

Fig. 1. Block diagram of the low photon energy plasma flash x-ray generator.

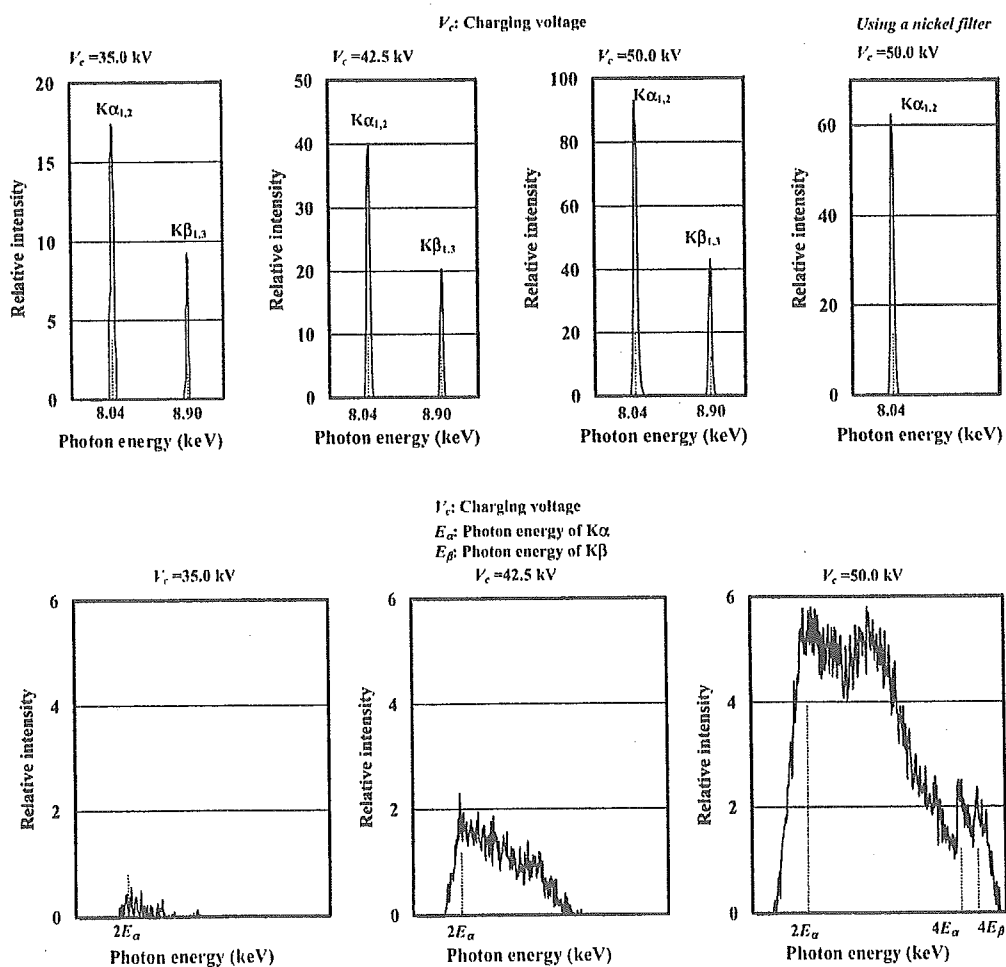


Fig. 2. X-ray spectra from weakly ionized linear plasma at the indicated conditions.

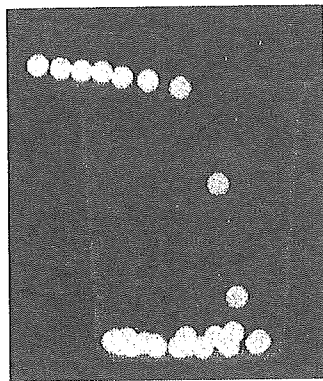



Fig. 3. Radiogram of plastic bullets falling into polypropylene beaker from a plastic test tube.

40 mm


3. 制動X線の角度分布を用いた単色フラッシュX線装置

この単色フラッシュX線装置^{21,22)}は高光子エネルギーのクリーンな特性X線を発生させるために試作した。制動線は電子軌道と反対方向には出力し難い性質を利用した場合には、比較的容易に準単色あるいは単色のX線を得ることができる。この装置は高電圧パルス発生装置、ターボ分子ポンプ、X線管などからなる。パルス発生装置では2段マルクス回路を採用し、充電電圧の約2倍の高電圧パルスが出力する。X線管にはグラファイト製の円盤状陰極と棒状のモリブデンターゲットが付いており、陰極表面からの電子ビームがターゲット先端に衝突し、X線は陰極とマイラーX線窓を透過して出力する (Fig. 4)。管体はアクリル製で、1 mPa 程度に連続排気される。スペクトルは前述の結晶分光器を用いて測定した。厚さ 20 μm のジルコニウムフィルターを用いた場合には K β 線が吸収されるので、クリーンな単色の K α 線を得ることができた (Fig. 5)。フラッシュX線装置の管電圧と電流は減衰振動となり、それぞれの最大値は充電電圧が70 kV の条件下で 120 kV と 1.0 kA であった。また熱蛍光線量計で測定した最大X線強度は線源から 0.5 m の位置で 1パルス当たり 70 μGy であった。

Fig. 6 はガラス製試験管から流れ出る水で、撮影距離と充電電圧はそれぞれ 0.5 m と70 kV であった。X線パルスの幅は約 70 ns であるため、水の完全静止画像を撮影できた。

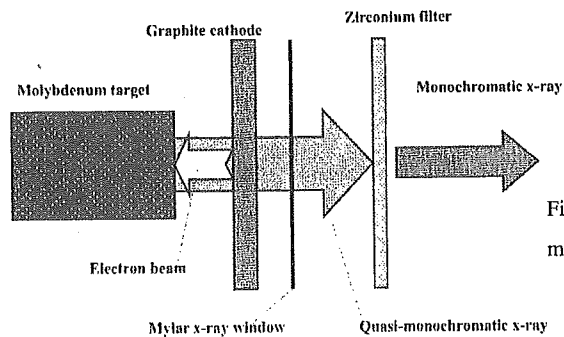


Fig. 4. K-photon irradiation using a monochromatic flash x-ray tube.

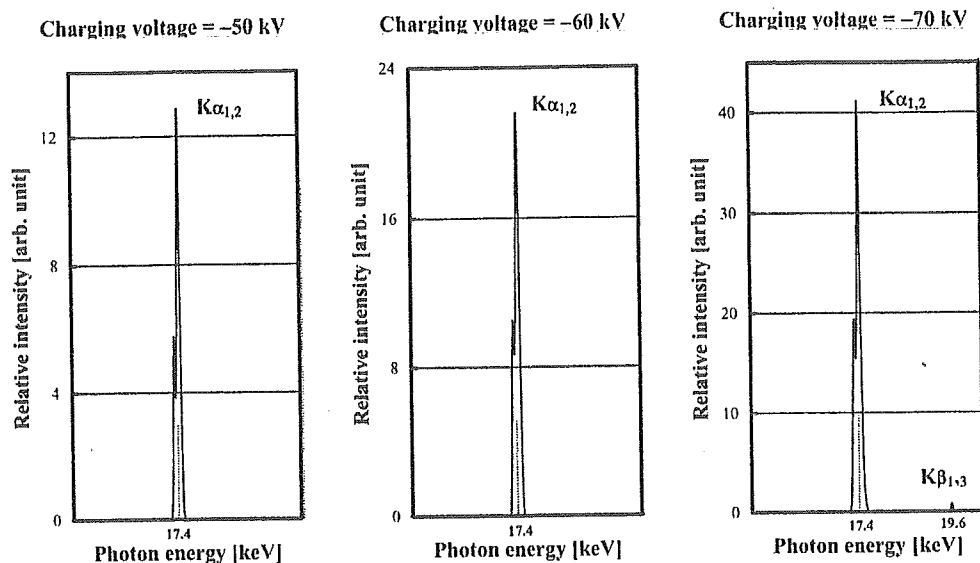


Fig. 5. X-ray spectra from a molybdenum target.

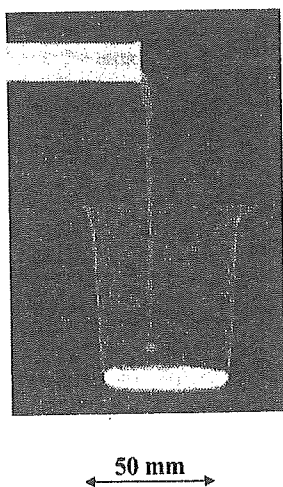


Fig. 6. Radiogram of water falling into polypropylene beaker from a glass test tube.

4. 高光子エネルギープラズマX線装置

高光子エネルギーのクリーンなK系列特性X線とそれらの高調波を発生させるため、高光子エネルギーのプラズマX線装置²⁹⁾を製作した。このフラッシュX線装置は高電圧充電器、コンデンサーユニット、ギャップスイッチ、ターボ分子ポンプ、そしてフラッシュX線管等よりなる。150 nFのコンデンサーを80 kV程度に充電し、蓄積された電荷をギャップスイッチを閉じることによりX線管内に放電し、フラッシュX線を得る。管はターボ分子ポンプにより1 mPa程度に連続排気される。

Fig. 7はK系列特性X線発生原理図で、直径3.0 mmの棒状タンタルターゲットと内径4.5 mmのリング状グラファイト陰極が取り付けられている。陰極からの電子ビームはターゲット先端にほぼ垂直

に衝突するので、プラズマが形成され、図のようにK系列特性（準単色）X線が発生する。

ほぼ製品に近いプロトタイプゆえ、管電圧と電流の最大値を測定することは難しいが、充電電圧が80 kVの場合の最大値はそれぞれ160 kVと40 kA程度である。2極管を用いているので、X線照射時間は短く、約100 ns程度であった。次にフラッシュX線装置の線量率は極めて高いことから、半導体検出器を用いてスペクトルを測定することはできない。モリブデンターゲットから出力するX線スペクトルも結晶分光器を用いて測定したが、特性X線強度は充電電圧を高めることにより著しく増加した。しかし、20 μm 厚のジルコニウムフィルターを用いてK β 線を吸収することは難しく、高調波も発生しなかった。一方、タンタルターゲットでも、ほぼクリーンなK系列特性X線を得ることができた (Fig. 8)。また熱蛍光線量計で測定した最大X線強度は線源から1.0 mの位置で1パルス当たり約300 μGy であった。

Fig. 9はガドリニウムの質量吸収係数とタンタルK α 線の平均光子エネルギーの関係を示している。ガドリニウム造影剤はMRAで使用されるが、図のようにタンタルK α 線はガドリニウムに効率よく吸収される。実験結果から、重量百分率で15%程度の造影剤を用いれば、十分に高コントラストで撮影できる。酸化ガドリニウムを用いて造影したウサギ頭部をFig. 10に示す。図のように100 μm 程度の微小血管が観察できた。

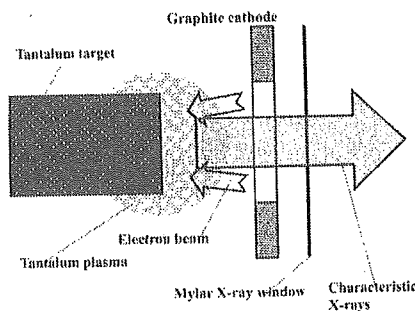


Fig. 7. K-photon irradiation from weakly ionized tantalum plasma.

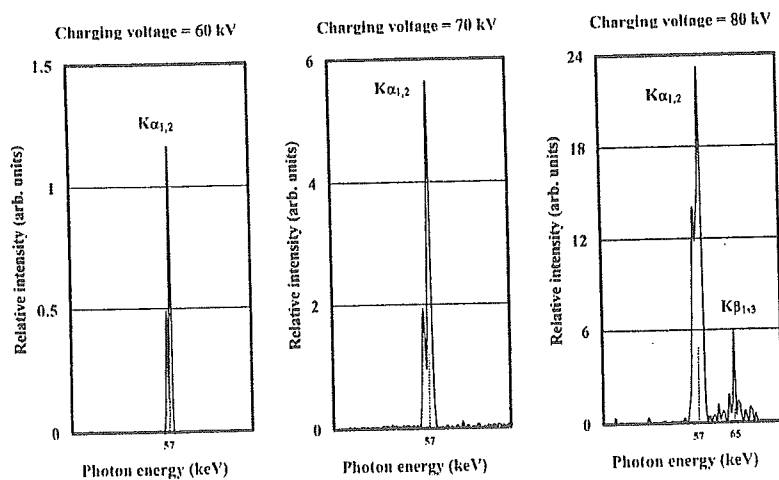


Fig. 8. X-ray spectra from a tantalum target.

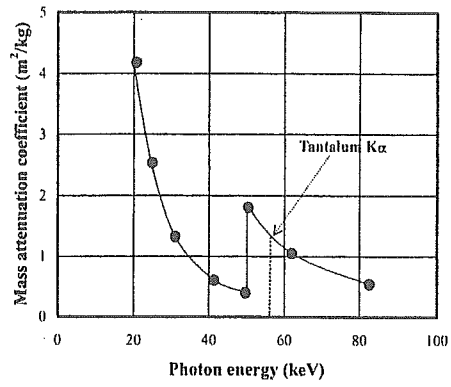


Fig. 9. Mass attenuation coefficient of gadolinium and the average photon energy of tantalum

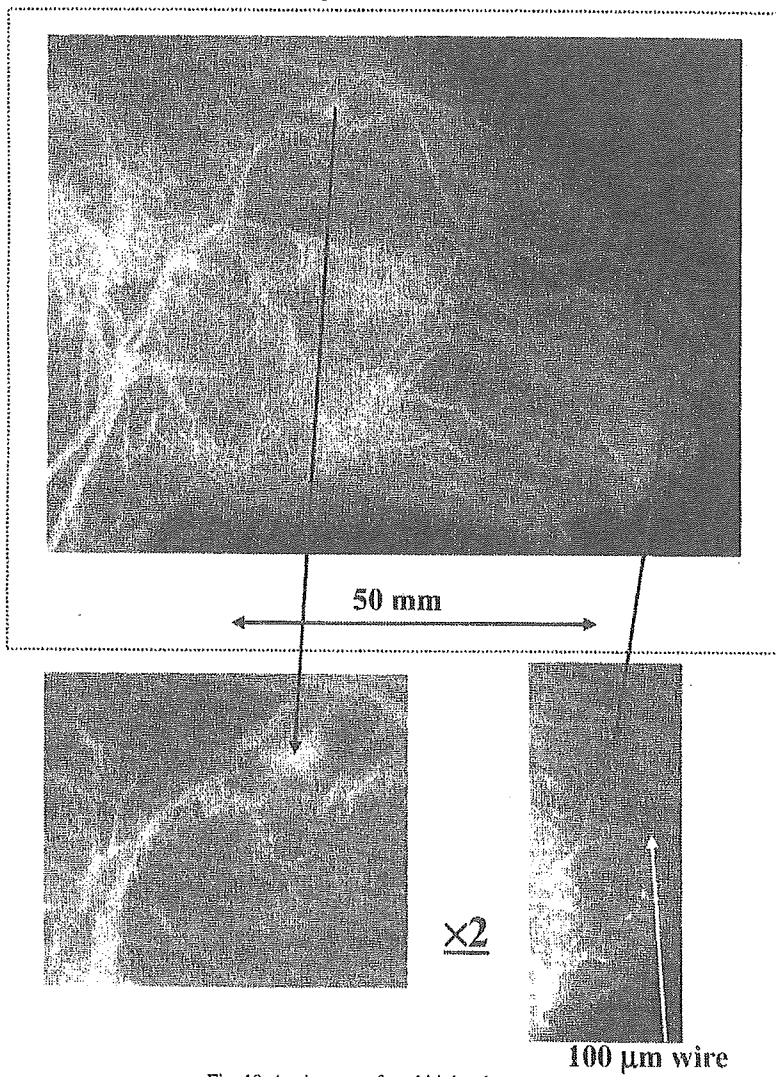


Fig. 10. Angiogram of a rabbit head

5. 制動X線の角度分布を用いた単色X線装置

定常的でクリーンなK系列特性X線を発生させるために、熱陰極（フィラメント）付きのX線管と制動X線の角度分布を用いた単色X線装置を製作した。この装置は高電圧電源、ターボ分子ポンプ、開放型のX線管等よりなる。管はターボ分子ポンプにより 0.5 mPa 程度に連続排気される。X線管の陽極には正の高電圧が印加され、陰極は接地されている。Fig. 11 はX線管の構造図で、フィラメントからの電子流は収束電極でターゲット先端に集められる。この実験では棒状ターゲットを使用した。管にはモリブデンターゲットを取付けたので、単色化のためのKエッジフィルターは 20 μm 厚のジルコニウムである。管電圧が 30 kV、管電流が 0.10 mA の条件におけるX線強度は、線源から 1.0 m の位置で 12.1 $\mu\text{Gy/s}$ で、クリーンな $\text{K}\alpha$ 線が観測できた (Fig. 12)。Fig. 13 はウサギの大腿で、直径 15 μm のヨウ素マイクロスフェアを使って造影した。マイクロスフェアは生体の造影ファントムを製作するのに有用である。フラッシュX線管と比較して、このX線管では高光子エネルギーのクリーンなK系列特性X線を得ることは難しい。

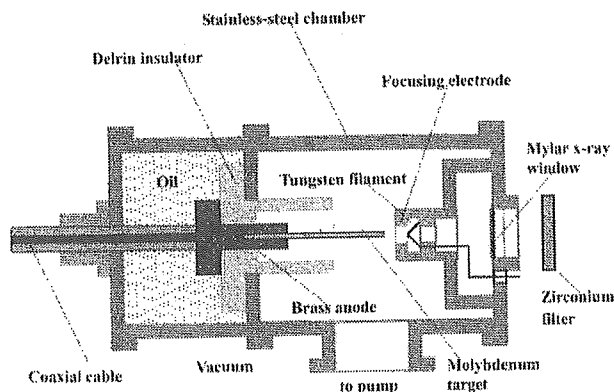


Fig. 11. Schematic drawing of the monochromatic x-ray tube.

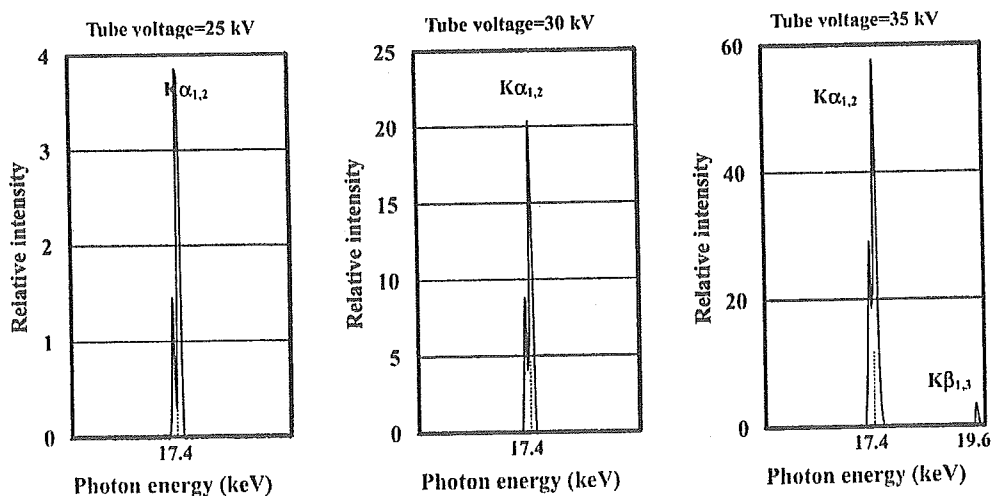


Fig. 12. X-ray spectra from the molybdenum target.

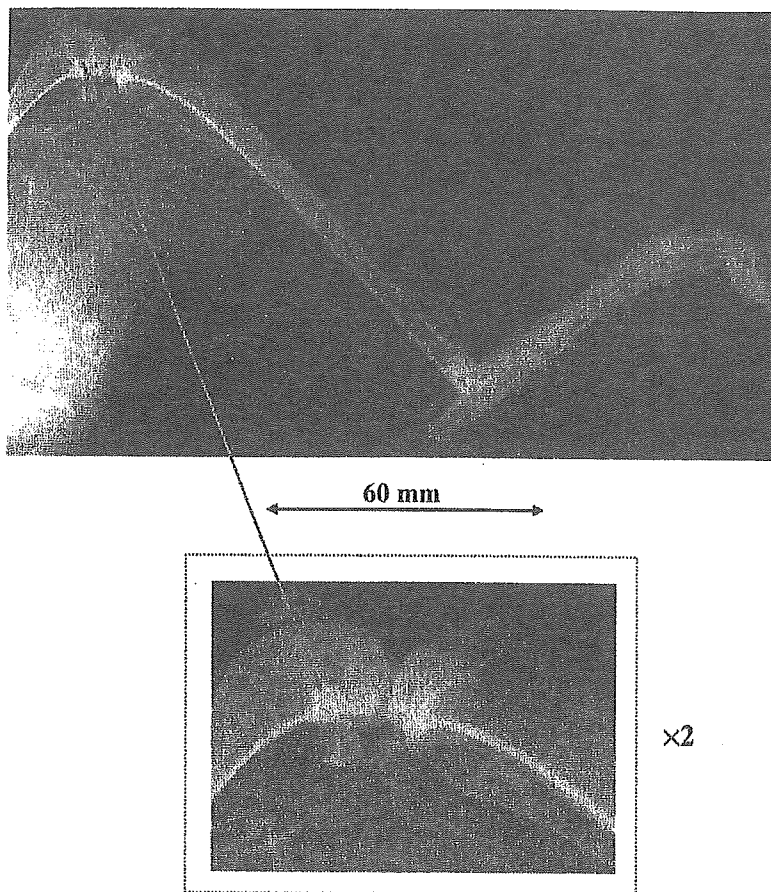


Fig. 13. Angiogram of a rabbit thigh.

6. セリウムX線装置とヨウ素Kエッジ造影

コーンビームを用いてシンクロトロンと同等のヨウ素Kエッジ造影効果を得るため、 $K\alpha$ 線の平均光子エネルギーが 34.6 keV のセリウムX線管^{24,25)}を製作し、高電圧電源と接続してポータブルX線装置を製作した。装置はメインコントローラーとコッククロフト・ウォルトン回路を組み込んだX線管ユニットからなる。メインコントローラーでは管電圧、管電流、そしてX線照射時間を調整できるが、コントローラーに接続したパソコンを用いても遠隔から制御できる。X線管の陽極は接地され、陰極に負の高電圧が印加される。X線管の焦点径は約 1 mm で、フィルター無し、そして硫酸バリウムフィルターを付けた場合のX線強度は、線源から 1.0 m の位置で、それぞれ 209 および 16.8 $\mu\text{Gy/s}$ であった。このとき、管電圧と電流は、それぞれ 60 kV と 0.5 mA であった。

Fig. 14 はセリウムX線管からのX線スペクトルで、管電圧が 60 kV のものである。図のようにシャープなK線が得られ、硫酸バリウムフィルターの挿入によって $K\beta$ 線強度は著しく減弱した。ヨウ素マイクロスフェアを用いた犬の心臓の造影では、厚さ 100 mm の水ファントムを用いた場合にも、血管のコントラストはほとんど変化しなかった (Fig. 15)。

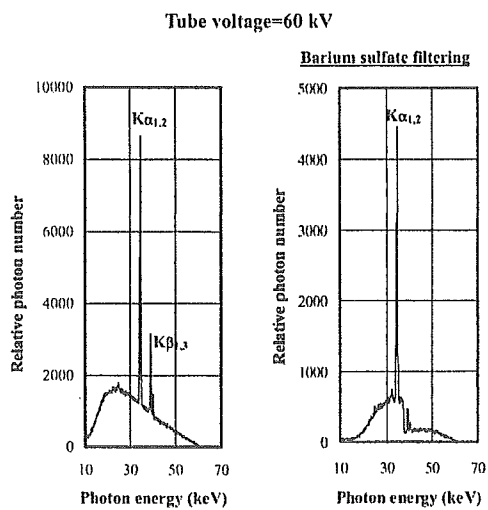


Fig. 14. X-ray spectra from a cerium target.

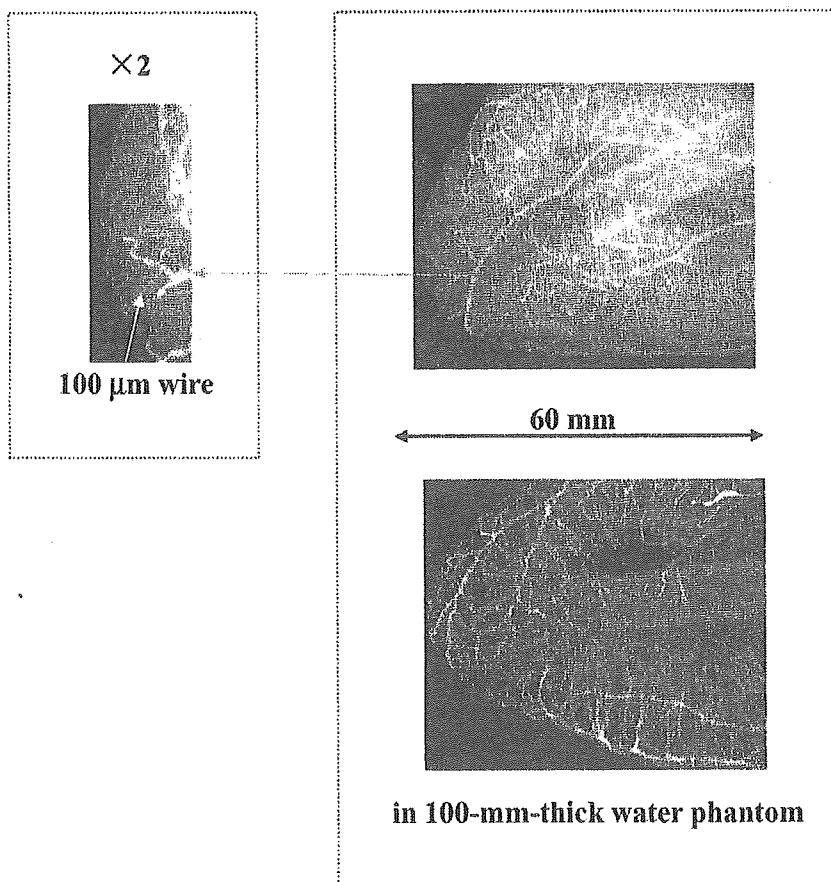


Fig. 15. Angiograms of a dog heart.

7. 制動X線の疑似単色化とデジタル拡大撮影

ターゲット材の融点等の問題から、セリウムを用いて微小焦点X線管を製作することは難しい。ここでは 100 μm タングステン管付きポータブルX線装置から発生する制動X線を疑似単色化し、ヨウ素造影に適したスペクトルにした後、3倍拡大撮影による造影を試みた。撮影には厚さ 3.0 mm のアルミニウムフィルターを用い、管電圧と撮影距離 (X線源とイメージングプレート間) はそれぞれ 60 kV と 1.5 m であった。また管電圧と電流がそれぞれ 60 kV と 0.5 mA のとき、X線強度は線源から 1.0 m の位置で 26.0 $\mu\text{Gy/s}$ であった。

撮影に使用した CR のサンプリングピッチは 87.5 μm であるが、8 LP (62.5 μm) の線が認識できた (Fig. 16)。また犬の心臓の造影でも 100 μm 程度の血管が観察でき、線源側に厚さ 100 mm のアクリル板を用いた場合でも画像のコントラストはそれほど変化しなかった (Fig. 17)。

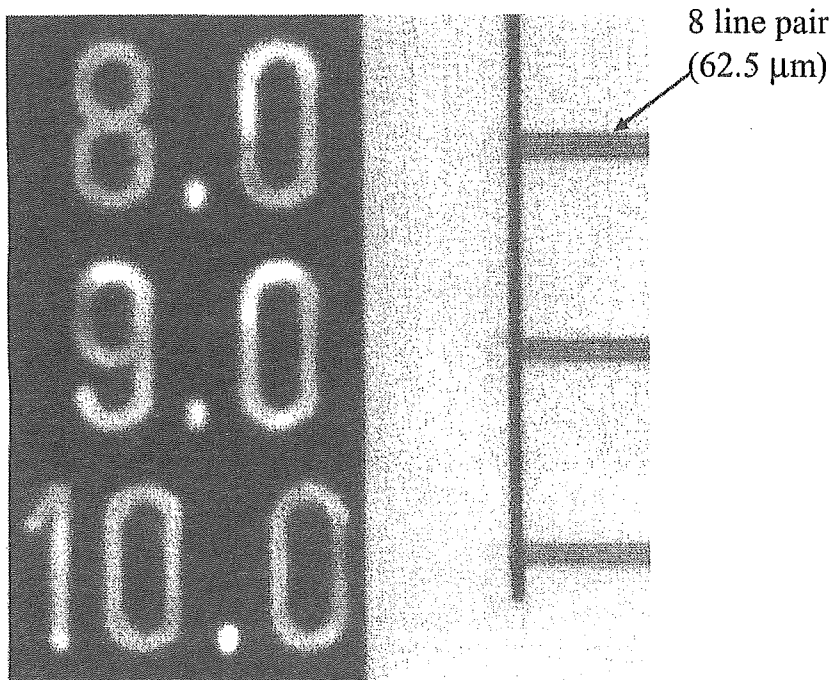


Fig. 16. Magnification radiogram of a test chart.

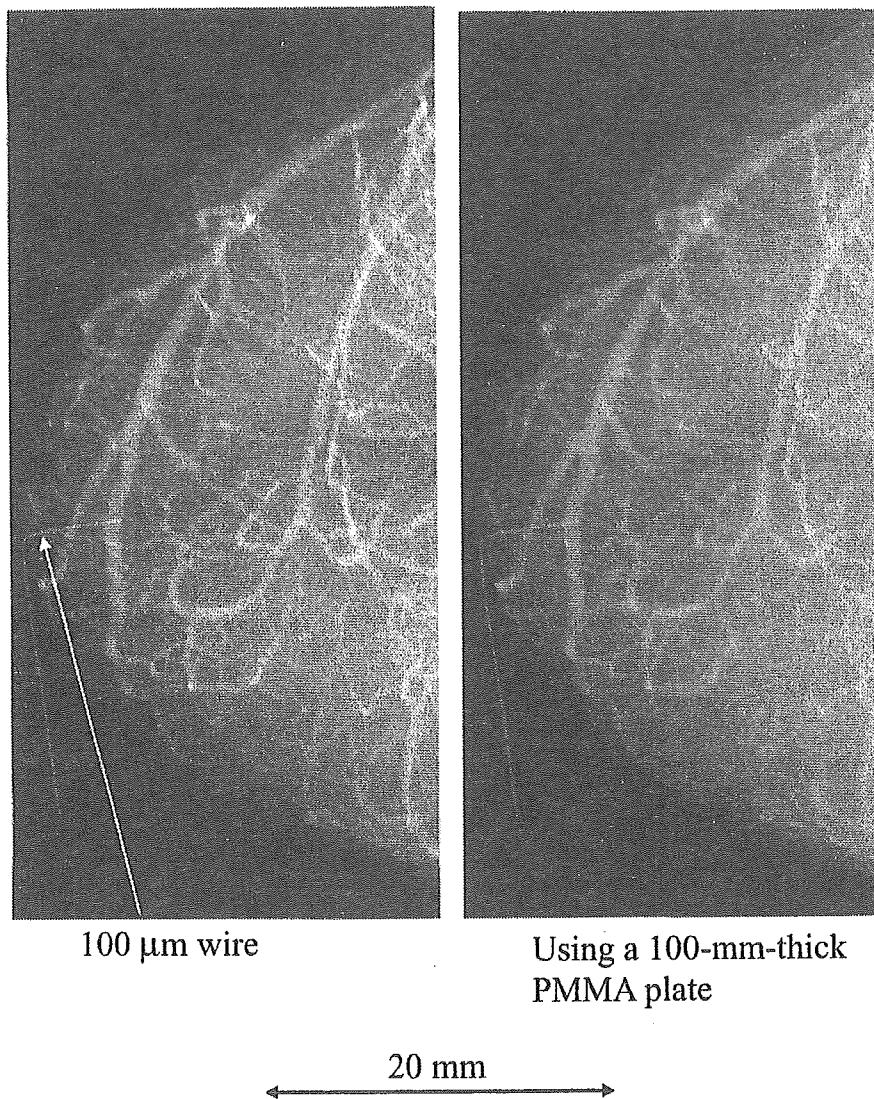


Fig. 17. Magnification angiograms of a dog heart.

7. おわりに

低フォトンエネルギープラズマX線装置では充電電圧の増加により、高調波が観測された。これらの高調波は制動X線のプラズマ内での吸収により発生したと思われる。要するに、K系列特性X線の整数倍のフォトンエネルギーに相当する制動線がプラズマを透過し易いと想像される。次にモリブデン管付き高フォトンエネルギープラズマX線装置ではジルコニウムフィルターにより K β 線が吸収され難く、この現象は K β 線の線吸収係数が低下したためと思われる。

セリウムX線装置から発生するK系列特性X線はシャープで、前述のように硫酸バリウムのフィル

ターを用いた場合には $K\alpha$ 線を有効に用いることができる。しかし $K\beta$ 線も効率よく吸収されることから、酸化セリウムのフィルターも有用であると思われる。現在、回転陽極管を製作するための基礎実験を行っており、高線量率セリウム管も実現するかもしれない。

血管のコントラストは若干劣るが、アルミニウムフィルター等を使って発生する疑似単色制動X線も有効であった。さらに被曝線量を考慮する必要があるが、拡大撮影による空間分解能の向上、散乱線の低減、そして位相コントラスト効果の付加は、これからのデジタル撮影には必須であると思われる。100 W級の10 μm フォーカス回転陽極管が実用化され、加えてkW級の100 μm フォーカス管は製作可能であることから、特に高精細撮影を行う場合には小焦点管をお勧めする。

謝辞

本研究は文部科学省、厚生労働省、私学振興財団、JST、NEDO、そして岩手県からの研究助成金により遂行されている。

文献

1. J.J. Rocca, V. Shlyaptsev, F.G. Tomasel, O.D. Cortazar, D. Hartshorn and J.L.A. Chilla, "Demonstration of a discharge pumped table-top soft x-ray laser," *Phys. Rev. Lett.*, **73**, 2192-2195, 1994.
2. K. Yoshiaki, A. Nagashima, K. Nagashima, M. Kado, T. Kawachi, N. Hasegawa, M. Tanaka, A. Sasaki and K. Moribayashi, "X-ray lasers driven by optical lasers," *AIP Conference Proc.*, **506**, 613-620, 1999.
3. J.J.G. Rocca, J.L.A. Chilla, S. Sakadzic, A. Rahman, J. Filevich, E. Jankowska, E.C. Hammarsten, B.M. Luther, H.C. Kapteyn, M. Murnane and V.N. Shlyapsev, "Advances in capillary discharge soft x-ray laser research," *SPIE*, **4505**, 1-6, 2001.
4. S. Le Pape, Ph. Zeitoun, J.J.G. Rocca, A. Carillon, P. Dhez, M. Francois, S. Hubert, M. Idir and D. Ros, "Characterisation of an x-ray laser beam," *SPIE*, **4505**, 23-34, 2001.
5. C. Gerth, "Free-electron laser at the TESLA test facility at DESY: toward a tunable short-pulsed soft x-ray source," *SPIE*, **4505**, 131-145, 2001.
6. A. C. Thompson, H. D. Zeman, G. S. Brown, J. Morrison, P. Reiser, V. Padmanabahn, L. Ong, S. Green, J. Giacomini, H. Gordon and E. Rubenstein, "First operation of the medical research facility at the NSLS for coronary angiography," *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 625-628, 1992.
7. H. Mori, K. Hyodo, E. Tanaka, M. U. Mohammed, A. Yamakawa, Y. Shinozaki, H. Nakazawa, Y. Tanaka, T. Sekka, Y. Iwata, S. Honda, K. Umetani, H. Ueki, T. Yokoyama, K. Tanioka, M. Kubota, H. Hosaka, N. Ishizawa and M. Ando, "Small-vessel radiography in situ with monochromatic synchrotron radiation," *Radiology*, **201**, 173-177, 1996.
8. K. Hyodo, M. Ando, Y. Oku, S. Yamamoto, T. Takeda, Y. Itai, S. Ohtsuka, Y. Sugishita and J. Tada, "Development of a two-dimensional imaging system for clinical applications of intravenous coronary angiography using intense synchrotron radiation produced by a multipole wiggler," *J. Synchrotron Radiat.*, **5**, 1123-1126, 1998.
9. T. J. Davis, D. Gao, T. E. Gureyev, A. W. Stevenson and S. W. Wilkins, "Phase-contrast imaging of weakly absorbing materials using hard x-rays," *Nature*, **373**, 595-597, 1995.
10. A. Momose, T. Takeda, Y. Itai and K. Hirano, "Phase-contrast x-ray computed tomography for observing

biological soft tissues," *Nature Medicine*, **2**, 473-475, 1996.

11. M. Ando, A. Maksimenko, H. Sugiyama, W. Pattanasiriwisawa, K. Hyodo and C. Uyama, "A simple x-ray dark- and bright- field imaging using achromatic Laue optics," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, L1016-L1018, 2002.
12. S. W. Wilkins, T. E. Gureyev, D. Gao, A. Pogany and A. W. Stevenson, "Phase-contrast imaging using polychromatic hard x-rays," *Nature*, **384**, 335-338, 1996.
13. A. Ishisaka, H. Ohara and C. Honda, "A new method of analyzing edge effect in phase contrast imaging with incoherent x-rays," *Opt. Rev.*, **7**, 566-572, 2000.
14. H. Ohara, C. Honda, A. Ishisaka and F. Shimoda, "Image quality in digital phase contrast imaging using a tungsten anode x-ray tube with a small focal spot size," *SPIE*, **4682**, 1-11, 2002.
15. E. Sato, K. Sato, T. Usuki and Y. Tamakawa, "Film-less computed radiography system for high-speed imaging," *Ann. Rep. Iwate Med. Univ. Sch. Lib. Arts and Sci.*, **35**, 13-23, 2000.
16. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma and applications," *Jpn. J. Med. Imag. Inform. Sci.*, **20**, 148-155, 2003.
17. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma," *Jpn. J. Med. Phys.*, **23**, 123-131, 2003.
18. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma," *Rev. Sci. Instrum.*, **74**, 5236-5240, 2003.
19. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Sharp characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 713-720, 2004.
20. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, S. Sato and K. Takayama, "Clean monochromatic x-ray irradiation from weakly ionized linear copper plasma," *Opt. Eng.*, **44**, 049002-1-6, 2005.
21. E. Sato, M. Sagae, E. Tanaka, Y. Hayasi, R. Germer, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, 7324-7328, 2004.
22. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Compact monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube," *Med. Phys.*, **32**, 49-54, 2005.
23. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Inoue, A. Ogawa, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "High-speed K-edge angiography achieved with tantalum K-series characteristic x rays," *SPIE*, **5745**, 810-817, 2005.
24. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Portable x-ray generator utilizing a cerium-target radiation tube for angiography," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 699-704, 2004.
25. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Demonstration of enhanced K-edge angiography using a cerium target x-ray generator," *Med. Phys.*, **31**, 3017-3021, 2004.

心血管疾患における細胞-遺伝子ハイブリッド治療

国立循環器病センター研究所心臓生理部 みや はら よし のり もり ひで ぞう 宮原 義典, 盛 英三
国立循環器病センター研究所再生医療部 なが や のり とし 永谷 憲 歳

はじめに

1980年代より遺伝性疾患を皮切りに、悪性腫瘍、自己免疫疾患などに対して遺伝子治療の臨床応用が開始され、現在では欠損遺伝子や変異遺伝子を補充する治療法から、生体の治癒力を補う目的の治療にも拡大施行されている。循環器疾患における遺伝子治療は、1994年に米国のタフツ大学で VEGF (血管内皮細胞増殖因子) 遺伝子の虚血肢への血管内投与という形で行われ、血管再生効果が確認された¹⁾。以後、循環障害に対する遺伝子治療の臨床応用が多くの施設で行われている。

また、日本では1997年に臓器移植法が施行され、心臓、肺などの脳死臓器移植が可能となったが、ドナー不足のためにこれまで二十数例が施行されるにとどまっている。末期の臓器不全に対して何らかの代替治療が必要とされている中で、体性幹細胞移植や tissue-engineering などの再生医療が注目を集めている。当施設では、2004年より既存の治療に抵抗性の重症拡張型心筋症および虚血性心筋症の患者に対して、間葉系幹細胞移植の臨床研究を開始している。

われわれはこの遺伝子治療と細胞移植治療をハイブリッドし、基地 (base) となる機能細胞に補完的機能をもつ遺伝子を導入するという遺伝子-細胞ハイブリッド治療を考案した。遺伝子を格子

構造を有する生分解性ゼラチンに取り込ませ、このゼラチン-遺伝子複合体を貪食能を有する細胞に導入させる方法である。われわれは正常な血管床の再生という点に主眼を置き、細胞-遺伝子ハイブリッド治療を原発性肺高血圧症に応用した。

本稿では、ゼラチンを用いた遺伝子導入法、ゼラチン-遺伝子複合体、肺高血圧症に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療の研究成果について概説する。

ゼラチンを用いた遺伝子導入法

従来用いられてきた代表的な遺伝子導入法として、プラスミド DNA そのものを組織に投与する方法、アデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルスベクターを用いる方法などがあげられる。しかし、プラスミド DNA の直接投与では組織内で拡散・希釈され、細胞核内に到達する前に核酸分解酵素により分解されてしまうため、有効な治療効果を得るには大量の遺伝子を準備する必要がある。また、ウイルスベクター法は導入効率の良いものの、ウイルス蛋白の抗原性、ウイルスの突然変異の懸念など、安全性に重大な問題がある。われわれが考案した細胞-遺伝子ハイブリッド化は、*ex vivo* でウイルスベクターを用いることなく細胞への遺伝子導入が高効率に行える次世代の

[Key words] 細胞-遺伝子ハイブリッド治療, 血管新生, 肺高血圧症

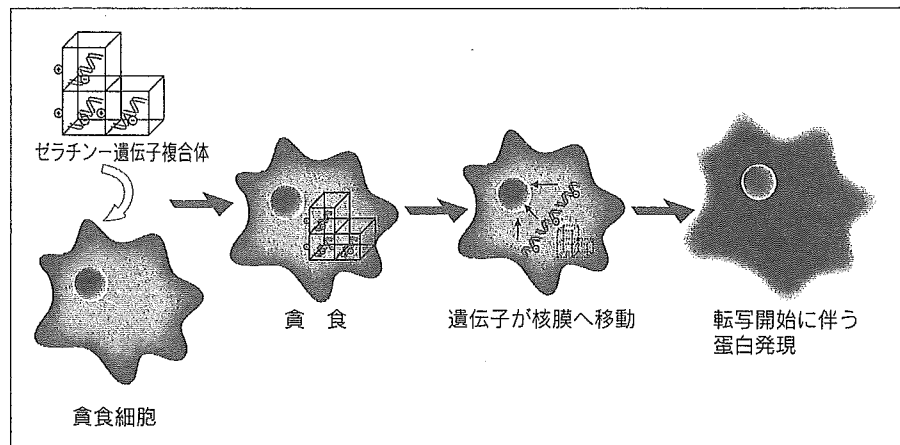


図1 ゼラチンを用いた遺伝子導入の概念図

貪食細胞がゼラチン-遺伝子複合体を取り込んだ後、ゼラチンは細胞内で分解され、封入されていた遺伝子が核膜へ向かい、蛋白発現に向けたプロセスが開始される。

遺伝子導入法である(図1)。このハイブリッド化を実現する鍵となる物質が生分解性ゼラチンである。

ブタの皮膚から抽出したゼラチンをグルタルアルデヒドの架橋反応により格子構造とし、エチレンジアミンを加えると正帯電ゼラチンが完成する²⁾。この正帯電ゼラチンの特徴として、

- ① 陽性に帯電しているので、陰性に帯電しているDNAや蛋白質と数時間接触することにより容易にイオン結合し、電気的複合体を形成する。
 - ② 構造が3次元格子状なので、結合物質をゲル内部に保護することにより、分解酵素の影響を受けにくくする。
 - ③ 生体内で徐々に分解を受けて、この分解に伴い結合物質を徐々に放出する。
 - ④ その分解速度はゼラチンの架橋度を変えることにより自由に調節できる。
 - ⑤ ゼラチン-遺伝子複合体は貪食細胞(単球、マクロファージなど)に容易に貪食される。
 - ⑥ 貪食細胞内で高率に遺伝子を発現する。
- などがあげられる。

われわれはゼラチンを、その構造や表面電荷を自由に変えることが容易である性質から遺伝子の

担体として利用することを着想した。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内へ封入してゼラチン-遺伝子複合体を形成し、生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の分解・代謝が緩和となり、結果として安全かつ高効率に遺伝子を導入することができると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を延長させることに成功し、遺伝子の発現率も従来の遺伝子単独投与と比較して約10倍の増加が認められた³⁾。

ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体による血管新生療法

血管内皮細胞から産生されるアドレノメデュリンは、生体内で最も強い血管拡張作用を示すペプチドであり⁴⁾、血管新生促進や抗アポトーシス作用などの多様な生理活性を併せもつ。われわれは家兔下肢虚血モデルを用いてゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の治療効果を検討した⁵⁾。大腿動脈摘除後10日目に大腿筋肉内にアドレノメデュリン遺伝子そのもの、およびゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体を投与した群を作製し、4週間後に下腿血圧、組織血流量および組

織内の毛細血管密度を調べた。いずれの治療もコントロール群と比較して著明な血管新生および血流改善効果を認めたが、ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体投与群が有意に勝っており(図2a, b, c), 血管造影でもより多くの再生血管が描出された(図2d)。また、筋肉組織中のアドレノメデュリン濃度は投与後2週間にわたって遺伝子単独投与群よりも高値を示した(図2e)。この事実により、アドレノメデュリン遺伝子をゼラチン内に封入して投与することで、遺伝子が虚血組織内で長期にわたり高濃度に維持され、徐放されながら遺伝子導入を果たし、より効果的な血管新生の発現が得られたと考えられる。

ゼラチンを介した細胞-遺伝子ハイブリッド治療

遺伝子または調節因子の投与のみでは代謝による影響があり、必要とされる場所への有効量の到達の面で限界がある。この問題を解決するために1991年に細胞を遺伝子発現の基地として用いるcell-basedの遺伝子治療がPlautzらによって始められた⁶⁾。これをさらに発展させた細胞-遺伝子ハイブリッド治療は、貪食能をもつ機能細胞にゼラチン-遺伝子複合体を取り込ませて遺伝子導入を行う。つまり、細胞が遺伝子発現の基地としてだけでなく、治療要素としての働きをもつことになる。細胞移植の観点から言い換えれば、移植細胞の機能強化のために遺伝子治療を併用した治療法といえる。細胞-遺伝子ハイブリッド治療は、ベクターにウイルスを使用せず、ゼラチンを用いることで安全性と効率の高い遺伝子導入を実現する。また、移植したマクロファージや単球などの貪食細胞が自身の走化性によって障害部位に特異的に集まるため、標的組織へ凝集したこれらの細胞が導入された遺伝子をもとにタンパク質を合成し、より高い治療効果を上げると考えられる。

血管内皮前駆細胞を用いた原発性肺高血圧に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療

1997年Asaharaらは、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells: EPCs)が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末梢血中に動員され、障害部位に遊走・付着し、血管内皮細胞に分化して血管を形成することを明らかにした^{7,8)}。また、われわれはEPCsがマクロファージのような貪食能を有し、ゼラチン-遺伝子複合体を貪食することを発見した⁹⁾。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おり^{10,11)}、この効果は、①EPCs自身が血管形成に加わることで、②EPCsがVEGFなど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。

原発性肺高血圧症の病態は、血管内皮細胞の機能障害およびそれに基づく血管作動物質の不均衡であると考えられている(図3)。われわれは、肺血管床で強力な拡張因子として働くアドレノメデュリンを血管内投与することで、平均肺動脈圧を低下させることができることを示してきた¹²⁾。アドレノメデュリンの特異的受容体は、体血管よりもむしろ肺血管に多数存在し¹³⁾、血管平滑筋の受容体に直接作用してcAMPを増加させたり、血管内皮細胞に働き一酸化窒素を介して血管拡張を引き起こす¹⁴⁾。故に、原発性肺高血圧症は細胞-遺伝子ハイブリッド治療が適している疾患と考えられた。

まず、アドレノメデュリン遺伝子をゼラチンに封入して*ex vivo*にてEPCsに取り込ませた(図4a, b, c)。このEPCsの貪食による遺伝子導入は、ウイルスベクターを用いずにEPCs自身への50~70%という高効率の遺伝子導入を可能にした。近年アドレノメデュリンはPI3K-Akt経路を活性化することで血管内皮細胞の生存、遊走、増殖に関与することがわかり、アドレノメデュリン遺伝子を導入することでEPCs自身のアポトーシス抑制、増殖促進の効果も得られることが明らか

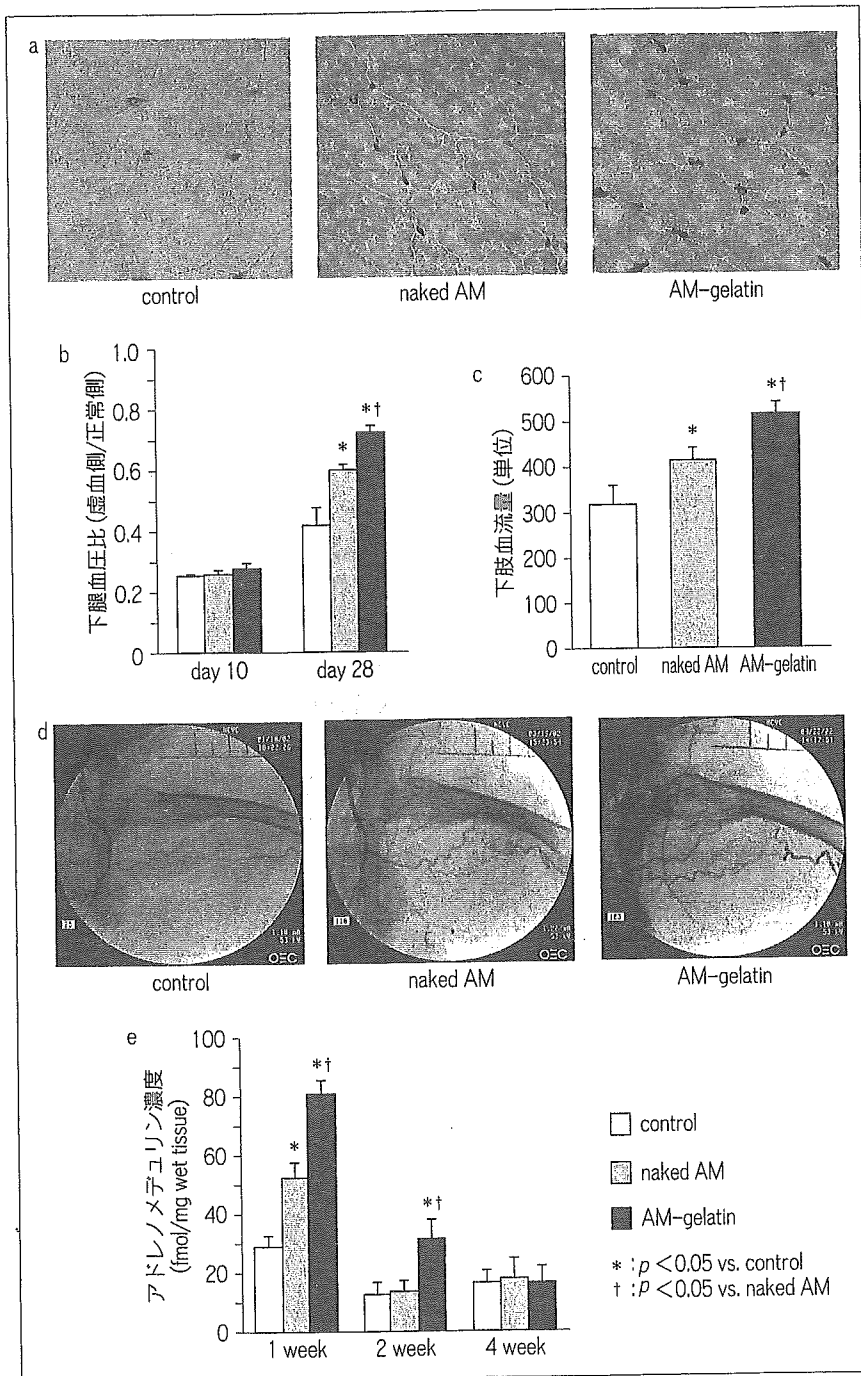


図2 ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の血管新生効果

naked AM : アドレノメデュリン遺伝子単独投与群, AM-gelatin : ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体投与群

a : 虚血側大腿筋のアルカリホスファターゼ染色による毛細血管密度の比較 (×200).

b, c : 下腿血圧および下腿血流量は複合体投与群が有意に勝っていた.

d : 血管造影検査による再生血管の描出.

e : 治療後の筋肉組織内アドレノメデュリン濃度の経時的推移.

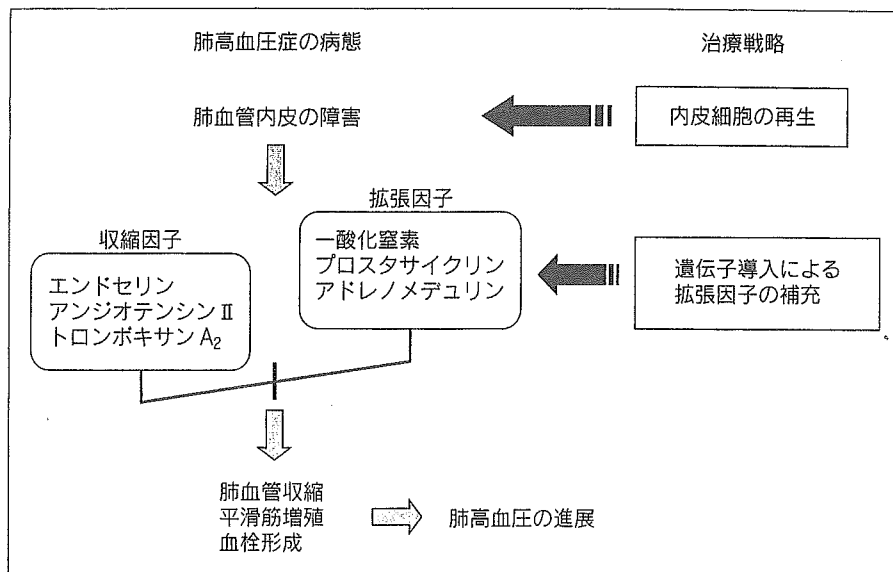


図3 肺高血圧症の病態に基づいた細胞-遺伝子ハイブリッド治療の戦略

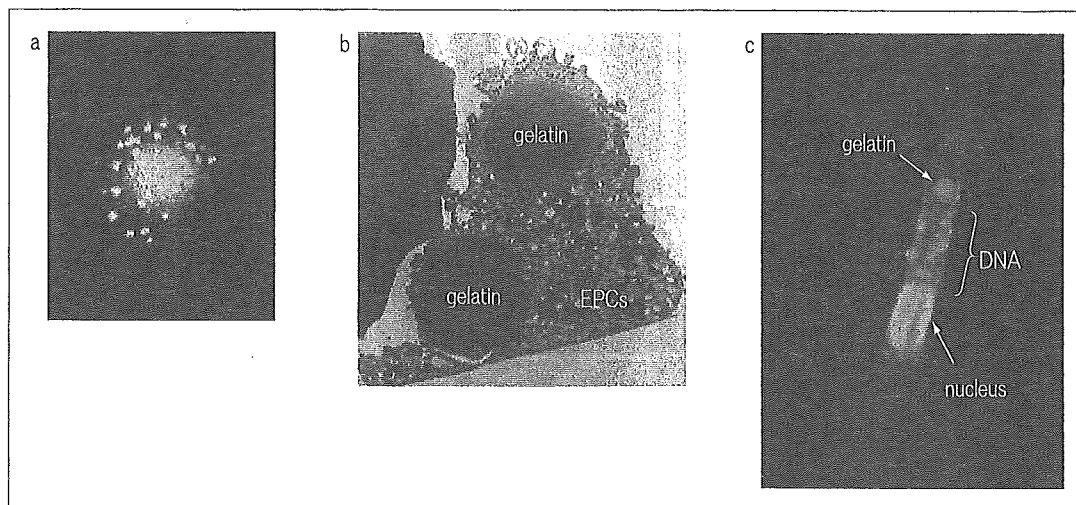


図4 ゼラチンを用いた EPCs への遺伝子導入

- a: ゼラチンに封入されたアドレノメデュリン遺伝 (RITC-labeled)
- b: ゼラチンを貪食した血管内皮前駆細胞
- c: ゼラチンから細胞核に向かって DNA が放出される様子.

かになった。

モノクローリン投与にて作製したラット肺高血圧モデルにアドレノメデュリン遺伝子を導入した EPCs を経静脈的に投与し、3 週間後に肺高血圧

の軽減効果を検討した⁹⁾。EPCs は肺細動脈と間質に付着し、成熟した血管内皮細胞として血管を形成したが (図 5a, b), EPCs 単独投与では肺動脈の有意な低下には至らず、肺血管抵抗のわず

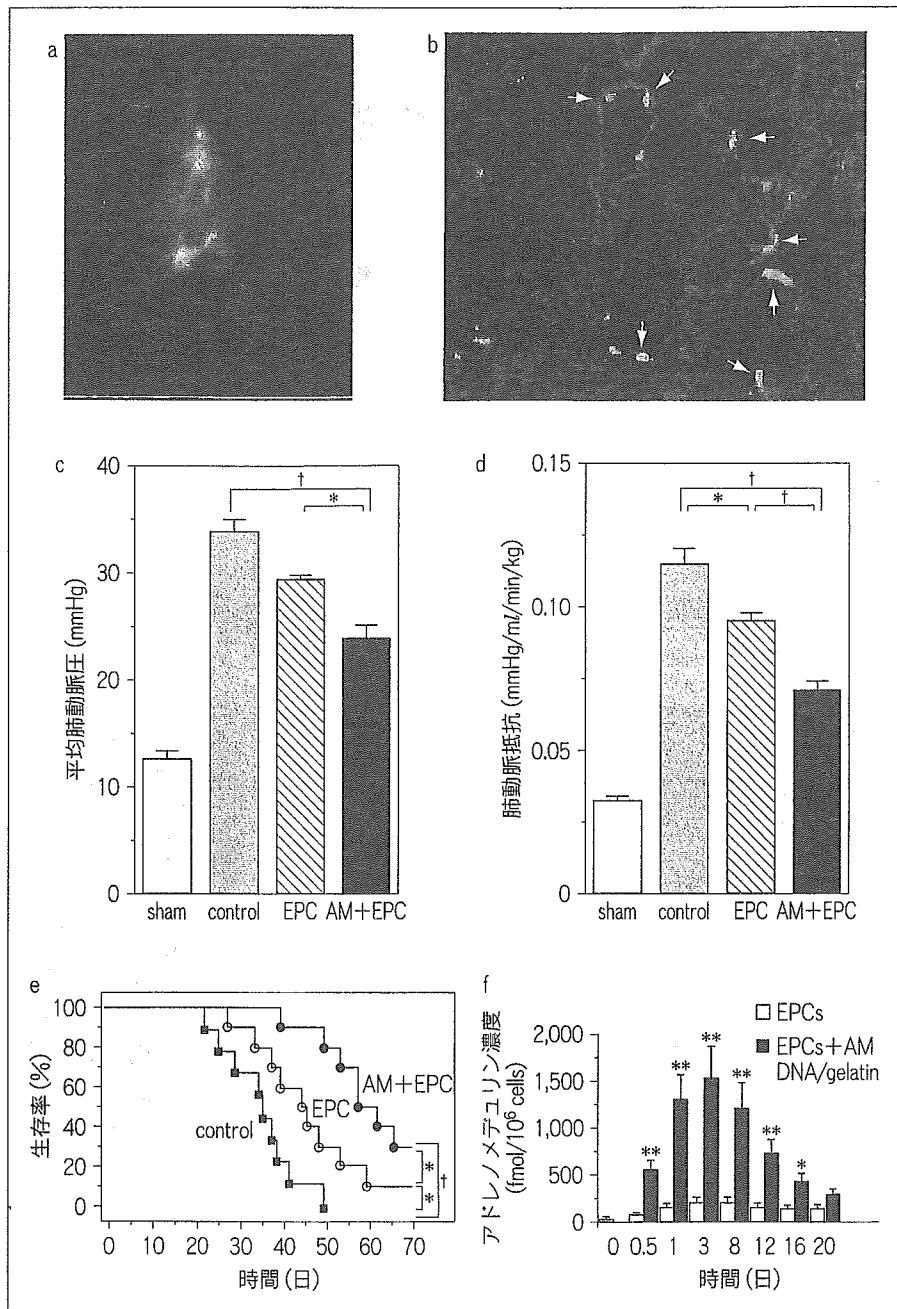


図5 肺高血圧ラットに対する血管内皮前駆細胞とアドレノメデュリン遺伝子のハイブリッド治療の効果

a: GFP 遺伝子導入 EPCs.

b: GFP 発現 EPCs は、肺細動脈の内面や肺組織の間質に付着し、血管を形成した。

c, d, e: アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs の移植により、平均肺動脈圧、肺血管抵抗、および予後が有意に改善した。*: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$

f: 培養液中のアドレノメデュリン濃度。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs EPCs

な改善のみにとどまった。一方アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs は平均肺動脈圧および平均肺動脈抵抗を有意に低下させ、生存率を有意に改善させた (図 5c, d, e)。また、アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs は EPCs 単独の約10倍のアドレノメデュリンを分泌し、約3週間にわたって発現が持続した (図 5f)。原発性肺高血圧症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受容体拮抗薬が開発され、その有効性が報告されているが、これらの治療にも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。この細胞-遺伝子ハイブリッド治療が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

われわれが開発した生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法は安全性、遺伝子の徐放化による持続発現の点で、従来のウイルスベクターを用いた方法よりも優れている可能性がある。本法は貪食能をもつ細胞であれば利用可能であると考えられ、肺高血圧症や虚血性心疾患などの難治性循環器疾患に対する新たな再生治療として期待されている。

文 献

- 1) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996; **348**: 370-374
- 2) Tabata Y, Nagano A, Ikada Y et al: Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 1999; **5**: 127-138
- 3) Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N et al: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 1056-1062
- 4) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M et al: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **192**: 553-560
- 5) Tokunaga N, Nagaya N, Shirai N et al: Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* 2004; **109**: 526-531
- 6) Plautz G, Nabel EG, Nabel GJ et al: Introduction of vascular smooth muscle cells expressing recombinant genes *in vivo*. *Circulation* 1991; **83**: 578-583
- 7) Asahara T, Murohara T, Isner JM et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 964-967
- 8) Asahara T, Kawamoto A: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; **287**: C572-C579
- 9) Nagaya N, Kangawa K, Mori H et al: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; **108**: 889-895
- 10) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al: Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; **103**: 634-637
- 11) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; **360**: 427-435
- 12) Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M et al: Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2004; **109**: 351-356
- 13) Owji AA, Smith DM, Coppock HA: An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology* 1995; **136**: 2127-2134
- 14) Nakamura M, Yoshida H, Makita S et al: Potent and long-lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. Comparisons between normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997; **95**: 1214-1221

血管新生療法

竹下 聡

はじめに

血管新生療法 (therapeutic angiogenesis)¹⁾は、血管増殖因子やその遺伝子、あるいは骨髄や末梢血細胞を用いて血管新生を促進させ、組織虚血の改善を図る治療法である。循環器領域における初の遺伝子治療としても知られる vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子を用いた血管新生療法が、米国の Isner らによって行われたのは 1994 年のことである²⁾。現在までにすでに 10 年以上が経過し、遺伝子以外にも増殖因子蛋白、骨髄細胞、末梢血細胞などを用いたさまざまな治療が試みられ、その有効性も検証されつつある。各々の治療法の詳細は他稿に譲り、ここでは血管新生療法がどのように生まれ、どのように育ってきたか、その歴史を概説する。

血管新生療法の臨床応用まで

血管新生療法のコンセプトそのものは決して新しいものではない。80 年代後半には、ネコの虚血肢モデルに対して大網の脂質分画を投与し、虚血を改善させる試みが行われている。大網や脂肪細胞の再生医療への応用は最近のトピックであり、このような研究がすでに 20 年近く前に存在したことは興味に値する。これらの血管新生療法と Isner らが行ったそれとの差異は、後者が VEGF という血管内皮細胞に特異的な増殖因子を用いた点にある。90 年代初頭、Isner らは家兎の虚血肢モデルに VEGF 蛋白を投与し、血管新生療法の臨床応用を検討した。動脈投与、静脈投与、繰り返し投与、ヘパリンの併用などさまざまな投与方法を検討し、投与方法のいかに関わらず、側副血行の促進には 100~1000 μg の VEGF 蛋白が必要なことを明らかにした。しかしながら、

大量の VEGF 蛋白を投与すると、投与した蛋白が全身を循環し、非目的部位へと到達するのは避け難い。血管増殖因子の全身への拡散は、糖尿病患者においては網膜症を悪化させ、癌患者では腫瘍血管の発達を促進させる。また、一部の血管増殖因子は NO を介した血管拡張作用を有し、遷延性低血圧を惹起する。事実、VEGF 蛋白を用いた血管新生療法の臨床試験では、低血圧を避けるために投与量が制限された。

大量の蛋白投与に伴う副作用を回避するために行き着いた結論が遺伝子を用いたローカドラッグデリバリーであった。Isner らはカテーテルを用いて血管細胞へ VEGF 遺伝子を経皮的に導入し、それらの細胞から VEGF 蛋白を分泌させようと考え、表面が親水性ゲルでコーティングされた冠動脈形成術用バルーンカテーテル (ハイドロゲル・バルーンカテーテル) による遺伝子導入を試みた。ハイドロゲルは、狭窄部位におけるバルーン通過性を改善するために施されたコーティングであるが、Isner らはこのゲルにプラスミド DNA の水溶液をしみ込ませ、遺伝子キャリアとして用いた。通常の PTCA テクニックによりバルーンを目的部位へと進め、4~8 気圧で 1 分間バルーンを拡張させることで遺伝子の血管壁への導入が可能であった。その導入効率よりポゾームによる遺伝子導入に比し 100 倍以上の高効率ではあったが、βガラクトシダーゼ遺伝子を用いた組織的検討では、導入部位のわずか 0.1% 以下の細胞にしか遺伝子発現が認められなかった^{3,4)}。このわずかな細胞によって血管新生を促進することが可能なのが問題となるのだが、遺伝子の導入効率 (transfection efficiency) と治療効率 (therapeutic efficiency) とは同義ではない。遺伝子産物である増殖因子が細胞外へと分泌されれば、たとえ導入効率は低くとも、パラクリン効果が期待できる⁵⁾。この仮説は動物実験によって検証された。すなわち、ハイドロゲル・バルーンカテーテルを用いて家兎虚血肢モデルに VEGF 遺伝子の導入を行うと、約 3 週間にわたりその発現が認められ、VEGF 蛋白の動脈内投与と同等以上の側副路発達効果が得られたのである。一方、末梢血中の VEGF 蛋白の濃度は ELISA による測定限界付近にあり、きわめて低値であった。つまり遺伝子の導入効率は低くとも、治療効果を得るに十分な VEGF の局所濃度が維持可能であり、逆に末梢血中濃度は希釈効果によって低く抑えられたのであ

たけした さとし：国立循環器病センター心臓血管内科