

200/023/

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

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13年度総括・分担研究報告書

主任研究者 江頭健輔

平成14(2002)年4月

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13年度総括・分担研究報告書

主任研究者 江頭健輔

平成14（2002）年4月

目次

1. 研究組織	1 ページ
2. 総括研究報告書	2 4 ページ
3. 分担研究報告書	
サブテーマ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	
研究課題：高血圧性心肥大に関わる新規アクチン関連細胞骨格蛋白（LACS）の単離と機能解析	5 7 ページ
サブテーマ2：我が国独自の新規ベクターの臨床応用	
研究課題：慢性炎症における病的血管新生発生機構の解析	8 12 ページ
サブテーマ3：抗MCP-1遺伝子治療戦略の確立	
研究課題1：再狭窄に対する抗MCP-1遺伝子治療法の開発	
研究課題2：動脈硬化に対する抗Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)遺伝子治療の有用性	13 17 ページ
サブテーマ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	
研究課題：閉塞性動脈硬化症に対する末梢血幹細胞移植の有用性	18 20 ページ
4. 研究成果の刊行に関する一覧表	21 ページ
5. 研究成果の刊行物・別刷	21 ページ

研究組織

主任研究者名・所属・役職

江頭 健輔 九州大学大学院医学研究院循環器内科学 講師

分担研究者名・所属・役職

居石 克夫 九州大学大学院医学研究院病理病態学 教授

米満 吉和 九州大学大学院医学研究院病理病態学 助手

事務担当

新谷 奈保 九州大学大学院医学研究院循環器内科学

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研究院 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4つのサブテーマからなる；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（担当：江頭健輔）、2）我が国独自の新規ベクターの臨床応用（担当：居石克夫、米満吉和）、3）抗 MCP-1 遺伝子治療戦略の確立（担当：江頭健輔）、4）末梢血内皮前駆細胞移植療法による治療的血管新生（担当：江頭健輔）、などである。

平成13年度は以下の成果を得た；1）subtractive hybridization 法により新規遺伝子 LACS を単離した。LACS は心筋細胞肥大に関与する新規遺伝子と考えられる；2）全く新しいコンセプトに基づく遺伝子導入ベクターの生物学的特性を解析し、これを用いて生理的血管新生には複数の血管新生因子の協調的連動が必要であること示した；3）今年度の研究成果から、MCP-1 をターゲットとする治療が再狭窄に対する有用な新規治療になる可能性が明かとなったので、現在、「再狭窄に対する遺伝子治療臨床研究」を厚生労働省への申請している（現在審議中）；4）血行再建術の適応とな

らない症例に対して末梢血内皮前駆（CD34 陽性）細胞（EPC）を用いた細胞移植療法を実施し良好な成績を得た。

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項目のサブテーマについて研究を進めた。

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”
慢性的一酸化窒素産生阻害によって高血圧、心肥大、動脈硬化が生じる。我々は、その分子機序を解明する方法として subtractive hybridization 法により新規遺伝子 LACS (L-NAME-related actin cytoskeletal protein)を一酸化窒素産生阻害ラットの心臓より単離した。LACS は心臓および骨格筋に特異的に発現し、高血圧心肥大モデルの心臓で広く発現が増加しており、培養心筋細胞においても心肥大誘導後に発現が増加した。これらの成績から、LACS は心筋細胞肥大に関与する新規遺伝子と考えられる。
2. 我が国独自の新規ベクターの臨床応用
全く新しいコンセプトに基づく遺伝子導入ベクターの生物学的特性を解析し、これを用いて生理的血管新生には複数の血管新生因子の協調的連動が必要であること、その作用には階層性があること、血管新生因子の量的なアンバランスが病的血管新生を引き起こすことを示した。またこのような血管新生因子の作用バランスは、関節炎などの免疫異常による疾患の発生にも重要であることを示した。
3. 抗 MCP-1 遺伝子治療戦略の確立
我々が開発した変異型 MCP-1 遺伝子を用いた遺伝子導入が抗 MCP-1 遺伝子治療として有用であることを報告してきた。今年度はラットならびにサル（注：原文は「サル」）の動脈バルーン傷害モデルを用いて有効性を明らかにしたので報告する。これらの研究成果から、MCP-1 をターゲットとする治療が再狭窄に対する有用な新規治療になる可能性が明らかとなったので、現在、「再狭窄に対する遺伝子治療臨床研究」を厚生労働省へ申請している

(現在審議中)。

4. 末梢血内皮前駆細胞移植療法による治療的血管新生
血行再建術の適応とならない症例に対して末梢血内皮前駆 (CD34 陽性) 細胞 (EPC) を用いた細胞移植療法を実施し良好な成績を得た。本研究により末梢血内皮前駆細胞移植が、骨髄細胞移植と比較して、より安全かつ低侵襲で広く臨床応用可能な治療法になる可能性があることが示唆された。

C. 考察ならびに結論

1. 新規遺伝子 LACS がアクチン繊維との関連を介して、心筋細胞肥大に関与している可能性が考えられる。アクチン繊維および心肥大との関連に関する機能を現在解析中である。
2. 血管新生過程において内因性の血管新生因子が極めて重要であり、単一遺伝子を発現させるだけでは血流を回復させる効果的な血管新生を誘発することは容易ではないということが明かとなった。さらに「機能的」血管新生には複数の血管新生因子の協調的連動が重要であり、それらのバランスが崩れることにより「病的」血管新生を誘発するという仮説が想定される。さらに各血管新生因子は、各々が血管新生過程の重要なパートを担っており、それらのいずれかの活性が低下すると血管新生因子による治療効果に歪みが出て来ると考えられる。
3. 再狭窄ならびに動脈硬化の原因に MCP-1 が必須の役割を果たすことが明かとなった。さらに、霊長類で MCP-1 をターゲットとする治療が再狭窄に対する有用な新規治療になる可能性が初めて示された。
4. 本研究により末梢血内皮前駆細胞移植が、骨髄細胞移植と比較して、より安全かつ低侵襲で広く臨床応用可能な治療法になる可能性があることが示唆された。

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。

サブテーマ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（担当：江頭健輔）

高血圧性心肥大に関わる新規アクチン関連細胞骨格蛋白 (LACS) の単離と機能解析

九州大学大学医学部附属病院 循環器内科 江頭 健輔

【研究要旨】 慢性的一酸化窒素産生阻害によって高血圧、心肥大、動脈硬化が生じる。我々は、その分子機序を解明する方法として subtractive hybridization 法により新規遺伝子 LACS (L-NAME-related actin cytoskeletal protein)を一酸化窒素産生阻害ラットの心臓より単離した。LACS は心臓および骨格筋に特異的に発現し、高血圧心肥大モデルの心臓で広く発現が増加しており、培養心筋細胞においても心肥大誘導後に発現が増加した。これらの成績から、LACS は心筋細胞肥大に関与する新規遺伝子と考えられる。

【背景と目的】 我々は一酸化窒素(NO)合成阻害薬をラットに慢性的に投与することにより高血圧および動脈硬化、心肥大などの心血管リモデリングが生じることを明らかにしてきた。しかし本モデルにおける心肥大の成立機序は不明である。私たちはこれらの変化が心臓組織局所の ACE 活性の増加によって生じ、ACE 阻害薬や AT1R 拮抗薬ではほぼ完全に抑制できることを報告してきた。しかし局所で RAS が活性化する機序をはじめ、これらのシグナリングにはまだ不明な点も多い。

そこで私たちは心血管病変を形成する上で重要な役割を果たす新規遺伝子をクローニングしようとして着想した。求める遺伝子は病変部位で発現が亢進している遺伝子の中にあると考え、特に心臓局所での発現亢進遺伝子をサブトラクション法で得ようと考えた。そして本研究の目的はこの遺伝子の機能を明らかにし、本モデル以外の心血管病に対しても普遍的な意味を持つ新規遺伝子である可能性を検討することである。

【方法と結果】

Subtractive Hybridization 法により新規遺伝子 LACS (L-NAME-related actin cytoskeletal protein)を NO 合成阻害ラットの心臓より単離した。雄 WKY ラットに L-NAME(100mg/L)を 1 週間経口した群と対照群の心臓から RNA を抽出し、Subtractive Hybridization 法により L-NAME 群で発現が亢進している cDNA をクローン化し、その中で新規遺伝子のみについて Northern blot 法 で L-NAME 投与後の心臓組織での mRNA 発現を検討した。ランダムプライマーを用い L-NAME 投与後 1 日目の polyA RNA から入

ZAPII cDNA library を作成し、LACS 遺伝子の断片をプローブとしてスクリーニングを繰り返して、全長 cDNA を取得した。LACS は心臓および骨格筋に特異的に発現し、NO 合成阻害ラットの心臓のみでなく、他の複数の高血圧心肥大モデルラットの心臓でも発現が増加することを示した。また培養心筋細胞への肥大性のアゴニスト投与による心肥大誘導の際にも発現が増加することを明らかにした。

【考察】 LACS は細胞内では細胞間接着部位のアクチン繊維終末に局在し、アクチン繊維と結合していることが示された。このことはアクチン繊維に対して何らかの機能制御の役割を担う可能性を示唆する。また、LACS がアクチン繊維との関連を介して、心筋細胞肥大に関与している可能性が考えられる。アクチン繊維および心肥大との関連に関する機能を現在解析中である。

【共同研究者】 井上 修二郎、市来 俊弘、大谷規彰、臼井 真、竹下 彰

【学会発表】 平成14年4月、日本循環器学会学術総会（札幌市）にて発表予定

サブテーマ2
我が国独自の新規ベクターの臨床応用（担当：居石克夫、
米満吉和）

慢性炎症における病的血管新生発生機構の解析

九州大学大学院医学研究院 病理病態学 米満吉和、居石克夫

【研究要旨】

全く新しいコンセプトに基づく遺伝子導入ベクターの生物学的特性を解析し、これを用いて生理的血管新生には複数の血管新生因子の協調的運動が必要であること、その作用には階層性があること、血管新生因子の量的なアンバランスが病的血管新生を引き起こすことを示した。またこのような血管新生因子の作用バランスは、関節炎などの免疫異常による疾患の発生にも重要であることを示した。

【研究目的】

血管炎や動脈硬化巣等、慢性持続炎症巣には常に新生血管の形成を認めることを報告して来た (Hum Pathol 1995, Ann NY Acad Sci 1997)。このような新生血管は通常の状態とは異なり複雑な構造を示し、時には血管腫様の形態を取ることが多い。さらにはこれらの病的血管では、高頻度に赤血球の漏出を認め、血管構造上の脆弱性が示唆される (Lab Invest 1996)。本研究では、この病的血管新生の分子メカニズムを解明するため、我々が独自に開発した組換えセンダイウイルスベクター (SeV) により生体内で特定の血管新生因子を過剰発現させ、どのような生体反応を惹起するか、そして血管新生因子ごとに惹起される新生血管の性質について検討した。

【研究方法】

1) 虚血条件下における血管新生因子 VEGF と FGF-2 の役割の解析

マウス後肢に重症虚血を作成、SeV にて VEGF、FGF-2 を過剰発現させ、その下肢の予後に対する影響、血流回復効果、新生血管数、新生血管の成熟度について検討を加えた。

2) 虚血条件下における血管新生因子 HGF と FGF-2 の役割の解析

虚血状態の培養血管平滑筋細胞、培養線維芽細胞、マウス後肢に FGF-2 を作用させ、HGF の発現制御機構について検討を加えた。

3) アジュバント誘発性ラット関節炎モデルにおける FGF-2 の機能解析

結核菌死菌をアジュバントとして投与、SeVにてFGF-2を過剰発現、あるいは中和抗体投与にてFGF-2活性を中和した際における、関節腫脹、骨破壊、血管新生について検討を加えた。

【結果】

1) 虚血条件下における血管新生因子 VEGF と FGF-2 の役割の解析

重症虚血骨格筋では内因性 VEGF 発現は著しく増強され、特に SeV-VEGF では約 7 倍、SeV-FGF2 で 3～4 倍の発現亢進を認めた。つまり、前者では VEGF 単独の高発現状態を、後者では VEGF+FGF-2 の双方の高発現状態を実現できたことになる。結果、SeV-FGF2 群 (VEGF+FGF-2 の高発現状態) は極めて高い救肢効果が得られたにも関わらず、SeV-VEGF 群 (VEGF 単独の高発現状態) では、対照群と比較して下肢の予後は著しく低下した。

次にこの効果の差異の原因を調べるため、脱落部より中枢部の大腿骨格筋の血管新生状況を検討した。興味深いことに、SeV-FGF2 投与群、SeV-VEGF 投与群共にベースラインの 5 倍程の著明な血管数の増加を認め、その数そのものには有意差はなかった。ところが SeV-FGF2 群では PECAM-1 陽性の微小血管のうち α -smooth muscle cell actin に陽性になる周皮細胞の被覆が約 50% に認められたのに対し、SeV-VEGF 群では同様の細胞は 20% 程度に留まった。さらにレーザードップラーにて血行回復の状況を調べたところ、VEGF 群では血行回復はほとんど見られず、その結果下肢の脱落に至ることが示された。

2) 虚血条件下における血管新生因子 HGF と FGF-2 の役割の解析

下肢筋肉中の HGF 濃度は、これまでの培養系での報告と異なり虚血により有意に高値であり、SeV-FGF2 投与により内因性 HGF 発現は著しく亢進した。培養系では HGF mRNA の発現は FGF-2 濃度依存性に上昇し、時間経過では 2 峰性発現増強パターンを示した。種々のシグナル遮断薬によるスクリーニングを行なったところ、刺激早期の HGF mRNA は protein kinase A (PKA)、cyclophosphamide 他の影響を受けず MAPK1/2 (MEK) 阻害剤のみ遮断された。一方刺激後期における HGF 分泌は Ras、p70S6K 遮断薬、抗 PDGF-AA 中和抗体で部分的、MEK 遮断薬にて完全に抑制された。いずれの場合も PKA 遮断薬は効果が見られず、また FGF-2 刺激ではリン酸化 CREB は検出できなかった。

3) アジュバント誘発性ラット関節炎モデル (AIA) における FGF-2 の機能解析

ヒトリウマチ関節炎患者および AIA モデル双方で内因性 FGF-2、VEGF レベルは亢進しており、AIA モデルに SeV にて FGF-2 を外来性に過剰発現させると、内因性 VEGF の発現も強く亢進した。その結果、FGF-2 遺伝子導入 AIA ラットでは関節の腫脹、血管新生、炎症細胞浸潤のみならず、破骨細胞数、パンヌス形成、骨破壊が著明に促進された。逆に FGF-2 の中和抗体を関節腔内に投与すると、これらの臨床・病理学的所見が軽減することから、FGF-2 は関節炎の炎症反応や血管新生のみならず、骨反応制御にも重要な役割を演じていることが示唆された。

[考察]

病的血管新生における各種血管新生因子の役割の解析について、今回の我々の成績は従来
の通説と比較すると意外なものであった。つまり血管新生過程において内因性の血管新生因子が極めて重要であり、単一遺伝子を発現させるだけでは血流を回復させる効果的な血管新生を誘発することは容易ではないということである。さらに VEGF や HGF に対する中和抗体によって FGF-2 の血流回復効果を遮断できることが明らかになっていることから、「機能的」血管新生には複数の血管新生因子の協調的連動が重要であり、それらのバランスが崩れることにより「病的」血管新生を誘発するという仮説が想定される。さらに各血管新生因子は、各々が血管新生過程の重要なパートを担っており、それらのいずれかの活性が低下すると血管新生因子による治療効果に歪みが出て来ると考えられる。

今後はこれらの血管新生因子の階層的な作用機構に、他の血管新生因子がどのように絡んでいるかを、生体系を中心に解析して行きたい。

[業績リスト (2001 年以降)]

Kume M, Komori K, Matsumoto T, Onohara T, Takeuchi K, Yonemitsu Y, Sugimachi K.
Administration of a decoy against the AP-1 binding site suppresses neointimal thickening in rabbit balloon injured arteries.

Circulation 105:1226-1232, 2002.

Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S, Nakagawa K, Nakashima Y, Iwamoto Y, Nagai Y, Hasegawa M, Sueishi K. Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats.

The Journal of Immunology 168:450-457, 2002.

Matsumoto T, Komori K, Shouji T, Kuma S, Kume M, Yamaoka T, Mori E, Furuyama T, Yonemitsu Y, Sugimachi K.

Successful and optimized *in vivo* gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse.

Gene Therapy 8:1174-1179, 2001.

Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, Ueno H, Nakashima Y, Nakagawa K, Fukumura M, Kato A, Hasan M, Nagai Y, Sugimachi K, Hasegawa M, Sueishi K.

Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system.

The FASEB Journal 15:1294-1296, 2001.

Komori K, Shoji T, Furuyama T, Yonemitsu Y, Mori E, Yamaoka T, Matsumoto T, Sugimachi K.
Non-penetrating vascular clips anastomosis inhibited intimal thickening under poor runoff conditions in canine autogenous vein grafts

European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 21: 241-247, 2001.

Ishida M, Komori K, Yonemitsu Y, Matsumoto T, Onohara T, Sugimachi K.

Immunohistochemical phenotypic alterations of rabbit autologous vein grafts implanted under arterial circulation with or without poor distal runoff -implications of vein graft remodeling.

Atherosclerosis 154:345-354, 2001.

サブテーマ3
抗 MCP-1 遺伝子治療戦略の確立（担当：江頭健輔）

研究報告 1

再狭窄に対する抗MCP-1遺伝子治療法の開発

ラットならびにサルのパルーン傷害モデルでの検討

九州大学医学部附属病院 循環器内科 江頭健輔、臼井 真、北本史朗、大谷規彰

【研究要旨】

我々が開発した変異型MCP-1遺伝子を用いた遺伝子導入が抗MCP-1遺伝子治療として有用であることを報告してきた。今年度はラットならびにサルの動脈パルーン傷害モデルを用いて有効性を明らかにしたので報告する。これらの研究成果から、MCP-1をターゲットとする治療が再狭窄に対する有用な新規治療になる可能性が明かとなったので、現在、「再狭窄に対する遺伝子治療臨床研究」を厚生労働省への申請している（現在審議中）。

【背景と目的】冠インターベンション後再狭窄に対する確立された治療法はない。最近再狭窄の分子機構として血管傷害後早期に生じる炎症の重要性が注目されてきた。しかし、血管壁に生じる炎症を効率的かつ安全に阻止できる治療法は限られていた。我々は単球/マクロファージの遊走に必須の役割を持つケモカインであるmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の機能を生体レベルで阻止できる新しい抗MCP-1遺伝子治療法を開発した。すなわち、MCP-1のN末端の2番目から8番目までのアミノ酸が欠損した欠損体（7ND）がMCP-1受容体の強力なdominant negative inhibitorとして作用すること、7ND遺伝子を動物実験の骨格筋に導入すると同タンパクが循環血中に分泌されること、分泌された7NDは単球のMCP-1受容体（CCR2）に結合し受容体シグナルを阻止すること、遠隔臓器のMCP-1による単球浸潤を著明に抑制できること、を明らかにした（FASEB J 2000、Circulation 2001）。昨年度は、高コレステロール食負荷ウサギモデルにおいてパルーン傷害後の炎症反応（MCP-1発現亢進、単球・マクロファージ浸潤）が著しく抑制され再狭窄反応（内膜肥厚、陰性リモデリング）が減少することを報告した（Circulation accepted）。今年度の研究の目的は、ラットならびにサルのパルーン傷害モデルを用いて7ND遺伝子導入が血管傷害後の炎症反応ならびに新生内膜肥厚を抑制するかどうかを明らかにすることである。

【方法】

麻酔下にWKYラットの頸動脈のバルーン傷害を行った。手術前、右大腿筋内に7ND遺伝子(300 g+electroporation法)あるいは、PBS(PBS+electroporation法)を筋注した。病理組織学的検索ならびに遺伝子発現解析を行った。

カニクイサルの頸動脈バルーン傷害を実施した。バルーン傷害直後に右大腿筋内に7ND遺伝子(500 g/kg)あるいは、対照遺伝子(500 g/kg)を筋注した。上記と同様の解析を行った。

【結果】ラット頸動脈バルーン傷害後3-7日後にMCP-1の遺伝子ならびにタンパク発現、単球を主体とする炎症細胞浸潤と増殖(PCNA陽性細胞出現)が認められ、28日後には内膜肥厚を認めた。7ND遺伝子導入によって、このような炎症・増殖ならびに新生内膜肥厚は70%抑制された。

サルモデルでも同様に傷害28日後に新生内膜肥厚が観察された。7ND遺伝子導入によって新生内膜肥厚は約70%抑制された。

【考察】これらの成績から、ウサギ(昨年度)、ラットならびにサル(今年度)において再狭窄反応(血管傷害後内膜肥厚)の原因にMCP-1が必須の役割を果たすことが明らかとなった。申請者は、従来、ラットやウサギモデルにおいて有効性が示された治療法であっても、ヒトでは再狭窄に対する作用が全く認められないということが殆どであったことから、ヒトに近い霊長類での検討が必要と考えサルモデルでの実験を行った。霊長類でMCP-1をターゲットとする治療が再狭窄に対する有用な新規治療になる可能性が初めて示された。このような研究成果から、現在、「再狭窄に対する遺伝子治療臨床研究」を厚生労働省へ申請している(現在審議中)。

【関連業績】

Egashira K, Zhao QW, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, Nishida K, Inoue S, Katoh M, Ichiki T, Takeshita A. Importance of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Pathway in Neointimal Hyperplasia After Peri-arterial Injury in Mice and Monkeys. *Circulation Research* accepted

Usui M, Egashira K, Ohtani K, Kataoka C, Ishibashi M, Hiasa K, Inoue S, Katoh M, Ichiki T, Kitamoto S, Takeshita A. Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Inhibits Restenotic Changes (Neointimal Hyperplasia) After Balloon Injury in Rats and Monkeys. *FASEB J* conditionally accepted

研究報告 2

動脈硬化に対する抗 Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)

遺伝子治療の有用性

九州大学医学部附属病院 循環器内科 江頭健輔、白井 真、北本史朗、大谷規彰

【研究要旨】我々は昨年度にアポE欠損マウスモデルを用いて抗 MCP-1 遺伝子治療によって高脂肪食負荷による動脈硬化病変の発生が抑制されることを報告した (Circulation 2001)。今年度は、我々の抗 MCP-1 療法の臨床的意義を明確にするために、一旦生じた動脈硬化の進行ならびに不安定化に対する抗 MCP-1 療法の効果を検討した。本研究成果により、抗 MCP-1 遺伝子治療によって動脈硬化の進行だけでなくプラーク不安定化が防止できることが示唆された。

【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きた。我々は昨年度にアポE欠損マウスモデルを用いて抗 MCP-1 遺伝子治療によって高脂肪食負荷による動脈硬化病変の発生が抑制されることを報告した (Circulation 2001)。この成績は動脈硬化の進行に事実 MCP-1 を介する炎症が関与することを明らかにしたものである。しかし、この成果を臨床応用していくためには一旦発生した動脈硬化の進行が抗 MCP-1 療法によって制限 (あるいは退縮) するかどうか、心血管イベントの責任病変であるプラーク不安定化が抑制されるかどうか、などを明らかにする必要がある。そこで今年度の研究の目的は、上記の2点を仮説として掲げ、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。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高齢の ApoE 欠損マウスを用いた。

【方法】20週齢以上の ApoE 欠損マウスを用いた。これらのマウスでは進行性動脈硬化病変が大動脈に生じていた。7ND 遺伝子あるいは対照遺伝子 (β galactosidase) を2週間毎に大腿骨格筋に注入し、遺伝子投与開始8週後に動物を殺し、上行大動脈なたびに

弓部の動脈硬化病変の面積を評価した。内膜肥厚の程度ならびに不安定プラークの指標(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。免疫組織化学法を用いて、MCP-1 発現部位を検討した。

【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。

対照遺伝子群では8週間の観察期間中に動脈硬化プラークが約2倍に進行した。7ND 遺伝子群では、このプラーク面積の増加が防止された。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。さらに、動脈硬化の程度(内膜肥厚)の増加も防止された。病理組織学的解析により対照遺伝子群では動脈硬化病変内のプラーク不安定化指標が生じていた(脂質沈着増加、炎症増加、コラーゲン減少、平滑筋減少)。7ND 遺伝子導入により、これらの指標の変化が防止される(安定化の方向に向かう)ことが明かとなった。対照遺伝子あるいは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進行の分子機構に 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かとなった。

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、MCP-1 を介する炎症が動脈硬化ならびに動脈硬化性疾患の発症に必須の役割を果たすことがあきらかとなった。

【関連業績】

Egashira K, Ni WH, Kitamoto S, Usui M, Inoue S, Ohtani K, Ishibashi M, Hiasa K, Kataoka C, Ichiki T, Nishida K, Takeshita A. Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Limits Progression and Destabilization of Established Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice. Circulation submitted.