

の協力を得て、共同開発した。

微小血管造影法に必要な要素

1. 高輝度

輝度は単位面積あたりのX線の光子量であり、イメージングプレートに像を映し出す重要な要素である。X線は被写体を通過する時に散乱・吸収されるため、検出器に到達する前にその光子量は顕著に減衰する。こうした理由で既存の血管造影装置は、X線の光子量を維持するために白色光で撮影している。放射光のX線は、既存のX線装置より約 10^8 倍も輝度が高く、被写体によりX線の減衰を受けても、十分な光子量を維持することが可能である。X線を単色化する行程で、著しく光子量を減少させたとしても、既存の白色X線と同等の光子量を検出器に確保することができる。この要素は、微小血管造影には必要不可欠である。

2. 単色化

ヨードは33.3 keVのエネルギーレベルでK吸収端を持つ。これは質量吸収係数が不連続に上昇し、X線のエネルギーをヨードのK吸収端の直上のエネルギーに変換すると、ヨードと周囲組織との質量吸収係数の差が最大となる。組織とヨードとのコントラストが最良となるため、微量のヨードを検出できやすくなる効果がある(図3)。放射光をシリコン結晶によるBragg反射を応用し、その角度により必要な単色エネルギーを得ることができる(図4)。

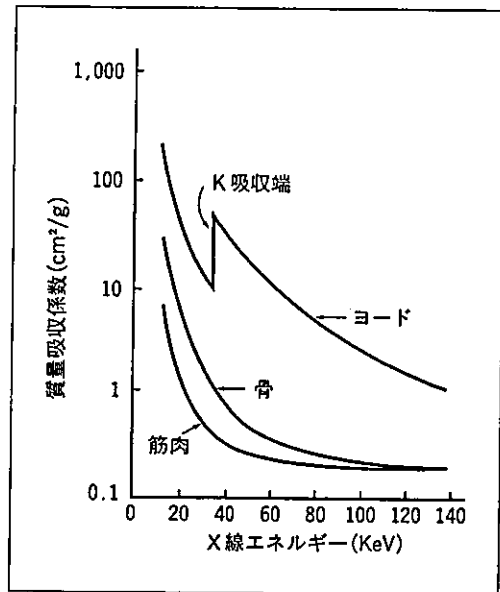


図3. X線エネルギーと質量吸収係数の関係
33.3keV直上でヨードK吸収端が上昇し、組織との質量吸収係数を最大にする。

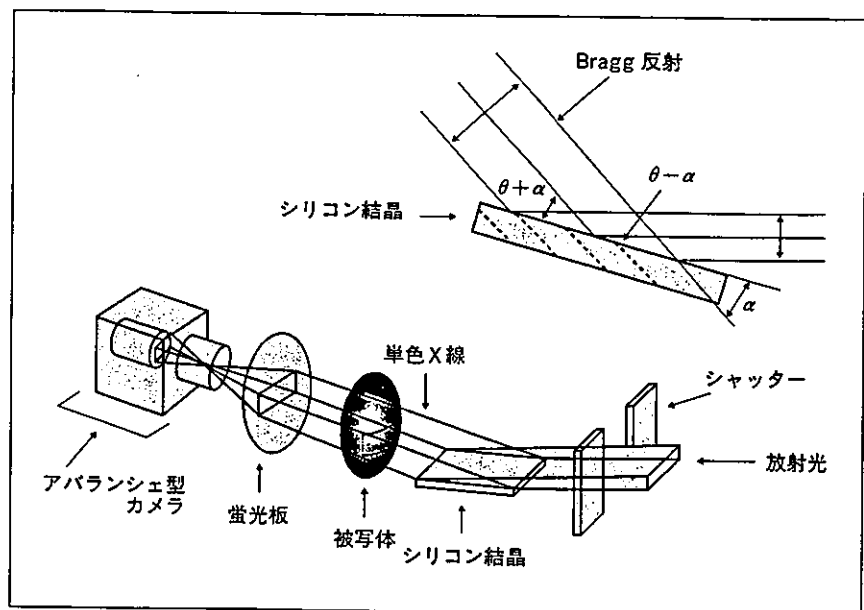


図4. 放射光施設の微小血管造影システム
放射光をシリコンを用いBragg反射させ、その角度を調節し、単色X線を得る。その像は高感度、高解像度のアバランシェ型カメラで撮影される。

3. 平行化

平行線により映し出された像は、理論的にいえば等大の大きさになる。非平行光線は被写体から像との距離が離れるほど像は拡大し、辺縁がぼやけてしまう(図5)。放射光のX線は限りなく平行な性質であり、これも微小血管造影に理想的である。一方、既存のX線は平行線ではなく、微小血管レベルの評価に影響するため、微小血管造影には不向きである。浜松ホ

トニクスが開発した微細な孔を多数有するキャピラリープレートを用いると、X線を平行化することが可能である。X線源と被写体の距離を近づけた場合、平行化すると像の拡大を防げるが、平行化しないと像が拡大してしまうことをコンピュータシミュレーションで証明した(図6)。

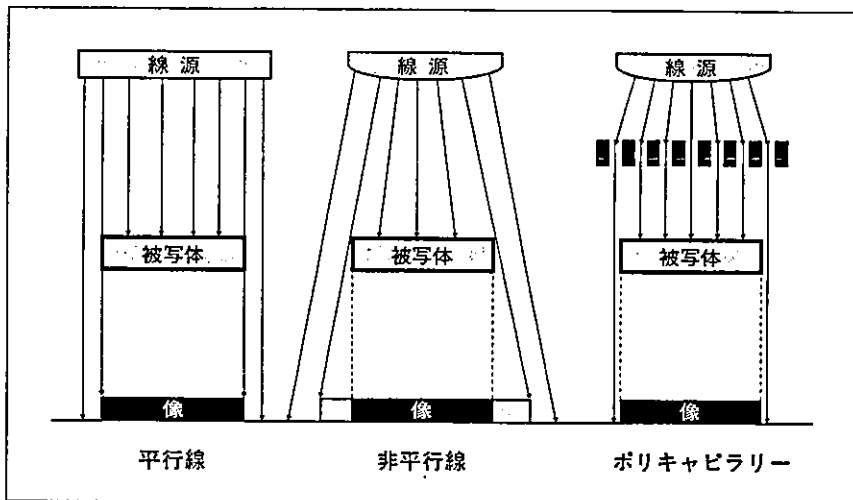


図5. 平行化

平行線では被写体と像は同一の大きさであるが(左)、非平行線では像が拡大し、辺縁はぼやける(中)。ポリキャピラリーを用いて平行化させると、像は被写体の大きさに限りなく近づく(右)。

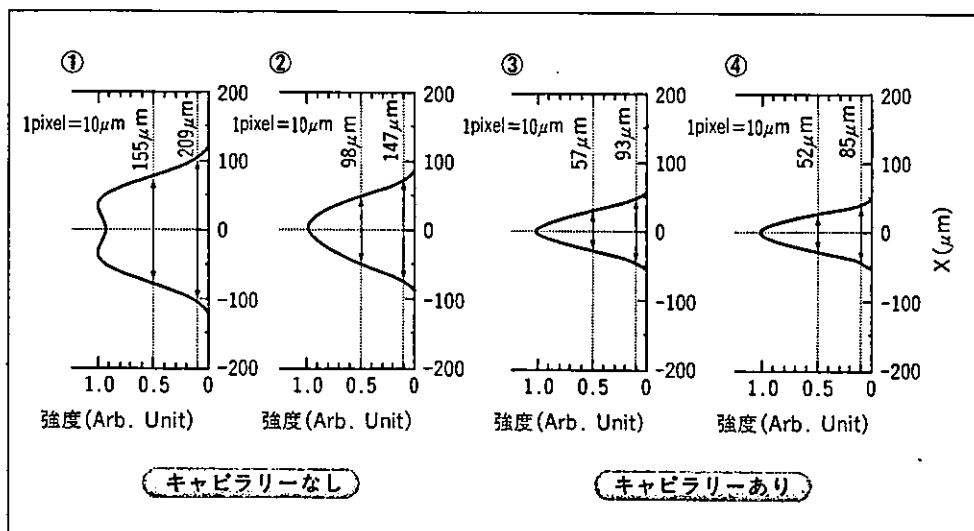


図6. ポリキャピラリーのコンピュータシミュレーション

①②は線源とスリットとの距離がそれぞれ50cmと80cmで、キャピラリーによる平行化がない状態である。この時に検出器に入るX線幅は、それぞれ155μm、98μmに拡大される。③④も同じく距離を50cmと80cmとし、キャピラリーで平行化した状態である。平行化した場合は、52~57μm程度の誤差しかない。

1 pixel = 10 μm.

4. 高解像度・高感度

検出器の解像度をチャート撮影から得ることができる。1mm幅に4本のライン(2ラインペア)を識別できれば、 $1,000\mu\text{m} \div 4$ で $250\mu\text{m}$ の解像度、同じく20本のライン(10ラインペア)識別できれば $50\mu\text{m}$ の解像度となる。既存の血管造影装置では約2ラインペアであり、空間分解能は $250\mu\text{m}$ といえる(図7)。感度を高くすると微量のX線を検出できるため、微小血管を造影するにはイメージングプレートとして高感度蛍光板の使用が好ましい。

K吸収端(33.3 keV)上にピークを持つ疑似単色X線を得ることができる。

3. 平行化

焦点に起因するボケを低減する目的で、マルチファイバーからなるコーン型のコリメーターを開発した。チャンネルサイズと素子の厚みにより、出射角と透過効率が決定的なため、実用となる条件を求め試作した(図8)。これにより、被写体が検出器から離れる場合に生じる解像度の低下を防ぐことができる。

病院設置型微小血管造影装置

新エネルギー・産業技術開発機構(NEDO)の支援により、病院設置型微小血管造影装置を開発した。X線源は既存の大容量大出力を持つCT用のX線管を用い、検出系はNHKエンジニアリングの技術により超高感度ハイビジョンカメラシステムを導入した。

1. X線管球

普及型微小血管造影装置のCT用のX線管は、最大陽極熱容量が5MHUと世界最大級の大きさである。X線高電圧装置も大出力化し、市販の装置では不可能な $70\text{kVp} \cdot 800\text{mA}$ で高輝度のX線を得ることができる。連続20秒照射が可能であり、撮影は動画で観察できる。優れた冷却性能を持ち、480秒の休止で繰り返し照射が可能である。

2. 疑似単色化

疑似単色化はランタノイド系の金属を複合したフィルターで、ヨードの

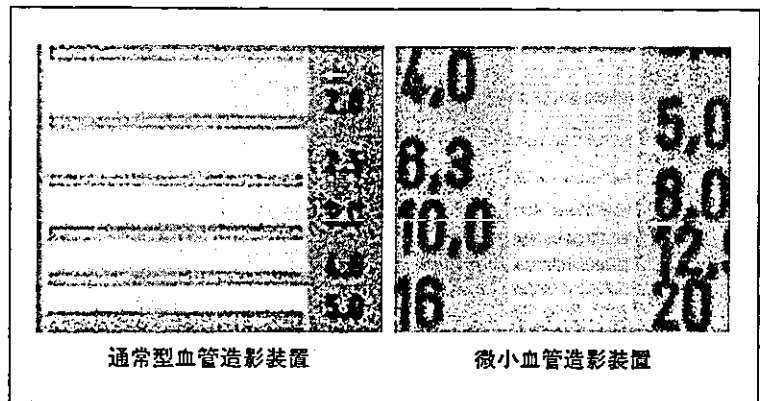


図7. チャートによる解像度の評価
通常型血管造影装置(左)の解像度は $250\mu\text{m}$ ($1\text{mm}/4=2$ ラインペア)、普及型微小血管造影装置(右)の解像度は $50\mu\text{m}$ ($1\text{mm}/20=10$ ラインペア)を示す。

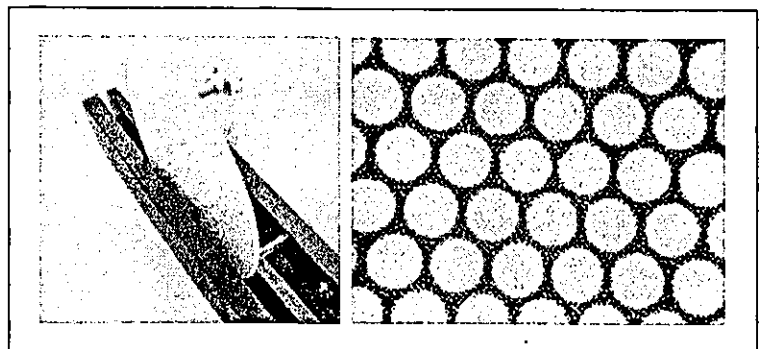


図8. ポリキャピラリー
多数の孔を持ったポリキャピラリーが、X線を平行化する。

4. 超高感度ハイビジョンカメラの開発

検出系は高解像度・高感度蛍光板で作成した蛍光像を、超高感度・高精細撮像管であるアバランシェ型ハイビジョンモノクロ新 Super-HARP カメラで撮影する。これらの検出器系から高解像度(50 μm)が得られる。CCD を用いたハイビジョンカメラは、画素あたりの光子数が減少し感度が低下するため、高精細画像として微小血管を描出するには限界がある。アバランシェ型ハイビジョン用撮影管は高解像度で、高感度の撮影が可能である。非セレン膜で構成された光伝導電層は、高電圧操作下で電子なだれ現象を生じさせ、実効量子効率が数百倍の光電変換ができる。新 Super-HARP カメラは、空間分解能は 25 μm で、CCD カメラより 100 倍以上の感度があり、25 μm の非セレン膜の構造をとっている⁶⁾⁻⁹⁾。

5. トータルシステム

本装置は、既存の血管装置と同様に C アーム保持型を有しており、さまざまな角度からの撮影が可能である(図 9)。今までのハイビジョン映像は、高画質

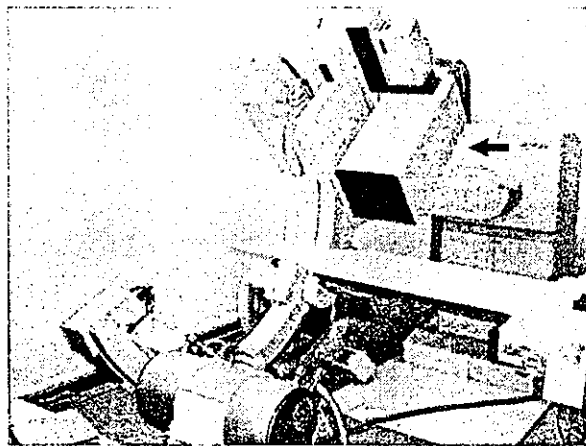


図 9. トータルシステム

筒型の X 線管は、現在臨床で使用されている CT 用の高出力線源である(白矢印)。C アーム上端には蛍光板を有した検出器と HARP 管を有するカメラを搭載している(黒矢印)。

200 万画素の動画映像 1 秒間 30 フレームを長時間記録する装置が必要であり、放送局用の VTR しかなかった。これは、専門家しか扱えなく、装置から得られた画像の分析も複雑であった。そこで、デジタル高精細画像処理・表示装置を導入した。ハードディスクへの直接記録方式をとり、数十分の長時間記録が可能となり、小型で安価な装置となった。性能は、10 ビットデジタル画像データが記録できる大容量ハードディスク 144GB(1,000 \times 1,000 画素 \times 10 ビットを 30 フレーム/秒を 40 分記録可能)を搭載しており、映像データは直ちに再生・逆再生・スチル再生が可能であり、マウスのみで機械操作ができる。

6. 直接 X 線量と散乱線量

安全性の検討として、直接 X 線量と散乱 X 線量を計測した。X 線発生装置から 1 m に検出器を設置し、管電圧 70 kV、管電流 500 mA で 20 秒照射した場合、0.547 Sv(62.7R)であった(図 10)。検査の撮影条件としては、最低でも一検査あたり 100 R 以下(3 R/sec)を目標としており、妥当な線量と考えられる。また、X 線発生装置から 1 m の距離にファントムを置き、50 cm 側方で散乱 X 線を検出した場合の散乱 X 線量は 0.0225 mSv(2.58 mR)であった(図 11)。放射線医療従事者の年間被曝量の限度は 50 mSv であり、術者に対する影響は少ないと考えられた。

7. 微小血管画像

イヌ冠動脈ファントムを用い、既存の血管造影装置と比較した。ファントムは冠動脈にヨードを含むマイクロスフィアを注入後に結紮し、作成した。微小血管造影装置では、イヌ冠動脈の中隔枝が末梢まで分岐するたびに血管径が細くなっていくのが観察できたが、既存の X 線装置では観察できなかった(図 12)。また、ウサギ下肢血管を結紮し、慢性期に形成された新生血管を微小血管造影装置で観察した。さらに、血管拡張剤であるアデノシンを動脈に投与したところ、微小血管が拡張する現象も確認できた(図 13)。現在のところ

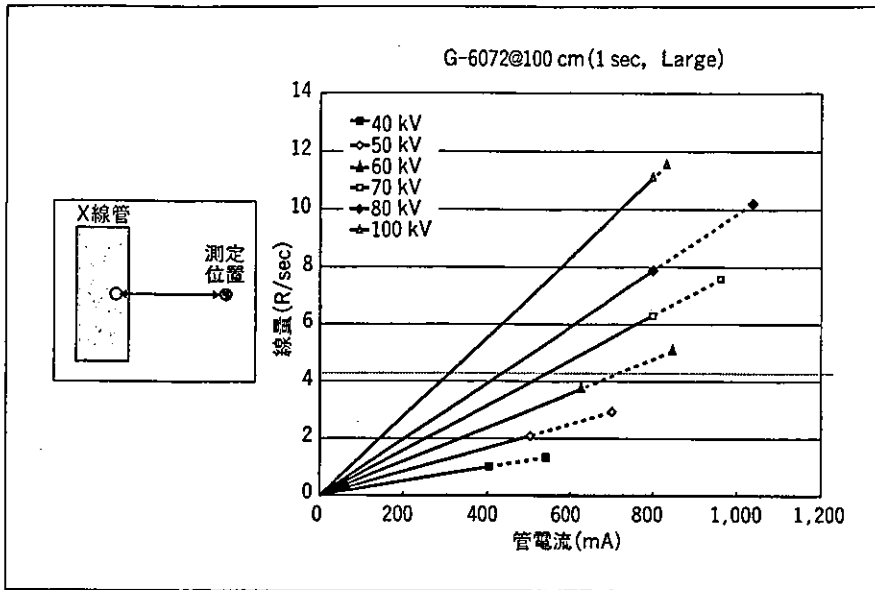


図 10. X線強度
微小血管造影装置のX線強度は管電圧70V、管電流500mAの20秒照射で0.547 Sv(62.7 R)であった。

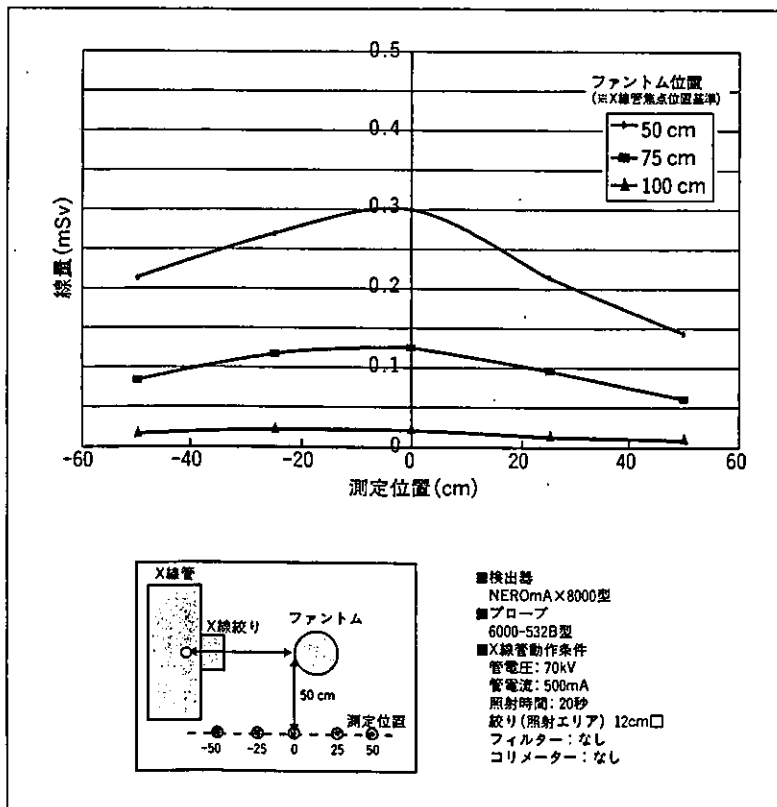


図 11. 散乱X線
X線発生装置から1mの距離にファントムを置き、50cm側方での散乱X線量は0.0225 mSv(2.58 mR)であった。

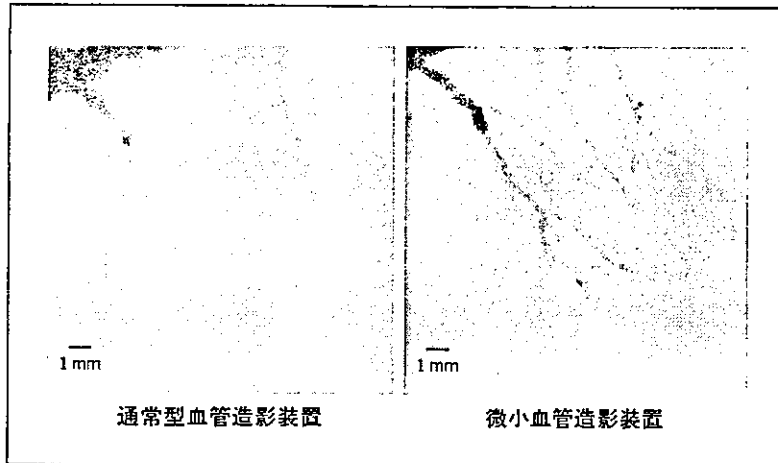


図 12. イヌ冠動脈
通常型血管造影装置ではイヌ冠動脈の末梢側はぼやけてしまっているが(左), 微小血管造影装置では末梢側までイヌ冠動脈末梢を観察することができる(右).

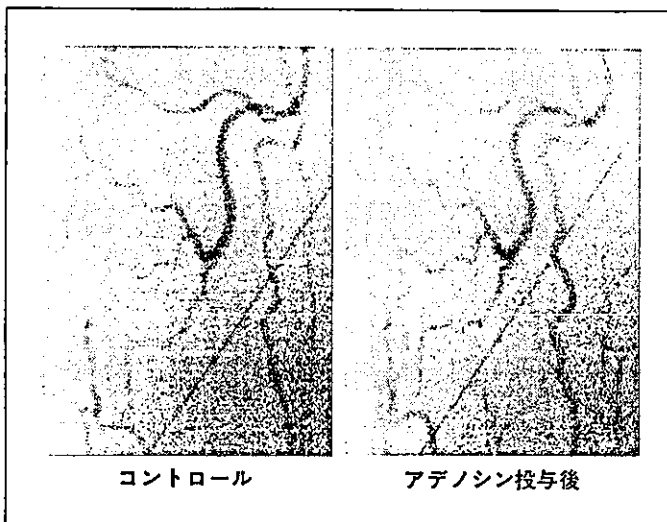


図 13. ウサギ下肢血管
新生血管を微小血管造影装置で観察した(左). 血管拡張剤であるアデノシンを動脈に投与し, 微小血管が拡張する現象が観察できた(右).

ろ, 体厚が約 10 cm 程度の被写体しか通過できないため, 心血管系など厚い被写体を撮影することはできない。このため, 下肢血管病変に対する血管再生療法の効果判定を目的としている。

まとめ

骨髄単核球移植または末梢血幹細胞による血管再生療法の評価に関しては, 一般の検査では臨床症状の改

善を十分に評価できておらず, 適切に再生血管の臨床評価をする方法は確立されていない。今回開発された病院設置型の微小血管造影装置は, 高輝度の X 線源と高解像度・高感度の検出器を持ち合わせており, 微小血管を鮮明に描出することが可能である。再生治療の前後で微小血管の変化を検討し, 血管新生が臨床症状の改善に関与していることを証明できると考えられる。

◎文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-966, 1997
- 2) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103 : 897-903, 2001
- 3) Tomita S, Ren-Ke Li, Richard D, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 : II-247-II 256, 1999
- 4) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360 : 427-435, 2002
- 5) Mori H, Hyodo K, Tobita K, et al : Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. *Circulation* 89 : 863-871, 1994
- 6) Tanioka K : A highly sensitive camera tube using avalanche multiplication in an amorphous selenium photoconductive target. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 1656 : 1-12, 1992
- 7) Kubota M, Kato T, Suzuki S, et al : Ultrahigh-sensitivity new super HARP camera. *IEEE Trans Broadcast-ing* 42 : 251-258, 1996
- 8) Umetani K, Ueki H, Takeda T, et al : High-spatial-resolution and real-time medical imaging using a high-sensitivity HARPICON camera. *J Synchrotron Rad* 5 : 1130-1132, 1998
- 9) Tanioka K, Ohkawa Y, Miyakawa K, et al : Ultra-high-sensitivity New Super-HARP Pickup Tube. IEEE Workshop on CCD and Advanced Image Sensors 2001

3. 遺伝子-細胞ハイブリット治療-

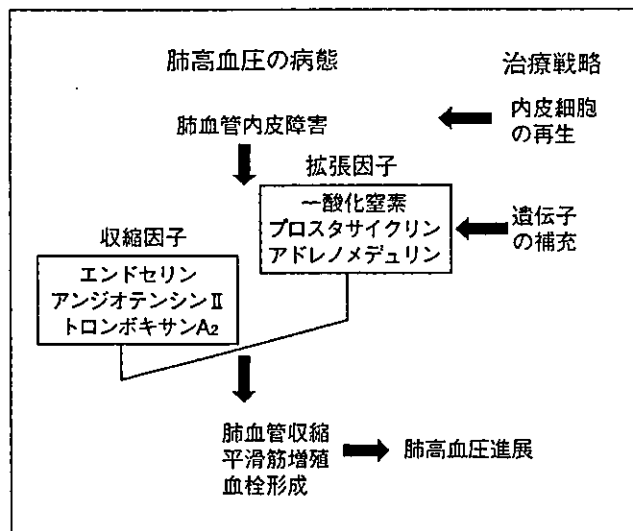
永谷 憲歳・片岡 雅晴

肺高血圧症、特に原発性肺高血圧症（PPH）発症の原因の1つとして肺血管内皮の機能障害が報告されている。正常の肺血管内皮細胞は様々な血管拡張因子を分泌して肺血管の低圧系を維持しているが、肺高血圧症では肺血管内皮機能障害により血管作動物質のバランスが破綻（収縮因子>拡張因子）している。すなわちエンドセリン（ET-1）、トロンボキサンA₂などの収縮因子が増加し、内因性血管拡張因子であるプロスタサイクリンや一酸化窒素の産生が相対的に低下している。このような病態に着目した治療として、①肺血管内皮細胞で産生される拡張因子の補充と収縮因子の抑制、②正常な肺血管内皮細胞の再生促進という治療法が考えられる。肺血管内皮由来の拡張因子の補充という観点からプロスタサイクリン合成酵素（PGIS）や一酸化窒素合成酵素（eNOS）遺伝子治療の効果が動物実験で証明され、また血管内皮前駆細胞（EPCs）を用いた肺血管内皮の再生治療が報告された。本稿では肺高血圧症に対する遺伝子治療、再生医療の可能性に関して最近の基礎的研究を中心に概説する。

はじめに

原発性肺高血圧症（PPH）に対する治療としてプロスタサイクリン療法やエンドセリン（ET）受容体拮抗薬などが開発され、その有効性が報告されている。しかしなお治療抵抗性の症例が存在し、肺移植の適応とされながらもドナー不足により十分な治療が受けられないのが現状である。図①に示すよう PPH 患者では肺血管内皮細胞から産生させる血管作動物質のバランスが破綻している（収縮因子>拡張因子）。従って、血管拡張因子の遺伝子導入、さらには血管新生因子や血管内皮前駆細胞を用いて正常な肺血管内皮細胞を再生させることが肺高血圧軽減につながる可能性がある。

図① 肺高血圧症における血管作動物質のバランス破綻と病態に基づいた治療戦略



I. 肺高血圧症の遺伝子治療

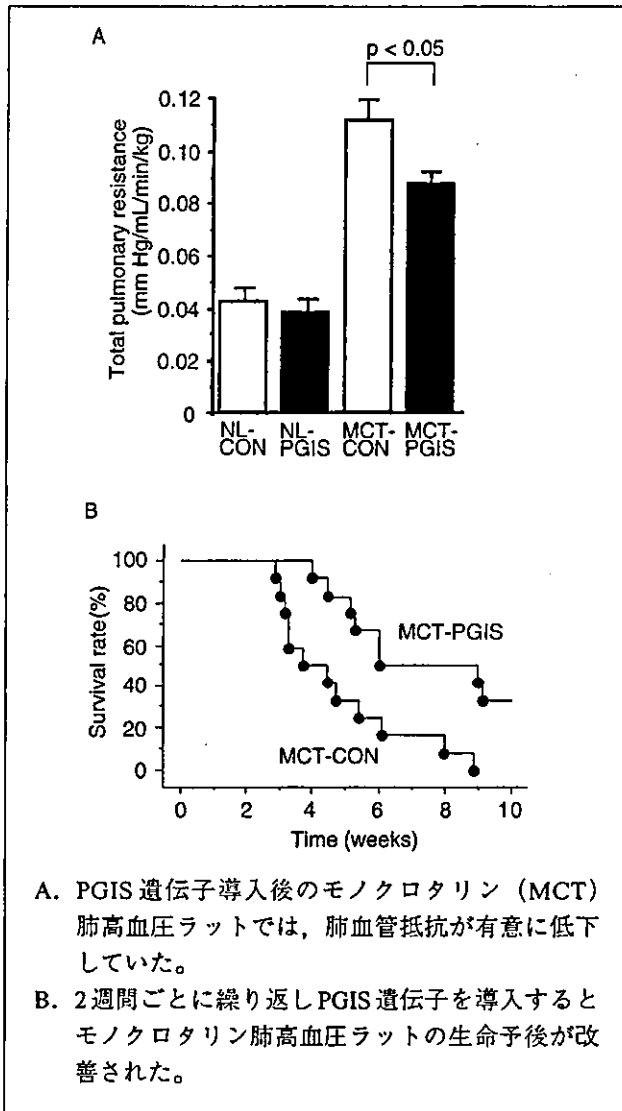
遺伝子導入により肺血管拡張因子である一酸化

窒素（NO）やプロスタサイクリンが肺血管で持続的に過剰産生されれば、肺高血圧が軽減できる可

key words

肺高血圧, 遺伝子治療, 再生医療, 血管内皮前駆細胞, アドレノメデュリン

図② プロスタサイクリン合成酵素 (PGIS) 遺伝子導入による肺高血圧軽減効果 (文献2より)



能性がある。これまでに報告された肺循環への遺伝子導入法にはカテーテルによる肺動脈内直接投与、経気道的投与、遺伝子導入した細胞の移植などがある。経気道的遺伝子導入法は肺血管への直接の導入効率は低い、細気管支への遺伝子導入が可能であり、並走する肺抵抗血管に作用することができる。また、*ex vivo*で遺伝子導入された細胞を静脈内投与すると、細胞を介して肺血管床に遺伝子導入が可能である。

われわれは、PPH患者の肺組織ではプロスタサイクリン合成酵素 (PGIS) の産生が低下している¹¹⁾ことに注目し、経気道的PGIS 遺伝子治療を開発した¹²⁾。PGISはプロスタグランジン H₂ からプロスタ

サイクリンを生成するのに必要な酵素である。PGIS 遺伝子導入により肺でのプロスタサイクリンの合成を促し、その濃度を保つことができれば、点滴による持続投与の必要もなくなり、患者負担の少ない新しい治療法となる可能性がある。実際、われわれは、HVJリボソームをベクターとしてPGIS 遺伝子を経気道的にモノクロタリン肺高血圧ラットに導入することに成功した。その結果、肺組織でのプロスタサイクリンの産生が増大し、肺高血圧の軽減、生存率の改善が得られた (図②)。

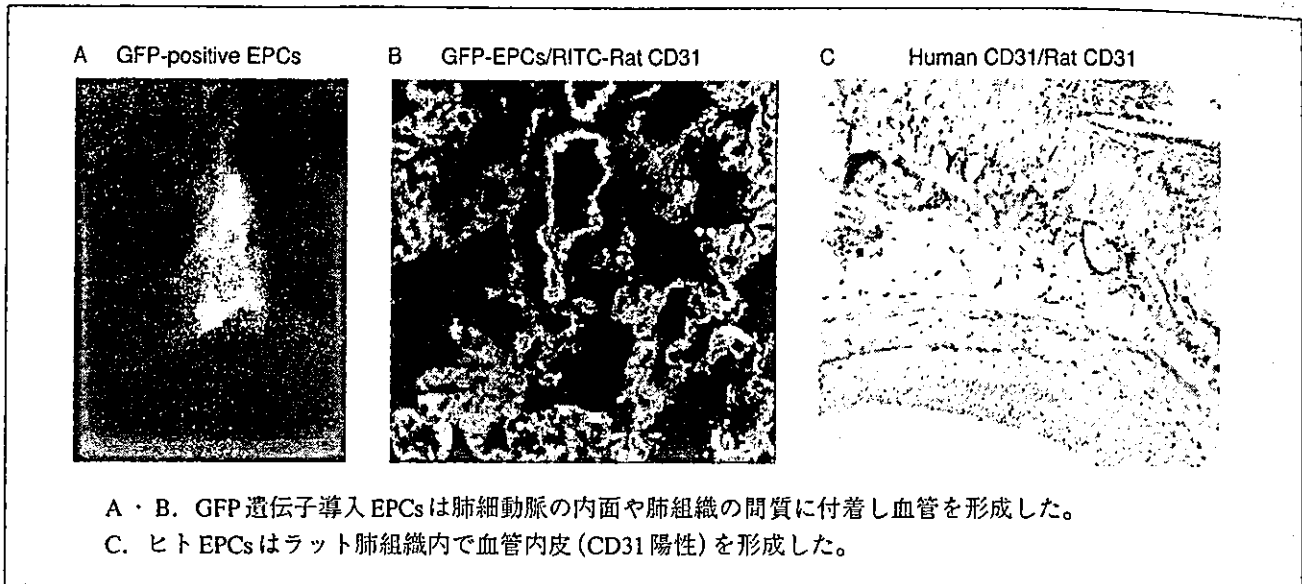
その他、一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の経気道的遺伝子導入¹³⁾や強力な肺血管拡張因子であるCGRP 遺伝子導入による肺高血圧軽減効果¹⁴⁾が報告されており、今後の展開が期待される。

II. 肺高血圧症に対する再生医療

従来、成人個体における血管新生は既存の血管内皮細胞の発芽的増殖と遊走によるものと理解されていたが、1997年、Asaharaらは成人の末梢血中には内皮細胞に分化しうる血管内皮前駆細胞 (EPCs) が存在することを明らかにした¹⁵⁾。血管形成は、辺縁部に位置するEPCsが血管内皮細胞となり血管壁を形成し、中心部に位置する造血幹細胞が血球系に分化して血液を形成することが明らかとなった。EPCsは血管障害部位への遊走能、血管再生能を持ち、生体内で虚血や血管内皮障害が起こったときに骨髄から強制動員され、血中を流れてその障害部位へ付着して血管内皮細胞に分化して血管を形成する。この細胞の能力を利用して急性心筋梗塞ラットに静脈からEPCsを投与すると、血管新生さらには梗塞サイズが縮小され、心機能が改善することが報告された¹⁶⁾。臨床においてもEPCsの移植は虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症の治療に有効であることが報告されている¹⁷⁾。EPCsの治療効果は、①EPCs自身が血管内皮細胞に分化して血管形成に参加するため、②EPCsがVEGFらの血管新生因子を放出して局所の血管新生を促すためと考えられる。

PPH患者の病態として、血管新生を伴わない血管内皮細胞の増殖が指摘されている。われわれはEPCsによって正常な肺血管内皮細胞を再生させる

図③ 移植したEPCsの肺組織への定着と肺血管の形成 (文献9より)



ことで肺高血圧が軽減すると仮説を立て、経静脈的EPCs投与による肺高血圧軽減効果を検討した⁹⁾。ヒト臍帯血から血管内皮マーカー陽性のEPCsを分離培養した。正常のラットに静脈からEPCsを投与しても肺組織への付着は認められなかったが、モノクローリンで肺血管内皮細胞や間質に障害を与えた後に投与すると、EPCsは肺細動脈と間質に付着し成熟した血管内皮細胞となった(図③)。また、EPCsの移植は肺組織の血管数を増加させた。平均肺動脈圧に有意な変化は認められなかったが、肺血管抵抗のわずかな改善が認められた。その後、自家のEPCsを移植すれば、モノクローリン誘発肺高血圧を有意に抑制することが他施設から報告された¹⁰⁾。しかし、EPCsの移植のみでは肺高血圧治療効果に限界があると思われた。

Ⅲ. 遺伝子-細胞移植ハイブリッド治療

近年、移植細胞の機能強化のために遺伝子-細胞移植ハイブリッド治療が報告された。Murasawaらは細胞寿命をつかさどるテロメラーゼをEPCsに導入することにより、EPCsの細胞寿命を延長してEPCsによる血管新生効果を増強させることに成功した¹¹⁾。われわれはEPCsの移植治療効果を高めるために、生体内で最も強力な血管拡張ペプチドと考えられているアドレノメデュリンの遺伝子をEPCsに導入した。アドレノメデュリンは血管平滑

筋細胞の受容体に直接作用してcAMPを増加させ、また血管内皮に働き一酸化窒素を介して血管拡張をきたす¹²⁾。また、われわれはアドレノメデュリン遺伝子導入によってEPCsのアポトーシスが抑制されることや増殖が促進されることを明らかにした。また、アドレノメデュリン遺伝子はEPCsをベクターとして肺組織まで運ばれることで(cell-based gene therapy)、アドレノメデュリンの発現による肺血管拡張作用が期待できる。こうして、細胞移植による治療効果と導入した遺伝子の発現による相乗効果で治療効果を増強させる、いわゆる遺伝子-細胞ハイブリッド治療法を生み出した。

われわれは、マクロファージなどの従来の貪食細胞と同様に、EPCsがゼラチン/プラスミドDNA複合体を容易に貪食することを報告した⁹⁾。このEPCsの貪食能を利用したex vivo遺伝子導入は、ウイルスベクターを用いずにEPCs自身へ高率の遺伝子導入を可能にした。また、ゼラチンはその分解とともにプラスミドDNAを徐放でき、長時間の遺伝子発現を可能にした(図④)。実際にこの方法でアドレノメデュリン遺伝子をEPCsへ導入すると細胞質でのタンパクの強発現が確認でき、その発現は2週間以上の長期間持続することがわかった。

アドレノメデュリン遺伝子導入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、生存率を改善させた(図⑤)。これらの効

図4 ゼラチンを用いたEPCsへの遺伝子導入

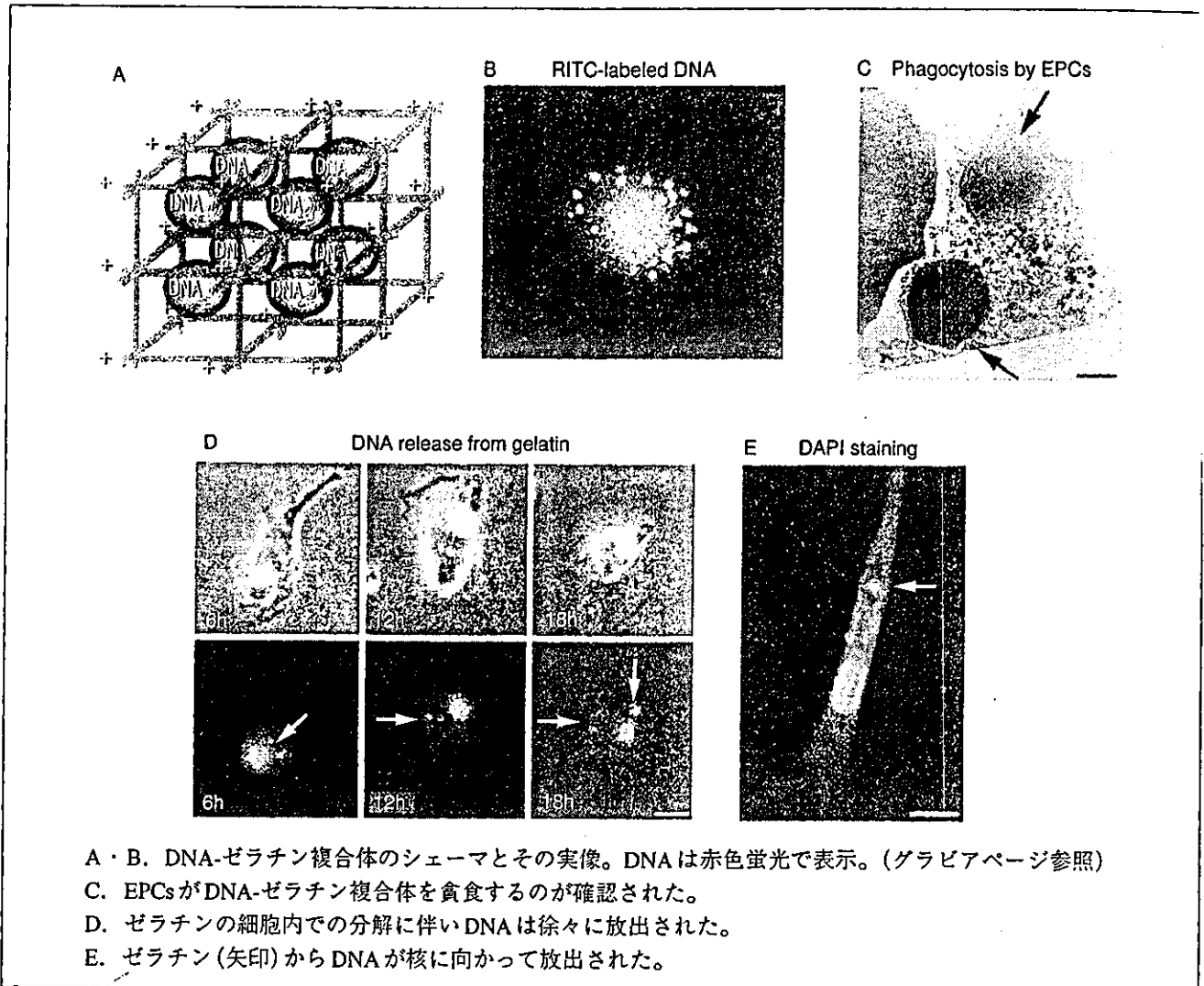
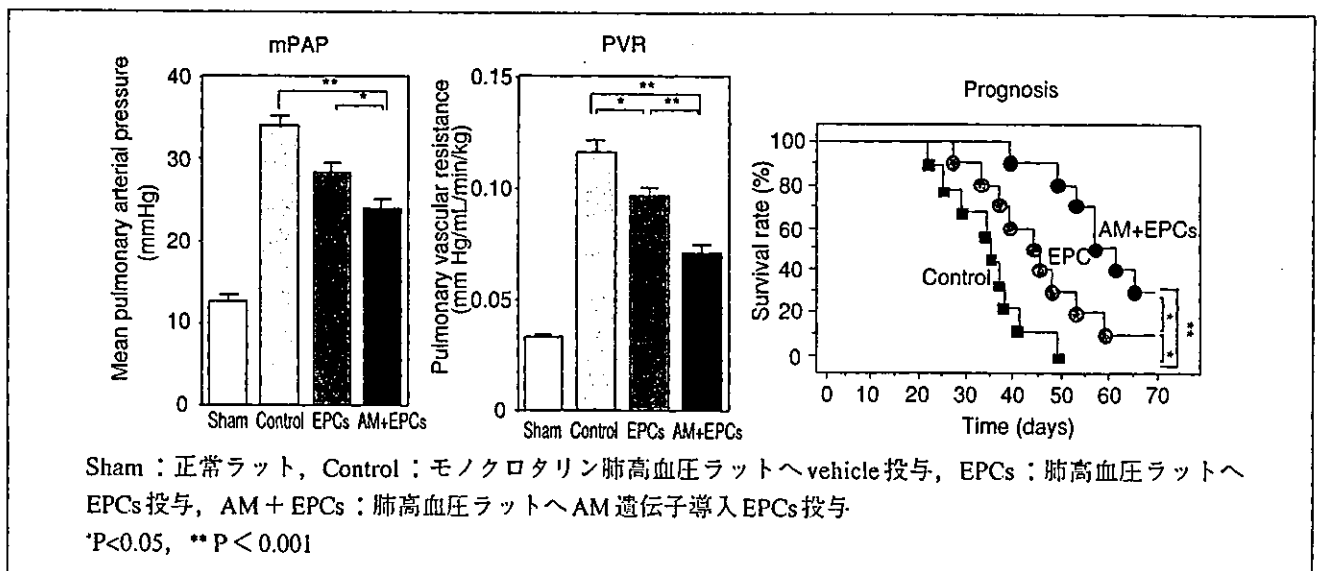


図5 アドレノメデュリン (AM) 遺伝子導入EPCsの移植による平均肺動脈圧 (mPAP), 肺血管抵抗 (PVR), 肺高血圧ラットの予後改善効果



果はEPCsの単独投与より優っていた。既存の治療に抵抗性のPPH患者が少なからず存在することを考えると、この細胞移植-遺伝子ハイブリッド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。

おわりに

肺高血圧症では、肺血管内皮の機能異常によって血管作動物質のバランスが破綻している。われ

われは血管拡張因子であるアドレノメデュリン遺伝子を導入したEPCsを移植することで、肺高血圧が軽減できることを証明した。細胞移植と遺伝子治療を同時に行う遺伝子-細胞ハイブリッド治療法は、細胞による肺血管内皮の再生のみでなく、EPCsをベクターとして肺組織選択的に遺伝子導入を可能にし、新たな肺高血圧治療法として期待される。

参考文献

- 1) Tuder RM, Cool CD, et al : Am J Respir Crit Care Med 159, 1925-1932, 1999.
- 2) Nagaya N, Yokoyama C, et al : Circulation 102, 2005-2010, 2000.
- 3) Champion HC, Bivalacqua TJ, et al : Circ Res 84, 1422-1432, 1999.
- 4) Champion HC, Bivalacqua TJ, et al : Circulation 101, 923-930, 2000.
- 5) Asahara T, Murohara T, et al : Science 275, 964-967, 1997.
- 6) Asahara T, Kawamoto A : Am J Physiol Cell Physiol 287, C572-C579, 2004.
- 7) Kawamoto A, Gwon HC, et al : Circulation 103, 634-637, 2001.
- 8) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, et al : Lancet 360, 427-435, 2002.
- 9) Nagaya N, Kangawa K, et al : Circulation 108, 889-895, 2003.
- 10) Zhao YD, Deng Y, et al : Circulation 108 (Suppl), 295 (abstract), 2003.
- 11) Murasawa S, Llevadot J, et al : Circulation 106, 1133-1139, 2002.
- 12) Nagaya N, Kyotani S, et al : Circulation 109, 351-356, 2004.

永谷憲歳

1992年 千葉大学医学部卒業
 千葉大学医学部附属病院第三内科研修医
 1993年 国立習志野病院循環器内科研修医
 1994年 国立循環器病センター内科心臓部門レジデント
 1997年 国立循環器病センター研究所生化学部流動研究員
 1998年 国立循環器病センター内科心臓部門医員
 2003年 国立循環器病センター研究所再生医療部室長

編集者プロフィール



田畑泰彦 (たばた やすひこ)

京都大学再生医科学研究所生体組織工学研究部門生体材料学分野 教授
大阪大学大学院医学研究科未来医療開発専攻 教授 (併任)
京都大学工学博士 / 京都大学医学博士 / 京都大学薬学博士

1959年2月生まれ、大阪府出身。1981年京都大学工学部高分子化学科卒業。同年同大学医用高分子研究センター助手。1990年京大生体医療工学研究センター助手。1991～1992年米国マサチューセッツ工科大学、ハーバード大学医学部外科客員研究員。1996年京大生体医療工学研究センター助教授。2000年より現職。

東京工業大学、岩手医科大学、新潟大学大学院歯学研究科の非常勤講師。名古屋大学工学研究科、京都府立医科大学、京都大学医療技術短期大学部、京都大学大学院薬学研究科、岡山大学工学部の客員講師。

<賞>

1990年 日本バイオマテリアル学会科学奨励賞授賞。2001年 第5回心臓血管病学カンファレンス若手研究奨励賞、武田計測知財団研究奨励賞優秀研究賞、2002年 日本バイオマテリアル学会学会賞授賞、第1回日本再生医療学会総会優秀演題賞、第11回日本泌尿器科学会会長賞 (基礎研究部門最優秀演題)。

<学会役員>

日本 DDS 学会評議員、日本炎症再生学会評議員、日本創傷治癒学会評議員、日本組織工学会理事、硬組織再生生物学会理事、日本バイオマテリアル学会理事、世界 Tissue Engineering 学会理事。

Advanced Drug Delivery Reviews, Tissue Engineering, J. Biomaterial Science, Polymer Eds. 編集委員。

現在の研究目的は、基礎生物医学研究あるいは医療 (予防、診断、治療) に応用可能な方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体組織工学、DDS、幹細胞工学、生殖工学を目指した生体吸収性あるいは非吸収性の生体材料 (体内あるいは生体成分と接触して使用する材料) の開発研究を行っている。研究の性格上、国内外の医歯学、獣医学、薬学の大学、研究機関あるいは企業との共同研究が多く、知的財産権および産業化に関しても関心を持っている。基礎研究が重要であることは、もちろん言うまでもないことであるが、「研究成果を世の中に還元すること」も大切であると、常々考えている。移植医療、再建外科医療、再生医療、薬物治療など、現在の医療には多くの医薬用材料が用いられているにもかかわらず、これらの材料の研究者は極めて少ない。材料科学のバックグラウンドを持ち、医歯学、生物学、薬学に flexibility のある材料科学研究者を育て、本当に患者さんのためになる材料の研究開発を行って行きたいと思っている。抱負は生命科学のわかる材料科学研究者の育成。

専門分野：生体材料、生体吸収性材料、生体組織工学、ドラッグデリバリーシステム (DDS)、幹細胞工学

遺伝子医学 MOOK ①

再生医療への ブレイクスルー その革新技术と今後の方向性

定 価：5,250円 (本体 5,000円+税)

2004年11月10日 第1版第1刷発行

編 集 田畑泰彦

発行人 大上 均

発行所 株式会社 メディカル ドウ

〒550-0004 大阪市西区鞠本町1-6-6 大阪華東ビル

TEL. 06-6441-2231・FAX. 06-6441-3227

E-mail: home@medicaldo.co.jp

URL: http://www.medicaldo.co.jp

振替口座 00990-2-104175

印 刷 報栄印刷株式会社

©MEDICAL DO CO., LTD. 2004 Printed in Japan

・本書の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権 (送信可能化権を含む) は株式会社メディカルドウが保有します。

・JCLIS <(株)日本著作出版権管理システム委託出版物>

本書の無断複製は著作権法上での例外を除き禁じられています。複製される場合は、そのつど事前に、(株)日本著作出版権管理システム (電話 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199) の許諾を得てください。

ISBN4-944157-31-2

III. グレリン

特 論

グレリンのトランスレーショナルリサーチ —循環器疾患—

Ghrelin in the treatment of cardiovascular disease

永谷憲歳¹ 寒川賢治²

Key words : グレリン, 心不全, 心機能, 交感神経

はじめに

グレリン(ghrelin)は, 1999年, 児島, 寒川らにより発見された成長ホルモン(GH)分泌ペプチドである¹⁾. グレリンの受容体GHS-R(growth hormone secretagogue receptor, 成長ホルモン分泌促進因子受容体)²⁾は視床下部, 下垂体に多く発現しているが, 心房, 心室, 血管などにもその発現が確認され³⁾, グレリン独自の心血管作用の存在が示唆された. これまでに明らかとなったグレリンの心血管作用にはGH/IGF-1を介したもの(蛋白同化作用, 強心作用, 血管拡張作用)^{4,5)}とGHS-Rを介したグレリン独自の働き(血管拡張作用, 心血管のアポトーシス抑制, 交感神経抑制作用, エネルギー代謝改善作用)がある.

本稿では, グレリンの循環器領域におけるトランスレーショナルリサーチ, 特にグレリンによる難治性心不全治療の可能性について述べる.

1. 心不全の病態とグレリン

慢性心不全患者ではその末期において, 体重減少, 筋力低下を来す症例が少なからず存在する. このような状態は心悪液質(cardiac cachexia)と呼ばれ, その存在は心不全の独立した予

後規定因子であると考えられている⁶⁾. 心悪液質の原因としては, 血行動態の悪化のみでなく, 異化作用を有するTNF- α , アンジオテンシンII, ノルエピネフリンなどのサイトカイン, 神経体液性因子が関与している⁷⁾. 著者らはグレリンのエネルギー代謝改善作用に着目し, 心不全, 心悪液質の病態におけるグレリンの意義に関して検討した. 慢性心不全患者74人の血中グレリン濃度を測定し, 臨床データと比較検討した. 興味深いことに, 心悪液質を伴う心不全患者24人において, 血漿GH濃度とともにグレリン濃度が上昇していた(図1)⁸⁾. 血漿グレリン濃度は心不全の重症度の指標であるNYHA機能分類および左室駆出率とは相関しなかった. グレリンは蛋白同化作用を有するGHの分泌を刺激することや, GHを介さずに摂食促進⁹⁾, エネルギー代謝改善¹⁰⁾に働くことを考慮すると, 心悪液質の病態における代償機序として胃組織でのグレリン分泌が促進されたと考えられる. 以上よりグレリンは, 慢性心不全に伴う異化に傾いたエネルギー代謝の是正に重要な役割を担っている可能性がある.

2. グレリンの心血管作用

健常人や慢性心不全患者にグレリン(10 μ g/

¹Noritoshi Nagaya: Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 国立循環器病センター研究所再生医療部 ²Kenji Kangawa: Department of Biochemistry 同研究所生化学部

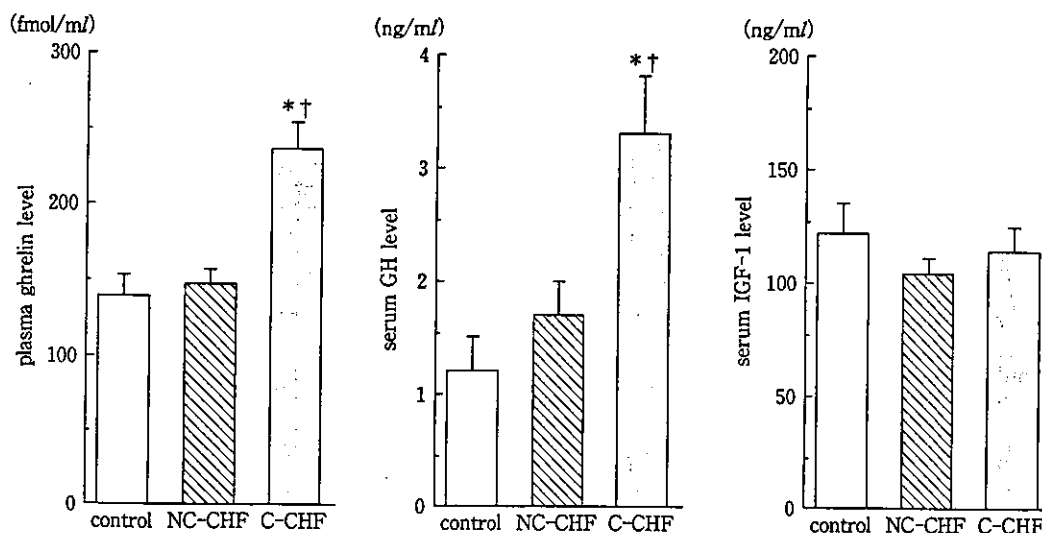


図1 心不全患者における心悪液質の有無による血中グレリン、成長ホルモン(GH)、インスリン様成長因子(IGF-1)濃度*

NC-CHF: 心悪液質を伴わない心不全患者, C-CHF: 心悪液質を伴った心不全患者.

* $p < 0.05$ vs control, † $p < 0.05$ vs NC-CHF.

kg)を静脈内投与すると、比較的長時間持続する降圧効果がみられる(図2)¹³⁾。GHS-Rは血管に多数存在すること、前腕動脈への局所投与ではGH/IGF-1を増加させずに血流を増加させること¹²⁾、GH欠損のdwarfラットへの静脈内投与においても血圧を低下させる¹³⁾などの結果から、グレリンによる血管拡張作用が示唆された。Wileyらは単離血管を用いた研究で、グレリンはエンドセリンによって収縮した血管を内皮非依存性に拡張させることを証明した¹⁴⁾。

興味深いことに、グレリンの静脈内投与によって著明に動脈圧が低下するにもかかわらず心拍数の増加は認められなかった(図2)¹³⁾。近年、Matsumuraらは、グレリンの脳室内投与の結果からグレリンは交感神経を有意に抑制することで血圧を調節していることを明らかにした¹⁵⁾。

グレリンは生体にとっては交感神経抑制の方向に働くにもかかわらず、グレリンの静脈内投与は心拍出量を有意に増加させた^{3,11)}。単離心筋細胞に対するグレリンの直接の心筋収縮作用はみられないことから¹³⁾、この心拍出量の増加はグレリンの血管拡張作用による心後負荷の軽減、GHによる強心作用が一部関与していると

考えられた。そのほか、グレリンは心筋細胞、血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することが報告された。そのメカニズムとしてERK1/2とPI3-kinase/Aktの活性化が関与する¹⁶⁾。これらの実験結果より、グレリンは心血管の保護に働くことが示唆された。

3. グレリンによる新たな心不全治療

GHはインスリン様成長因子I(insulin like growth factor I: IGF-1)を介して心筋収縮増大、血管拡張、心筋構築促進に働く^{4,5)}。実際、GHを冠動脈結紮後の心不全ラットに2週間皮下投与すると、心拍出量の増大、血管抵抗の低下、代償性左室肥大の促進による心筋壁応力の低下が得られる⁴⁾。したがって強力なGH分泌促進作用をもつグレリンが慢性心不全の治療薬として応用できる可能性がある。またグレリン独自の心血管作用、エネルギー代謝改善作用が、心機能不全や心悪液質の是正に有効である可能性がある。そこで著者らは、悪液質を伴った慢性心不全ラットにグレリン(100 μ g/kg)を1日2回、3週間の皮下投与を行い、心機能および心悪液質の改善効果を検討した¹³⁾。グレリン投与によ

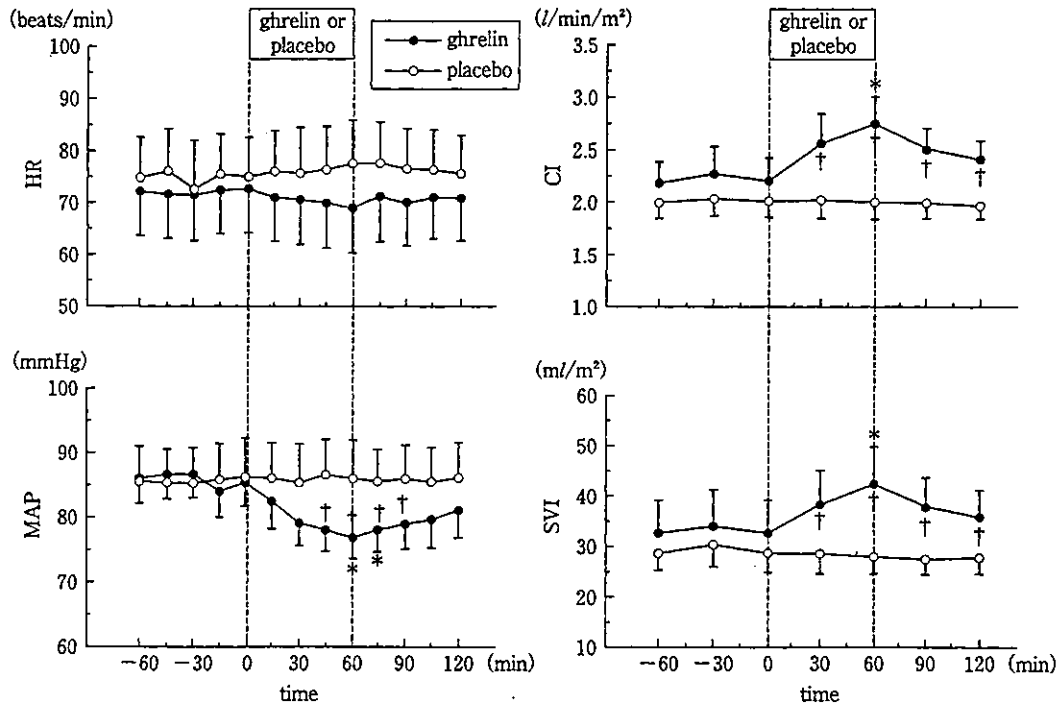


図2 心不全患者へグレリンを静脈内投与したときの心拍数(HR), 平均動脈圧(MAP), 心係数(CI), 一回駆出量係数(SVI)の変化¹¹⁾

* $p < 0.05$ vs time 0, † $p < 0.05$ vs placebo.

り血中GH, IGF-1濃度は上昇し, 心拍出量および心筋収縮性の指標であるMax dp/dtは増加した(図3)。またグレリン投与群では, これまでに報告されたGH補充療法と同様に非梗塞部の代償性心肥大が促進された。グレリンはGH/IGF-1分泌促進を介して蛋白同化作用を発揮し, 心筋構築を促進させ壁応力を軽減させることで心機能改善に働いた可能性がある。またグレリン投与により上昇したGH/IGF-1が心筋収縮を増強させた可能性がある。グレリン慢性投与により末梢血管抵抗の有意な低下が認められたことから, 心拍出量の増加は血管拡張作用による心後負荷の軽減が一部関与していると考えられる。また慢性心不全ラットにグレリンを投与すると, 体重および骨格筋量の有意な増加が観察された(図3)。GHを介した蛋白同化作用以外に, 摂食促進, 末梢での脂肪蓄積作用が心悪液質の是正に関与した可能性がある。

グレリンのトランスレーショナルリサーチを

推し進めるべく, これらの動物実験をもとに心不全患者へのグレリン投与の臨床試験を開始した。グレリン(0.10 μ g/kg/min)を経静脈的に1時間投与すると, 血中GH濃度の上昇(基礎値の16倍)以外に, 平均動脈圧の低下(-9 mmHg), 心拍出量の増加(+25%)が認められた(図2)¹¹⁾。更に慢性心不全患者を対象にグレリンの長期投与(1日2回, 3週間)を行った。明らかな副作用は出現せず, 代償性心肥大を促し(心筋構築の改善), 心機能を改善させた。またグレリン投与によって骨格筋量が増加した。これらの効果にはグレリンによるGH分泌促進作用が関与していると考えられた。興味深いことに, 繰り返しのグレリン投与は血中ノルアドレナリンを全例で有意に低下させた。交感神経の抑制は慢性心不全患者の心機能改善・生命予後改善に働くと考えられているため, グレリンは交感神経抑制作用を介して心機能改善に働いた可能性がある。またグレリン投与により運動耐

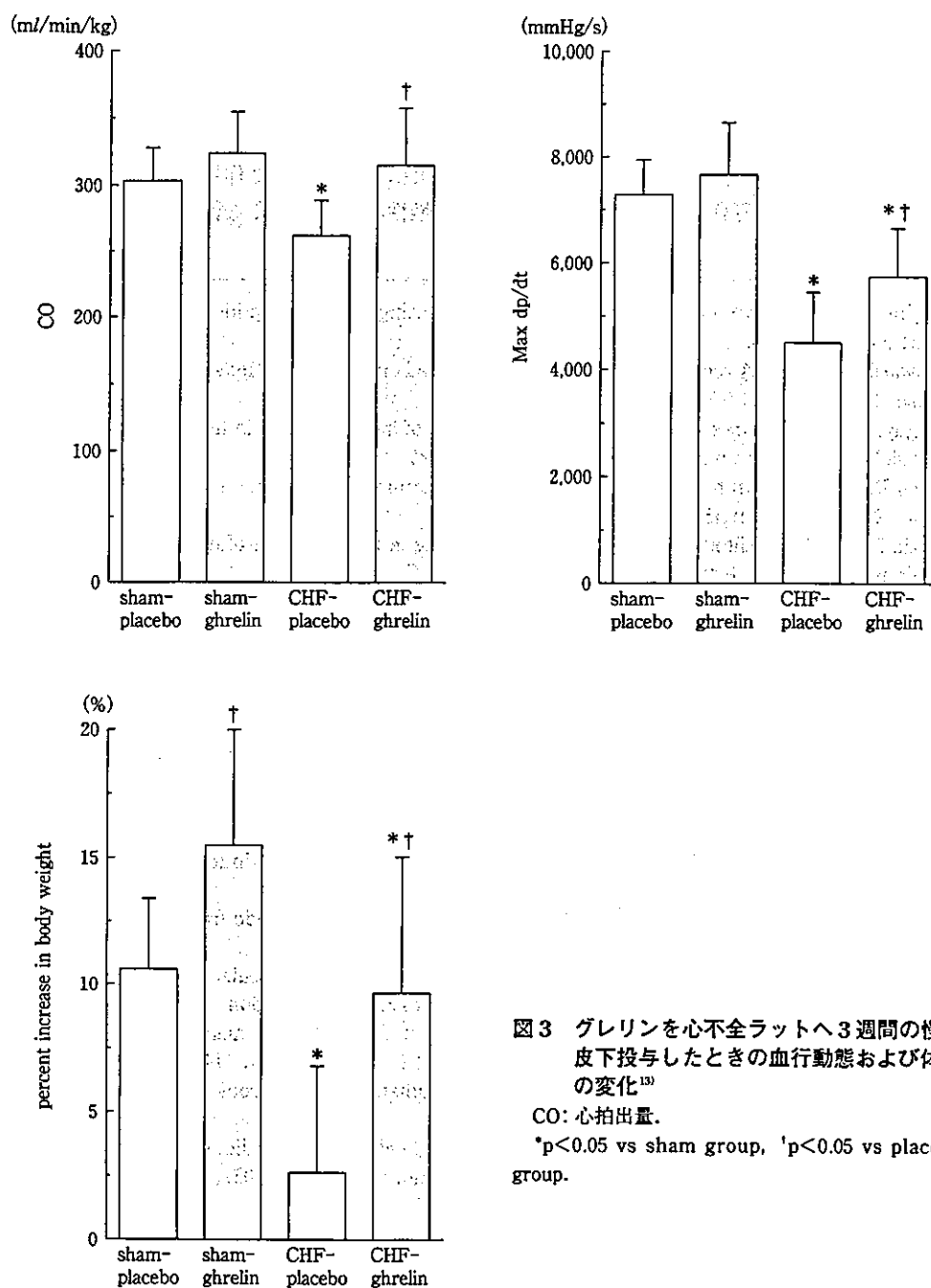


図3 グレリンを心不全ラットへ3週間の慢性皮下投与したときの血行動態および体重の変化¹⁹⁾

CO: 心拍出量.

*p<0.05 vs sham group, †p<0.05 vs placebo group.

容能は有意に改善させた。心機能の改善と下肢骨格筋量の増加が一部関与していると考えられた。これまでの動物実験と同様に、グレリンは食欲を増進させ、摂食量を増加させた。これらの効果はGHによる蛋白同化促進作用とともに

エネルギー代謝改善に働く可能性がある。このパイロット研究よりグレリンの繰り返し投与は慢性心不全患者の心機能、運動耐容能、エネルギー代謝を改善させる可能性が示唆された。今後は慢性心不全を対象にグレリン投与の無作為

化二重盲検試験を行い、グレリンの安全性と有効性を検証していく予定である。

おわりに

グレリンは強力な GH 分泌作用を介して、またグレリン独自の心血管作用、交感神経抑制作

用、摂食促進作用、エネルギー代謝改善作用を介して、心不全患者の心機能改善、およびそれに伴う低栄養状態の是正に重要な役割を担っている。グレリンは従来から存在する心不全治療薬とは全く異なった作用を有することから、重症慢性心不全の新たな治療薬として期待される。

■文 献

- 1) Kojima M, et al: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660, 1999.
- 2) Howard AD, et al: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273: 974-977, 1996.
- 3) Nagaya N, et al: Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1483-R1487, 2001.
- 4) Yang R, et al: Growth hormone improves cardiac performance in experimental heart failure. *Circulation* 92: 262-267, 1995.
- 5) Fazio S, et al: A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 334: 809-814, 1996.
- 6) Anker SD, et al: Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 349: 1050-1053, 1997.
- 7) Anker SD, et al: Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance in cardiac cachexia. *Circulation* 96: 526-534, 1997.
- 8) Nagaya N, et al: Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 104: 2034-2038, 2001.
- 9) Nakazato M, et al: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198, 2001.
- 10) Tschop M, et al: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-913, 2000.
- 11) Nagaya N, et al: Hemodynamic, renal and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5854-5859, 2001.
- 12) Okumura H, et al: Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol* 39: 779-783, 2002.
- 13) Nagaya N, et al: Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 104: 1430-1435, 2001.
- 14) Wiley KE, Davenport AP: Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 136: 1146-1152, 2002.
- 15) Matsumura K, et al: Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. *Hypertension* 40: 694-699, 2002.
- 16) Baldanzi G, et al: Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159: 1029-1037, 2002.

III. グレリン

病態と疾患からみたグレリン

循環器疾患

Ghrelin and cardiovascular disease

清水嘉人 永谷憲歳

Key words : 悪液質, 心機能障害, 内皮機能障害

はじめに

グレリン(ghrelin)は、児島、寒川らにより発見された強力な成長ホルモン(GH)分泌ペプチドであり¹⁾、視床下部から分泌されるGH放出ホルモンとともに脳下垂体のGH分泌調節をしている。グレリンはG蛋白共役型のオーファン受容体GHS-R(growth hormone secretagogue receptor, 成長ホルモン分泌促進因子受容体)²⁾の内因性リガンドとして胃組織から単離された。グレリンはGHの強力な分泌活性を有するが、GHを介さない独自の作用として、摂食亢進作用や体重増加作用をもち、エネルギー代謝の調節に関与することが明らかとなった³⁾。グレリンの受容体であるGHS-RのmRNAは視床下部、下垂体に多く発現しているが、心房、心室、血管などにもその発現が確認された⁴⁾ことからグレリンの循環器系への関与が示唆された。循環器疾患、特に重症慢性心不全患者においては、心機能障害をはじめ悪液質や内皮機能障害などがその病態としてしばしば認められる。

本稿では、これらの病態におけるグレリンの病態生理学的意義に関して概説する。

1. 心不全患者に伴う悪液質におけるグレリンの意義

様々な疾患の末期では、体重減少、筋力低下を来す症例が存在する。このような病態は悪液質(cachexia)といわれ、エネルギーバランスの不調和により異化の亢進した状態となっている。特に、末期の慢性心不全患者では、cardiac cachexiaと呼ばれる心機能低下に伴う悪液質のため負のエネルギーバランスを呈しており、その存在は心不全の独立した予後規定因子と考えられている⁵⁾。cardiac cachexiaの原因として、血行動態の悪化のみならず、異化作用を有するTNF- α 、アンジオテンシン、ノルエピネフリンなどのサイトカインまたは神経体液性因子が関与している。cardiac cachexiaを伴う慢性心不全患者では、血漿グレリン濃度の上昇が認められた(図1)⁶⁾。血漿グレリン濃度は心不全の重症度の指標であるNYHA機能分類および左室駆出率とは相関しなかったが、体格指数(BMI)と負の相関を示し、更に血中TNF- α 値と正の相関を示したことより血漿グレリン濃度とcardiac cachexiaの関連が示唆された。そのほか、例えば肺癌⁷⁾や神経性食思不振症⁸⁾など循環器疾患以外の悪液質を有する疾患においても血漿グレリン濃度の上昇が認められた。

Yoshito Shimizu, Noritoshi Nagaya: Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 国立循環器病センター研究所再生医療部

0047-1852/04/¥50/頁/JCLS

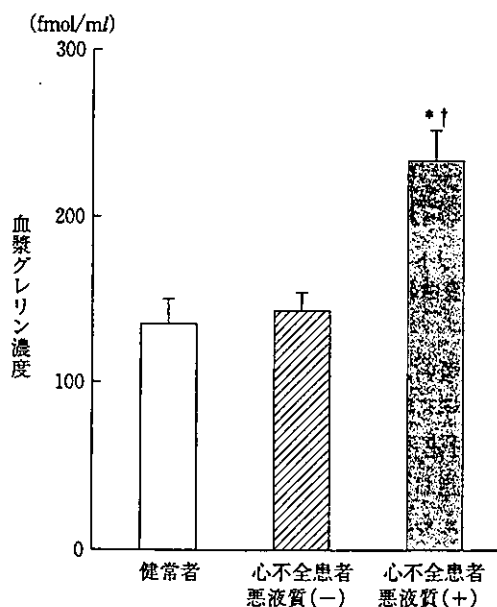


図1 心不全患者における悪液質の有無による血漿グレリン濃度⁹⁾

* $p < 0.05$ vs 健常者, † $p < 0.05$ vs 悪液質を伴わない心不全患者。

悪液質における血漿グレリン濃度の上昇は、グレリンの有するエネルギー代謝調節作用を考慮すると、負のエネルギーバランスに対する代償的機序によるものと考えられる。すなわち、悪液質における異化亢進時に、胃から分泌されたグレリンは消化管内ではなく血管内に分泌され、増加した血中のグレリンがホルモンとして循環することにより摂食亢進が起こり、更には同化/異化のエネルギーバランスの不調和を改善すると考えられる。またグレリンはGHの分泌促進を介した蛋白同化作用や、更にグレリン独自の作用としての末梢での脂肪蓄積作用も併せ持っており⁹⁾、これらの作用も悪液質の是正に関与していると思われる。

2. 心機能障害に対するグレリンの意義

グレリンはエネルギー代謝調節作用のほかに、循環動態における生理的作用として、GHおよびその mediator である insulin-like growth factor-1 (IGF-1) を介した蛋白同化作用による代償性心肥大の促進や血管拡張作用があり、また

GHを介さないグレリン独自の作用としての血管拡張作用¹⁰⁾や交感神経抑制作用¹¹⁾を有する。GHS-Rは心臓や血管にも発現がみられていることから、グレリンはGHS-Rを介して循環動態の調節にかかわっている可能性がある。特に心機能低下時には、前述の悪液質の際と同様に、グレリンが代償的機序により循環動態の維持に関与する可能性があり、今後のメカニズムの解明が待たれる。またグレリンには細胞内シグナル伝達の刺激、特にERK(extracellular signal-regulated kinase)-1/2およびPI(phosphatidylinositol)3-kinase/Aktの活性化を介して内皮細胞や心筋細胞のアポトーシスを抑制する効果がある¹²⁾ことが報告されており、グレリンの心保護作用が心機能低下予防、更には心不全の進展の抑制に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

3. 内皮機能障害に対するグレリンの意義

慢性心不全の病態の一つとして血管内皮機能の低下があげられる。内皮機能障害は動脈硬化の初期段階でもあり、心血管障害の発症に影響する。GHはIGF-1を介して内皮機能を改善することが知られている¹³⁾。またGHS-Rに対する外因性リガンドである合成GH分泌促進物質 hexarelin もまた、内皮機能障害を改善することが報告されている¹⁴⁾。動脈硬化を呈したヒトの血管ではGHS-Rが高発現されていることが報告されており¹⁵⁾、このことからGHS-Rの内因性リガンドであるグレリンが、内皮機能障害更には動脈硬化の進展予防に関与している可能性が考えられる。グレリンをGH欠損ラットに投与すると、アセチルコリン負荷に対する単離大動脈の弛緩の改善がみられ、グレリンはGHを介さない独自の作用として血管内皮機能改善効果を有することが示唆された¹⁶⁾。更にグレリンを投与されたラット大動脈では内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)蛋白の高発現がみられており(図2)¹⁵⁾、グレリンの内皮機能改善効果はeNOS/NO経路の改善によるものと考えられた。内皮由来のNOは抗動脈硬化作用を有することから、グレリンはGHS-Rを介して内皮