慢性虚血肢に対する新しい血管新生療法として、アデノウイルスベクターを用いた *ex vivo* 法による basic fibroblast growth factor (bFGF) 遺伝子の遺伝子導入法について検討した。まずラビットの大腿動脈を切除することにより下肢慢性虚血モデルを作成し、同一ラビットの皮膚より線維芽細胞を採取培養した。そしてこの培養線維芽細胞に bFGF 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを感染させた後、虚血側の内腸骨動脈内に動注した（治療群）。動注後 28 日目に下肢動脈圧測定や血管造影、組織毛細管密度、内腸骨動脈血流量測定などで検討した結果、治療群は対照群と比べ有意な側副血行路の発達が認められた

研究目的

最近の血管外科領域における手術手技の進歩やインターベンション技術の発達により、重症の虚血肢にたいしても良好な予後が期待できるようになってきた。しかし広範囲にわたる閉塞例や末梢型閉塞例など血行再建が困難な症例も多い。本研究はこのような従来の血行再建が困難なケースに対処すべく、治療効果に優れ且つ安全な血管新生療法の開発を目的としている。

研究方法

治療的血管新生療法研究において最も使われることの多いラビット下肢慢性虚血モデルを用いた。実験の 21 日前に予め日本白色ラビット(3-3.5kg)の左大腿動脈を全長にわたり切除して虚血状態を作成した。同時に同一個体より採取した皮膚片より線維芽細胞を分離培養した。実験前日にこの培養線維芽細胞に 20pfu/cell の濃度で bFGF 遺伝子組み込みアデノウイルス（第一世代）を感染させた。この bFGF 遺伝子には IL-2 の分泌シグナルが付加されており、遺伝子導入された細胞は bFGF 蛋白を細胞外に分泌するようになる（*in vitro* の実験で確認済）。この遺伝子導入された線維芽細胞を虚血側の内腸骨動脈より動脈注射した（治療群）。対照群として LacZ 遺伝子を

組み込んだアデノウイルスを用いて同様の実験を行った。動注 28 日後、下肢血圧測定、血管造影 (angiographic score)、内腸骨動脈血流量測定の後、ラビットを殺処分としサンプルを採取した。

また線維芽細胞を Indium-111 でラベルし動注して投与細胞の体内分布を検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験はすべて東京大学医学部附属動物実験施設において同施設の実験動物取り扱い規則に従って施行された。またウイルスによる遺伝子導入は東京大学旧第一外科 P2 レベル実験室で、また動物への投与は動物施設内の中大型動物用 P2 レベル実験室で行った。Indium を用いた実験は東京大学 RI 総合センターで施行した。

研究結果

線維芽細胞動注前後で下肢血圧の有意な低下は認められなかった。

Indium ラベルされた線維芽細胞は左大腿部に全動注量の 29.5±9.5%、左下腿に 12.6±8.1%集積し、他部位における有意な集積はなかった。

左下肢血圧の右血圧に対する割合である pressure index は治療群で 0.79±0.1%、対照群で 0.56±0.1%と有意な ( $p<0.01$ ) 改善が認められた。

angiographic score は治療群で  $0.65 \pm 0.12$ 、対照群で  $0.40 \pm 0.05$  と有意な ( $p < 0.01$ ) 増加が認められた。

内腸骨動脈血流は安静時においては治療群で  $21.2 \pm 2.6$ 、対照群で  $11.6 \pm 2.7$ 、パパベリン負荷時においては治療群で  $46.5 \pm 7.2$ 、対照群で  $31.6 \pm 8.1$  と有意な ( $p < 0.01$ ) 改善が認められた。

筋組織内毛細血管密度は治療群で  $21.2 \pm 2.6/\text{mm}^2$ 、対照群で  $11.6 \pm 2.7/\text{mm}^2$  と有意な ( $p < 0.01$ ) 上昇が認められた。

細胞投与から犠牲死にいたる期間の経時的な血液検査では臓器障害を思わせる所見はなかった。

### 考察

我々の開発した新しい血管新生療法はラビット慢性下肢虚血モデルにおいて有意な側副血行の発達と組織血流の改善をもたらした。また細胞動注による虚血の増悪は血圧でモニターしたかぎり認められず、血液検査による検討では臓器障害も発生していないことが明らかになった。

### 結論

本研究で検討された新しい血管新生療法はその効果において有効で、且つ安全性に優れていることが示唆された。

### 研究発表

#### 1. 論文発表

Adenovirus-mediated ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis. 2001, Gene Therapy in submission.

#### 2. 学会発表

なし

### 知的所有権の取得状況

なし

「高血圧・心筋梗塞の発症・治療感受性遺伝子の診断システム構築」に関する研究

分担研究者 山崎 力 東京大学大学院医学系研究科薬剤疫学講座 客員助教授

#### 研究要旨

平滑筋細胞の脱分化形質への変換の分子メーカーに位置づけられるミオシン重鎖 SMemb 遺伝子の転写制御に関わる転写因子 BTEB2 の機能解析を通して、BTEB2 の転写誘導の機序解明ならびに活性化するシグナルの解明、さらに BTEB2 が再狭窄病変の発症に密接に関わっていることを解明した。一方、Klotho 遺伝子は、マウスでの挿入変異解析を通して明らかになった早期老化に関わる新規遺伝子である。Klotho 遺伝子の欠損マウスは、成長障害、動脈硬化、骨粗鬆症、不妊症、皮膚萎縮、歩行障害、肺気腫等の多彩な早期老化の症状を呈する。本年度は、Klotho を中心に老化と血管の接点に着目し、Klotho が内皮機能を制御することを見いだした。最終的には klotho 蛋白の治療薬として有用性を持つか否かを明らかにする。

#### A. 研究目的

血管平滑筋の分化・増殖とは、動脈硬化や虚血性心疾患の治療として行われる冠動脈血行再建術後の再狭窄の発症に深く関わっている。しかし、損傷した血管の平滑筋の性質や個体発生の過程にある血管の特徴・性質については、まだ十分に理解されていない。平滑筋の分化と発生を司る分子機構の解明は、動脈硬化に代表される血管平滑筋の関与している血管疾患の予防・治療の開発の糸口となる可能性がある。

一方、個体老化を抑制し、血管内皮機能を保護すると考えられる新規遺伝子

Klotho を 1997 年に見いだした。Klotho 遺伝子は、マウスでの挿入変異解析を通して明らかになった早期老化に関わる新規遺伝子である。Klotho 遺伝子の欠損マウスは、成長障害、動脈硬化、骨粗鬆症、不妊症、皮膚萎縮、歩行障害、肺気腫等の多彩な早期老化の症状を呈する。Klotho マウスの早期老化の形質はヒトの老化の形質と酷似し、マウスよりもヒトの老化モデルの実験動物に位置づけられる。本研究では、個体老化を抑制する新規遺伝子 Klotho が動脈硬化や心不全などの循環器病態でどのような役割を担っているかを明らかにするが目的である。

#### B/C. 研究方法・研究結果

我々は、平滑筋ミオシン重鎖遺伝子に注目してきた。同遺伝子は平滑筋に最も特異的に発現し、また形質変

換時に、同遺伝子のアイソフォームの変換がみられる。脱分化した平滑筋に特異的に発現する平滑筋ミオシン重鎖遺伝子の発現調節の研究を通して、同遺伝子の発現調節を司る転写調節因子の単離に成功した。BTEB2 と名付けられたこの因子は、脱分化時に発現する平滑筋ミオシン重鎖遺伝子のプロモーターと結合し、同遺伝子の転写を調節する。

平滑筋の分化・増殖と形質変換時における平滑筋ミオシン重鎖及び BTEB2 の機能解析を通して、次のような研究成果をあげてきた。1) 増殖型・脱分化型平滑筋に選択的に高発現しているミオシン重鎖 SMemb 遺伝子の遺伝子発現を制御する機構を調べた結果、遺伝子発現調節において、転写因子 BTEB2 が重要であることを明らかにした。2) BTEB2 は平滑筋ミオシン重鎖遺伝子の発現調節のみならず、tissue factor を含む凝固系の遺伝子発現にも重要であることを見出した。さらに単球も発現していることを見出し、BTEB2 は血管壁全体における遺伝子発現に関与していることを明らかにした。3) BTEB2 は正常血管及び神経の発生時期に発現するとともに、冠動脈血行再建術後の新生内膜に発現することを見出し、血管および平滑筋の正常発生および脱分化時における時空間的な遺伝子制御を司る因子であることを明らかにした。

一方、Klotho の役割を中心に老化と血管の接点に着目し、次のような研究成果をあげてきた。1) Klotho マウスには一酸化窒素の産生低下による血管内皮機能障

害が存在することを明らかにした。2) 野生マウスとの体結合解析により、Klotho マウスの血管内皮機能が改善することを明らかにした。3) 内皮障害を有する他の動物モデル（高脂血症肥満ラット）にアデノウイルスに組み込んだ Klotho 遺伝子を導入し、一酸化窒素産生機能が回復し、さらに血管内皮機能の改善に寄与することを明らかにした。4) 血管内皮細胞に Klotho 遺伝子を導入すると、抗アポトーシス作用を示すことを明らかにした。

(倫理面への配慮)

動物実験では動物愛護の観点から苦痛のないよう全身麻酔下に行った。それ以外は、*in vitro* の培養細胞を用いた実験であり、倫理面の問題はないと考える。

#### D/E. 考察・結論

以上のように、我々は、平滑筋の分化・増殖ならびに形質変換時の遺伝子発現調節において重要な役割を果たすと考えられる転写因子 BTEB2 を同定した。遺伝子発現制御に関わる転写因子 BTEB2 の機能解析を生化学、細胞生物学等、多岐にわたる局面から解析しており、研究成果を順調にあげている。平滑筋の分化・増殖ならびに形質変換における BTEB2 の役割が明らかになれば、この因子を標的とした創薬を通じた動脈硬化の予防法・治療法の開発に期待できる。

また、Klotho 因子は液性因子であり、一酸化窒素のパスウェイを介した内皮機能の調節に関与することを示した。Klotho 因子は、血管内皮細胞を中心とした血管細胞の寿命決定や生理機能を調節する因子であり、血管のホメオスタシスに寄与すると考えられる。Klotho 遺伝子ならびにその蛋白の投与は、血管障害や個体老化の防止に有用であると考えられるため、Klotho を標的とした新しい治療戦略の構築が今後期待される。

#### F. 研究発表

論文発表

Watanabe N, et al. BTEB2, a Kruppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res.*

1999;85:182-91.

Kawai-Kowase K, et al. Transcriptional activation of the zinc finger transcription factor BTEB2 gene by Egr-1 through mitogen-activated protein kinase pathways in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999;85:787-95.

Nagai R, et al. Transcriptional regulation of smooth muscle phenotypic modulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:214-22; discussion 222-3.

Wada Y, et al. Expression of the transcriptional factor egr-1/BTEB2 in cardiac xenograft vascular remodeling. *Transplant Proc.* 2000;32:1089-91.

Hoshino Y, et al. Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells : analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive factor for restenosis. *Circulation.* 2000;102:2528-34.

Ogata T, et al. Inducible expression of BTEB2, a member of the zinc-finger family of transcription factors, in cardiac allograft arteriosclerosis. *Transplant Proc.* 2000;32:2032-2033.

Ogata T, et al. Inducible expression of basic transcription factor-binding protein 2 (BTEB2), a member of zinc finger family of transcription factors, in cardiac allograft vascular disease. *Transplantation.* 2000;70:1653-6.

Ogata T, et al. Inducible expression of basic transcription element-binding protein 2 in proliferating smooth muscle cells at the vascular anastomotic stricture. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;119:983-9.

Saito Y et al. *In vivo* klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;276:767-72.

#### G. 知的所有権の取得状況

特になし

血管新生と血管保護療法の開発に関する研究

分担研究者 佐田政隆 東京大学医学部附属病院（循環器内科）医員

**研究要旨** アポトーシス誘導因子である Fas リガンド遺伝子の過剰発現が、内皮細胞死は誘発せずに炎症細胞の浸潤を抑制し、血管保護作用を有することを明らかにした。また、スタチン系高脂血症治療薬が虚血後の血管新生を促進することを動物実験で明らかにした。さらに、骨髄由来の幹細胞が血管病変形成に寄与することを解明した。

A. 研究目的

虚血性疾患の治療として冠動脈形成術やバイパス手術が広く行われるようになった。しかし、多くの症例で再狭窄や再閉塞が生じる。また、臓器移植が行われるようになったが移植後動脈硬化症によって予後が制限される。このような、増殖性血管病の病態生理を明らかにし、有効な治療法の開発を目指す。主として、日本で発見されたアポトーシス誘導因子 Fas リガンドを用いて細胞死を利用した遺伝子治療法を開発する。

一方、血行再建術不能な慢性虚血疾患患者に対して側副血行路の発達を促す「治療的血管新生療法」が注目されている。その多くは内皮細胞に対する増殖因子蛋白ないし遺伝子の投与である。その有効性が報告されると同時に血管新生の増強による癌、糖尿病性網膜症、動脈硬化症の増悪が懸念されている。本研究では薬剤による血管新生促進効果を検討する。

B. 研究方法

(1) 細胞死を利用した血管保護療法の開発

アポトーシス促進因子である Fas リガンドを発現するアデノウイルスベクターを作製する。ラット頸動脈のバルーン傷害モデル、ラット頸動脈同種移植モデルにおいて Fas リガンド発現ベクターの効果を検討する。

(2) 薬物を用いた血管新生促進療法の開発

C3H/HeN マウスの大腿動脈を結さつ切離し、下肢虚血モデルを作製する。手術3日前から生食もしくはセリバスタチン(6mg/kg/日、皮下)を連日投与する。

虚血下肢への血流回復をレーザードップラー血流計を用いてモニターする。5週目に大腿筋を採取し抗 CD31 染色を用いて毛細血管密度を計測する。また、薬効の機序を解明するため、セリバスタチン投与三日後のマウス大動脈を摘出し、Ach を用いて内皮依存性の血管弛緩反応を測定する。さらには、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)欠損マウスを用いて、セリバスタチンの血流改善促進作用を評価する。

(倫理面への配慮)

本研究では既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いて検討する。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) Fas リガンドを用いた血管保護療法

バルーン傷害後のラット頸動脈への Fas リガンド遺伝子の導入は平滑筋細胞のアポトーシスを誘発し、2週間後の新生内膜形成を有意に抑制した。細胞静止的(cytostatic)な p21 遺伝子が、アデノウイルスへの免疫性を獲得したラットに対しては無効であったにもかかわらず、Fas リガンド遺伝子では免疫性の有無に関わらず有効であった。

ラット頸動脈内皮に Fas リガンド発現アデノウイルスベクターを感染したところ、同種移植後の炎症細胞浸潤が抑制され、1-2ヶ月後の血管病変形成が抑制された。

(2) スタチン系薬物による血管新生促進作用

高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤

であるセリバスタチンの投与により虚血肢の血流回復が有意に促進された。また、セリバスタチンの投与により大動脈の内皮依存性弛緩反応が著明に増強された。eNOS 欠損マウスでは、セリバスタチンによる血流改善効果が認められなかった。以上より、スタチン系薬剤は、内因性一酸化窒素合成酵素を活性化することで虚血後の血流回復を促進していることが解明された。

#### D. 考察

Fas リガンドを用いての血管保護療法の有効性が確認された。また、その効果がアデノウイルスへの免疫性を獲得した個体でも認められ、臨床面での実用性が高い。今後全身への毒性の少ない組織特異的ベクター、組織特異的遺伝子導入法の開発を行い、臨床応用への予備実験を大動物を用いて行う。

大規模試験で、スタチン系の薬剤は正常コレステロール患者の心血管事故発症率、死亡率を低下させることが明らかになっている。本研究で明らかとなった、虚血後の血管新生促進作用はその臨床効果の一因であると思われる。

#### E. 結論

細胞死を利用した血管保護療法を開発した。また、薬剤を用いた新規の血管新生療法を開発した。臨床研究への発展が期待される。

#### F. 研究発表

(論文)

Sata, M., Maejima, Y., Adachi, F., Fukino, K., Saiura, A., Sugiura, S., Aoyagi, T., Imai, Y., Kurihara, H., Kimura, K., Omata, M., Makuuchi, M., Hirata, Y., Nagai, R. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000, 32: 2097-2104.

Sata, M., Kakoki, M., Nagata, D., Nishimatsu, H., Suzuki, E., Aoyagi, T., Sugiura, S., Kojima, H., Nagano, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Omata, M., Nagai, R., Hirata, Y.

Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cGMP-independent mechanism.

*Hypertension.* 2000, 36: 83-88.

Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Yoshizumi M, Mano T, Walsh K, Sata M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y. Cyclin A downregulation and p21(cip1) upregulation correlate with GATA-6-induced growth arrest in glomerular mesangial cells. *Circ Res.* 2000, 87:699-704.

Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW, Aoyagi T. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training *Circulation* 2000;101:2134-2137

(学会発表)

Sata, M., Takahashi, A., Ako, J., Maejima, Y., Nakajima, H., Adachi, A., Hirata, Y., Ouchi, Y., Walsh, K. "Tranilast Inhibits Neointimal Hyperplasia Via a p21<sup>WAF1</sup>-Dependent Pathway." American Heart Association 72th Scientific Sessions, New Orleans, 2000

Sata, M., Maejima, Y., Nakajima, H., Adachi, F., Aoyagi, T., Kimura, K., Hirata, Y. "A Mouse Model of Vascular Ballooning Injury That Induces Rapid Onset of Medial Cell Apoptosis Followed by Reproducible Neointimal Hyperplasia." American Heart Association 72th Scientific Sessions, New Orleans, 2000

Sata, M., Maejima, Y., Nakajima, H., Adachi, F., Kimura, K., Sugiura, S., Fukino, K. "Genetic Background Influences Ischemia-Induced Angiogenesis." American Heart Association 72th Scientific Sessions, New Orleans, 2000

Sata, M., Maejima, Y., Nakajima, H., Adachi, F., Aoyagi, T., Sugiura, S., Fukino, K., Hirata, Y. "Acute and Chronic Smooth Muscle Cell Apoptosis after Angioplasty Occurs Independently of the Fas Pathway." American Heart Association 72th Scientific Sessions, New Orleans, 2000

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

「血管内狭窄部拡張機能付きガイドワイヤー」特願 2000-175983 (佐田)

「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」特願 2000-175993 (佐田)

血管再生及び保護に関する研究

分担研究者 森下 竜一 大阪大学医学部遺伝子治療学

研究要旨

血管再生を増強する治療戦略として、HGF など血管新生因子の遺伝子と血管拡張物質であるプロスタサイクリンを合成する PGI<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子との共導入による第二世代の血管再生療法の有用性を示した。

A、研究目的

動脈硬化性疾患である閉塞性動脈硬化症や心筋梗塞などの低侵襲な新規治療法として血管再生を促進する治療戦略が期待されている。我々は、1994 年より遺伝子治療臨床研究が開始された VEGF 遺伝子に加え、肝細胞増殖因子（HGF）が新生血管形成と血流増加をもたらすことを明らかにした。更に、本研究では血管再生を増強する治療戦略と安全で副作用の少ない治療を目指した非ウイルス遺伝子導入法の開発を行う。

B、研究方法

血管再生を増強する治療戦略として、HGF 遺伝子導入により再生された血管を拡張、もしくは、維持することが重要であるとの視点で、血管拡張物質であるプロスタサイクリンを合成する PGI<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子との共導入を行った。閉塞性動脈硬化症モデルはラット腸骨動脈の摘出により作成し、ヒト HGF 遺伝子及びプロスタサイクリンを合成する PGI<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子の筋肉内投与を行い、血管新生及び血流改善効果を調べた。遺伝子導入法として、プラスミド単独投与法に加え、超音波とマイクロバブルを利用したプラスミド DNA の投与も行い、発現効率を検討した。

C、研究結果

閉塞性動脈硬化症に対する血管新生療法の有効性は、ヒト HGF プラスミド DNA 及びプロスタサイクリンを合成する PGI<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子のラット

筋肉内への導入により有意な血管新生が組織学的に確認された。それに伴い、レーザー血流計を用いて血流増加も確認された。HGF 遺伝子による血管再生は、PGI<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子との共導入により、血管数及び血流ともに単独投与に比べ有意な増加を示した。培養内皮細胞での共導入実験では、NO 産生量には大きな変化は認められず、NO 非依存性に血管再生が増強されたことが考えられた。また、安全で効率の高い遺伝子導入法としてプラスミド DNA を基盤とした新規手法の開発を目的として、マイクロバブルと超音波に注目した。マイクロバブル（オプチゾン）にプラスミド DNA を封入し、超音波をあてることにより膜表面に一過性の穴が形成され、遺伝子が高効率に導入できることが明らかになった。プラスミド単独に比較して 50-100 倍以上の遺伝子導入効率もたらされた。

D、考察

血管再生を増強する治療戦略として、HGF など血管新生因子の遺伝子と血管拡張物質であるプロスタサイクリンを合成する PGI<sub>2</sub> 合成酵素遺伝子との共導入による第二世代の血管再生療法の有用性を示した。また、超音波とマイクロバブルを利用した遺伝子導入法は、副作用の少ない非ウイルス遺伝子導入法として動脈硬化性疾患のような QOL 改善型の遺伝子治療の臨床応用に期待される。

E、結論

血管再生を増強する治療戦略として第二世代の血



管再生療法の有用性を示した。

## F、研究発表

### 1、論文発表

1) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hind limb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. Gene Therapy (in press)

## G、知的所有権の取得情況

### 1. 特許取得

森下竜一他。「インビボ遺伝子導入組成物」、特願500520905

細胞移植を応用した新しい血管再生療法の開発

分担研究者 室原豊明 久留米大学・循環器病研究所

研究要旨：内皮前駆細胞は、成人においては唯一の造血臓器である骨髄に由来する。本研究の目的は、自己骨髄あるいは末梢血中に動員された自己幹細胞を収集し、虚血組織に移植することにより内皮細胞の分化増殖を介して新しい血管や側副血管を再生すること、さらにこのことによって虚血組織の血行を機能的にも改善出来るかどうかを検討するものである。今回自己骨髄単核球細胞を移植投与することによって、虚血下肢骨格筋内における血管再生が有意に促進されるか否かをウサギを用いて検討した。この結果、血管新生・側副血管形成が、虚血下肢において実際に促進されることが確認された。この動物実験結果を元に、2000年我々は、末梢性動脈閉塞性疾患 [閉塞性動脈硬化症 (ASO) およびビュルガー病] の患者に同様の治療法を適応するべく、当大学医学部倫理委員会に諮問した。この結果承認され、既に臨床治験を開始している。今後至適細胞数の決定、詳細な機序の検索、より低侵襲の手法等について検討して行きたい。

#### A. 研究目的

成人末梢血中の単核球分画中には、血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞が存在し、血管新生に関与する。内皮前駆細胞は、成人においては骨髄に由来すると考えられる。本研究の目的は、自己骨髄あるいは末梢血中に動員された自己幹細胞を収集し、虚血組織に移植することにより内皮細胞の分化増殖を介して新しい血管や側副血管を再生すること、さらにこのことによって虚血組織の血行を機能的にも改善出来ないかどうかを検討するものである。

#### B. 研究方法

動物および成人の骨髄細胞から内皮前駆細胞を分離し、さらに成熟内皮細胞への分化誘導を試みる。また我々のこれまでの研究から、骨髄全単核球細胞分画からもこのような内皮前駆細胞が分化誘導できる骨格筋内における血管再生が有意に促進された。この実験結果を元に、2000年我々は末梢性動脈閉塞性疾患 [閉塞性動脈硬化症 (ASO) およびビュルガー病] の患者に同様の治療法を適応するべく、当大学医学部倫理委員会に諮問した。この結果承認され、既に臨床治験を開始している。第一例目は、73歳女性 ASO 患者であり、移植後有意な血管新生の増強とともに、患部の血流増加と QOL の著明な改善

と考えられる。比較的大きな動物（ウサギ）において、蛍光色素ラベルした自己骨髄単核球細胞または内皮前駆細胞を直接虚血骨格筋内に植え込む、または経動脈的に投与することによって、虚血部位における血管新生にこれらの骨髄細胞が組み込まれるか否かを検討する。さらに自己骨髄単核球細胞または内皮前駆細胞を移植投与することによって、虚血下肢骨格筋内における血管新生が有意に促進されるか否かを検討する。実際に他の治療法が無効であったヒト末梢動脈閉塞性疾患 [閉塞性動脈硬化症 (ASO) およびビュルガー病] の患者に同様の治療法が適応できるか否かも検討する。

#### C. 研究結果

自己骨髄単核球細胞を組織内移植投与することによって、ウサギ虚血下肢をみた。副作用は認められなかった。

#### D. 考案

自己骨髄単核球細胞の組織内移植は、虚血領域における血管再生と血流確保、さらに機能改善に有効であることが明らかにされた。今後この方面の臨床治験を継続し、症例数を増やすとともに、詳細な分子メカニズム、より低侵襲の治療法を模索したい。併

せて今後遺伝子治療との併用の可能性、さらには虚血性心疾患への応用を視野に入れた基礎的研究を続行したい。

#### E. 結論

自己骨髄単核球細胞の組織内移植は、臨床的にも有効な血管再生療法の一つであることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1.Murohara T. et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 2000; 105:1527-1536.
- 2.Duan J, Murohara T. et al. Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia: nitric oxide-dependent mechanism. *Circulation.* 2000;102:III370-III376.
- 3.Duan J, Murohara T. et al. Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2579-2585.
- 4.Shintani S, Murohara T. et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation.* 2001; 103: 897-903.

血管新生制御療法の開発

—抗腫瘍血管新生分子の遺伝子導入による癌の退縮

分担研究者 上野 光 産業医科大学教授

研究要旨

癌細胞は自ら血管新生因子を産生し血管新生を促進して栄養補給路を確保しながら腫瘍として成長する。この腫瘍血管新生を抑制できれば効率的な癌の退縮が達成される可能性が高い。ヒト肺癌由来の14種のがん細胞すべてが血管新生因子 VEGF を産生しており、その産生能と造腫瘍能には相関を認めた。ヌードマウス皮下にがん細胞を移植し、細胞外領域のみの可溶性 VEGF 受容体遺伝子を筋肉内に発現させると腫瘍はある程度の大きさまで成長した後はむしろ退縮した。腫瘍内では血管新生が阻害され癌細胞のアポトーシスが亢進していた。この戦略は検討した6種の癌細胞のうち5種で有効であり、汎用性も期待でき、癌の新たな治療戦略として有望である。路を解明した。Klotho 蛋白もしくは遺伝子の効果的な生体内投与方法に関する研究を行った。

【研究目的】

癌の成育には血管新生を誘導し栄養補給路を確保する必要がある。この腫瘍血管新生を抑制できれば効率的な癌の退縮が達成される可能性が高い。また癌以外にも糖尿病性網膜症など病的血管新生が病態の主体である疾患も存在する。血管新生を制御することで新しい治療戦略となりうるか否かその方法の確立と検証を行うことを目的とする。

【研究方法】

強力な血管新生因子として知られる VEGF (Vascular endothelial growth factor)受容体 (flt-1) の細胞外ドメインに免疫グロブリンの Fc 部分を融合させたキメラ体を作成し  
3. 癌細胞をヌードマウス皮下に植え癌細胞が生着した後、AdVEGF-ExR を1度だけ筋肉内に注入して観察すると、腫瘍はある程度の大きさにまで成長した後、退縮した。  
4. 腫瘍組織内では血管新生の抑制と癌細胞のアポトーシス亢進が観察された。  
5. 可溶性 VEGF 受容体は VEGF 産生能の

デノウイルスベクターに組み込んだ

(AdVEGF-ExR)。ヒト肺癌由来の14種の癌細胞を準備した。造腫瘍能はヌードマウス皮下に癌細胞を植え、その成育を経時的に観察した。腫瘍は組織学的に検討した。

【研究結果】

1. 癌細胞培養上清中の血管新生因子を測定すると、準備した14種すべての癌細胞で VEGF が産生されていた。さらに VEGF 産生量とヌードマウスにおける造腫瘍能には相関が認められた。
2. 可溶性 VEGF 受容体は VEGF に結合し、VEGF の作用を特異的に抑制できることを in vitro, in vivo 両方の系で確認した。

高い癌ほど有効で、検討した6種の癌細胞のうち5つで有意の腫瘍退縮効果を認めた。  
6. 可溶性 VEGF 受容体導入マウスは前例生存し成育や行動に明らかな異常は観察されなかった。