

図 4

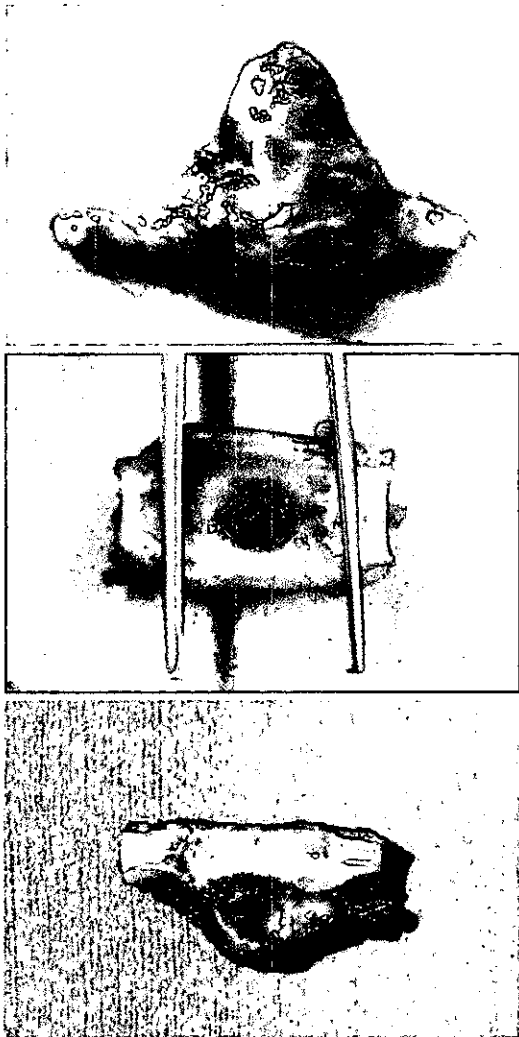


図 5



図 6

瘤は血管造影では確認できなかった。これは動脈瘤がステントにより完全に閉塞できたと言える。親血管の直径は 4mm であった。親血管は狭窄せず、すべて開存していた。

C-4. 肉眼所見

ステント留置直後、ステントにより閉塞した動脈瘤の内部は血栓化していた（図 5）。1 週、1 ヶ月、3 ヶ月後にはステントにより閉塞された動脈瘤の内部はほぼ完全に器質化されていた。血管の縦切り切片から、ステント設置 1 週間において頸動脈に留置したステントグラフトのカバーに開けた微細孔を通して血管壁からカバー内腔面への内膜の侵入を認めた。動脈瘤への入り口は完全に閉鎖されていた。

C-5. 病理学所見

ステント留置直後の標本を光学顕微鏡で観察すると、瘤の入り口はステントにより完全に遮断され、動脈瘤の内部はほぼ完全に血栓で占められていた（図 6）。ステント留置 7 日後には動脈瘤の内部に僅かな血栓が観察されたが、他の部分はほぼ完全に器質化されていた。ステント留置初期にはステント内腔は微細孔を通した組織侵入により新生膜の薄層が覆っていた。ステント内腔は平滑であった（図 7）。



図 7

SEM 観察により、ステント内腔面は血管内皮細胞で完全に覆われていた。すべてのステントにおいて、動脈瘤は成熟した繊維性の結合組織で満たされた（組織化した血栓）。ステント留置直後には、1 例を除き、2-5 層からなる薄い新生内膜が処置部位に存在した。繊維性の結合組織（ステント周辺の組織化した成熟血栓と新生内膜）の中で、マクロファージからなる軽度の炎症性細胞浸潤を認めた。

処置 1 ヶ月、および 3 ヶ月後の標本では、マクロファージ、好中球、および異物性巨細胞からなる肉芽腫性の組織増殖が観察された。頸動



図 8

脈に留置したステントの内腔表面は繊維性組織による薄層および内皮細胞で覆われていた。

D. 考察

脳血管内治療は血管奇形、動脈瘤、および狭窄・閉塞疾患のような脳血管疾患の治療法として広く用いられている。ステントは治療時間とコストに有利なため、動脈瘤の塞栓には魅力的である。

我々の開発したステントはすぐに動脈瘤を閉塞し、術後初期において親血管の血栓性閉塞を回避でき、長期の開存を保った。基材に用いたステントは、動脈の狭窄治療のために開発されたバルーン拡張型を流用した。このステントにカバーした弾性フィルムはエキシマレーザーアブレーション法により微細孔が厳密に施され、光反応性ゼラチンによりヘパリンを含浸させている。

ヒト動脈瘤を模倣した動脈瘤モデルが開発されているが、長時間を要し、再現性が低いので、最も信頼性のある動脈瘤モデルとして犬頸動脈に end-to-side に作製した静脈囊吻合モデルを用いた。犬は移植片の修復がブタ、ウシ、ヒヒのような他種とくらべて修復が非常に遅く、ヒトに近い。犬とブタの間の修復の相違について

の研究により、ブタでは動脈瘤を修復する傾向を示す厚い新生内膜を認めたが、犬では動脈瘤が再発する傾向を示す薄い新生内膜を認めた事が報告されている。

頭蓋内動脈瘤の血管内手術は、特に GDC の電氣的に脱着可能なコイルが導入されたことにより、これまでの外科手術に変わる治療法として大変魅力的となっている。血管内手術は局所麻酔、鎮静下行える。しかしながら、コイルは通常単独では動脈瘤を完全に埋めることはできず、動脈瘤の完全な閉塞には血栓形成が必要となる。細胞外マトリックスの合成と堆積を行う血管平滑筋細胞 (VSMCs) の移動、増殖が創傷修復過程における血管の統合や血管修復に伴う。ブタ動脈瘤の完全なる修復はバルーン障害後の新生内膜の過形成に似た厚い内膜を形成する。しかし、犬やウサギでは新生内膜形成が不十分なため、コイルによる塞栓の後に動脈瘤の再発が考えられる。GDC 治療では、術後 12 週まで瘤口の内皮化は臨床的に観察できなかった。コイルの内皮化は血栓性塞栓の併発を防ぐのに有用であるだけでなく、瘤口での血管平滑筋細胞の誘導・増殖も減少できる。一方、コラーゲンや繊維化を促進する他の増殖因子で修飾したコイルは繊維芽細胞の移動や内皮細胞のための良好な足場を提供すると考えられる。ブタ動脈瘤の治療には 3 段階ある：(1) 炎症を伴った血液凝固、(2) タンパクマトリックス生成を伴う VSMCs の移動と増殖、(3) 血管再構築である。厚く、強い新生内膜の形成により、動脈瘤の閉塞に続く永続的な動脈瘤の塞栓ができる。しかしながら、動脈瘤をコイルで塞栓する方法に数点の欠点がある。まず、デバイスの大きさと形を動脈瘤に適応させるときに動脈瘤が伸張するため、術中に出血する恐れがある。第二に、コイルは瘤口を完全に閉塞することができないので、閉塞できなかった動脈瘤から再出血する恐

れがある。第三に、コイルが詰まっているために、再循環の恐れがある。

コイルによる塞栓の制限を防ぐため、血管内でバルーンの拡張できるまたは自己拡張できるステントが有望であると報告されている。ステントはある程度の大きさを有しているため、動脈瘤の内腔に落ちることはない。チューブ状の自己拡張できる多孔性ステントは瘤に直接接触することなく完全または選択的に閉塞出来た。動脈瘤内での通常の流れ特性はステント留置の直後に変化した。瘤口での血液の流入が血管内デバイスのメッシュにより阻止された。血管内デバイスは瘤口をブリッジすることにより血流を親血管の流れを末端側へ選択的に向ける。その結果、動脈瘤への血液の流入を減少でき(血液をそらすことと導管の効果)、最終的に動脈瘤の閉塞を促進する。ステント留置の後、瘤内への血液の流入出はほとんど観察されなかった。数例において流入出が認められたが数分間放置すると血液の血栓化が起こった。ステント留置の後、鬱血により血栓が形成し、繊維性組織の成長や血栓の組織化が起こり、動脈瘤内腔の血栓化をまねいたと考えられる。

大きな瘤口の場合、非カバーステントは親血管へのコイルの脱漏を防ぎ、動脈瘤の血栓による不完全な閉塞を減少し、コイルが血管内腔の足場として作用する。大きな動脈瘤へステントを留置すると、広口の動脈瘤を狭口のものに変える。一度、囊塞栓材料やデバイスにより血流を瘤口でブロックすると、ステントは瘤口での内皮化を促進すると考えられる。弾性を有する薄膜層は瘤口でとぎれたままであったが、ステントのメッシュにより補強され、比較的厚く、内皮化した繊維性組織が犬動脈瘤モデルにおいて動脈瘤の再発や再成長を阻止したのかもしれない。もちろん、ステントを留置することは病巣に命中する能力や分岐部での動脈瘤により、

また動脈の分岐部周辺での瘤口により制限される。

未処理のステントでは動脈瘤の内腔を親血管内腔から隔離できない。理想的には、ステントは動脈瘤内腔を即座に隔離できることが要求される。血液の循環から広い動脈瘤口や瘻を隔離するためにステントを用いた報告がある。ステントは大きい瘤口を防ぎ、即座に動脈瘤への血液の流入を停止できるかもしれない。補綴グラフト材料は血液を比較的交通性の低い隔壁を形成する。ステントは血管内ステントのような接触デバイスで、動脈壁に固定された補綴グラフトである。この方法の原理は動脈片を隔離することで最狭窄を防ぎ、新生内膜の過形成を抑制させる。ステントを動脈瘤治療に応用すると、ステントやグラフトの大きさは動脈瘤径と親血管径にのみ決められ、動脈瘤の大きさや形には依存しない。

末梢血管障害を持つ 50 人の患者について、ダクロンを編んだ改良型バルーン拡張型 Palmaz ステントを内腔に留置させ、安定した血流表面を確保させた。頸動脈の擬動脈瘤では、ポリエステル (Craggstent; Mintec, Bahamas) の編み込みで覆われた自己拡張型ニチノールステントの使用により、ステント端での新生内膜が成長し、宿主血管の狭窄や塞栓を起こす可能性がある。ウサギ大動脈にポリエチルアクリレート/ポリメチルメタクリレート (PEM) をカバーしたステントを挿入すると、抗凝固および抗血小板治療 (ヘパリンとアスピリンの断続投与) にも関わらず強い血栓形成反応を伴い留置 3 日で塞栓した。ダクロンカバーステントは留置 9 ヶ月後に著しく高い再狭窄率を示した。小口径の動脈と表面の粗さ、電荷、表面自由エネルギーのような表面の物理性質が血栓形成や組織侵入 (再狭窄) に重要であると考えられる。

我々が開発したステントは留置直後に動脈瘤

を閉塞し、生成した血栓を断続的に洗い流すことができるために血栓症のリスクは低い。微細孔を通しての組織侵入により生成した薄い新生内膜は、ステント留置の初期にステント内腔面を覆った。囊を血管側壁に有する犬の動脈瘤モデルにおいて、フィブリングルーにて閉塞して 21 日後には瘤口は内皮層で覆われていた。走査型電子顕微鏡観察により、小さな IC-PC (internal carotid artery-posterior communicating artery) を有する塞栓患者において、IDC (interlocking detachable coil) コイルの内皮化を認めた。瘤口は完全に塞栓し、IBCA (イソブチルシアノアクリレート) の注入により犬動脈瘤処置の 1 週間後には内皮化された。我々の研究では、瘤口は留置 7 日後という早期に内皮層で覆われた。動脈の傷の剥削の後の内皮の復元により平滑筋細胞の増殖を阻害し、内皮の復元を刺激すると同時に新生内膜の過形成の退行を最大化する。ヘパリン、アスピリン、ジピリダモール、デキストランを組み合わせた治療は犬のモデルにおいてステントの血栓形成による塞栓を著しく防止した。別の研究により、植え付けた内皮細胞の生物学的効果は細胞特異的であり、一種類の薬理学的な内皮細胞の産生物類自体であるヘパリンの投与にも勝っている。内皮細胞は VSMC 増殖を抑制するヘパリン類似体を分泌し、内皮細胞層の修復が VSMC の成長を抑制し、内膜肥厚を防止することが内皮細胞剥削実験により示された。組織学的観察により、ステントによる動脈瘤閉塞の 1, 3 ヶ月後には、それぞれの動脈瘤内腔を満たすべく組織化された血栓を示す成熟した繊維性結合組織とコラーゲンの生成と親血管の開存を認めた。

E. 結論

我々が開発したステントは動物モデルだけではなく、ヒトにたいする頭蓋外の動脈瘤の塞栓

のための有用な補綴デバイスといえる。カバー材は薬物だけでなく遺伝子の固定・徐放担体として機能できるため、このカバーステントは遺伝子の局所送達を可能にする新しい遺伝子デリバリーデバイスとみなせる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda, Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 64A, 52-61.
2. S. Nishi, Y. Nakayama, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda, Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded micropored stent graft, *Neurosurgery.*, 2003, in press.

2. 学会発表

1. Nishi S, Nakayama Y, Ueda-Ishibashi H, Matsuda T, A novel high-performance stent graft with micropores and heparin immobilization: Embolization of canine cervical carotid aneurysm. *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 30th.
2. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、再狭窄への予防-ヘパリン固定化多孔質カバーステントの開発、第8回日本血管内治療学会(奈良三井ガーデンホテル)、2002年7月5日

3. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバーステントによる実験的動脈瘤の閉塞-その有用性-、第8回日本血管内治療学会(奈良三井ガーデンホテル)、2002年7月5日
4. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバーステントの実験的動脈瘤への応用-薄膜カバーへの微細孔とヘパリンの付与、第40回日本血管内治療学会(札幌京王プラザホテル)、2002年10月3日
5. 西正吾、中山泰秀、植田初江、マツダ武久、FK506を付与したcovered stentの開発-内膜肥厚に対する抑制効果、第40回日本血管内治療学会(札幌京王プラザホテル)、2002年10月3日
6. 西正吾、香月教寿、中山泰秀、植田初江、松田武久、頸部内頸動脈血管形成術(ステント留置術)より安全な手技、長期効果を目指して、第18回日本脳神経血管内治療学会(沖縄コンベンションセンター)、2002年12月5日
7. 西正吾、香月教寿、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバーステントの実験的動脈瘤への応用、薄膜カバーへの微細孔とヘパリンの付与、第18回日本脳神経血管内治療学会(沖縄コンベンションセンター)、2002年12月5日
8. Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ishibashi-Ueda, Development of novel drug-eluting covered stents with combination of micropores and differential coating of heparin and FK506, *Cardiovascular Radiation Therapy (CRT) 2003* (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
9. S. Nishi, Y. Nakayama, H. Ishibashi-Ueda, T. Matsuda, A heparin loaded

stent graft with micropores: Embolization of experimental carotid aneurysms, *Cardiovascular Radiation Therapy (CRT) 2003* (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日

10. H. Ishibashi-Ueda, Y. Nakayama, S. Nishi, Histological evaluation of FK506 eluting and polymer covered stents in rabbits, 第67回日本循環器病学会学術集会(福岡国際会議場) 2003年3月30日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 中山泰秀、西 正吾、山田 進、動脈瘤閉鎖具、特願 2002-195851

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

循環器系疾患動物モデルの作製と遺伝子治療に関する研究 1：
内膜肥厚、虚血疾患モデルと血管ホルモン遺伝子導入効果

分担研究者 伊藤 裕（京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・内分泌代謝内科 助教授）

研究要旨

本プロジェクトで開発する合成高分子系遺伝子導入ベクターの臨床研究に向けた準備研究として、2種類の循環器系疾患の動物モデルを作製し、アデノウイルスベクターまたはプラスミドを用いた遺伝子治療を行った。兔静脈グラフトを動脈切断面に端端吻合による移植を行い、狭窄モデルを作製した。アデノウイルスを用いて CNP 遺伝子を導入すると、血管平滑筋細胞の過増殖を抑制することができた。さらに障害内皮の再生が促進され、抗血栓機能など内皮機能を回復でき、血管保護作用が発揮されることを明らかとした。一方、CNP プラスミドを虚血疾患モデルマウスに筋注すると、血管再生が促進されることを明らかとした。本研究において前臨床研究のモデルと評価系が確立され、本プロジェクトで開発するベクターとの比較系が構築できた。

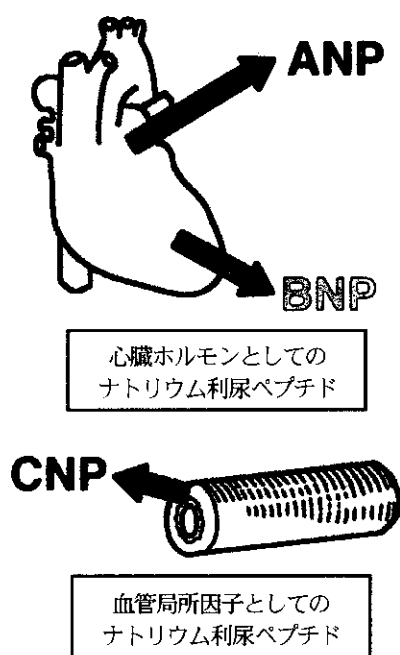


図 1

A. 研究目的

強力な利尿、ナトリウム利尿、血管平滑筋弛緩作用を有するナトリウム利尿ペプチドは、ANP、BNP、CNP より成るが、我々はこれまで ANP、BNP が心臓から分泌されるホルモンであり、一方 CNP は血管内皮細胞から分泌され NO と同様に cGMP カスケードを活性化する新しい内皮由来血管拡張ペプチドであることを明らかにした (図 1)。更に、ナトリウム利尿ペプチドが血管平滑筋細胞の遊走・増殖を抑制し、その分化を誘導することを報告した。ANP 及び BNP は既にそれぞれ本邦及び米国においてペプチド製剤として急性心不全の治療剤として臨床応用されている。血管局所ホルモンである CNP は、動脈硬化症疾患に対する臨床応用が期待されるが、慢性疾患である血管病の治療に対しては、半減

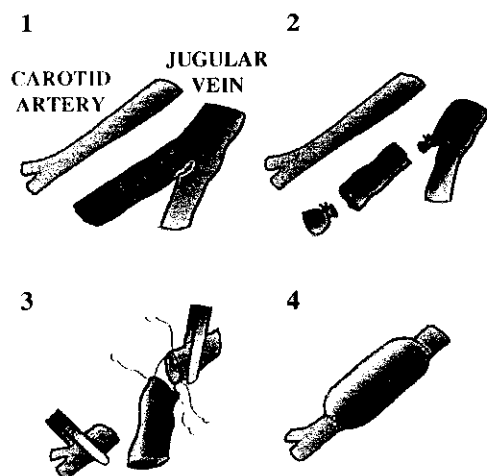


図 2

期の短いペプチド製剤の応用は困難である。そこで本研究においては、ナトリウム利尿ペプチドの内皮細胞への作用を解析し、血管保護・再生への効果を検証するとともに、CNP の血管壁への有効な遺伝子導入法を開発することをその目的とする。

BC. 研究方法及び研究結果

BC-1. 静脈グラフトモデルにおけるアデノウイルスを用いた CNP 遺伝子導入の効果—CNP の抗血栓、内皮再生作用の検討

我々がクローニングしたラット CNPcDNA をアデノウイルスベクターに組み込み、ウサギ静脈グラフトモデルにおいて血管壁への遺伝子導入を行った (図 2)。すなわち、ウサギ carotid artery に同側の jugular vein を端端吻合した。吻合の際、CNP アデノウイルス (5×10^8 PFU) を含有したリンゲル液 150 μ l をグラフト静脈内に 30 分間停留させ感染させた。グラフト後 2 週間、4 週間後の静脈血管を検討したところ、CNP アデノウイルス感染群では対照の LacZ 遺伝子アデノウイルス感染群に比べ、内膜肥厚が 40~50% に抑制されていた。更に Evans blue を用いた生体染色により、内皮の再生が著しく亢進することが明らかとなった (図 3)。すなわち、4 週間後も対照群では内皮化面積は $46 \pm 8\%$

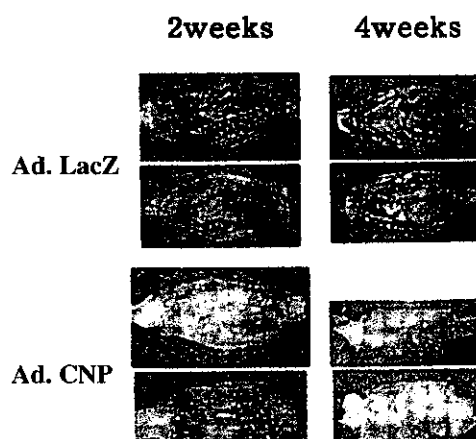


図 3

であったのに対し、CNP アデノウイルス感染群では $96 \pm 1\%$ であった。更に内皮化の促進に伴い、血栓形成も抑制された。

BC-2. ナトリウム利尿ペプチドの培養内皮細胞再生作用とその分子機構の解析

培養ヒト臍帯静脈、冠動脈及びウシ大動脈由来内皮細胞を用いて、ナトリウム利尿ペプチドの内皮再生効果とその分子機構を検討した。ANP、BNP、CNP はともにその生理的濃度 $10^{-11} \sim 10^{-19}$ M の範囲で、内皮細胞の遊走・増殖を有意に促進した。また、内皮細胞を損傷剥離しその後の再生を評価する wound healing array においても、内皮再生の有意の促進作用を示した。これらの作用は、ナトリウム利尿ペプチドのセカンドメッセンジャーである cGMP により活性化される cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) 阻害剤により抑制された。更に、培養内皮細胞に ANP を添加することにより、添加後 30 分以内に MAP キナーゼである Erk1/2 のリン酸化及び Akt のリン酸化が亢進した。ANP による内皮促進効果は、Erk1/2 阻害剤 (PD98059, 10^{-5} M) 及び Akt を活性化する PI_3 キナーゼの阻害剤 (Wortmannin, 10^{-7} M) により抑制された。

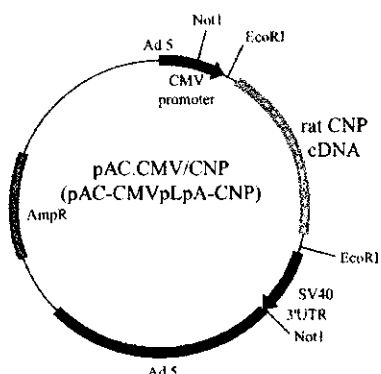


図 4

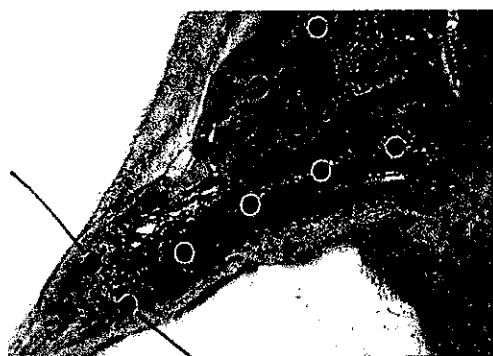


図 5

BC-3. ナトリウム利尿ペプチド系遺伝子改変動物を用いたナトリウム利尿ペプチド血管再生作用の検討

マウス大腿動脈結紮後血管新生モデルを用いて我々の開発した種々のナトリウム利尿ペプチド系遺伝子改変動物で血管再生を検討した。BNP トランスジェニックマウスでは、大腿動脈結紮後の血流回復が対照マウスに比べ有意に促進し、また阻血部の毛細血管数の有意の増加が認められた。更に、cGK 過剰発現マウスにおいても、結紮後 28 日目の血流は対照マウスに比べ 30% 有意に上昇していた。一方、cGK1 遺伝子ノックアウトマウスでは著明な血管再生の抑制が認められた。BNP トランスジェニックマウスの阻血部血管では、Erk1/2 のリン酸化が上昇していた。また、in vitro のコラーゲンゲ

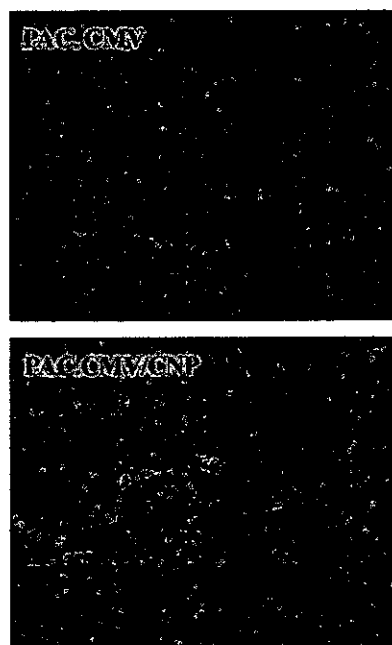


図 6

ル 3 次元培養系において、ナトリウム利尿ペプチド ($10^{-8}M$) は培養内皮細胞により毛細血管網の形成を促進し、この作用は Erk1/2 阻害剤により有意に抑制された。

BC-4. 下肢阻血モデルにおける CNP プラスミドによる遺伝子導入効果

臨床応用を考えた場合、アデノウイルスベクターは安全性の面からはその応用が困難である。そこで我々は上記①~③の知見をもとに、CNPcDNA 発現プラスミド (図 4) を用い、マウス大腿動脈結紮後血管新生モデルにおいて、CNP 遺伝子導入の効果を検討した。阻血後、大腿部に CNP プラスミド 500 μ g を 200 μ l の生理的食塩水に溶解し、10ヶ所に分け筋注した (図 5)。注入後 20 週目において外来性の CNP の遺伝子発現を免疫組織染色にて確認した (図 6)。一方、血中 CNP 濃度に有意の上昇は認められなかった。CNP プラスミド投与後では、結紮後 16 日、20 日目の血流が対照群と比べ有意に上昇し、毛細血管数も増加していた (図 7, 8)。

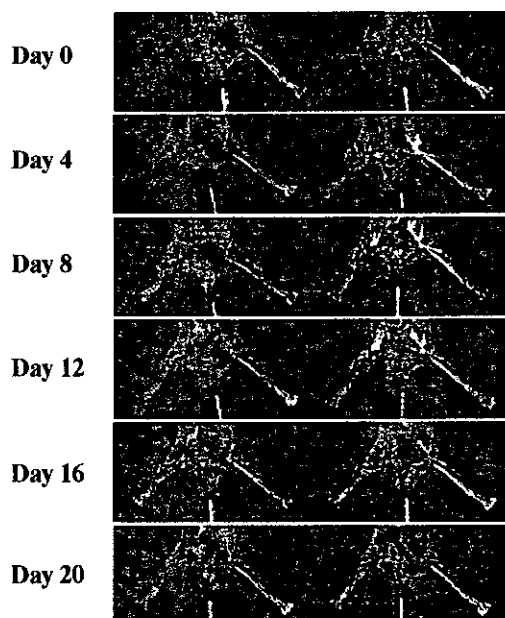


図 7

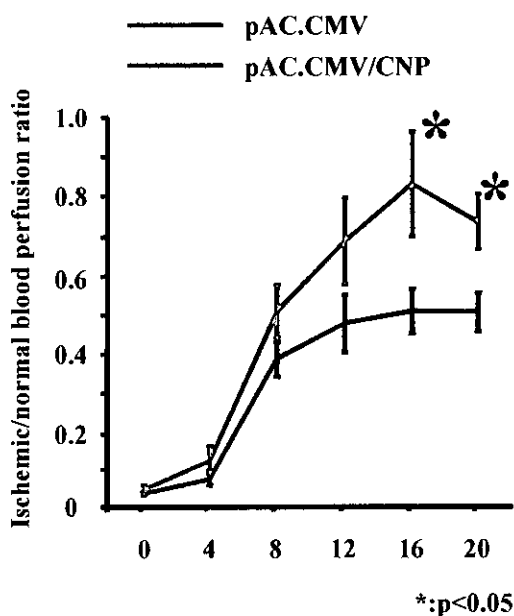


図 8

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではインフォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

DE. 考察及び結論

兔静脈グラフトを動脈切断面に縫合固定することで再狭窄のモデルが、またマウス大腿動脈を結紮することにより末梢阻血モデルを作製した。アデノウイルスベクターを用いた血管壁への CNP 遺伝子導入により、血管平滑筋細胞の過剰増殖が抑制されるのみならず、障害内皮の再生が促進され、抗血栓機能等内皮機能が回復し、血管保護作用が発揮されることが示された。更に、CNP プラスミドの虚血部への筋注により、血管再生が促進されることも明らかとなった。我々はまた、BNP トランスジェニックマウスでは、虚血部の酸化ストレスが減少し、炎症細胞浸潤がむしろ抑制される結果も得ている。このように、内因性のホルモンである CNP はその副作用の発現が少なく、血管壁を構成する内皮細胞、血管平滑筋細胞や炎症細胞に対してそれぞれ作用点を有し、多彩な生物作用を発揮することで統合的に血管保護再生を促進すると考えられ、その血管保護再生遺伝子治療法への応用の有用性が期待される。高い安全性と効率性を兼ね備えた合成高分子系ベクターの開発により、より確実な治療法と成り得ると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Ohno et al: Accelerated re-endothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide. *Circulation* 105: 1623-1626, 2002.
2. K. Masatsugu et al: Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress. *Regulatory Peptides* 111, 13-19, 2003.
3. K. Miyashita et al: Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. *Hypertens. Res.* 26: S93-S98, 2003.
4. K. Yamahara et al: Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 2003 in press.
5. H. Kook et al: Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. *Am.J.Physiol.* 2003 in press.
6. T. Yurugi-Kobayashi et al: Contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood* 2003 in press.

2. 学会発表 (国際学会)

1. H. Itoh et al: Natriuretic peptides induce regeneration of endothelial cells both in vivo and in vitro.
19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension
2002.6.23-27 (Prague, Czech Republic)
2. N. Sawada: Direct phosphorylation and protein kinase and its implication in hypertension and hypertensive vascular remodeling.
19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension
2002.6.23-27 (Prague, Czech Republic)
3. K. Yamahara: Novel action of natriuretic peptides to accelerate ischemia-induced angiogenesis.
19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension
2002.6.23-27 (Prague, Czech Republic)
4. T. Yurugi: Embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells as promising cell sources for vascular regeneration therapy.
19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension
2002.6.23-27 (Prague, Czech Republic)
5. H. Itoh: Potentials of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) in vascular regeneration medicine.
12th International Vascular Biology Meeting
2002.5.12-16 (Karuzawa)

6. N. Sawada: Direct phosphorylation and inactivation of small GTPase RhoA by cGMP-dependent protein kinase and its implication in hypertension and atherosclerosis.
12th International Vascular Biology Meeting
2002.5.12-16 (Karuizawa)
7. J. Yamashita: In vitro differentiation of cardiomyocytes from embryonic stem cell-derived FLK1-positive vascular progenitor cells.
12th International Vascular Biology Meeting
2002.5.12-16 (Karuizawa)
8. T. Yurugi: Contribution of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) to adult neoangiogenesis.
12th International Vascular Biology Meeting
2002.5.12-16 (Karuizawa)
9. K. Yamahara: Novel action of natriuretic peptides to accelerate ischemia-induced angiogenesis.
12th International Vascular Biology Meeting
2002.5.12-16 (Karuizawa)
10. N. Sawada: Direct phosphorylation and inactivation of small GTPase RhoA by cGMP-dependent protein kinase and its implication in hypertension and atherosclerosis.
American Heart Association 75th Scientific Sessions
2002.11.17-20 (Chicago, USA)
11. T. Yurugi: Contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage.
American Heart Association 75th Scientific Sessions
2002.11.17-20 (Chicago, USA)
12. T. Yamahara: Therapeutic potentials of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration.
American Heart Association 75th Scientific Sessions
2002.11.17-20 (Chicago, USA)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

循環器系疾患動物モデルの作製と遺伝子治療に関する研究2：
原発性肺高血圧症、原発性高コレステロール血症に対する遺伝子治療

分担研究者 斯波真理子（国立循環器病センター研究所 室長）

研究要旨

本プロジェクトで開発する合成高分子系遺伝子導入ベクターの臨床研究に向けた準備研究として、肺高血圧症、原発性高コレステロール血症の疾患モデルとして肺高血圧症ラット、ならびにアポ E ノックアウトマウスを作製し、ポリエチレンイミンならびに界面活性剤共存系での遺伝子治療を行った。循環器疾患に対する遺伝子治療のためのベクターは、取り込まれた細胞に対して毒性を示さないことが遺伝子治療を成功させる上で重要なファクターである。ウイルスに代わる遺伝子導入ベクターとしてポリマーおよび Surfactant を用いた新しい遺伝子治療法の確立を目的とし、ポリマーとしてはポリエチレンイミン、Surfactant としては Tween をもちい、マウスおよびラットを用いた遺伝子導入実験を行った。ポリエチレンイミンは、ウイルスを用いない遺伝子導入ベクターとして、原発性肺高血圧症、原発性高コレステロール血症に対する遺伝子治療を行う上で有用なベクターであることが示された。また、Surfactant は、Naked DNA の筋肉注射の遺伝子発現を増強することが示され、閉息性動脈硬化症に対する種々の growth factor 遺伝子による遺伝子治療に応用が可能であった。また、遺伝子導入法として気管内投与方法を開発し、その有効性を確かめた。

A. 研究目的

近年、ウイルスベクターによる遺伝子治療の安全性に疑問が深まる中、ウイルスに代わるベクターとして、カチオン性ポリマーやリポソームに関心が寄せられるようになってきた。しかしながら、合成ベクターと DNA との複合体は、溶解性、安定性、粒子径、表面電位のコントロールなど解決すべき問題点が多く、ウイルスベクターと同様の機能を持つには至っていない。本研究では循環器疾患の予防及び治療を目的と

して、ポリマーベクターなど非ウイルスベクターを用いた新しい遺伝子治療法の開発を行っている。安全で発現効率が高く、かつ非侵襲的な遺伝子治療法の開発をめざしている。

B. 研究方法

非ウイルスベクターとして、我々はカチオン性ポリマーと非イオン性 surfactant を用いている。

カチオン性ポリマーとして線状のポリエチ

レンイミンを用い、ルシフェラーゼ遺伝子との DNA コンプレックスを作製した。DNA コンプレックスは、陰性染色後、透過電子顕微鏡で観察したところ、直径 30-50nm の均一な小粒子であった。この DNA コンプレックスをマウスおよびラット気管内に噴霧、ルシフェラーゼ活性を測定し、それぞれの動物の肺で最大の遺伝子発現を認める条件を検討した。DNA コンプレックスによる遺伝子治療の対象疾患として、肺高血圧症、原発性高コレステロール血症を考えているため、疾患モデル動物として、それぞれ肺高血圧症モデルラットおよびアポ E ノックアウトマウスを用いた。約 200g の Wister ラットにモノクロタリンを腹腔内投与、3 週間後にカテーテルによる右室圧測定すると約 90mmHg であり、肺高血圧症モデルが形成されたと考えられる。これらのラットにアドレノメデュリン遺伝子をポリエチレンイミンとの DNA コンプレックスとして気管投与を行った。1~2 日後、再度右室圧を測定し、アドレノメデュリン遺伝子発現による効果の判定を行った。アポ E ノックアウトマウスに対しアポ E 遺伝子をポリエチレンイミンとの DNA コンプレックスとして気管内投与を行い、前、2 日後、7 日後に採血を行った。得られた血清を HPLC で分離、VLDL+LDL と HDL 分画のコレステロール値を測定した。

遺伝子の筋肉注射に対する Surfactant の効果を調べるため、マウス大腿四頭筋に DNA を Surfactant の存在下に注射を行った。Surfactant として Tween 20, 40, 60, 80, Triton X-100 を用い、遺伝子発現は注射部位の筋肉をホモゲナイズし、ルシフェラーゼ活性測定にて評価した。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じ

た場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではインフォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

C. 研究結果

Linear と Branched のそれぞれのポリエチレンイミンを用いた DNA とのコンプレックスを、マウスおよびラット気管内投与したところ、それぞれの肺に特異的に遺伝子発現を認めた。遺伝子発現効率は、Linear ポリエチレンイミンのほうが、Branched よりも高値であった。DNA とポリエチレンイミンのコンプレックスは、1:4~1:6 の割合のもので、最大の遺伝子発現を認めた。原発性肺高血圧症モデルラットに対し、アドレノメデュリンを DNA コンプレックスとして気管内投与したところ、2 日後で右室圧が平均 90mmHg から平均 60mmHg に低下していた。このことから、アドレノメデュリン遺伝子が肺高血圧症に対し、有効であることが示された。

アポ E ノックアウトマウスに対し、アポ E 遺伝子とポリエチレンイミンの DNA コンプレックスを気管内投与したところ、2 日後に 10%、7 日後に 20% の総コレステロール値の低下を認めた。これらの低下は、HPLC により、VLDL+LDL 分画の低下によるものであることが示された。

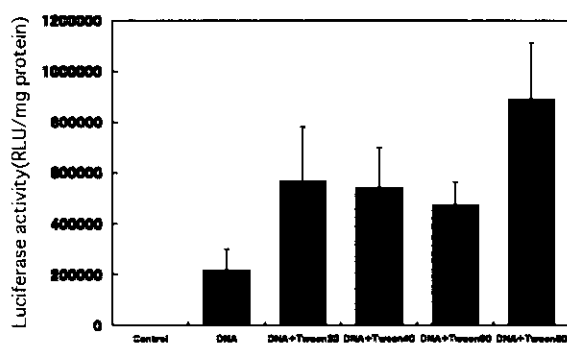


図 1

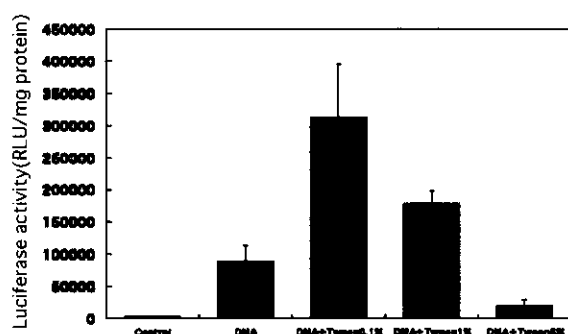


図 2

遺伝子の筋肉注射に対する Surfactant の効果を調べるため、DNA を Surfactant の存在下にマウス大腿四頭筋に注射を行った。Tween 20、40、60、80 のいずれも遺伝子発現増強効果を認めたが、Tween 80 が最大の効果を示した(図 1)。

Tween 80 の遺伝子発現効率増強作用に対する濃度依存性を図 2 に示す。

Tween 80 が 0.1% のところで最大の効果が出ることが示された。また、TritonX-100 存在下には遺伝子発現は低下することも示された。これらの遺伝子発現増強効果の時間依存性を見たものが図 3 である。

Surfactant の遺伝子発現増強効果は、3 日まで顕著であり、比較的短期間の効果であることがわかった。

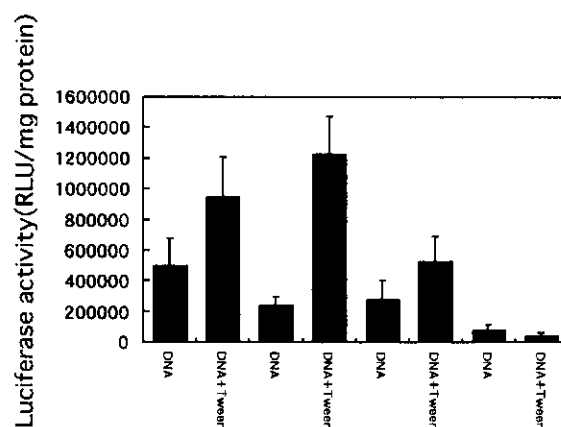


図 3

D. 考察

ポリエチレンイミンは、ウイルスを用いない遺伝子導入ベクターとして、原発性肺高血圧症、原発性高コレステロール血症に対する遺伝子治療を行う上で有用なベクターであることが示された。また、Surfactant は、Naked DNA の筋肉注射の遺伝子発現を増強することが示され、閉息性動脈硬化症に対する種々の growth factor 遺伝子による遺伝子治療に応用が可能である。

E. 結論

ポリエチレンイミンおよび Surfactant は循環器疾患に対する遺伝子治療法として有用であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A: Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. J. Clin. Endocrinol. Met.

in press

2. Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A, Takamisawa I, Shimokado K, Kataoka K: Polyion complex micelles as vectors in gene therapy. Pharmacokinetics and in vivo gene transfer-. Gene Therapy 9: 407-414, 2002

2. 学会発表

1. 梅田真理子、庄田香織、斯波真理子、内田欣吾、中山泰秀、光カチオン生成型親水性高分子を用いた DNA とのコンプレックス形成の光制御、第 51 回高分子学会年次大会 (パシフィコ横浜)、2002 年 5 月 30 日
2. Nakayama Y, Umeda M, Harada-Shiba M, Shoda K, Development of high-performance gene delivery vector: Photocontrol of DNA complex formation. *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 30th.
3. 中山泰秀、斯波真理子、梅田真理子、内田欣吾、庄田香織、林美智子、マラカイトグリーン化高分子の遺伝子ベクターとしての可能性、*光化学討論会*、2002 年 9 月 11 日
4. 高見澤格、陳偉、神野桂子、斯波真理子 Surfactant を用いた筋肉での遺伝子発現増強効果 第 34 回動脈硬化学会総会
5. 斯波真理子 遺伝子導入ベクターとしての高分子なナノミセル箱根山ワークショップ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

「筋肉注射による遺伝子治療の効果を増強する方法」特許出願中

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, T. Matsuda	Spatio-resolved hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization	Langmuir	18 (7)	2601-2606	2002
H. Sonoda, S. Urayama, K. Takamizawa, Y. Nakayama, C. Uyama, H. Yasui, T. Matsuda	Compliant design of artificial graft compliance determination by new digital x-ray imaging system-based method	J. Biomed. Mater. Res.	60	191-195	2002
H. Okino, Y. Nakayama, M. Tanaka, T. Matsuda	<i>In situ</i> hydrogelation of photocurable gelatin and drug release	J. Biomed. Mater. Res.	59	233-245	2002
S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsutsui, Y. Nakayama, T. Matsuda, H. Nonogi	Local delivery of low dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model	Cardiovas. Res.	53	481-486	2002
T. Kawada, Y. Nakayama, C. Zheng, S. Ohya, K. Okuda, K. Sunagawa	A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording	Biomaterials	23	3169-3174	2002
W.G. Brodbeck, J. Patel, G. Voskerician, E. Christenson, M.S. Shive, Y. Nakayama, T. Matsuda, N.P. Ziats, J.M. Anderson	Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates <i>in vivo</i>	Proc.Natl.Acad.Sci.USA	99 (16)	10287-10292	2002
T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda	Thermoresponsive heparin coating: heparin conjugated with poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide) at one terminus	Langmuir	18 (12)	4862-4872	2002
S. Yasuda, M. Kanna, S. Sakuragi, S. Kojima, Y. Nakayama, S. Miyazaki, T. Matsuda, K. Kangawa, H. Nonogi	Local Delivery of single low-dose of C-type natriuretic peptide, an endogenous vascular modulator, inhibits neointimal hyperplasia in balloon-injured rabbit iliac artery model	J. Cardiovas. Phram.	39 (6)	784-788	2002
W.G. Brodbeck, Y. Nakayama, T. Matsuda, E. Colton, N.P. Ziats, J.M. Anderson	Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression <i>in vitro</i>	Cytokine	18 (6)	311-319	2002
Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda	Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances	J. Biomed. Mater. Res.	64A	52-61	2003
W.G. Brodbeck, G. Voskerician, N.P. Ziats, Y. Nakayama, T. Matsuda, J.M. Anderson	<i>In vivo</i> leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry	J. Biomed. Mater. Res.	64A	320-329	2003

N. Ohno, H. Itoh, T. Ikeda, K. Ueyama, K. Yamahara, K. Doi, J. Yamashita, M. Inoue, K. Masarusugu, N. Sawada, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, T. Yurugi, H. Kook, M. Komeda, K. Nakao	Accelerated reendothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide	Circulation	105	1623-1626	2002
T. Yurugi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, H. Hirai, T. Kobayashi, M. Ogawa, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Nakao	Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage	Blood			2002
S. Pivsa-art, A. Nakayama, N. Kawasaki, N. Yamamoto, S. Aiba	Biodegradability study of copolyesteramides based on diacid chlorides, diamines, and diols	J Appl Polym Sci	85	774-784	2002
H. Sashiwa, S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, K. Hiraga, K. Oda, S. Aiba	Production of <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine from α -chitin by crude enzymes from <i>Aeromonas hydrophilia</i> H-2330	Carbohydrate Res	337	761-763	2002
H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, N. Yamamoto, S. Aiba	Chemical modification of chitosan. 14: Synthesis of water-soluble chitosan derivatives by simple acetylation	Biomacromolecula	3 (5)	1126-1128	2002
H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, S. Aiba	Dissolution of chitosan in hexafluoro-2-propanol	Chitin and Chitosan Res	8 (3)	249-251	2002
H. Sashiwa, S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, M. Sukwattanasinitt, R. Pichyangkura, S. Aiba	Enzymatic production of <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of <i>N</i> -acrylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes	Carbohydrate Polymers	51	391-395	2003
H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, N. Yamamoto, H. Zhu, H. Nahano, Y. Omura, H. Saimoto, Y. Shigemasa, S. Aiba	Chemical modification of chitosan. 13. Synthesis of organosoluble, palladium adsorbable, and biodegradable chitosan derivatives toward the chemical plating on plastic	Biomacromolecules	3	1120-1125	2002
M. Shiba, K. Yamauchi, A. Harada, I. Takamisawa, K. Shimokado, K. Kataoka	Poluion complex micelles as vectors in gene therapy-pharmacokinetics and in vivo gene transfer	Gene Therapy	9	407-414	2002

20020450

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P 95-P 96の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。