

循環器疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製に関する研究

分担課題：細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

分担研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

**研究要旨** 次世代高分子ベクター（ゼラチン-遺伝子複合体他）をin vitroでヒト末梢血単球、マクロファージ、血管内皮前駆細胞、骨髄単核球に高い効率で遺伝子を導入する技術を開発する。マウス、ラット、家兎等を用いて諸臓器の循環障害をモデルを用いて血管成長因子等を導入した上記の細胞によるハイブリッド細胞-遺伝子治療法を開発する。

**A. 研究目的**

末梢血単球、マクロファージその他の細胞によってどん食され、細胞内で遺伝子が発現するgelatin- 遺伝子複合体を血管内皮前駆細胞に取り込ませる技術を開発し、血管内皮前駆細胞への非ウイルス性遺伝子導入による機能強化を実現する。機能強化した自己血管内皮前駆細胞を病態モデルに投与して細胞-遺伝子ハイブリッド治療を実現する。また再生血管評価のための単色x線診断システム（空間解像度50ミクロン）を開発する。これを用いて虚血組織血管床の再構築に対する血管内皮前駆細胞移植法の効果を検討する。

gelatin- 遺伝子複合体による遺伝子導入法は非ウイルス性でかつ導入効率が高い。既存のウイルス性ベクターと比較して、安全面で大きな利点があり、一方遺伝子単独投与方法と比べると導入効率において格段に優れている。自己細胞に非ウイルス性の遺伝子導入を行うことにより、拒絶反応のリスクもない画期的な細胞移植治療が実現する。具体的にはadrenomedulin遺伝子を血管内皮前駆細胞に導入し、肺高血圧、下肢虚血、および心筋虚血モデルで治療効果を検討する。さらにマクロファージにGFP遺伝子を導入し、静脈内投与による臓器targetingが可能かどうか検討する。また、FGF4遺伝子を導入したマクロファージを下肢虚血、および心筋虚血モデルに静脈内投与し、治療効果を検討する。

**B. 研究方法**

- 1) 血管内皮前駆細胞（EPC）にgelatin- 遺伝子（GFPおよびadrenomedulin遺伝子）複合体をどん食させ、細胞内での遺伝子発現を

GFP遺伝子で検討し、肺高血圧モデル等で細胞-遺伝子ハイブリッド治療の効果を検討する。

- 2) 微小血管造影法の開発：放射光を線源とする微小血管造影法の代替として、病院に設置可能な普及型微小血管造影装置の試作機を作成する。

**C. 研究結果**

- 1) gelatin- 遺伝子複合体による血管内皮細胞への遺伝子導入法を確立した。肺高血圧モデルで、adrenomedulin 遺伝子により機能強化したEPCの有効性を確認した。
- 2) 空間像度 50 ミクロンの普及型微小血管造影装置の一次試作を完成させた。

**D. 考察**

gelatin- 遺伝子複合体による遺伝子導入法は非ウイルス性でかつ導入効率が高い。既存のウイルス性ベクターと比較して、安全面で利点があり、一方、遺伝子単独投与方法と比べると導入効率と治療効果でより優れている。

**E. 健康危険情報**

なし

**F. 結論**

自己細胞に非ウイルス性の遺伝子導入を行うことにより、細胞と遺伝子の両方の機能が治療に貢献する細胞-遺伝子ハイブリッド治療が実現される。普及型微小血管造影装置の実現により下肢虚

血疾患に対する血管再生医療の効果判定が容易となる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 國本 聡, 笠原啓史, 浅原孝之, 盛 英三ほか遺伝子による血管新生. ここまで進んだ再生医療の実際(田畑泰彦編),2003 , 羊土社. pp116-123.
2. Akiyama T, Mori H. et al, Acetylcholinesterase Inhibitor Elicits Muscarinic Receptor-Mediated Cholinergic Transmission In The Rat Adrenal Medulla, Catecholamine Research, 2002, Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp65-68
3. J.T.Pearson, H.Mori,et.al, Future Investigations of Micro-Macro Level Cardiac Functions Using X-ray Diffraction, BME 2002, 16:29-35.
4. T.Kawada, H.Mori,et.al, Disruption of vagal efferent axon and nerve terminal function in the postischemic myocardium, Am J Physiol Heart Cric Physiol 2002, 283:H2687-H2691.
5. H.Kitagawa, H.Mori,et.al, Effects of Moderate Hypothermia on Norepinephrine Release Evoked by Ouabain, Tyramine and Cyanide J.Cardiovascular Pharmacology 2003, 41: S111-S114.
6. E.Sato, H.Mori,et.al, Quasi-monochromatic prallel radiography achieved with a plane-focus x-ray tube Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences 2002, 37:23-32.
7. E.Sato, H.Mori,et.al, New X-ray irradiation from weakly ionized linear plasma Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences 2002,37:13-22.
8. T.Kawada, H.Mori,et.al, Effect of brief ischaemia on myocrdial acetylcholine and noradrenaline levels in anaesthetized cats, Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical 2002, 95:37-42.
9. E.Kuwabara, H.Mori,et.al, Inhomogeneous Vasodilatory Responses of Rat Tail Arteries to Heat Stress:Evaluation by Synchrotron Radiation Miroangiography, Japanese Journal of Physiolsy 2002, 52 :403-408.
10. E.Sato, H.Mori,et.al, Fundamental study on parallel beam radiography using a polycapillary plate, Pro.SPIE 2002, 4682:298-310.
11. E.Sato, H.Mori,et.al, Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-x-ray laser generator, Pro.SPIE 2002, 4682:538-548.
12. H.Kasahara, H.Mori,et.al, Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of Fibroblast Growth Factor 4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia, JACC 2003, 41:1056-62.
13. 秋山剛、盛英三、他、虚血部心臓交感神経終末におけるノルエピネフリン動態、呼吸と循環 2003、51:269-275.
14. 河合敏昭、盛英三、他、微小血管撮影装置開発と再生血管の可視化、Radiosotopes 2003、52:55-58.
15. 西上和宏、盛英三、他、血管再生療法の未来と画像評価法、BME 2002、16:45-50.
16. 土持 裕胤、盛英三、他、生分解性ゼラチンを用いた遺伝子治療法、遺伝子医学 2002、6:382-385.
17. 佐藤英一、盛英三、他、新 X 線源創製の試みとポリキャピタリーを用いた平行ビーム撮影、日本写真学会誌 2002、65:473-479.
18. 福山直人、盛英三、他、ゼラチン-遺伝子複合体を用いた血管新生療法、循環器科 2002、51:259-263.
19. 田中越郎他. 放射光微小血管造影法による再生血管の可視化. 放射光, 2002, 16:30-33.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

班友

福山直人、田中越郎 東海大学医学部

循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製に関する研究

分担課題：遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

分担研究者 永谷 憲歳 国立循環器病センター心臓内科

研究要旨

生体吸収性ゼラチンを用いた血管内皮前駆細胞（EPCs）への非ウイルス性遺伝子導入法の開発に成功した。ゼラチン遺伝子複合体は容易に EPCs に貪食され、高率の遺伝子導入（70%以上）、長時間の遺伝子発現（2週間以上）が可能となった。血管拡張因子であるアドレノメデュリン（AM）遺伝子を導入した EPCs を移植すると、モノクロタリン肺高血圧ラットの肺血管抵抗が軽減し、生命予後が改善された。この細胞移植/遺伝子ハイブリット治療法は重症肺高血圧症に対する新たな治療法となる可能性がある。

A. 研究目的

肺高血圧症は肺血管内皮障害を病因とする予後不良な疾患である。血管内皮前駆細胞(EPCs)は血管障害部位への遊走能、血管再生能を持つことが知られている。今回の研究目的は、生体吸収性ゼラチンを用いた EPCs への新たな *ex vivo* 遺伝子導入法を開発すること、さらにはアドレノメデュリン (AM) 遺伝子導入 EPCs の移植が肺高血圧を軽減させるか否か検討することである。

B. 研究方法

ヒト臍帯血から単核球細胞を分離培養し、EPCs を得た。正電荷に帯電したゼラチンに AM DNA を結合させ、EPCs と3日間の共培養を行った。モノクロタリン肺高血圧ラットに、AM 遺伝子を導入した EPCs を静脈内投与して、3週間後の肺高血圧軽減効果および予後改善効果を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は日本生理学会の定める動物実験ガイドラインに従って行われた。

C. 研究結果

EPCs はゼラチン/DNA 複合体を貪食し、EPCs 自身への高率の遺伝子導入（76%）が可能であった。AM 遺伝子導入 EPCs は EPCs 単独の10倍の AM を分泌し、2週間以上発現が持続した。経静脈的に投与した EPCs は肺動脈に付着して血管を形成した。AM 遺伝子導入 EPCs の移植は、コントロール群に比べて平均肺動脈圧を有意に低下させ（ $24 \pm 2$  vs  $34 \pm 1$  mmHg,  $p < 0.001$ ）、生存率を改善させた（ $p < 0.001$ ）。

D. 考察

今回の研究では、血管内皮細胞へ分化する可能性のある未熟な EPCs に *ex vivo* で遺伝子導入し、体

内へ移植した。興味深いことにEPCsはゼラチン/プラスミドDNA複合体を容易に貪食した。このEPCsの貪食能はウイルスベクターを用いずに高率の遺伝子導入を可能にした。比較的方法も簡便であることから、新たな遺伝子導入法として期待される。EPCsは虚血や外傷によって血管内皮が障害されると、骨髄から末梢血へ動員され、血管内皮障害部位を感知、遊走して血管を再生させると言われている。本研究においても、EPCsは静脈内投与で容易に肺血管に付着して血管を形成した。本研究における肺血管内皮への遺伝子導入はこの未熟な細胞の1)障害血管への遊走能、2)血管内皮再生能を利用したものであると言える。血管拡張因子であるAMの遺伝子を導入したEPCsを体内への移植をした結果、肺高血圧ラットの平均肺動脈圧、全肺血管抵抗は著明に低下した。EPCsから分泌されたAMがパラクライン的に血管内皮、平滑筋に働いて、肺血管を拡張させた可能性がある。

#### E. 結論

EPCsの貪食能を利用したEPCs自身への非ウイルス性遺伝子導入に成功した。AM遺伝子導入EPCsの移植はモノクロタリンラットの肺高血圧を軽減し、生命予後を改善させた。この細胞移植/遺伝子ハイブリット治療法は重症肺高血圧症に対する新たな治療法となる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Tabata Y, Mochizuki

N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Hara H, Asahara T, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. Circulation (in press)

2. Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. Circulation (in press)
3. Nagaya N, Okumura H, Uematsu M, et al. Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. Am J Physiol (in press)

##### 2. 学会発表

American Heart Association 75th, 2002, Chicago  
Nagaya N, Horio T, Horio T, et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製に関する研究  
分担課題：遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

分担研究者 清水 達也 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 助手

研究要旨

遺伝子導入された細胞のデリバリーシステムとして単離した細胞を注入するより細胞シートとしてデリバリーの方が効率的であることを着想し、本年度の研究では基本的な細胞シートの作製ならびに積層化法を確立、*in vivo* への正着ならびに長期的な生存を確認した。

A. 研究目的

遺伝子導入された細胞のデリバリーシステムとして遺伝子導入後、その細胞を標的臓器に直接あるいはカテーテルを用いて経皮経管的に移植する方法が考えられる。これら単離細胞のインジェクションによる移植法は既に臨床応用もされておりある程度の効果は期待されるが、血管への流出、移植片の内部壊死など細胞の損失も多くより効率的なデリバリー法の開発が必要となっている。そこでシート状に組織化された細胞の回収および移植が可能となれば、最初から隣接している細胞が互いに接着していることで血管への流出を防ぐことができ、また移植片の厚さを積層枚数で制御することによりインジェクション時のような細胞塊の形成による内部壊死を回避でき、その結果、細胞の損失なく効率よくデリバリーできることが期待される。そこで本研究では心疾患を対象とし心筋細胞をシート状に回収・積層化する手法を開発 *in vivo* への移植実験を行いその生存を長期にわたり観察することを目的とした。

B. 研究方法

シート状の細胞の回収には当研究所で開発された温度応答性培養皿を用いた。この培

養器材は通常の培養皿上に温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を電子線照射により表面修飾したもので、通常の培養温度である 37℃では疎水性表面となり細胞接着性であるが、32℃以下の低温処理で親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿を使うと、接着した細胞をトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく脱着させることが可能である。さらに、細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態では、低温処理により細胞がその下面の接着因子とともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合は全く解離せず維持されるため細胞をシート状に回収できる。この培養皿状に新生仔ラット心筋細胞を培養し細胞シートを作製した。低温処理により脱着した細胞シートを積層化、電気生理学的解析および組織学的解析を行った。さらに、積層化心筋細胞シートをヌードラット皮下組織に移植、皮膚表面電位を測定、さらに切開してその収縮弛緩、組織像を長期にわたり経時的に観察した。実験動物を使用した実験に関しては東京女子医科大学動物実験に関する指針に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して十分な倫理的配慮のもとに行った。

C. 研究結果

低温処理により脱着した心筋細胞シートを重層化したところ2枚の細胞シートは同期して拍動し、組織切片にて多数のコネキシン43の発現を認めたことより、重層化心筋細胞シート間の形態および電氣的結合が示された。さらに、4層まで積層化したところ、肉眼レベルで同期して収縮弛緩運動することが確認された。次に、重層化心筋細胞シートをヌードラット皮下組織に移植した結果、宿主心臓とは異なるグラフト由来の皮膚表面電位が確認された。移植部を切開したところ心筋グラフトが肉眼レベルで自発的に収縮弛緩していた。グラフト内には2~3日のうちに多数の毛細血管網新生が確認された。組織切片上、伸展し横紋を有する心筋細胞ならびに細胞間にはデスモゾームやギャップジャンクションを認め心筋様組織が再構築されていた。さらに長期にわたって観察したところ心筋組織がホストラットの成長に伴いその大きさ、厚さ、電気伝達速度、収縮力の増大を示す結果を得た。最終的には最長1年までその拍動を維持して生存することを確認した。

#### D. 考察

シート状の心筋細胞の積層化によりシート間に電氣的、形態的な結合ができ全体が同期して拍動したことはさらなる積層化によりより厚く高機能な移植心筋組織作製の可能性を示唆するものであり、心筋症による重

症心不全に対する新たな細胞治療法となることが期待される。また遺伝子デリバリーの担体として損失なく効率的に遺伝子デリバリーが可能であると考えられる。

#### E. 結論

温度応答性培養皿を用いた心筋細胞シートの積層化により同期して自律拍動する心筋グラフトの作製が可能となりその長期的な生存が確認され、遺伝子デリバリーの効率的な担体としての可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Tissue engineering for myocardial regeneration. J Artif Org. 5:216-222(2002)

・ Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cardiac tissue engineering based on novel cell-sheet manipulation techniques utilizing temperature-responsive culture surfaces. Tissue Engineering for Therapeutic Use 6. 57-66(2002)

##### 2. 学会発表

・ The 75th Scientific Sessions of American Heart Association, 2002. 11.17-20, Chicago, Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. Tissue-Engineered Cardiac Grafts Survive and Preserve Their Beating up to

6 Months in Rat Subcutaneous Tissues.  
Supplement to Circulation Vol.106, No.19,  
II-464 (2002)

・ 5th Annual Meeting of the Tissue  
Engineering Society international,  
2002.12.8-10, Kobe. Shimizu T, Yamato M,  
Kikuchi A, Okano T. Fabrication of  
multi-layered and neovascularized  
myocardial tissues by cell sheet  
engineering. Tissue Engineering Vol. 8,  
No. 6, P1246 PP-197

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
増田治史 浅原孝之	血管内皮前駆細胞による血管再生	須田年男 岡野栄之	再生医学	中山書店	東京都	2003	162-168
國本 聡 笠原啓史 浅原孝之 盛 英三 ほか	遺伝子による血管新生	田畑泰彦	再生医療の実際	羊土社	東京都	2003	116-123
Akiyama T, Mori H.	Acetylcholinesterase Inhibitor Elicits Muscarinic Receptor-Mediated Cholinergic Transmission In The Rat Adrenal Medulla	Nagatsu	Catecholamine Research	Kluwer Academic/Plenum Publishers	New York	2002	65-68
清水達也	細胞シート用材料	筏 義人	再生医療工学の最先端	シーエムシー出版	東京都	2002	29-35

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y	Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation.	J. Controlled Release	80	333-343	2002
Hosseinkhani H, Aoyama T, Ogawa O, Tabata Y	Liver targeting of plasmid DNA by pullulan with metal coordination.	J. Controlled Release	83	287-302	2002
Iwaguro H, Masuda H, Asahara T et al.	Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration.	Circulation	105(6)	732-738	2002
Kawamoto A, Iwaguro H, Asahara T et al.	Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia.	Circulation	107	461-468	2002



J.T.Pearson, H.Mori,et.al	Future Investigations of Micro-Macro Level Cardiac Functions Using X-ray Diffraction	BME	Vol.16,No1	29-35	2002
T.Kawada, H.Mori,et.al	Disruption of vagal efferent axon and nerve terminal function in the postischemic myocardium	Am J Physiol Heart Cric Physiol	283	H2687-H2691	2002
H.Kitagawa, H.Mori,et.al	Effects of Moderate Hypothermia on Norepinephrine Release Evoked by Ouabain, Tyramine and Cyanide	Journal of Cardiovascular Pharmacology	41	S111-S114	2003
E.Sato, H.Mori,et.al	Quasi-monochromatic parallel radiography achieved with a plane-focus x-ray tube	Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences	No.37	23-32	2002
E.Sato, H.Mori,et.al	New X-ray irradiation from weakly ionized linear plasma	Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences	No.37	13-22	2002
T.Kawada, H.Mori,et.al	Effect of brief ischaemia on myocardial acetylcholine and noradrenaline levels in anaesthetized cats	Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical	95	37-42	2002
E.Kuwabara, H.Mori,et.al	Inhomogeneous Vasodilatory Responses of Rat Tail Arteries to Heat Stress:Evaluation by Synchrotron Radiation Miroangiography	Japanese Journal of Physiolosy	52	403-408	2002
E.Sato, H.Mori,et.al	Fundamental study on parallel beam radiography using a polycapillary plate	Pro.SPIE	4682	298-310	2002
E.Sato, H.Mori,et.al	Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-x-ray laser generator	Pro.SPIE	4682	538-548	2002
H.Kasahara, H.Mori,et.al	Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of Fibrolast Growth Factor 4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia	JACC	Vol.41,No.6	1056-62	2003
秋山剛、 盛英三、他	虚血部心臓交感神経終 末におけるノルエピネ フリン動態	呼吸と循環	第 51 卷 第 3 号	269-275	2003

河合敏昭, 盛英三, 他	微小血管撮影装置開発 と再生血管の可視化	Radiosotopes	Vol.52,No1	55-58	2003
西上和宏, 盛英三, 他	血管再生療法の未来と 画像評価法	BME	Vol.16,No.2	45-50	2002
土持 裕胤 盛英三, 他	生分解性ゼラチンを用 いた遺伝子治療法	遺伝子医学	Vol.6,No.3	382-385	2002
佐藤英一, 盛英三, 他	新 X 線源創製の試みと ポリキャピタリーを用 いた平行ビーム撮影	日本写真学会 誌	65 巻 7 号	473-479	2002
福山直人, 盛英三, 他	ゼラチン-遺伝子複合 体を用いた血管新生療 法	循環器科	51	259-263	2002
田中越郎	放射光微小血管造影法 による再生血管の可視 化	日本放射光学 会誌	Vol.6,No.1	30-33	2003
Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al.	Cardiac tissue engineering based on novel cell-sheet manipulation techniques utilizing temperature-responsive culture surfaces.	Tissue Engineering for Therapeutic Use	6	57-66	2002
Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al.	Tissue engineering for myocardial regeneration.	J Artif Org.	5	216-222	2002

20020408

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.26-P.28の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。