

20030391

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

血管新生と血管保護療法の開発に関する研究

(H15-再生-006)

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 永井 良三

平成 16 (2004) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	5
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. 血管保護療法に関する研究 永井良三	11
2. 血管保護療法と血管新生の促進療法に関する研究 前村浩二	15
3. 血管新生と血管保護療法の開発に関する研究 佐田政隆	18
4. 遺伝子導入による血管新生の促進療法に関する研究 森下竜一	21
5. 内皮前駆細胞移植による血管新生療法に関する研究 室原豊明	23
6. 遺伝子導入による血管新生の抑制療法に関する研究 上野 光	26
7. 骨髄系体細胞移植による虚血性心臓病への血管再生・ 傷害冠血管再狭窄予防治療に関する研究 松原弘明	29
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33

総括研究報告書

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研究科（循環器内科）教授

研究要旨 (1) 骨髄由来細胞が動脈硬化病変を形成する平滑筋細胞の中に存在することを明らかにした。(2) 自家骨髄移植による下肢に対する血管新生療法を開発し多施設による臨床治験にて有効性と安全性を確認した。さらに重症虚血心への治療も開始した。(3) 肝細胞増殖因子遺伝子導入は動物モデルで、糖尿病性神経症、皮膚潰瘍に有効であった。さらに転写因子 EPAS1 の遺伝子導入は VEGF に比較して、より成熟した血管新生を促す可能性が示された。(4) 可溶性 VEGF, FGF 受容体に加え可溶性 Tie2 や可溶性 PDGF 受容体が顕著な抗腫瘍効果を示した。(5) 遺伝子を用いた各種の血管保護療法を開発した。転写因子 KLF5 に対する siRNA を開発し、in vivo での投与方法を検討中である。

永井良三

東京大学大学院医学系研究科
循環器内科、教授

前村浩二

東京大学大学院医学系研究科
循環器内科、助手

佐田政隆

東京大学大学院医学系研究科
循環器内科、助手

森下竜一

大阪大学大学院医学系研究科
臨床遺伝子治療学、教授

室原豊明

名古屋大学大学院医学系研究科
器官制御内科、教授

上野 光

産業医科大学医学部病態医化学、教授

松原弘明

京都府立医科大学大学院医学研究科
循環器病態制御学、教授

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) 動脈硬化病変を構成する細胞の由来

異なる血管障害モデルを用いて病変に寄与する骨髄由来細胞の程度を検討する。また骨髄細胞のうち、血管の修復と病変形成に関与する分画を検討した。野生型マウスの骨髄を、①全骨髄 (TBM 群)、② 造血幹細胞が大部分を占める c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻分画 (KSL 群) ③ 高度に純化した造血幹細胞 1 個(HSC 群)によって置換した。その後、血管にワイヤーを用いた傷害を加え、病変への骨髄細胞の取り込まれ方を比較した。

2) 自家骨髄移植による血管再生と新生療法

a) 平成 12 年から開始している末梢動脈疾患患者への自家骨髄移植療法の臨床治験を継続する。最大の効果を得るための移植細胞数、筋肉注入法、至適患者を検討する。PGI2 との併用効果、遺伝子 Angiopoietin-1 との併用効果についての

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

基礎的検討を行う。b) 動物実験を経て、内科的・外科的血行再建術が困難であり狭心症を頻発する重症虚血性心臓病患者に NOGA システムを利用して自家骨髄細胞を心筋に移植する。胸痛回数、心肺運動試験、心筋シンチ、心エコー、CAG、NOGA システムにより心機能を評価した。

3) 遺伝子導入ならびに薬物による血管新生の促進と抑制療法

a) 糖尿病性神経障害と皮膚潰瘍の遺伝子治療

12 週齢の雌性 SD ラットに STZ により糖尿病を誘発し、ヒト HGF 遺伝子を両大腿部筋肉内に直接注射し、神経伝達速度、Laser Doppler Image (LDI) を測定し効果判定を行った。皮膚潰瘍に対する遺伝子治療は 7 週齢の雄性 Wistar ラットにステロイドホルモンの皮下注射にて潰瘍を誘発し、潰瘍誘発直後にヒト HGF 遺伝子とヒト PGIS 遺伝子を潰瘍周囲にシマジェットを用いて導入した。その後経時的に潰瘍の修復を創面積にて、潰瘍面における血流の増加を LDI にて、さらに創内におけるコラーゲン量を測定し、遺伝子導入の効果を評価した。また転写因子 EPASI による遺伝子導入の基礎実験をマウスモデルを用いて行った。

b) 血管新生に関係する受容体の可溶性による腫瘍血管新生抑制療法

種々の血管新生因子に対する受容体のうち細胞外領域のみの可溶性受容体を作成し、アデノウイルスベクターに組み込む。細胞外マトリクスと癌細胞の信号伝達を阻害できる分子群をアデノウイルスベクターに組み込む。ヒト癌由来の細胞をヌードマウスの皮下、脾臓、尾静脈より導入し、上記分子群が単独または併用で、腫瘍血管新生、腫瘍増殖そして転移を抑制できるかどうか検討する。さらにその抑制効果の分子機構を解析する。

4) 遺伝子および骨髄細胞を用いた血管保護療法

a) 転写因子 KLF5 の機能を解析するために、KLF5 遺伝子発現を効率よく行える siRNA を開発した。KLF5 の下流因子探索を microarray を用いて行った。内皮細胞および平滑筋細胞を用いて siRNA の細胞増殖や遊走への作用を検討した。

b) Klotho 因子の血管への作用を検討するため、

Klotho 遺伝子センダイウイルスを作成した。センダイウイルス、アデノウイルスを用いて、内皮細胞における Klotho の作用と分子機構に関して検討した。

(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、さらには厚生労働省・文部科学省で承認を得て試行する。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) 動脈硬化病変を構成する細胞の由来

骨髄由来細胞の取り込まれる程度は、血管障害モデルにより異なり、組織損傷の程度とその後のケモカイン、サイトカインの発現量と相関していた。特に wire injury 後の大腿動脈では、内皮はほぼ完全に剥離され中膜の細胞はアポトーシスにより消失していた。このような強い傷害後は、修復に必要な細胞が局所に残存せず遠隔の幹細胞が動員されざるをえなくなると考えられた。TBM もしくは KSL で骨髄を置換したマウスでは、傷害後の血管病変に骨髄由来細胞が数多く認められた。一方、一個の造血幹細胞を移植した HSC 群では、病変には骨髄由来細胞が関与することは殆ど認められなかった。以上より、造血幹細胞より未分化な骨髄細胞もしくは間葉系細胞から、血管前駆細胞が分化している可能性が高いと考えられた。

2) 自家骨髄移植による血管再生と新生療法

a) ヒト虚血肢に対して自己骨髄細胞移植による血管新生療法を 2000 年 1 月より開始した (TACT-1)。細胞移植後、虚血症状は有意に改善し、約 60% の患者で回復がみられた。これらの結果は、2002 年の Lancet に掲載された。さらに実施施設、症例数を増やして検討中である。b) 狭心症モデル大動物実験での成績に加えて、閉塞性動脈硬化やバー

ジャー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果が 2 重盲検試験で確認されたことより、倫理委員会において内科的・外科的に血行再建困難な虚血性心臓病患者への自家骨髄単核球移植を経皮のカテーテルを用いて 4 例に実施した (2-4x10⁸ 個/20 部位)。10 日以内に狭心痛は全く消失し、左心室収縮率は 43% から 52% へと増加した。最長 2 年 5 ヶ月の観察期間を持つが当初危惧された不整脈は全く観察されていない。

3) 遺伝子導入ならびに薬物による血管新生の促進と抑制療法

a) 糖尿病ラットでは神経伝達速度は糖尿病誘発後 13 週の時点ですでに健常コントロール群に比し有意な低下が認められた。ヒト HGF 遺伝子導入群では遺伝子導入部位周辺での血流量、神経伝達速度ともコントロール群に比し、有意に改善した。次に皮膚潰瘍モデルへヒト HGF 遺伝子単独導入群、およびヒト HGF 遺伝子およびヒト PGIS 遺伝子共導入群、コントロール群間で効果を比較検討した。創面積においては HGF 群においてもコントロール群と比較すると有意な縮小が認められ、その効果 HGF + PGIS 群においてさらに増強されていた。また LDI による血流量測定でもやはり HGF + PGIS 群において最も有意な増加を認め、ついで HGF 群となっていた。コラーゲン量の測定においては HGF + PGIS 群と HGF 群においては有意な差は認められなかったが、ともにコントロール群よりは有意に増加していた。

転写因子 EPAS1 の過剰発現により、VEGF やその receptor である Flt-1、Flk-1、さらに angiopoietin1 のレセプターである Tie2 の発現が誘導され、内皮細胞の遊走性が亢進した。さらにマウス皮膚創傷モデルに EPAS1 のアデノウイルスを投与すると、mural cell に囲まれた新生血管が作られており、EPAS1 が VEGF に比較してさらに成熟した血管新生をおこす遺伝子となる可能性が示された。

b) 可溶性 VEGF、FGF 受容体が無効であったガンのうち、N417 細胞では可溶性 Tie2 (sTie-2) が、QG56 では可溶性 PDGF 受容体が顕著な抗腫瘍効果を示した。N417 腫瘍内部には通常の血管が観察されず、代わって PAS 染色陽性の偽血管形成 (Vasculogenic mimicry : VM) が認め

られた。VM 形成の分子機構についてはなお不明であるが、N417 細胞自身が、通常は血管内皮細胞で発現されている Tie2 を発現していることから、sTie-2 はがん細胞の Tie-2 機能を阻害し VM 形成を阻害することで抗腫瘍効果を発揮した可能性が高い。

マウス骨髄から増殖能の高い細胞を可溶性 FGF 受容体をアデノウイルスを用いて EPC に導入し、この EPC を H460 腫瘍近傍に注入すると、腫瘍内に取り込まれ (LacZ 発現 EPC で確認) 腫瘍の生育が抑制された。腫瘍近辺には β -galactosidase 活性は検出されず、腫瘍内に取り込まれた EPC から産生される可溶性 FGF 受容体により血管新生が阻害され腫瘍成長が抑制された可能性が高い。

4) 遺伝子および骨髄細胞を用いた血管保護療法

a) KLF5 に対する siRNA を作成し、培養平滑筋細胞、内皮細胞で KLF5 がノックダウンされることを確認した。さらに下流遺伝子として同定している PDGF-A および TGF- β の発現が低下しており、実験系の有効性が確認された。次に KLF5 siRNA を作用させたヒト臍帯静脈内皮細胞の機能を検討したところ、VEGF による遊走能が著明に抑制されていることがわかった。KLF5 ノックアウトマウスの解析で、このマウスにおいて血管新生が著明に抑制されていることが示されており、培養細胞のデータと合わせると、KLF5 siRNA によって血管新生を抑制できる可能性がある。

in vivo への siRNA の応用を進めるためには、遺伝子導入法が重要となる。そこで、我々は新たな遺伝子導入法としてナノ粒子を用いることを検討し、siRNA を封入できること、また、培養細胞へと siRNA を導入することができることを明らかとした。また、静注することによって生体内へ機能的なプラスミド DNA を導入することができた。今後、この手法を用いて siRNA を導入することによって、血管新生や動脈硬化への治療応用が可能になると期待される。

b) 培養内皮細胞および動物個体において Klotho が血管保護作用を持つことを明らかとした。さらに、内皮細胞においてはこの保護作用の少なくとも一部は Akt の情報伝達系路を介していることを明らかとした。

D. 考察

今年度の研究計画はほぼ達成できた。血液中の前駆細胞が強度傷害後の血管の修復と病変形成に関わる現象が再確認された。各種病態における前駆細胞の動態とその制御機構を現在研究している。

また世界に先駆けて、虚血肢や重症虚血心筋に対する自己骨髄細胞を用いた血管新生療法の臨床試験を行い安全で有効であることが明らかとなった。我々が虚血心筋への自己骨髄細胞移植療法を実施したあとに、同様の経皮的カテーテルを用いた虚血性心臓病患者への自家骨髄単核球移植が米国で 20 人、中国で 8 人に実施された。いずれも不整脈などの副作用は全く発現せず心機能改善効果が明らかに認められた。No-option 虚血性心臓病患者に対する細胞移植治療は効果的な治療として期待される。

平滑筋細胞の脱分化に関与する転写因子として単離された KLF5 が様々な臓器リモデリングに関与していることが明らかとなり、それを抑制する siRNA の開発にも成功した。今後 KLF5 を標的とした治療法を開発していく。

E. 結論

流血中には骨髄由来の血管前駆細胞が存在し血管病の病態生理に関与していると考えられる。その動員、定着、分化、増殖に関する研究は、血管病の新たな治療法開発に貢献すると期待される。

「骨髄由来血管前駆細胞」の定着や分化に関する研究は血管病の治療、血管再生に今後貢献すると期待される。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末梢血管疾患、虚血性心疾患に対して世界に先駆けて臨床治験を開始した。有望な結果を得ており、今後、心疾患治療への応用が期待されている。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

分担報告書参照

学会発表

分担報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告

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

我々は平滑筋細胞形質変換の分子機構の解析を通して、血管病態における平滑筋機能制御に重要な Krüppel 型転写因子 KLF5 を同定した。KLF5 ノックアウトマウスを用いてこの転写因子が *in vivo* において、動脈硬化、心肥大・線維化、血管新生など慢性炎症を基盤として組織リモデリングが進展する病態の制御に重要な機能を持つことを明らかとした。本研究計画ではこの KLF5 の機能を転写制御ネットワークの中で位置づけるために siRNA (short interfering RNA)を用いた KLF5 ノックダウン法を開発するとともに、この siRNA の臨床応用のための基礎検討を行った。我々が開発した siRNA は、効率よく KLF5 の発現をノックダウンした。また内皮細胞機能を抑制する結果を得た。一方、血管保護に関わる液性因子に関しては老化関連因子 Klotho を中心として研究を進めた。Klotho は血管新生促進作用および保護作用を示すが、内皮細胞においては Akt シグナルを介することを明らかにした。

A. 研究目的

血管病変は代謝的ならびに物理的傷害に細胞が反応し、慢性に引き続くことによって血管壁組織の再構築が進み、形成されるということができる。従って、ストレスに応答する細胞の分子機構を解明し、特に、慢性期において細胞機能を制御し、組織リモデリングを調節するメカニズムを理解することは、新しい治療ターゲットの同定と治療・予防法開発に結びつく。本研究では、特に細胞の応答を最終的に決定付ける転写因子ネットワークと、細胞外からのシグナルに関しては血管保護作用を示す老化関連因子 Klotho に着目して検討を進めると同時に、治療法へと結びつく遺伝子ノックダウン法の開発を行った。

血管病態の形成過程において形質変換・脱分化した平滑筋細胞が重要な機能を果たすことは広く知られている。これまでの研究においてアンジオテンシン II をはじめとする増殖因子や物理的・化学的刺激が平滑筋細胞の形質変換を引き起こすことが明らかにされているが、最終的に細胞の運命を決定する遺伝子発現制御機構に関してはあまりよく分かっていなかった。我々は平滑筋細胞の形質変換に伴って発現誘導され、脱分化平滑筋細胞のマーカーである非筋型ミオシン重鎖 SMemb の転写を制御する転写因子 KLF5 を先に同定した。KLF5 の動物個体におけ

る役割を明らかにするために、ノックアウトマウスを作成し KLF5 の機能を *in vivo* で検討したところ、KLF5 が動脈硬化を含む血管病態のみならず、心肥大・線維化や血管新生に重要であり、慢性炎症を基盤として進展する心血管病態における細胞機能制御の鍵分子の一つであることが明らかとなった。

そこで、本研究計画では、心血管病態における KLF5 を中心とした転写制御ネットワークの機能解明のために、RNAi を用いて KLF5 遺伝子発現をノックダウンする手法の開発と、この方法を用いた KLF5 機能解析、さらに臨床応用を目指した基礎的検討を行った。

Klotho に関してはセンダイウイルスを用いた新しい *in vitro*、*in vivo* の遺伝子導入法を開発し、Klotho の機能解析を進めた。

B. 研究方法

KLF5 機能を解析するために、KLF5 遺伝子発現を効率よく行える siRNA を開発した。KLF5 の下流因子探索を microarray を用いて行った。内皮細胞および平滑筋細胞を用いて siRNA の細胞増殖や遊走への作用を検討した。

Klotho 因子の血管への作用を検討するため、Klotho 遺伝子センダイウイルスを作成した。センダイウイルス、アデノウイルスを用いて、内皮細胞に

における Klotho の作用と分子機構に関して検討した。

(倫理面への配慮)

上記研究は培養細胞および実験動物を用いて行われた。動物実験に関しては当施設のガイドラインに厳密に従い、動物愛護の観点に配慮して行われた。また、培養細胞で代替可能な実験に関しては培養細胞を積極的に用いた。

C. 研究結果

我々はこれまでの研究で、KLF5 が外的ストレスに暴露された平滑筋細胞において PDGF-A や TGF- β といった組織リモデリングに重要なパラクライン因子の発現を制御することを明らかとした。KLF5 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の機能解析の結果は、平滑筋細胞以外にも内皮細胞や心臓線維芽細胞など、間葉系細胞由来の細胞で広く重要な機能を持つことを示唆する。一方、KLF5 の転写制御機構の解析から、KLF5 が RAR や PPAR γ を含む、複数の転写因子、転写コファクターと相互作用することが示された。これらの結果から、KLF5 は各細胞において転写因子やコファクターからなるネットワークの中で鍵となる機能を持ち、このネットワークは各細胞において多様な遺伝子の機能制御に関わっている可能性が高い。そこで、各細胞における KLF5 を中止とした転写ネットワークの機能を明らかにするために、KLF5 遺伝子の発現を効率よくノックダウンする方法の開発を試みた。

RNAi (RNA interference) は、二本鎖の RNA によって配列特異的な遺伝子発現抑制が生じる現象であり、最近になって哺乳類細胞でも作用することが明らかとなった。哺乳類細胞においては短い二本鎖 RNA (siRNA, short interfering RNA) が作用する。我々は KLF5 発現をノックダウンするために 10 種類以上の配列を検討し、非常に効率よく作用する配列を同定した。

KLF5 に対する siRNA を用いて KLF5 転写調節ネットワークを解明するために、まず KLF5 ダウンストリーム遺伝子の検討を行った。培養平滑筋細胞および内皮細胞でノックダウンを行う最適なトランス

フェクション法を確立した。KLF5 ノックダウンを行った細胞より RNA を抽出し、コントロール siRNA を作用させた細胞からの RNA を対象として microarray 解析を行った。KLF5 siRNA 処理群において、KLF5 と同時にこれまでに下流遺伝子として同定している PDGF-A および TGF- β の発現が低下しており、実験系の有効性が確認された。KLF5 siRNA の処理により、多数の遺伝子の発現が増加あるいは減少しており、その中にはパラクライン遺伝子以外にも細胞外基質分解酵素、細胞外基質、あるいはパラクライン因子受容体の遺伝子が含まれていた。今後、これらの発現変化が見られた遺伝子群の相互関連と、プロモーター領域の情報をバイオインフォマティクスの手法で解析することによって、KLF5 転写ネットワークの機能を明らかにしていくことができると考えられる。

一方、siRNA によって KLF5 ノックダウンすることによって *in vivo* でも細胞機能を制御できる可能性がある。そこで、KLF5 siRNA の作用をまず培養細胞レベルで検討した。KLF5 siRNA を作用させたヒト臍帯静脈内皮細胞の機能を検討したところ、VEGF による遊走能が著明に抑制されていることがわかった。KLF5 ノックアウトマウスの解析で、このマウスにおいて血管新生が著明に抑制されていることが示されており、培養細胞のデータと合わせると、KLF5 siRNA によって血管新生を抑制できる可能性がある。

in vivo への siRNA の応用を進めるためには、遺伝子導入法が重要となる。従来の非ウイルス性遺伝子導入法では成体での遺伝子導入効率が非常に悪く、また肝臓や肺などの一部臓器にほとんどの遺伝子がトラップされることがわかっている。そこで、我々は新たな遺伝子導入法としてナノ粒子を用いることを検討した。このナノ粒子は DNA あるいは RNA と遺伝子導入試薬をさらに脂質で被覆した形態を持っており、生体適合性と安定性が高い。我々はこのナノ粒子に siRNA を封入できること、また、培養細胞へと siRNA を導入することができることを明らかとした。また、静注することによって生体内へ機能的なプラスミド DNA を導入することができた。

今後、この手法を用いて siRNA を導入することによって、血管新生や動脈硬化への治療応用が可能になると期待される。

Klotho 遺伝子の機能解析と血管保護法への応用のため、Klotho を発現するセンダイウイルスを用いて、培養細胞および動物個体への Klotho 遺伝子導入を行った。その結果、培養内皮細胞および動物個体において Klotho が血管保護作用を持つことを明らかとした。さらに、内皮細胞においてはこの保護作用の少なくとも一部は Akt の情報伝達系路を介していることを明らかとし、また、作用因子の一つとして eNOS を同定した。

D. 考察

従来の我々の研究によって KLF5 が心血管系病態の形成に重要であることが明らかとなっている。今回の研究によって、siRNA を用いて KLF5 発現を効率よくノックダウンすることが可能となった。また、siRNA を動物個体へと導入するためのナノ粒子の開発にも成功しており、今後これらを組み合わせることによって、動脈硬化や血管新生の新しい治療法が開発できると考えられる。

KLF5 siRNA を用いることによって、KLF5 ノックダウンが多数の遺伝子発現に変化を与えることが明らかとなった。今後、バイオインフォマティクスの手法を用いて発現変化した遺伝子群の相互関連を検討することにより、KLF5 を中心としたネットワークの機能と、このネットワークを構成する因子を明らかにできるだろう。

Klotho 遺伝子に関してセンダイウイルスによる新しい遺伝子導入法を開発し、培養細胞および動物個体への効率よい遺伝子導入を得られた。今後、培養細胞を用いて Klotho 遺伝子の機能を解析することによって、Klotho を血管保護両方へ応用するための基礎的知見が得られると期待される。

E. 結論

血管の慢性炎症と組織リモデリングに重要な転写因子 KLF5 の機能解析と、KLF5 をターゲットとする治療法開発のために、KLF5 を効率よくノックダ

ウンできる siRNA を開発した。さらに siRNA を導入するためのナノ粒子を開発した。この siRNA は基礎的研究に有用だけでなく、血管保護療法に重要な治療法へと展開が期待される。KLF5 の機能解析を進めるとともに、Klotho の研究成果を加えることによって、血管保護に作用する液性因子から核内への転写ネットワークへとつながる情報伝達系路が明らかにされ、さらに新しい治療法開発のターゲットが同定されるだろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, Kawai-Kowase K, Matsumura T, Sasaki K, Munemasa Y, Manabe I, Kurabayashi M, Collins T, Nagai R. Regulation of platelet-derived growth factor-A chain by Kruppel-like factor 5: new pathway of cooperative activation with nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 279:70-76, 2004.
- Suzuki T, Muto S, Miyamoto S, Aizawa K, Horikoshi M, Nagai R. Functional interaction of the DNA-binding transcription factor Sp1 through its DNA-binding domain with the histone chaperone TAF-I. *J Biol Chem* 278:28758-28764, 2003.
- Sakamoto H, Sakamaki T, Kanda T, Hoshino Y, Sawada Y, Sato M, Sato H, Oyama Y, Nakano A, Takase S, Hasegawa A, Nagai R, Kurabayashi M. Smooth muscle cell outgrowth from coronary atherectomy specimens in vitro is associated with less time to restenosis and expression of a key Transcription factor KLF5/BTEB2. *Cardiology* 100:80-85, 2003.
- Saito K, Ishizaka N, Mitani H, Ohno M, Nagai R. Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced downregulation of klotho, an anti-aging gene, in rat. *FEBS Lett* 551:58-62, 2003.
- Niu P, Shindo T, Iwata H, Ebihara A, Suematsu Y, Zhang Y, Takeda N, Iimuro S, Hirata Y, Nagai R. Accelerated cardiac hypertrophy and renal damage induced by angiotensin II in adrenomedullin knockout mice. *Hypertens Res* 26:731-736, 2003.
- Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T, Kurihara H, Suzuki E, Sata M, Satonaka H, Takeda R, Nagata D, Kakoki M, Hayakawa H, Kangawa K, Matsuo H, Kitamura T, Nagai R. Endothelial responses of the aorta from adrenomedullin transgenic mice and knockout mice. *Hypertens Res* 26 Suppl:S79-84, 2003.
- Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K, Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi N, Horikoshi M, Nagai R. Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 23:8528-8541, 2003.
- Manabe I, Nagai R. Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep* 5:214-222, 2003.

2. 学会発表
- 2003.3.28 第 67 回日本循環器学会学術集会 「K
KLF5 not only synergistically activates PDGF-A
gene with NF- κ B but also accelerates SMC
proliferation」 福岡
- 2003.3.28 第 67 回日本循環器学会学術集会
「PPAR γ ligand dependent interaction with
transcriptional coactivators control the vascular
smooth muscle cell differentiation」 福岡
- 2003.3.29 第 67 回日本循環器学会学術集会
「Proteomic identification of a transcriptional
repressor of the transcription factor KLF5/BTEB2」
福岡
- 2003.3.30 第 67 回日本循環器学会学術集会
「Krüppel-like factor 5 (KLF5) and peroxisome
proliferator γ (PPAR γ) cooperatively control
cellular responses in vascular diseases」 福岡
- 2003.3.30 第 67 回日本循環器学会学術集会
「Krüppel-like zinc-finger transcription factor 5
(KLF5) mediates immune responses in
cardiovascular remodeling」 福岡
- 2003.7.17 日本薬学会 薬学研究ビジョン部会 第
2 回創薬ビジョンシンポジウム 特別講演「循環
器研究における創薬」 東京
- 2003.8.22. 高遠・分子細胞額シンポジウム 第 15
回 ゲノム、発生、生体調節 「心血管系のスト
レス応答における転写因子： KLF5 の役割」 高
遠
- 2003.8.30 第 124 回日本医学会シンポジウム 肥満の
科学 「脂肪細胞形質変換の転写制御」 箱根
- 2003.10.15 第 76 回日本生化学会学会 シンポジウム
生活習慣病と転写調節因子 —モデル動物から
創薬への模索— 「Role of Krüppel-like factor 5
(KLF5) in the cardiovascular system: From
pathophysiological mechanisms to therapeutic
target」 横浜
- 2003.12.6 第 1 回循環系フィジオーム
「KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type
transcription factor, mediates both smooth muscle
cell activation and cardiac hypertrophy」 岡山
- 2003.9.30 第 13 回国際動脈硬化学会「Potential role of
Krüppel-like transcription factor5 (KLF5) in
adipocyte differentiation」 京都
- 2003.10.1 第 13 回国際動脈硬化学会 シンポジウム
Proliferation and differentiation of smooth muscle
cells 「Role of KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-
finger type transcription factor, in vascular
remodeling」 京都
- 2003.10.3 第 13 回国際動脈硬化学会 Satellite
Symposia Vascular smooth muscle cells and
remodeling 「Role of Krüppel-like factor 5 (KLF5)
in the cardiovascular system」 神戸
- 2003.11.9 77th Scientific Sessions of American Heart
Association Cardiovascular Seminars 「Krüppel-like
zinc-fingers in cardiovascular development and
remodeling」 オランダ
- 2003.11.9 76th Scientific Sessions of American Heart

Association 「Oral Retinoic Acid Receptor Alpha
Agonist Inhibits In-Tent Restenosis」 オランダ

H. 知的財産権

該当なし。

転写因子 EPAS1 の過剰発現により、VEGF やその receptor である Flt-1、Flk-1、さらに angiopoietin1 のレセプターである Tie2 の発現が誘導され、内皮細胞の遊走性が亢進した。さらにマウス皮膚創傷モデルに EPAS1 のアデノウイルスを投与すると、mural cell に囲まれた新生血管が作られており、EPAS1 が VEGF に比較してさらに成熟した血管新生をおこす遺伝子となる可能性が示された。

A. 研究目的

再生、血管新生療法は次世代の治療法として脚光を浴び、実際に VEGF や bFGF による血管新生療法の臨床治験が行われているものの、投与局所の浮腫の出現、高齢者や糖尿病患者では効果が低いなどの問題がある。我々は血管内皮細胞に多く発現し低酸素状態での血管新生に重要な役割を果たすと考えられる転写因子 Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) に注目し研究を行った。本研究により虚血による血管新生のメカニズムを明らかにするとともに、現在の血管新生療法に比べて、より効果があり副作用の少ない次世代の血管新生療法への応用をめざす。

B. 研究方法

1) EPAS1 の標的遺伝子の同定

血管内皮細胞において、どのような遺伝子群が EPAS1 の標的となり、血管新生において機能しているかをアデノウイルスによる overexpression や siRNA を用いた抑制実験により解明する。アデノウイルスを培養細胞に infection し、血管新生に関連する遺伝子群の発現の変化を cDNA マイクロアレイ法にて検討する。これにより、血管新生を調節する新たな遺伝子が同定されることが期待できる。

2) 低酸素下での血管新生のメカニズムの解明と治療への応用

皮膚創傷治癒モデル、ラット心筋梗塞モデル、下肢虚血モデルにて EPAS1 アデノウイルスを投与し心

筋梗塞範囲の縮小効果、下肢の虚血の改善効果を検討する。特に、血管内皮細胞のみでなく、それを取り巻く周皮細胞、平滑筋にも注目し、VEGF 投与と比較して、より成熟した血管新生が形成されるかを評価する。

(倫理面への配慮)

上記研究は培養細胞および実験動物を用いて行われた。動物実験に関しては当施設のガイドラインに厳密に従い、動物愛護の観点に配慮して行われた。また、培養細胞で代替可能な実験に関しては培養細胞を積極的に用いた。

C. 研究結果

1) EPAS1 の標的遺伝子の同定

我々は、EPAS1 の下流遺伝子を検索する為に、アデノウイルスを用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に EPAS1 を過剰発現させ、その下流遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した。その結果、VEGF、Adrenomedullin、prostacyclin synthase を含む 130 個の標的遺伝子を同定し、今回その一つ Flt-1、VEGFR-type 1 の発現解析を行った。レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイにて、Flt-1 プロモーター上流に存在する HIF-1 結合配列に EPAS1/ARNT の 2 量体が結合し、転写活性を亢進することを確認した。HUVEC に dominant negative EPAS1 を過剰発現させると、低酸素にて誘導される内因性 Flt-1 mRNA 発現が減弱することから、EPAS1 は Flt-1 発現

を生理的に調節していると考えられた。一方、HUVEC にアデノウイルスを用いて EPAS1 を過剰発現させると、VEGF に対する遊走能が亢進した。

2) 低酸素下での血管新生のメカニズムの解明と治療への応用

マウス皮膚創傷治癒モデルを用いて、創部に EPAS1 を過剰発現させると SM α actin 陽性細胞に包まれた血管密度が増加し、治癒過程が有意に促進された。創部における VEGF、Flk-1、Flt-1、Tie2 mRNA も増加しており、EPAS1 は VEGF およびその受容体、Tie2 発現を亢進することで成熟した血管形成を促進している可能性があると考えた。

D. 考察

EPAS1 は VEGF のみでなく、Tie2 も誘導することが知られ、血管内皮とそれを取り巻く細胞との相互作用を促すことにより VEGF による血管新生よりも、より成熟した血管新生をおこすことが期待されていた。実際に、VEGF を皮膚で過剰発現させたマウスでは、微小血管は増生するものの非常に漏れやすく、浮腫や炎症細胞の浸潤が見らる不完全な血管であるのに対し、EPAS1 と類似の HIF-1 α を過剰発現させたマウスでは、漏れの無い、完全な血管が増生することが示された (Genes Dev. 2001;15:2520-32)。また VEGF を皮膚で過剰発現させたマウスでは出血性の潰瘍や、皮膚腫瘍を形成したのに対し HIF-1 α を過剰発現させたマウスではこれらの変化は見られなかった。EPAS1 は VEGF のみでなく、さらにそのレセプターの Flt-1、Flk-1 も誘導することにより、HIF-1 α よりもさらに成熟した血管新生が形成されることが期待されるとともに、高齢者や糖尿病患者などの VEGF のレセプターが downregulation した患者でも有効であることが期待される。

本研究により虚血による血管新生のメカニズムを明らかにするとともに、現在の血管新生療法に比べて、より効果があり副作用の少ない次世代の血管新生療法の開発が期待される。

E. 結論

VEGF を用いた血管新生療法は臨床的にも行われ

てきているが、治療により生じた血管は脆弱で浮腫を生じやすいことが知られている。今回の結果から、EPAS1 を用いた治療は、より成熟した血管を再構築する治療法として期待できると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314:415-419.

2. 学会発表

Gordon Research Conference: Angiogenesis and microcirculation (Newport, RI: 2003/8/11-15)

Norihiko Takeda, Koji Maemura, Yasushi Imai, Tomohiro Harada, Daiji Kawanami, Takefumi Nojiri, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai. DELIVERY OF ENDOTHELIAL PAS DOMAIN PROTEIN 1 GENE PROMOTES MATURE ANGIOGENESIS THROUGH THE TRANSACTIVATION OF BOTH VEGF AND ITS RECEPTOR, FLT-1

American Heart Association Scientific Sessions 2003 (Orlando: 2003/11/9-12)

Norihiko Takeda, Koji Maemura, Yasushi Imai, Tomohiro Harada, Daiji Kawanami, Takefumi Nojiri, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai. DELIVERY OF ENDOTHELIAL PAS DOMAIN PROTEIN 1 GENE PROMOTES MATURE ANGIOGENESIS THROUGH THE TRANSACTIVATION OF BOTH VEGF AND ITS RECEPTOR, FLT-1

第 67 回日本循環器学会総会 (福岡: 2003 年 3 月 28 日-30 日)

Norihiko Takeda, Koji Maemura, Yasushi Imai, Tomohiro Harada, Daiji Kawanami, Takefumi Nojiri, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai. DELIVERY OF ENDOTHELIAL PAS DOMAIN PROTEIN 1 GENE

PROMOTES MATURE ANGIOGENESIS THROUGH
THE TRANSACTIVATION OF BOTH VEGF AND ITS
RECEPTOR, FLT-1

第 40 回日本臨床分子医学会学術集会（東京：2003
年 7 月 10, 11 日）

武田憲彦、前村浩二、今井靖、原田智浩、川浪大治、
野尻剛史、永井良三 Endothelial PAS Domain
Protein 1 により成熟した血管形成が誘導される

第 26 回日本高血圧学会（宮崎：2003 年 10 月 29
日-11 月 1 日）

武田憲彦、前村浩二、川浪大治、永井良三
Endothelial PAS Domain Protein 1 により VEGF お
よびその受容体 Flt-1 発現が誘導され、成熟した血
管形成が促進される

H. 知的財産権
該当なし。

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

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 東京大学大学院医学系研究科（循環器内科）助手

研究要旨 血中前駆細胞は強い傷害後の血管修復と病態形成に関与することが再確認された。骨髄中の間葉系もしくはより未分化幹細胞から前駆細胞は派生しており、造血幹細胞からの形質転換分化の可能性は少ないと思われる。「骨髄由来血管前駆細胞」が血管病予防のための新たな標的になることが明らかになった。

A. 研究目的

閉塞性血管病は局所の細胞の分化、増殖によって生じると考えられている。私たちは、移植後動脈硬化、血管形成術後再狭窄、高脂血症による動脈硬化のモデルを用いて、血液中に動員された骨髄由来前駆細胞が傷害後の血管に定着し、内皮細胞もしくは平滑筋細胞に分化して病態形成に関与することを報告した。この説は世界で広く受け入れられるようになったが、一方では骨髄由来細胞の可塑性に疑問を投げかける報告も多くみられている。特に骨髄中の造血幹細胞の可塑性に関しては非常に激しい論争がなされている。血液中の骨髄由来前駆細胞が血管病態形成に関与するかどうか、いくつかの方法を用いて再検証してみた。

B. 研究方法(a) 異なる血管傷害モデルを用いての検討

野生型マウスに致死量の X 線 (9Gy) を照射し、GFP マウスもしくは LacZ マウスの骨髄を移植した。一匹の骨髄移植マウスの三つの異なる血管に、同時に別々の異なる傷害を加えた。ワイヤー傷害 (Wire Injury)、頸動脈の結紮 (Ligation)、ポリエチレンチューブの大腿動脈周囲への留置 (Cuff) の三種類の異なるモデルで手術を行い、4 週後に骨髄由来の病態への取りこまれ方を検討した。

(b) 一つの造血幹細胞を用いた骨髄置換マウスの解析

骨髄細胞のうち、血管の修復と病態形成に関与する分画を検討した。野生型マウスの骨髄を、①全骨髄 1×10^6 個 (TBM 群)、②造血幹細胞が大部分を占める c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻分画 1×10^3 個 (KSL 群) ③高

度に純化した造血幹細胞 1 個 (HSC 群) によって置換した。その後、血管にワイヤーを用いた傷害を加え、病態への骨髄細胞の取り込まれ方を比較した。

(c) Parabiosis モデルを用いての検討

従来の骨髄置換法においては、致死量放射線照射を用いたレシピエント骨髄の破壊が必須である。しかし、放射線照射は骨髄以外のさまざまなレシピエント臓器に影響をもたらし、生理的な骨髄細胞の標識方法ではない。また、移植した骨髄細胞が造血系を完全に置換することは認められているが、他の間葉系システムも生理的に再構築しうるかどうかは不明である。そこで、照射を伴わないで骨髄と血液細胞を標識する方法として、二つのマウスを皮下で結合させるという parabiosis のモデルを樹立した。このモデルを用いて、血管傷害と高脂血症性血管傷害モデルを施し、パートナー由来細胞の血管病態への関与を検討した。

(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(a) 異なる血管傷害モデルを用いての検討

ワイヤー傷害 (Wire Injury)、頸動脈の結紮 (Ligation)、ポリエチレンチューブの大腿動脈周囲への留置 (Cuff) 何れのモデルによってもアクチン陽性細胞からなる新生内膜が形成された。Wire Injury では多くの骨髄細胞が取り込まれていたが、Ligation では非常に少なかった。また、Cuff では

周囲の炎症細胞としては骨髄由来細胞が存在したが、新生内膜には殆ど取り込まれていなかった。骨髄由来細胞の取り込まれる程度は、組織損傷の程度とその後のケモカイン、サイトカインの発現量と相関していた。特に wire injury 後の大腿動脈では、内皮はほぼ完全に剥離され中膜の細胞はアポトーシスにより消失していた。このような強い傷害後は、修復に必要な細胞が局所に残存せず遠隔の幹細胞が動員されざるをえなくなると考えられた。

(b) 一つの造血幹細胞を用いた骨髄置換マウスの解析

TBM, KSL, HSC どの群においても末梢の血液細胞は移植細胞由来のものに再構築されていた。TBM もしくは KSL で骨髄を置換したマウスでは、傷害後の血管病変に骨髄由来細胞が数多く認められた。骨髄由来細胞の多くの細胞は、血管平滑筋細胞もしくは内皮細胞のマーカーを発現していた。一方、一つの造血幹細胞を移植した HSC 群では、病変には骨髄由来細胞が関与することは殆ど認められなかった。以上より、造血幹細胞より未分化な骨髄細胞もしくは間葉系細胞から、血管前駆細胞が分化している可能性が高いと考えられた。

(c) Parabiosis モデルを用いての検討

皮下の結合によって、従来から知られているように液性因子が交流するばかりでなく、末梢血、骨髄細胞も二マウス間を交流していた。すなわち、GFP マウスと野生型マウスを結合すると、7-10 日には野生型マウスの末梢血の約 50% が GFP 陽性になっていた。3-4 ヶ月後には、骨髄においてもほぼ 50% のキメリズムが確認された。片方のマウスの血管にワイヤー傷害を加えると、パートナー由来の細胞が新生内膜形成に関与していた。

D. 考察

血液中の前駆細胞が強度傷害後の血管の修復と病変形成に関わる現象が再確認された。前駆細胞としてはいろいろな細胞分画が混在している可能性が高いが、造血幹細胞からの形質転換分化現象は少ないようである。各種病態における前駆細胞の動態とその制御機構を現在研究している。

E. 結論

流血中には骨髄由来の血管前駆細胞が存在し血管病の病態生理に関与していると考えられる。その動員、定着、分化、増殖に関する研究は、血管病の新たな治療法開発に貢献すると期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(論文発表)

1. Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R. Origin of smooth muscle progenitor cells: Different conclusions from different models *Circulation*. 2003. 107: e106-e107.
2. Abe, M., Sata, M., Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Terauchi Y, Kadowaki T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Hirata Y, Nagai R Adrenomedullin augments collateral development in response to acute ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 306:10-15.
3. Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med*. 2003. 13:249-253.
4. Saiura A, Sata M, Washida M, Sugawara Y, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Little evidence for cell fusion between recipient and donor-derived cells. *J Surg Res* 2003. 113:222-227.
5. Sata, M., Tanaka, K., Ishizaka N., Hirata, Y., Nagai R. Absence of p53 leads to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. 23:1548-1552.
6. Fukino, K., Sata, M., Seko, Y., Hirata, Y., Nagai, R. Genetic background influences therapeutic effectiveness of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 310:143-147.

7. Tanaka K., Sata M., Hirata Y., Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res.* 2003. 93: 783-790.
8. Natori T, Sata M., Washida M., Hirata, Y, Nagai R., Makuuchi, M. Nicotine enhances neovascularization and promotes tumor growth. *Mol Cells.* 2003. 16: 143-146.
9. Sata, M. Molecular strategies to treat vascular diseases; Circulating vascular progenitor cell as a potential target for prophylactic treatment of atherosclerosis. *Circ J.* 2003: 983-991.
10. Sata, M., Nagai, R. Inflammation, angiogenesis, and endothelial progenitor cells: How do EPCs find their place? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004 in press
11. Sata, M., Nishimatsu, H., Osuga, J.I., Tanaka, K., Ishizaka, N., Ishibashi, S., Hirata, Y. Nagai, R. Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis. *Hypertension.* 2004 in press

(学会発表)

1. 佐田政隆、平田恭信、永井良三 「骨髄由来血管前駆細胞による血管修復と再生」第76回日本薬理学会年会シンポジウム「血管新生制御機構と治療戦略」2003年3月25日 福岡
2. Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R. Hematopoietic Stem Cells Differentiate into Vascular Cells that Participate in the Pathogenesis of Atherosclerosis 日本循環器学会学術集会 Plenary Session 5 'Frontier of Atherosclerosis Research' 2003年3月30日 福岡
3. 佐田政隆、永井良三 「骨髄由来細胞による再生および病態形成」第100回日本内科学会講演会パネルディスカッション「再生医療の展望」2003年4月2日 福岡
4. 佐田政隆 「Statin の pleiotropic action」第51回日本心臓病学会学術集会「モーニングセミナー」2003年9月9日 東京
5. Sata, M. "Bone marrow-derived progenitor cells contribute to vascular repair and atherosclerosis" XIIIth International Symposium on Atherosclerosis Master's Lecture (4ML14) October 2, 2003. Kyoto
6. Sata, M. "Roles of circulating vascular progenitors in plaque progression and destabilization" XIIIth International Symposium on Atherosclerosis Satellite Symposium October 3, 2003. Fukuoka
7. 佐田政隆、永井良三 「プラーク破綻の機序」第44回日本脈管学会総会シンポジウム：コンセンサス/コントロール3「冠動脈疾患-病態、診断、治療をめぐって」2003年11月7日 福岡
8. 佐田政隆、永井良三 「動脈硬化形成への骨髄細胞の関与」第26回日本血栓止血学会：座長指定演題シンポジウム 2003年11月28日 東京
9. Masataka Sata "Bone marrow-derived progenitor cells contribute to vascular repair and atherosclerosis." Annual Spring Conference of the Korean Society of Circulation. Cheju, Korea, April 17th, 2003.
10. Masataka Sata "Bone marrow-derived progenitor cells participate in the pathogenesis of atherosclerosis." 1st Euregio-Symposium Workshop on Atherosclerosis-Molecular Basis of an Inflammatory Disease. Vaals, Netherlands, September 27th, 2003.

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 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）
分担研究報告書遺伝子導入による血管新生の促進療法に関する研究
分担研究者 森下竜一 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：糖尿病性神経障害や皮膚潰瘍に対するヒト HGF(肝細胞増殖因子)遺伝子導入による血管新生療法の確立を動物モデルにおいて行った。神経障害に対してはヒト HGF 遺伝子を、糖尿病をラットの大腿部へ naked プラスミド導入により、坐骨神経の伝達速度の改善と坐骨神経周囲の血流増加をもって評価し、また皮膚潰瘍に対してはヒト HGF および血管拡張因子であるプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子の共導入をインスリン皮下注射用に開発され臨床応用されているシマジエットによりステロイドホルモンにより誘発された潰瘍の周囲に導入し、創面積・血流の増加・コラーゲン量をもとに評価した結果、共にコントロール群に比し有意な改善を認めた。これらの結果よりヒト HGF 遺伝子導入による血管新生療法が糖尿病性神経障害や皮膚潰瘍に対して有効であることが示され、今後臨床への応用が期待できるものと考えられる。

A. 研究目的

本研究では血管新生による難病治療を目標として糖尿病合併症で最も多い糖尿病性神経障害と皮膚潰瘍の遺伝子治療の可能性について動物モデルを用いて検討した。糖尿病性神経障害と皮膚潰瘍の病態を考えた場合、ともに血流の低下がその大きな原因の一つなることが報告されている。HGF 遺伝子導入は動物実験やヒトでの臨床研究において血管新生を誘導し、虚血状態を改善することを我々は既に報告しており、本血管新生療法を両病態に応用する可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 糖尿病性神経障害に対する遺伝子治療

12 週齢の雌性 SD ラットに STZ (40 mg/kg ip)により糖尿病を誘発し、その 13 週間後にヒト HGF 遺伝子を両大腿部筋肉内に直接注射し、その 2 週間後に神経伝達速度、4 週間後に血流量の増加を Laser Doppler Image (LDI)にて、さらに 8 週間後に神経伝達速度、LDI を再度測定し効果判定を行った。また体重測定、血糖測定も随時行った。

2. 皮膚潰瘍に対する遺伝子治療

7 週齢の雄性 Wistar ラットにステロイドホルモンの皮下注射にて潰瘍を誘発し、潰瘍誘発直後にヒト HGF 遺伝子とヒト PGIS 遺伝子を潰瘍周囲にシマジエットを用いて導入した。その後経時的に潰瘍の修復を創面積にて、潰瘍面における血流の増加を LDI にて、さらに創内におけるコラーゲン量を測定し、遺伝子導入の効果を評価した。

(倫理面への配慮)

両実験とも大阪大学の定める動物実験指針にのっとり、動物を扱っており倫理面においては特に問題はない。

C. 研究結果

1. 糖尿病性神経障害に対する遺伝子治療

経時的に測定した体重や血糖値においてはコントロールベクター導入群と HGF 遺伝子導入群においては有意な差は認めなかった。神経伝達速度は糖尿病誘発後 13 週の時点ですでに健常コントロール群に比し有意な低下が認められた。その後ヒト HGF 遺伝子導入群では 2 週間でコントロールベクター導入群に比し、有意な改善を認め、さらに遺伝子導入後 8 週間で HGF 遺伝子導入群では健常コントロール群と同等のレベルにまで回復していた。LDI による両大腿部(遺伝子導入部位周辺)での血流量は予想どおり HGF 遺伝子導入群においてコントロール群に比し、有意に上昇していた。さらに坐骨神経における血流量も同様の結果であり HGF 遺伝子導入群において有意な上昇がコントロール群に比し認められた。

2. 皮膚潰瘍に対する遺伝子治療

まず皮膚への遺伝子導入方法が確立されていなかったため、インスリン注射用に開発された無針のシマジエットの応用を試みた。予備実験においては皮膚から遺伝子導入を行うと表皮から真皮にかけて遺伝子が効率良く導入されることを確認し、本研究の目的に使用可能であると考えた。その後ヒト HGF 遺伝子単独導入群、およびヒト HGF 遺伝子およびヒト PGIS 遺伝子共導入群、コントロール群間で効果を比較検討した。創面積においては HGF 群においてもコントロール群と比較すると有意な縮小が認められ、その効果 HGF + PGIS 群においてさらに増強されていた。また LDI による血流量測定でもやはり HGF + PGIS 群において最も有意な増加を認め、ついで HGF 群となっていた。コラーゲン量の測定においては HGF + PGIS 群と HGF 群においては有意な差は認められな

ったが、ともにコントロール群よりは有意に増加していた。

D. 考察

両実験において HGF 遺伝子導入が有意に血管新生を誘導し、その標的部位での血流を増加させることによりその効果を発揮したと考えられる。特に糖尿病性神経障害に対する遺伝子治療においては遺伝子導入部位が大腿部ということでその標的部位から少し離れているが、HGF が分泌蛋白であることを考慮すればその効果についても納得のいくものである。同様の結果は他の分泌蛋白の遺伝子導入においても認められており、このようなアプローチは今後その対象疾患が広がる可能性を秘めている。また皮膚潰瘍に対する遺伝子治療においては PGIS 遺伝子の共導入という極めてユニークなアプローチも行い、それによる増強効果が確認できた。これは本実験では遺伝子導入部位では正常な血管が存在することを考慮すれば当然ではあるが、結果もその通りであり、非常に興味深いと思われる。本来なら経過を長期にわたり追う必要はあるが、本モデルの限界というべき問題があり(一過性のモデルで自然治癒する)、現在のところその効果に関しては不明である。今後さらにいろいろなモデルでの検討を行い、長期にわたる効果について検討したい。

E. 結論

HGF 遺伝子導入は以前に我々が報告したように虚血性の血管病変には血管新生作用により血流の増加をきたすことは明らかであり、本研究ではさらにその標的を糖尿病性の神経障害や皮膚潰瘍といった具合に日常臨床でよく遭遇する疾患にまで拡大し、その効果について検討したが、その結果ではやはり血流量の低下が原因となる疾患においてその有効性が示されたといえる。また皮膚潰瘍の遺伝子治療で示したように血管拡張作用を有する PGIS 遺伝子導入の併用によりその効果が増強しており、今後はそれぞれの病態において必要とされる遺伝子導入の併用によりさらなる効果を期待することができる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

- ・ 小池弘美, 森下竜一, 他. Gene therapy to treat diabetic neuropathy: Improvement of diabetic peripheral neuropathy by HGF gene transfer. 遺伝子診療学会, 大阪, 2003.
- ・ Koike H, Morishita R, et al. Gene therapy by HGF gene transfer into muscle to treat diabetic

neuropathy. ESGT, Edinburgh, 2003.

- ・ Kunugiza Y, Morishita R, et al. Acceleration of wound healing by combination gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet. 日本循環器学会, 東京, 2004 (予定).

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願中「針なしバネ型注射器(シマジェット)を用いた遺伝子・核酸等の生体導入法、疾患治療法」