

パージャー病の患者に自家骨髄細胞移植治療前と治療1カ月後に下肢血管造影(DSA)を施行した。治療前後では明らかな血管造影像の変化を認めない。

図Ⅲ-70 下肢血管造影(DSA)

法、さらに検出系を高感度、高解像度化するなどの方法がすべて実現される必要がある。

現在のところ、放射光を利用した施設で行われる微小血管造影法がこれらのすべてを可能としている²⁾。放射光とは広域のスペクトルを持つ白色光であり、シリコン結晶を用い単色化することにより微量のヨードを検出し、微小血管を描出することが可能となる。しかし、放射光施設はシンクロトロン加速器が必要であり、高額で広い敷地を要するため、微小循環造影を臨床へ普及する上で大きな障害となる。現時点で微小血管造影の臨床応用を実現した唯一の放射光施設が高エネルギー加速器研究機構であり、筑波大のグループと共に経静脈的冠動脈造影を多くの臨床例に行っている。世界最大の放射光施設であるSPring-8では、医学利用の候補の1つとして微小血管造影の可能性が検討されている。微小血管造影法の臨床への導入の近道としては装置を小型化し、コストを低下させる必要がある。そこで既存の高出力のX線源を用い微小血管を造影する装置も開発されている(後出)。

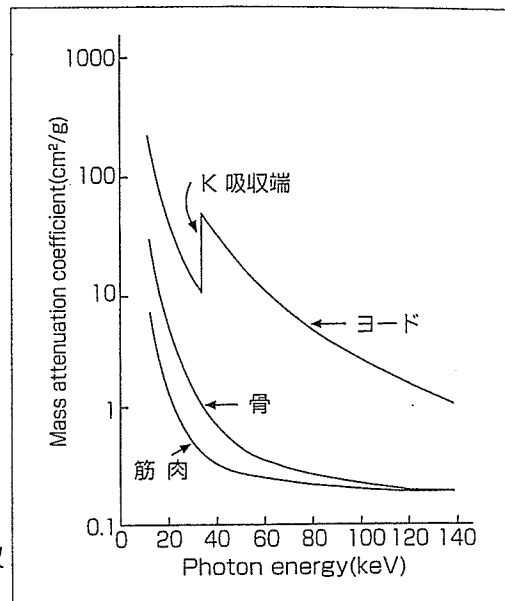
2. 微小血管の描出を実現するための要素

a. 高輝度

輝度はイメージングプレートに像を映し出すために非常に重要な要素であり、単位面積あたりのX線の光子量を表している。血管撮影などでX線は被写体に当たったときに吸収を受けかつ散乱し、イメージングプレートまでたどり着くのに顕著に減衰してしまう。血管造影などで境界が鮮明な像を得るには、X線の輝度を十分保つ必要があり、既存のX線源では白色光のまま撮影するしかなかった。一方、放射光から得られる輝度は非常に高輝度であり、従来のX線発生装置と比べ約 10^8 倍も明るく、人体による減衰を受けた後でも、撮像装置に有意なコントラストを結像できる十分な光子数を残すことができる。それ故にX線を単色化させるという著しい光子数の減

筋肉、骨およびヨードのK吸収端の関係を示す。33.3keV直上でヨードK吸収端は上昇し、人体との組織吸収係数の差が最大となる。

図Ⅲ-71 X線エネルギーと質量吸収係数の関係



少を伴う過程を経た後でも、通常の白色X線と同等の光子数を撮像系前面で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といつてよい。

b. 単色化

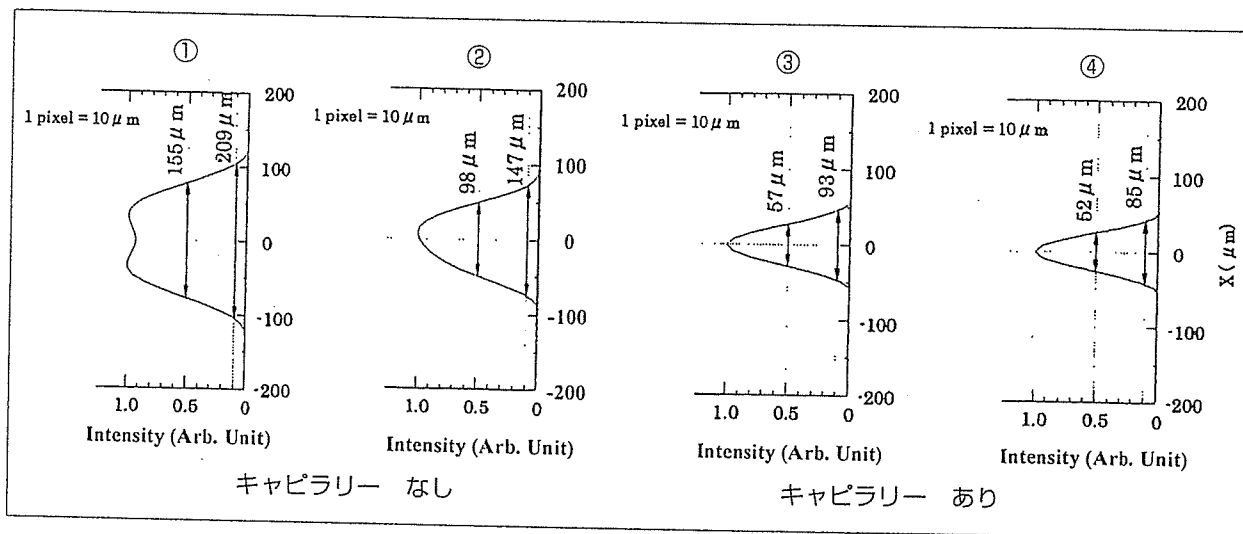
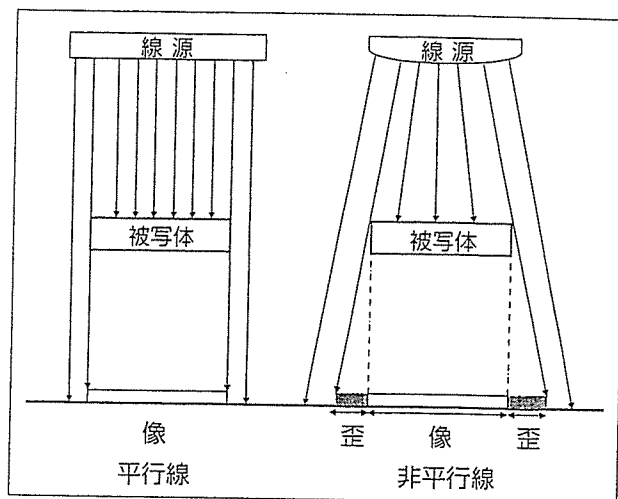
血管造影には通常ヨード含有造影剤が使用されている。ヨードは33.3 keVのエネルギーレベルで質量吸収係数が不連続に上昇するため（K吸収端）、X線のエネルギーをヨードのK吸収端の直上のエネルギーの直上に変換（シリコン結晶によるBragg反射を応用する）すると、ヨードと周囲組織との質量吸収係数の差（コントラスト）が最大となり、微量ヨードの検出ができる（図Ⅲ-71）。また、MRIなどに使用されているガドリニウム（Gd）がX線による血管造影時の造影剤として使用可能となれば、単色X線のエネルギーを50.5 keV（Gd吸収端直上）にしたときに最適の吸収の差を得られる。50.5 keVのX線の人体による吸収は33.3 keVのヨードK吸収端のそれと比較して著しく少ない。すなわち、Gd使用により患者被曝量を軽減した血管造影が実現できる。

c. 平行化

X線源が平行であれば、被写体とその像は理論的にいえば等大の大きさになる（正確には、X線が平行であっても散乱・回折するので本当の等大にはならない）。平行でない光線は被写体から像との距離が離れるほど像は拡大し、辺縁は歪んでしまう（図Ⅲ-72）。こうした変化はミクロの血管を評価するには、その血管の径を正確に検出するのに影響を与えることはいうまでもない。放射光は平行に限りなく近い性質を持ち、微小血管造影に理想的な線源といえるが、通常の医療用X線源は平行化されておらず、微小血管径の計測には不向きである。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は、そのキャピラリー（孔）にX線を通させると平行化することができ、低コストで通常のX線源を平行化できる有効な手法と考えられる。実際にその効果をコンピューターシミュレーションにおいて評価した。X線源

線源が平行の場合、被写体と像は等大になるが、平行でない場合には像は拡大し、辺縁が歪む。

図Ⅲ-72 X線の平行化の影響



図Ⅲ-73 キャピラリーによる平行化の評価

検出器から10cm離れた場所に50 μm のスリットを設置し、線源とスリットとの距離を変化させ平行化の効果を検討した。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155 μm 、98 μm 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、52～57 μm 程度の誤差しかない。

と被写体の距離を近づけた場合、平行化しないと像が拡大するが、平行化すると像の拡大を防ぐことができる(図Ⅲ-73)。すなわち、X線の平行化は解像度を確保するのに有用であることがわかる。

d. 高解像度化・高感度化

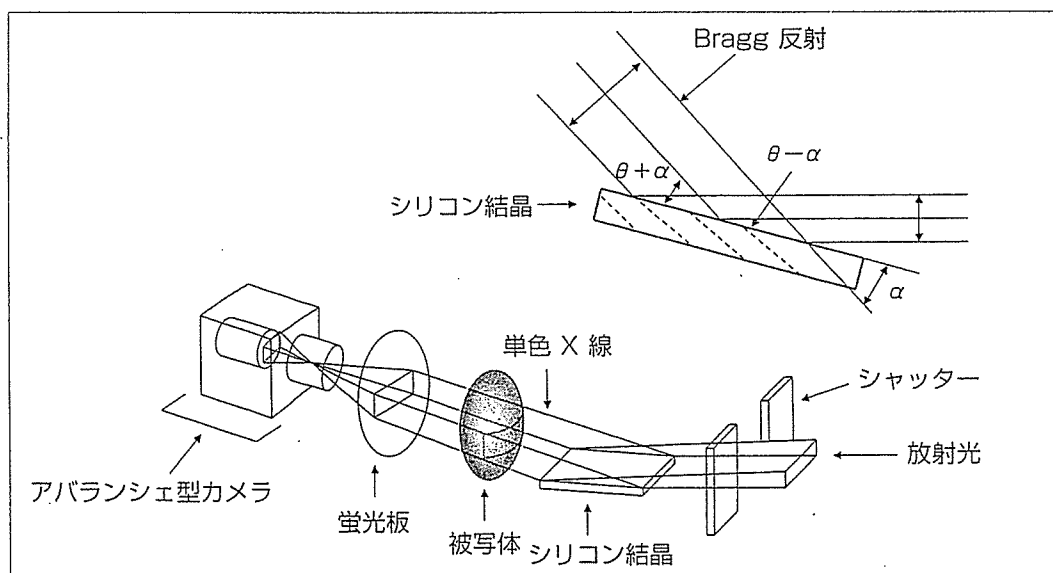
高輝度で単色化され、かつ平行化を有する理想的なX線源を実現できたとしても、検出器の解像度・感度が低ければ微小血管像は劣化してしまう。解像度を表すには通常チャート撮影が用いられる。1ミリ幅に40本のラインを引き(20ラインペア)、それを識別できれば25 μm (1mm/40=25 μm)の解像度が得られたことになる。通常の血管造影装置では2ラインペア程度が普通であるが(空間分解能250 μm)、高解像度撮影装置であれば25 μm レベルの解像度が可能である。また、感度が高くな

いと微量のX線を検出することができないため、イメージングプレートとしては高感度蛍光板が使用される。装置の原理・構造については後述する。

3. 線源の種類

a. 放射光

放射光とは光速で直進する電子が磁石によって進行方向を変えられた際に発生する電磁波であり、1947年に電子シンクロトロンで観測された。負の電荷をもつ電子は周囲に電場があり、高エネルギーの電子が磁場で曲げられると光子となって放出される。その性質は、高エネルギーの電子を持ち、進行方向の変化が大きいほど高輝度となり、紫外線からX線などの短い波長の光を含む広いスペクトルを有している。放射光施設は、電子ビームを発生させ光速近くまで加速する入射系加速器と、電子ビームを円形の軌道に留めておくための蓄積リングを必要とする。代表的な大型放射光施設はSPring-8（日本）、APS（米国）、ESRF（仏）があり、それぞれ8、7、6 GeVの電子ビームの加速エネルギーを有している。SPring-8放射光の原理と方法は、電子銃から電子ビームを放射し、線形加速器で1 GeVまで加速し、さらにシンクロトロンに導入して8 GeVまで加速する。それを蓄積リングに導入し、8 GeVのエネルギーで偏向電磁石や挿入光源により放射光を発生させる。発生した放射光は、ビームラインを通して、数カ所に設置してある蓄積リング棟に導かれ医学利用、地球科学、生命科学、環境科学、材料科学などの分野で応用される。特に、医学分野にて放射光は微小血管を造影し再生医療における新生血管治療の効果判定、悪性腫瘍による栄養血管の



図Ⅲ-74 放射光施設での微小血管造影システムの概略

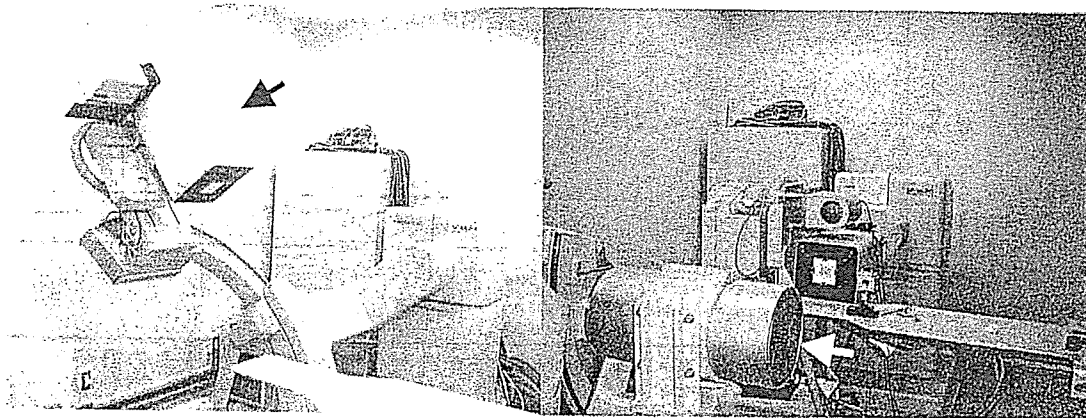
白色放射光をシリコン結晶に反射させ単色化する。被写体を通過したX線は蛍光板に像を作り、高感度高解像度アバランシェ型カメラで撮影する。シリコン結晶の格子面の角度（Bragg angle: θ ）により単色化エネルギーが決定され、格子面と結晶表面の角度（ α ）でZ軸への拡大率が決定される。

早期発見・早期治療、脳血管系や循環器系の微小循環障害などの評価への応用が検討されている。

放射光はその非常に高い輝度を有し、限りなく平行で指向性のある性質から微小血管造影に適した条件を有している。放射光施設での単色化は、白色放射光をシリコン結晶によって Bragg 反射させ、その格子面の角度により回折を受け単色 X 線のエネルギーを決定する (図Ⅲ-74)。前述したが、単色化は放射線量を減衰させてしまうが、シンクロトロン放射光は非常に高い輝度を有しており、単色化しても通常の X 線白色光と同等量の単色 X 線を確保することができる。格子面の角度 θ を変化させることにより、エネルギーレベル (反射光の波長) の調節が可能となる。

b. 普及型微小血管造影装置

放射光はその輝度の高さと平行性では非常に優れているが、多額のコストが掛かり、広大な施設を必要とする。実際に臨床応用へ普及するにはその施設へ行くしかなく、時間的・空間的にも問題がある。そこで新エネルギー・産業技術開発機構 (NEDO) の支援により、次世代単色 X 線診断・治療システムを開発し、開発グループの代表である浜松ホトニクスにより製造され、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が導入された (図Ⅲ-75)。普及型微小血管造影装置の線源として、高輝度の X 線を得るために大容量大出力をもつ CT 用の X 線管を用いた。撮影は冷却性能の改善により、連続 20 秒照射・8 分間休止で駆動することができる。単色化には金属フィルターを用い、高いエネルギーと低いエネルギーをカットし、33.3keV よりに近いエネルギーレベルの疑似単色 X 線を得る。単色 X 線の強度は $7.74 \times 10^{-1} \text{C/kg/s}$ ($= 3\text{R/s}$) に設定している。また、単色 X 線に X 線コリメータを使用し、ポリキャピラリーを通し平行化し、空間分解能を向上できる。これらにより $50 \mu\text{m}$ 以下の空間解像度を確保する。検出系は高解像度・高感度蛍光板 (イメージングプレート) で作成した蛍光像を、超高感度・高精細撮像管であるアパランシェ型ハイビジョンモノクロ新 Super-HARP カメラ (NHK) で撮影する方式で

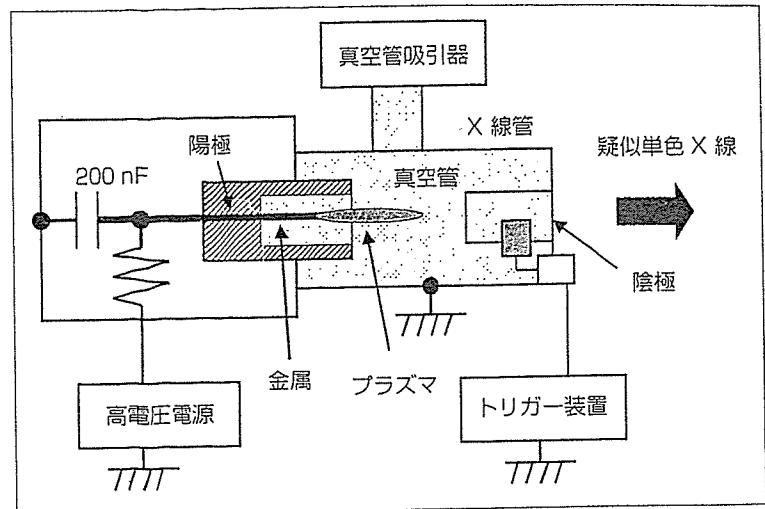


図Ⅲ-75 普及型微小血管造影装置の概略

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)。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)。

高電圧電源を用い 50 ~ 60kV まで充電し、トリガ装置による印加により X 線管内へ放電される時に、陽極のターゲット金属が気化され、疑似単色 X 線が発生される。

図 III-76 プラズマ X 線装置の概略



ある。この装置の空間分解能は $25 \mu\text{m}$ で、さらに感度は放送用 CCD カメラの 60 ~ 100 倍の感度を持つ。現段階では 50 ~ 100 μm の血管の描出を確認している。本装置は、臨床応用の対象として、末梢動脈閉塞症に対する血管再生療法の効果判定を念頭においている。すなわち、体厚 10cm 程度の下肢血管造影に応用する。この普及型単色 X 線装置では、放射光を線源とした場合とは異なり、心血管系など厚い被写体を撮影することはできない。

c. プラズマ X 線

プラズマ X 線の性質は高輝度でシャープな K 系列特性 X 線で、SN 比が非常に高い特徴がある。プラズマ X 線発生装置の原理は図に示すように、コンデンサーに 50 ~ 60kV 程度まで充電し、トリガ電圧の印加で X 線管に放電する。放電された陽極側の金属は管電流により気化され、弱電離線状プラズマの成長とともに特性 X 線が発生する (図 III-76)。ヨードの K 吸収端である 33.3keV 近傍の単色に近い X 線を得たい場合には、ターゲットとして Ce (原子番号 58) を選択すれば 34.566keV にピークを有する特性 X 線が得られる。こうして得られた X 線は、そのターゲット特性の疑似単色 X 線が得られるので、光子量を減少させるような金属フィルターなどの操作を必要としない。このプラズマ X 線装置は前述の普及型 X 線装置に比べ高輝度であり、人体のような比較的厚い被写体も通過することができる³⁾。

4. 検出法

a. 高解像度・高感度蛍光体

本微小血管造影法では浜松ホトニクスファイバオプティクプレート (FOS) (Gd 202S (Tb) または CsI (T 1)) を用いて X 線透亮像を可視光線に変換し、HARP カメラで撮影する。FOS は数ミクロン径のガラスファイバを数千万本束ねた光学デバイスに、X 線シンチレータを付加した X 線イメージングデバイスである。蛍光体のみを堆

積しているため膜厚を薄くでき、光の拡散を小さくすることができ高解像度 ($50 \mu\text{m}$ (20 ラインペア)) となる。また、蛍光体だけを堆積させ不純物を含まない高密度と微細な柱状結晶構造は、光ファイバに似た微細かつ緻密な構造が減光を大幅に削減し高感度を保てる。

b. HARP 法

CCD を用いたハイビジョンカメラでは、画素あたりの光子数が減少し感度が低下してしまうため、高精細画像として微小血管を描出するには限界がある。アパ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り、その構造は非セレン膜で構成された光伝導電層を有し、高電圧操作下で電子なだれ現象が生じ、実効量子効率数が数百倍の光電変換をすることができる¹⁾。NHK の開発したモノクロ新 super-HARP カメラは、 $25 \mu\text{m}$ 非セレン膜の構造を持ち、CCD カメラより 100 倍以上の感度を持ち合せている²⁾。

5. 症例提示

a. 放射光を用いた微小血管造影

ウサギ虚血肢の血管再生モデルを用いた、放射光施設での実験で血管径 $100 \mu\text{m}$ 以下の血管が鮮明に描出されているのがわかる (図 III-77)。DNA は体内に投与すると、DNA 分解酵素の働きにより可及的速やかに分解されてその効果が失われてしまう。そこで著者らは、ゼラチンハイドロゲル (GHG) と DNA の複合体を形成し再生

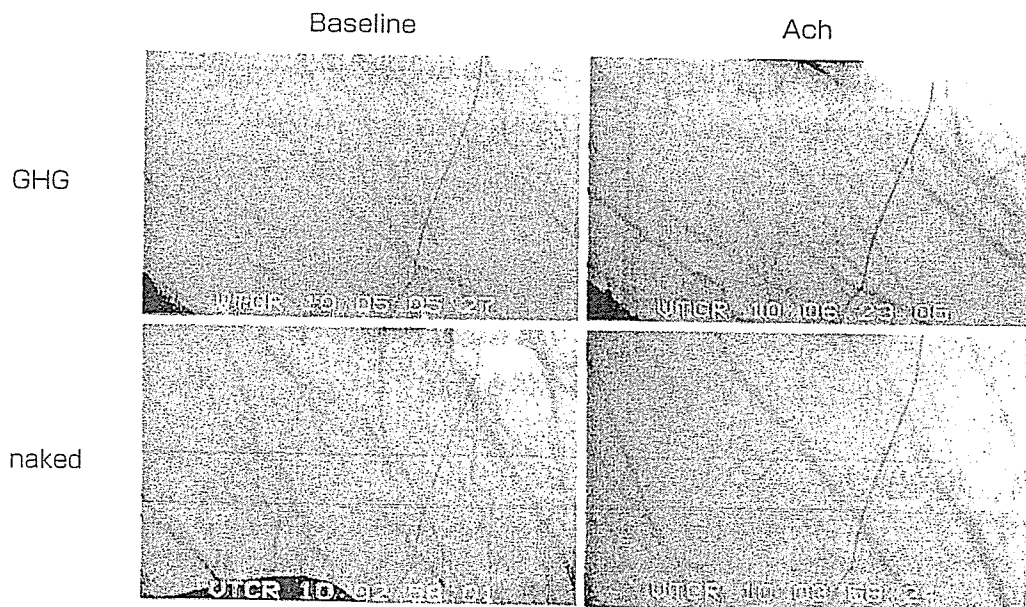


図 III-77 放射光を用いた微小血管の描出と血管機能の評価方法

再生治療により新生された血管径 $100 \mu\text{m}$ 以下の血管が描出されている。GHG・VEGF 複合体投与群ではアセチルコリン (Ach) 投与にて Baseline と比べ、血管の拡張と血管数の増加を認めるが (図上)、DNA 単独群 (naked) では血管の拡張と増加は認められない (図下)。

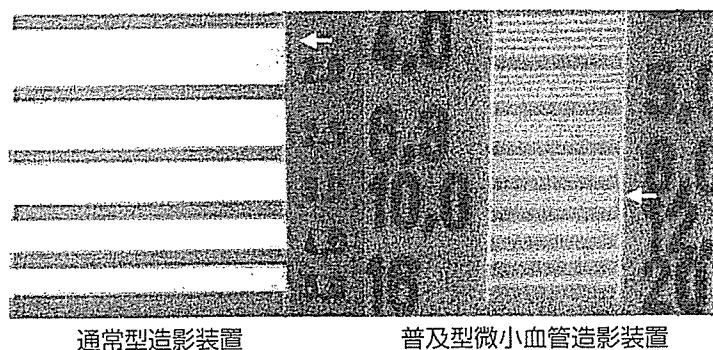
効果を徐放することにより、血管がより成熟度を増すかどうか微小血管造影法を用い検討した。DNAには血管成長因子であるVEGFを使用し、対象としてVEGF単独群、GHG・VEGF複合体群に血管再生治療を施行した。血管成熟度の評価方法はアセチルコリンの血管内投与による血管の反応性を用いた。結果はDNA単独群では血管の反応性は認めなかったが、GHG・VEGF複合体群では血管が拡張し、血管数が増加した(図Ⅲ-77)。

b. 普及型単色X線装置を用いた微小血管造影

微小血管撮影を通常の血管造影装置と普及型単色X線装置の比較を提示する。テストチャートとファントムを用い、両装置の空間解像度と微小血管の描出を検討した。テストチャートによる解像度は、通常型の造影装置は $250\ \mu\text{m}$ (2ラインペア)、普及型単色X線装置は $50\ \mu\text{m}$ (10ラインペア)であった(図Ⅲ-78)。単色X線装置の画像では、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減ることが観察できるが(図Ⅲ-79右)、通常型X線装置の画像では血管端がぼやけて、分岐に伴う血管径の減少を確認できないので(図Ⅲ-79左)、微小血管の評価には不向きである。

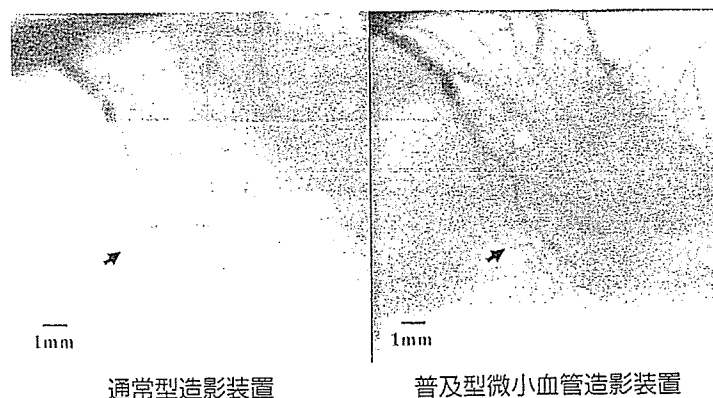
ポリキャピラリーによるX線平行化の効果を検討した。X線を平行化しない画像では、被写体を検出器から離すと血管端がぼやける。一方、キャピラリーによりX線を平行化すると、被写体を検出器から離れた場合でも血管両端の歪みがなく微小血管の描出をさらに向上させる(図Ⅲ-80)。

チャートを用いた図左の通常型血管造影装置の解像度は $250\ \mu\text{m}$ (2ラインペア)、図右の普及型微小血管造影装置の解像度は $50\ \mu\text{m}$ (10ラインペア)を示す。

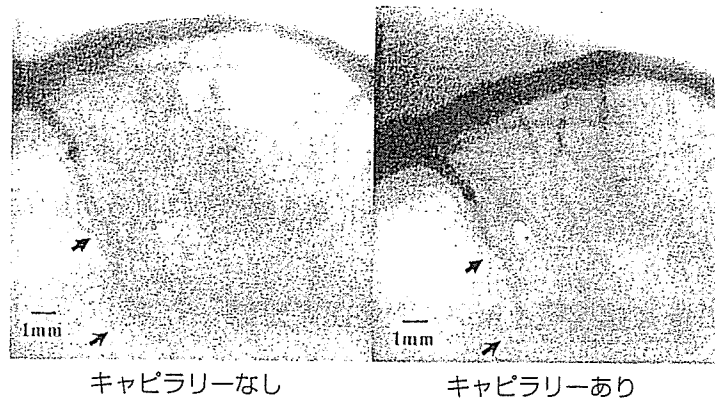


図Ⅲ-78 チャートによる通常型血管造影装置と普及型微小血管造影装置の比較

イヌ冠動脈にヨードマイクロスフィア(直径 $25\ \mu\text{m}$)を詰めて結紮したファントムを用い、撮影した。図左は通常型血管造影装置で撮影したものであり、冠動脈末梢側はぼやけてしまっているが、図右の普及型微小血管造影装置で撮影したファントムは末梢側まで血管を追うことができる。



図Ⅲ-79 イヌ冠動脈ファントムによる通常型血管造影装置と普及型微小血管造影装置の比較



イヌ冠動脈ファントムを検出器から15cm離れた状態で撮影した。血管は分岐すると血管径が小さくなるが、平行化していない図左の血管は分岐するごとに血管径が細くならないが、右のキャピラリーで平行化した場合には、分岐ごとに血管径が細くなるのが観察できる。

図Ⅲ-80 キャピラリーによる平行化の効果

6. まとめ

再生医療が注目されているにもかかわらず、臨床において再生血管を可視化して評価する方法は確立されておらず、臨床症状の改善が唯一の治療評価となっているのが現状である。微小血管造影法の可及的速やかな普及化が期待されている。また、微小血管造影法は病理学的診断方法とは異なり、治療前後で血管の変化を検討することができ、臨床応用に有用と考えられる。さらに、動脈硬化・糖尿病などによる微小血管疾患、悪性腫瘍などの早期診断にも発展していく可能性も有する。本稿では、再生血管の評価方法として、微小血管造影法に必要な要素と放射光および普及型微小血管造影装置について概説した。

[知久正明・西上和宏・佐藤英一・盛 英三]

参考文献

- 1) Tateishi-Yuyama E, 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.
- 2) Mori H, et al. : Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. *Circulation*, 89 : 863-871, 1994.
- 3) Sato E, et al. : Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-xray laser generator. *SPIE*, 4662 : 538-548, 2002.
- 4) Tanioka K, et al. : A highly sensitive camera tube using avalanche multiplication in an amorphous selenium photoconductive target. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 1656 : 1-12, 1992.
- 5) Kubota M, et al. : Ultrahigh-sensitivity new super HARP camera. *IEEE Trans Broadcast.*, 42 : 251-258, 1996.

2. 遺伝子を用いた再生医療

1) ゼラチンによる遺伝子の徐放化と細胞
—遺伝子ハイブリッド治療への応用

藤井隆文・永谷憲歳・徳永宜之・神田宗武・福山直人
田中越郎・田畑泰彦・浅原孝之・盛 英三

重症虚血性心疾患、難治性閉塞性動脈硬化症などでは、これまでの観血的治療法では十分な効果が得られない症例も多く認められる。遺伝子、細胞を用いた血管新生療法が、これからの新しい治療法の核として期待されているが、これらの導入法の開発が今後の大きな課題である。われわれは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、この複合体を貪食能を有する細胞に導入する方法を開発した。これにより、従来の非ウイルス性ベクター法よりも生体内での遺伝子発現期間が延長した。機能遺伝子、貪食細胞によるハイブリッド治療は、補完的な血管新生を実現すると考えられる。

はじめに

近年の遺伝子治療に関する進歩は目覚ましいものがある。本法は臨床応用に大きな期待が寄せられている治療法のひとつである。

1980年代より遺伝性疾患を皮切りに、悪性腫瘍、自己免疫疾患に対して遺伝子治療の臨床応用が開始され、その後循環器領域においても1994年に米国のタフツ大学で血管内皮増殖因子 VEGF 遺伝子を用いた下肢血管閉塞患者に対する遺伝子治療の臨床試験が行われた¹⁾。現在行われている遺伝子治療は、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されて施行されている。

1. 血管床の再生をめざした
遺伝子治療法の現状

遺伝子導入法としては、ベクターと呼ばれる運

び屋を用いるのが一般的だがウイルスを用いる方法と非ウイルス性の方法の2通りがある。前者はアデノウイルスやレトロウイルスなどを用いた方法があり、導入効率が高いという利点はあるが、バイオハザードが課題である。それに比べてプラスミド直接投与方法に代表される非ウイルス法は、導入効率は劣るが、安全操作が簡便である。しかしこの方法は投与したプラスミド DNA が細胞へ導入される前に生体内に存在する核酸分解酵素により分解される可能性が生じる。従って十分な治療効果のためには、大量の遺伝子が必要である。さらに現在でも遺伝子導入法には技術的な問題が多く残されており、特にウイルスベクターの安全性の問題、標的細胞への遺伝子導入効率の問題など数多くあり、臨床適用も限られている²⁾。

近年の遺伝子治療の進歩により遺伝子の欠損、変異に関わらず、サイトカイン、血管新生因子などの生体作用物質を投与することにより、著明な治療効果が報告されている。

Key Words

ハイブリッド治療、生分解性ゼラチン、マクロファージ、血管内皮前駆細胞、
ベクター、VEGF、FGF、Cell-based gene therapy、Angiogenesis、
Vasculogenesis 【用語解説1】

表① これまで行われてきた主な Cell based gene therapy

| 報告者 | Cell | Gene | 対象 | 導入部位 | 目的 |
|--|---------------------------|------------------------|----------|-------------|--------------------------|
| 1 Plautz, G. et al ¹⁾ | SMCs (smooth muscle cell) | β -galactosidase | 動脈壁 | 腸性動脈 | 組み換え遺伝子による血管病変の治療 |
| 2 Forough, R. et al ¹⁰⁾ | SMCs (smooth muscle cell) | TIMP-1 | 障害血管 | 内頸動脈 | 内皮細胞の過形成を防ぐ |
| 3 Chen, L. et al ¹¹⁾ | SMCs (smooth muscle cell) | ecNOS | 障害血管 | 内頸動脈 | 内皮の反応性を抑える, 血管内腔の拡張の制御 |
| 4 Osborne, W.R.A. et al ¹²⁾ | SMCs (smooth muscle cell) | Epo | 内頸動脈 | 内頸動脈 | 赤血球の増加 |
| 5 Nabel, E. et al ¹³⁾ | Endothelial cell | recombinant DNA | 障害血管 | 腸性動脈 | 血栓溶解, 血管新生, 成長因子の発現 |
| 6 Messina, L. et al ¹⁴⁾ | Endothelial cell | lac Z | 虚血四肢 | 大腿動脈 | 骨格筋への内皮細胞の導入 |
| 7 Willson, J. et al ¹⁵⁾ | Endothelial cell | lac Z | 動脈硬化症 | グラフト | 動脈硬化症の治療 |
| 8 Dichek, D.A. et al ¹⁶⁾ | Endothelial cell | TPA, a-UPA | 人工血管グラフト | 大腿動脈, 内シャント | 抗血栓効果 |
| 9 Flugelman, M.Y. et al ¹⁷⁾ | Endothelial cell | t-PA | ステント | ステント | 血栓溶解 |
| 10 Koh, G.Y. et al ¹⁸⁾ | skeletal myoblast | TGF- β | 心筋 | 心筋 | 局所での組み換え分子の長期発現 |
| 11 Barr, E. et al ¹⁹⁾ | myoblast | human growth hormone | 正常下肢 | 下肢筋肉 | 循環中への安定したタンパク導入 |
| 12 Lee, R.J. et al ²⁰⁾ | myoblast | VEGF | 正常心筋 | 左室壁 | 血管新生に調節された血管新生因子の発現が必要 |
| 13 Yau, T.M. et al ²¹⁾ | myocardial cell | VEGF | 虚血心筋 | 心筋虚血部 | 血管新生 |
| 14 Suzuki, K. et al ²²⁾ | skeletal myoblast | VEGF | 虚血心筋 | 心筋虚血部 | 血管新生, 血管拡張 |
| 15 Lu, Y. et al ²³⁾ | bioartificial muscle | VEGF | 虚血四肢 | 虚血四肢 | 血管新生・タンパク運搬 |
| 16 Campbell, A.I.M. et al ²⁴⁾ | SMCs (smooth muscle cell) | VEGF | 肺高血圧症 | 内頸動脈 | 肺高血圧症の進展を防ぐ, 右室リモデリングの改善 |
| 17 Iwaguro, H. et al ²⁵⁾ | EPCs | VEGF | 虚血四肢 | 尾静脈 | 血管新生・血流改善 |

よりよい血管新生療法には有用な血管新生因子が必要であり, 導入する血管新生因子としてこれまでに FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor)^[用語解説2], HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) などが報告されている^{3) 4)}。

1992年, Baffourら⁵⁾により家兔の下肢虚血モデルに対しFGF-2を導入することではじめて血管新生因子を用いた血管新生療法が報告された。その後もVEGFを用いた血管新生療法の有効性が報告されたが, これらは遺伝子導入ではなく直接タンパクを導入するものであった。ヒトへの臨床応用を考えると大量のタンパク質の精製に莫大なコストがかかる。そのため血管新生因子のプラスミドを血管内あるいは虚血部に投与する遺伝子治療が考えられた。

これら血管新生因子は血管内皮細胞増殖作用だけでなく様々な生物活性作用も有する。しかしながらこれらの血管新生因子が実際の生体における血管新生時にどのように関与しているかわかっていない。

最近の研究では血管新生因子の発現による血管新生^[用語解説3]の過程が明らかになりつつあり, VEGFの過剰発現により腫瘍形成や血管透過性の

高い新生血管の発育などが報告されている。正常な血管新生と成熟した血管の発育には細胞の型と分子のバランスが必要であるというWell-tempered vesselの概念⁶⁾が提唱されており, そのためには相互に調節しあった血管新生因子, 細胞や遺伝子を組み合わせたハイブリッド治療⁷⁾が必要となると考えられる。生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入療法は, *in vitro*での細胞内への遺伝子導入を非ウイルスベクターで高効率に行うことができ, 両親媒性ベクターとして血管内投与の可能な非侵襲性治療が期待できる優れた方法であり, さらに治療効果に関連する機能を有する複数の因子を導入することで細胞の作用と遺伝子の作用の相乗効果のみならず, それぞれの補完性も合わせ持った治療が可能となるであろう。

II Cell-based gene therapy^{8) (24)}

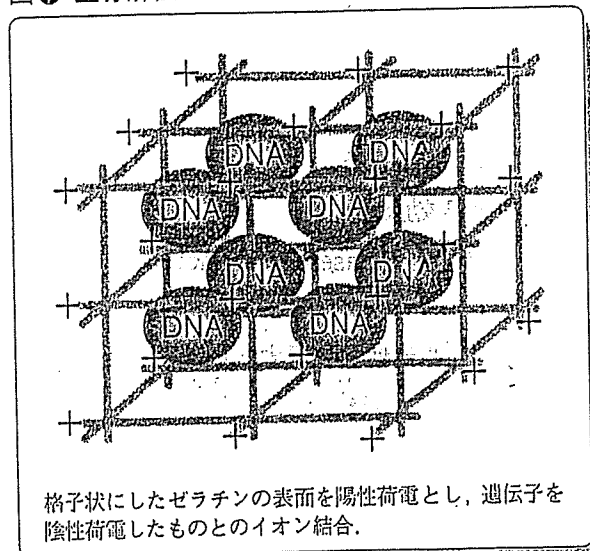
Cell-basedの遺伝子導入療法は, 遺伝子の発現期間の延長を通じてwell-tempered vesselの形成に役立つ可能性がある⁹⁾。1991年にPlautzら⁹⁾によりはじめてCell-basedの遺伝子導入が行われ, それ以降平滑筋や内皮細胞を用いた遺伝子導入が報告されてきた。その目的は遺伝子単独導入療法に比べて, より安定した, また長期の遺伝子発現

応用編

再生医療JODS

再生医療JODS

図⑩ 生分解性ゼラチンの格子構造—遺伝子結合



である。その目的のために種々の細胞を遺伝子発現の基地 (base) として用いる。細胞内ではDNA分解酵素による遺伝子の分解は極めて限られており、一方、遺伝子の転写からタンパクの発現にいたる全ての機構が整えられている。これらの理由から *ex vivo* で細胞内に遺伝子を導入し、この細胞を生体内に投与するという cell-based gene therapy⁹⁾⁻²⁵⁾ が行われるようになった。

表①に示すようにbaseとして用いられる細胞としては内皮細胞¹³⁾⁻¹⁷⁾、骨格筋細胞¹⁹⁾⁻²³⁾、平滑筋細胞^{9)-12) 24)} などが報告されている。遺伝子治療の標的器官は心臓、肺、下肢などである。導入される遺伝子はVEGFなどの血管新生因子²⁰⁾⁻²⁵⁾、GFPなどのマーカー遺伝子⁹⁾、その他の遺伝子 (TIMP-1¹⁰⁾、tPA⁷⁾、ecNOS¹¹⁾) などが報告されている。

Cell-basedの遺伝子導入の利点は、

- (1) 障害血管へ選択的な遺伝子導入を行うために、人工血管やステントのコーティングとして細胞を用いる。全身投与の手段としても用いられる可能性を有する。
- (2) 遺伝学的に細胞を比較的均一な集団として発育させることができる。
- (3) 遺伝子の導入、発現が確実に行われる。
- (4) ベクターに対する免疫、炎症反応が少ない、などである。

逆に、

- (1) 発現に遅れが伴う。
- (2) 採取、植え込みに別の過程が必要である。
- (3) 同系の細胞が必要である。
- (4) 培養中に細胞の表現型の変化が起こる、などの欠点もある。

遺伝子導入の標的細胞として当初血管系、平滑筋細胞と内皮細胞を使って行われた。血管内皮細胞は局所での血管の状態を調節し全身への遺伝子投与という可能性を持っている。

Plautz⁹⁾ らによる平滑筋細胞に β -galactosidase を遺伝子導入した研究を皮切りに、いくつかの研

究が行われた。Forough¹⁰⁾ らはTIMP-1を導入し内膜の過形成を減少させ、Chen¹¹⁾ らはeNOSを導入することにより血管のリモデリング、血管径の拡張を起こさせた。さらにはエリスロポイエチンの導入による赤血球の増加、血管新生などへの可能性に研究も行われた。

内皮細胞は微小血管のネットワークに接着するので、骨格筋の血管床なども遺伝子投与のレシピエントとなる利点を持っている。

内皮細胞への遺伝子導入¹³⁾⁻¹⁵⁾ は、全身への遺伝子投与の手段として始められ、グラフト¹⁶⁾ や、t-PAを導入したステントへの細胞-遺伝子導入¹⁷⁾ なども行われた。

しかし、ほとんどのCell-based gene therapyの場合、細胞の役割は、基地・baseとしての機能であり細胞自体による治療効果は一部を除いて考慮されていなかった。また大部分の遺伝子を導入した細胞は血管内投与で用いることはできなかった。細胞塊が血管を閉塞する危険性があるためである。そのため胸、腹部の主要臓器への投与はかなりの侵襲を伴うこととなる。

III. ゼラチンを用いた遺伝子細胞ハイブリッド治療

本治療法は以下のような特徴を有する。

- (1) cellがbaseとしてだけでなく治療要素としての働きを持つ

応用編

再生医療とDDS

再生医療とDDS

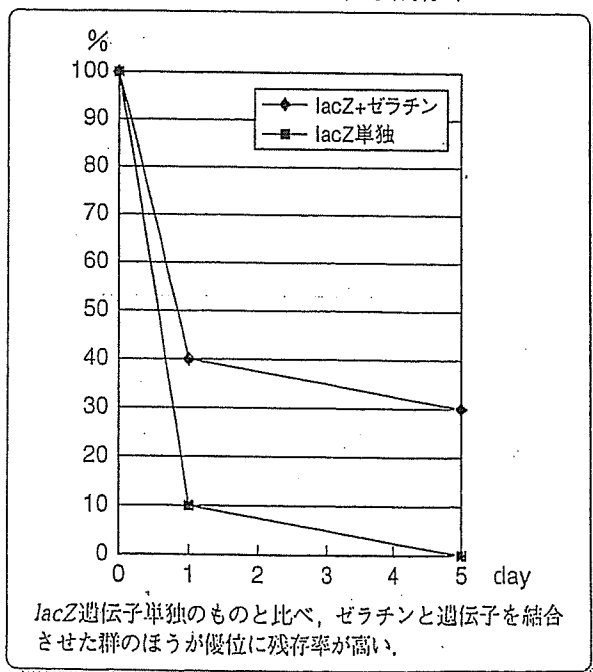
- (2)血管内投与が可能である
 - (3)ex vivoでの導入効果が高い
- などの点で、従来のcell-based gene therapyよりも優れている。

このハイブリッド治療を実現するkeyとなる物質がゼラチンである (図①)。

ゼラチンの特徴として、

- (1)陽性に帯電しているのに陰性に帯電している種々の物質(核酸やタンパク質)をイオン結合することができる。
- (2)構造が三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)ゼラチンであるため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放出する。
- (4)その分解速度は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(血管内皮前駆細胞^[用語解説4]、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。などが挙げられる。

図② 生体内におけるlacZ遺伝子残存率

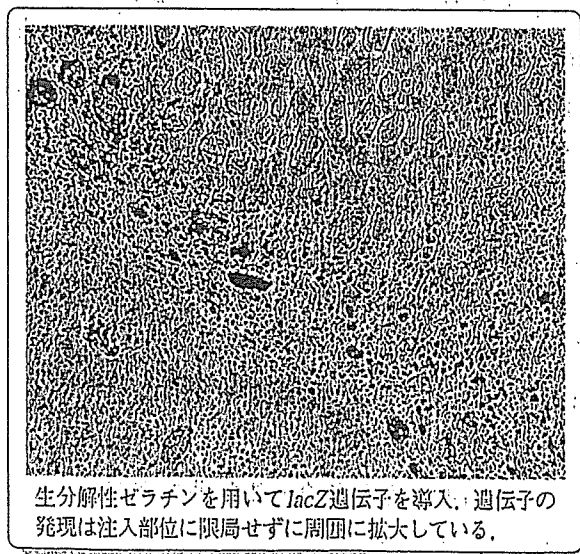


その構造や表面電荷を変えることが容易であることから²⁶⁾、われわれはゼラチンを遺伝子の担体として利用することを着想した。そこでゼラチンの構造を格子状にしてその表面電荷を陽性とする事で陰性荷電した遺伝子とイオン結合させ、ゼラチン-遺伝子複合体を作成した。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内へ封入して生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の代謝が緩徐となり、結果として安全かつ高効率に遺伝子を導入することができると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を飛躍的に延長させることに成功し(図②)、遺伝子の発現率も従来の遺伝子の単独投与と比較して約10倍の増加が認められた(図③)²⁷⁾。

本法の優れた点は、ウイルスベクターを用いないため感染の危険性が少ないことに加えて、移植したマクロファージや単球が走化性によって障害部位に特異的に集まるため遺伝子の導入効率が高まること、また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することである。

われわれが考案したゼラチンを用いた細胞内遺伝子導入法は、貪食能をもつ細胞であれば基本的

図③ 生分解性ゼラチン-lacZ

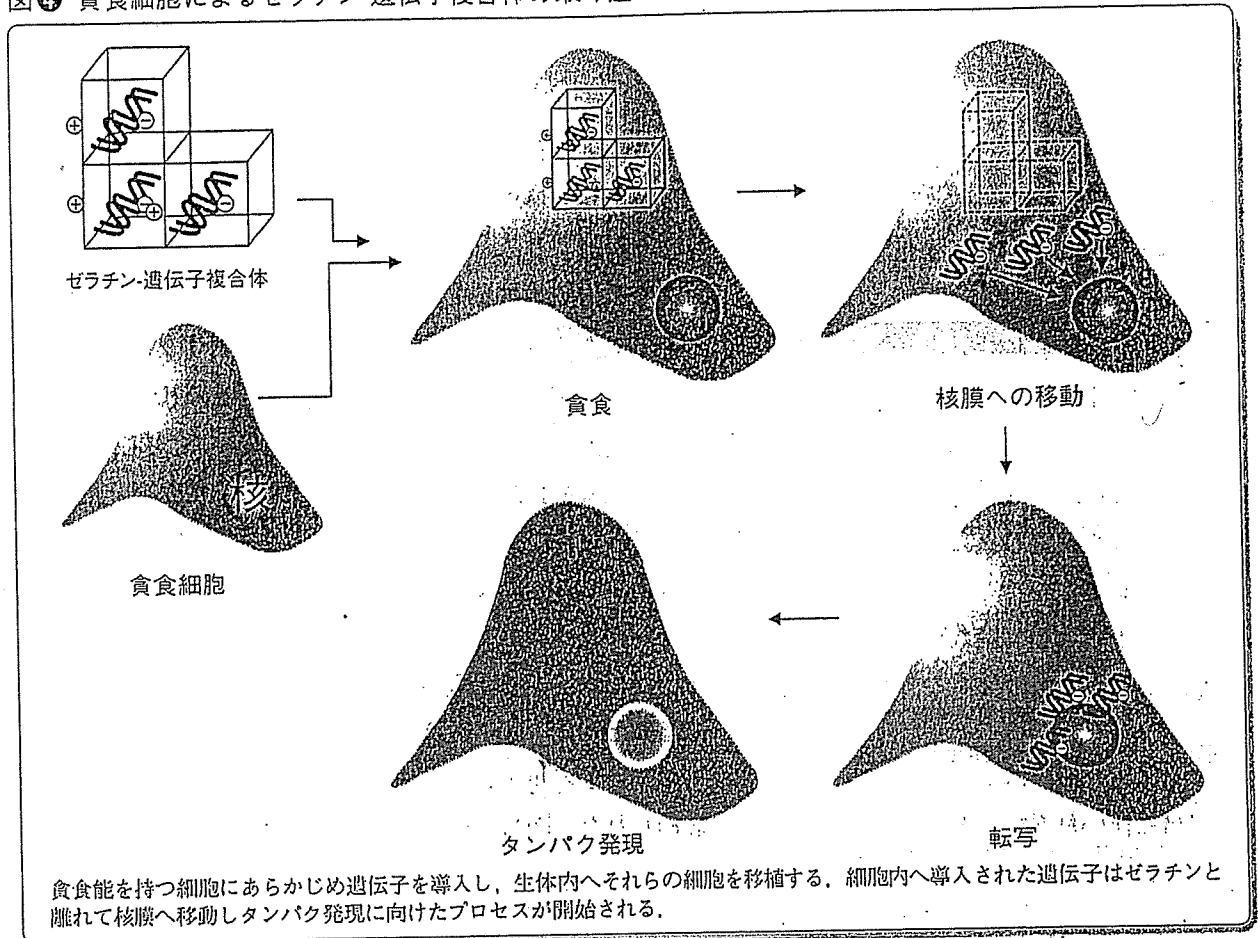


応用編

再生医療

再生医療 JDOCS

図④ 貪食細胞によるゼラチン-遺伝子複合体の取り込み



に適用可能であると考えられる。従って、食食能を有する血管内皮細胞、マクロファージなどにあらかじめ遺伝子を導入して生体内へ細胞移植すれば、血管新生能力、標的細胞への遊走能に加えて導入した遺伝子による血管新生作用の相乗効果が期待される。下肢虚血モデルに対する治療法としては、機能強化の目的で血管内皮前駆細胞へ VEGF の遺伝子を導入して投与する方法が報告され良好な成績が報告されている。(図④)

さらにわれわれは、血管内皮前駆細胞の有する血管新生作用と補完的な作用を有する遺伝子を導入することで、より成熟した血管床を再構築することをめざしており、難治性の循環障害である心筋梗塞、慢性閉塞性動脈硬化症、原発性肺高血圧症の治療に適用できないかと考えた。原発性肺高血圧症は何らかの原因により肺血管抵抗の上昇が起こり、その結果として右心不全が生じる病態であり、血管内皮細胞の機能不全が本病態の素因である可能性が指摘されており、現在の治療法とし

ては血管拡張物質である NO, プロスタサイクリン, アドレノメデュリンの治療効果が確認されている。

現在われわれはこれらの遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞を用い、ラットの肺高血圧症モデルに対する細胞移植治療の効果を検討中であるが良好な成果を上げている²⁸⁾。

おわりに

以上よりゼラチンを用いた遺伝子導入による血管新生療法は、徐放化による持続発現のみならず、遺伝子・細胞それぞれの機能を生かした方法であるといえる。従来法に比べて、安全性、侵襲に関しても優れていると考えられるが、今後は遺伝子導入効率の改善はもとより、遺伝子の発現部位や発現時期を制御する技術も必要であろう。機能的により成熟した組織や器官の再生を可能とするには複数の細胞や遺伝子を組み合わせるハイブリッ

ド治療が必要であり、生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法がヒトへの臨床応用へ向けてさらなる改善が必要となる。

再生研究Web site

www.ncvc.go.jp/
 国立循環器病センター
 http://www.nacos.com/jshc/
 日本組織細胞化学会
 http://new.nacos.com/jsch/
 日本細胞生物学会
 http://jtca.umin.jp/
 日本組織培養学会

用語解説

1. 血管形成 (vasculogenesis) 未分化な細胞 (血管内皮前駆細胞) が in site (目的地) にて増殖、分化し血管を構成する過程。
2. VEGF (vascular endothelial growth factor: 血管内皮成長因子) 受容体が内皮細胞に発現するサイトカインで、血管周囲の細胞から産生・分泌される。血管内皮細胞を特異的に増殖させ、血管透過性を亢進させる活性をもつ。ヒト組織中に最も豊富にある VEGF165 はヘパリン結合性の分泌型糖タンパク質である。
3. 血管新生 (angiogenesis) 既存血管の血管内皮細胞が増殖および遊走して成立する成熟個体の血管形成。
4. 血管内皮前駆細胞 末梢血液中に存在する骨髓由来の細胞で、血管内皮細胞に分化可能な血液細胞として発見される。抗原性などから、胎児期に存在する angioblast に近い細胞と推察されている。生体の血管形成に血液中から患部に集積する。

参考文献

- 1) Isner JM, Pieczek A, et al: Lancet 348, 370-374, 1996.
- 2) Yang Y, Trinchieri G, et al: Nat Med 1, 890-893, 1995.
- 3) Gospodarowicz D, Brown KD, et al: J Cell Biol 77, 774-778, 1978.
- 4) Keck PJ, Hauser SD, et al: Science 246, 1309-1312, 1989.
- 5) Baffour R, Berman J, et al: J Vasc Surg 16, 181-191, 1992.
- 6) Blau HM, Banfi A, et al: Nat Med 7, 532-534, 2001.
- 7) 福山直人, 笠原啓史 他: 循環器科 51, 259-263, 2002.
- 8) Kullo JI, Simari DR, et al: Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 196-207, 1999.
- 9) Plautz G, Nabel EG, et al: Circulation 83, 578-583, 1991.

- 10) Forough R, Koyama N, et al: Circ Res 79, 812-820, 1996.
- 11) Chen L, Daum G, et al: Circ Res 82, 862-870, 1998.
- 12) Osborne WR, Ramesh N, et al: Proc Natl Acad Sci USA 92, 8055-8058, 1995.
- 13) Nabel EG, Plautz G, et al: Science 244, 1342-1344, 1989.
- 14) Messina LM, Podrazik RM, et al: Proc Natl Acad Sci USA 89, 12018-12022, 1992.
- 15) Wilson JM, Birinyi LK, et al: Science 244, 1344-1346, 1989.
- 16) Dichek DA, Anderson J, et al: Circulation 93, 301-309, 1996.
- 17) Flugelman MY, Virmani R, et al: Circ Res 70, 348-354, 1992.
- 18) Koh GY, Kim S-J, et al: The J Clinical Investigation 95, 114-121, 1995.
- 19) Barr E, Leiden JM, et al: Science 254, 1507-1509, 1991.
- 20) Lee RJ, Springer ML, et al: Circulation 102, 898-901, 2000.
- 21) Yau TM, Fung k, et al: Circulation 104(suppl I), I-218-I-222, 2001.
- 22) Suzuki K, Murtuza B, et al: Circulation 104(suppl I), I-207-I-212, 2001.
- 23) Lu Y, Shansky J, et al: Circulation 104, 594-599, 2001.
- 24) Campbell AIM, Zhao Y, et al: Circulation 104, 2242-2248, 2001.
- 25) Iwaguro H, Yamaguchi J, et al: Circulation 105, 732-738, 2002.
- 26) Tabata Y, Ikada Y: J Pharm 39, 698-704, 1987.
- 27) Kasahara H, Tanaka E, et al: Journal of the American College of Cardiology, in press.
- 28) Nagaya N, Horio T, et al: Circulation 106(suppl II), II-496, 2002.

参考図書

- BME vol 16. No. 2 特集 再生医療と ME の接点. 2002.
- 循環器科 vol 51, No.3 循環器内科学における先進治療. 2002.

藤井隆文 (ふじいたかふみ)

(国立循環器病センター研究所心臓生理部)

1997年 岡山大学医学部卒業

岡山大学医学部心臓血管外科入局

1999年 呉共済病院心臓血管外科

2000年 社会保険広島市民病院心臓血管外科

2001年 国立病院岡山医療センター心臓血管外科

2002年 国立循環器病センター研究所心臓生理部



再生医療とDDS

3. 遺伝子による血管新生

國本 聡, 笠原啓史, 福山直人, 田中越郎, 知久正明, 永谷憲歳
西上和宏, 岩畔英樹, 増田治史, 浅原孝之, 盛 英三

サマリー

1994年に行われた循環器領域における遺伝子治療開始以来, 次々にその有効性が報告されている。これら循環障害に対しての遺伝子治療は遺伝子治療全体のなかでもっとも良好な結果が得られているといっても過言ではないと思われる。近年, nakedプラスミドや骨髄単核球投与による血管新生療法も臨床において開始されており, 増え続ける虚血性疾患に対しての新たな治療法としての位置を確保しつつある。本稿においては, 新たな治療法として行われてきている遺伝子投与による血管新生療法の現況を概説し, われわれが開発中の生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法とCell/Gene Hybrid Therapyについても解説する。

再生医療の現状

Folkmanにより腫瘍発育に血管新生因子による新生血管が関与していることが示されて以来¹⁾, 分子生物学の発展に伴い血管形成の機序が徐々に明らかになってきた。悪性新生物における血管新生の抑制, または虚血に対しての血管新生療法の可能性を示唆する研究報告がなされるなか, 血管新生促進因子による血管新生(再生)を得ることで虚血性疾患の治療を行う「治療的血管新生(therapeutic angiogenesis)」の概念が誕生した²⁾。そして, 1994年に米国タフツ大学のJeffrey M. Isnerらにより, 循環器領域における世界初の遺伝子治療が行われた³⁾。その後も, それ以外の血管新生促進因子を用いた治療的血管新生の検討が行われてきている。

1. 血管新生促進因子

種々の血管新生促進因子による血管新生(angiogenesis)あるいは血管形成(vasculogenesis)が報告されている(表1)。以下にその主なものについて述べる。

1) FGF (fibroblast growth factor : 線維芽細胞増殖因子)

FGFファミリーはヘパリンに親和性の高いポリペプチドであり, aFGF (acidic FGF : 酸性FGF=FGF-1), bFGF (basic FGF : 塩基性FGF=FGF-2), int-2 (FGF-3), hst-1 (FGF-4), FGF-5がある。FGFは内皮細胞のみでなく線維芽細胞や平滑筋細胞を増殖させる働きがある。このことは毛細血管のみでなく細小動脈の新生をきたす可能性があるが, 増殖性病変形性の可能性もある。aFGF, bFGFに関しては分泌シグナルが付いていないためにその分泌機序は詳細が不明である。一方, int-2, hst-1はシグナルペプチドをもち分泌されるタンパク質であり, VEGF産生を促進するhst-1/FGF-4は血管新生療法においてより有効である可能性があり狭心症に対しての臨床試験でも有効性が報告されている⁴⁾。また, FGF-5は脈絡膜血管新生に関与しているとの報告がある。

2) VEGF (vascular endothelial growth factor : 血管内皮増殖因子)

1つの遺伝子から5種類のアイソフォーム(121, 145, 165, 189, 206アミノ酸)が産生され, PDGF

(platelet derived growth factor : 血小板由来増殖因子)-Aあるいは-Bと似た構造をしている。in vitroでは内皮細胞の増殖促進, アポトーシスの抑制, in vivoでは血管新生, 血管透過性はもちろん管腔形成促進, 内皮細胞の遊走, 凝固線溶系タンパク質の産生, 細胞接着分子の内皮細胞上への発現等を誘導する。VEGFはシグナルペプチドをもつため, 分泌されパラクリン的に血管内皮細胞に働き, 低酸素状態に反応して働くという大きな特徴がある。これは, VEGFの転写開始点よりも上流に結合するHIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α : 低酸素誘導因子1 α)を介しての転写亢進が関与している。VEGF関連遺伝子群としてPIGF (placenta growth factor : 胎盤由来増殖因子), VEGF-B, -C, -D, -Eも発見されその効果について検討がなされている。最近, 生物学的活性の強いVEGF₁₆₅に特異的に結合するneuropilin-1 (NP-1)が報告された⁵⁾。これは単独では活性を示さないが, 内皮細胞に発現させるとVEGF受容体に対する結合が約10倍に上昇し, 活性も同程度上昇することが示された。VEGFは内皮細胞に限局的に働くが, 透過性の増大による浮腫をきたす例が少なくない。

3) HGF (hepatocyte growth factor : 肝細胞増殖因子)

HGFは, 肝臓の再生因子として発見されたが, 腎臓, 肺, 消化管そして血管等さまざまな臓器に関与している。HGFは典型的なシグナル配列をもつため細胞から分泌され, 受容体であるc-Metが内皮細胞に存在することから, VEGFと同様に血管平滑筋細胞には影響を与えず, 内皮細胞のみを増殖させることが明らかになっている⁶⁾。HGFは虚血の状況下においてはその発現は著明に低下しており, VEGFとは異なる。しかし, 受容体であるc-Metの発現は増加しており, HGFを遺伝子導入することによりその不足分を補うことが可能となり, 結果としてVEGFと同様な治療効果を得ることができるとされている。現在, 臨床においての投与が開始されており, その有効性が報告されている。副作用としての浮腫はVEGFと異なり報告されていない。

4) その他の血管新生促進因子

プロスタグランジン (PGE₁, PGE₂)は血管拡張作用と血管新生作用をもち, 化学的安定化を図ったプロドラッグの報告がある⁷⁾。

炎症性サイトカインにはIL-1/6/8, TNF- α , イン

略 語

| | |
|--|---|
| FGF : fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子) | G-CSF : granulocyte colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子) |
| VEGF : vascular endothelial growth factor (血管内皮増殖因子) | GM-CSF : granulocyte-macrophage colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子) |
| PDGF : platelet derived growth factor (血小板由来増殖因子) | PGE ₁ , E ₂ : prostaglandin E ₁ , E ₂ |
| HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1 α (低酸素誘導因子1 α) | PD-ECGF : platelet derived-endothelial cell growth factor (血小板由来内皮細胞増殖因子) |
| PIGF : placenta growth factor (胎盤由来増殖因子) | TNF- α : tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子- α) |
| NP-1 : neuropilin-1 | EGF : epidermal growth factor (上皮成長因子) |
| HGF : hepatocyte growth factor (肝細胞増殖因子) | TGF- β : transforming growth factor- β (形質転換増殖因子) |
| PA : plasminogen activator | PAF : platelet-activating factor (血小板活性因子) |
| MMP : matrix metalloproteinase | ECK : epithelial cell kinase |
| PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule-1 | |

ターフェロン等があるが、これらは炎症に際してマクロファージ、好中球等から分泌される。血管新生に関与しているものとしてはIL-8とTNF- α がある。

IL-8はC-X-Cファミリーに属する α -ケモカインの1つで血管新生を誘導する⁸⁾。TNF- α は低濃度ではIL-8, VEGF, bFGFの細胞内での転写を亢進して血

○表1 血管新生促進因子

| | |
|--|---|
| VEGFファミリー | |
| <ul style="list-style-type: none"> • VEGF • VEGF-B (VEGF-related factor : VRF) • VEGF-C (VEGF-related protein : VRP) • VEGF-D (c-fos-induced growth factor : FIGF) • VEGF-E • PlGF (胎盤由来増殖因子) • HIF-1α (低酸素誘導因子) • neuropilin-1 (NP-1) | 本文参照 Flt-1と結合、内皮細胞増殖 リンパ管内皮細胞増殖、遊走促進、血管内皮細胞増殖、血管透過性亢進 血管内皮細胞増殖、心・肺・骨格筋 KDR/Flk-1とのみ結合、哺乳類では(-) 血管内皮増殖促進 低酸素により誘導、VEGF転写を誘導 KDR/Flk-1とVEGF ₁₆₅ 結合を修飾、内皮細胞遊走能亢進 |
| FGFファミリー | |
| <ul style="list-style-type: none"> • FGF-1 (aFGF) • FGF-2 (bFGF) • FGF-3/int-2 • FGF-4/hst-1 • FGF-5 | 本文参照 シグナル配列 (-) シグナル配列 (-) シグナル配列 (+) シグナル配列 (+)、VEGF産生促進 脈絡膜血管新生に関与 |
| HGF | |
| プロスタグランジン | |
| <ul style="list-style-type: none"> • PGE1 • PGE2 | |
| thymidine phosphorylase | |
| <ul style="list-style-type: none"> • PD-ECGF (血小板由来内皮細胞増殖因子) | 血管内皮細胞遊走能亢進 |
| サイトカイン | |
| Class I/II | |
| <ul style="list-style-type: none"> • IL-2, 15 • エリスロポエチン • G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) • GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) | 細胞増殖・走化性の亢進 |
| IL-8 | |
| TNF- α (腫瘍壊死因子- α) | 低濃度にてIL-8, VEGF, bFGF転写の亢進 |
| Fasリガンド (FasL) | |
| EGF (epidermal growth factor : 上皮成長因子) | |
| <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β (形質転換増殖因子) • PAF (血小板活性因子) | |
| 細胞間接着因子 | |
| <ul style="list-style-type: none"> • VEカドヘリン • PECAM-1 | |
| プロテアーゼ | |
| <ul style="list-style-type: none"> • PA (plasminogen activator) • MMP (matrix metalloproteinase) -2, 9 | 血管内皮から産生 線維芽細胞、マクロファージから産生 |
| アドレノメジュリン (AM) | |
| アンジオゲニン (血管増生因子) | RNA分解酵素と類似 |
| アンジオポエチン-1 | VEGFによる血管新生促進作用 |
| アンジオテンシンII | |
| B61 | ECK (epithelial cell kinase) のリガンド、TNF α により発現 |
| ヒスタミン | |
| HIV-1 Tat protein | KDRの活性化 |
| レプチン | 脂肪細胞から分泌インスリン感受性ホルモン |
| leukotriene C4 (LTC4) | |
| PDGF-BB (血小板由来増殖因子) | VEGF誘導 |
| $\alpha v \beta 3$ | インテグリン |

管内皮細胞の管腔形成を促進する等血管新生促進に働くが、高濃度では血管新生を抑制する⁹⁾。

内皮細胞の管腔形成を調節するため、PA (plasminogen activator), MMP (matrix metalloproteinase) といったプロテアーゼ, $\alpha v \beta 3$ といったインテグリン, VEカドヘリンとPECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) 等の細胞間接着因子が働いている。プロテアーゼは血管基底膜を融解し、内皮細胞は刺激方向への遊走を開始する。遊走の際にはインテグリンが細胞外マトリックスと接着する働きをもつ。細胞間接着因子は血管内皮細胞の管腔形成に関与している。

アンジオポエチン-1は造血幹細胞が無血管領域に進入して分泌され血管内皮細胞の遊走を誘導する¹⁰⁾。

虚血によりAT-1受容体の発現が亢進し、アンジオテンシンIIを追加することによりさらに血流改善を認めた¹¹⁾。

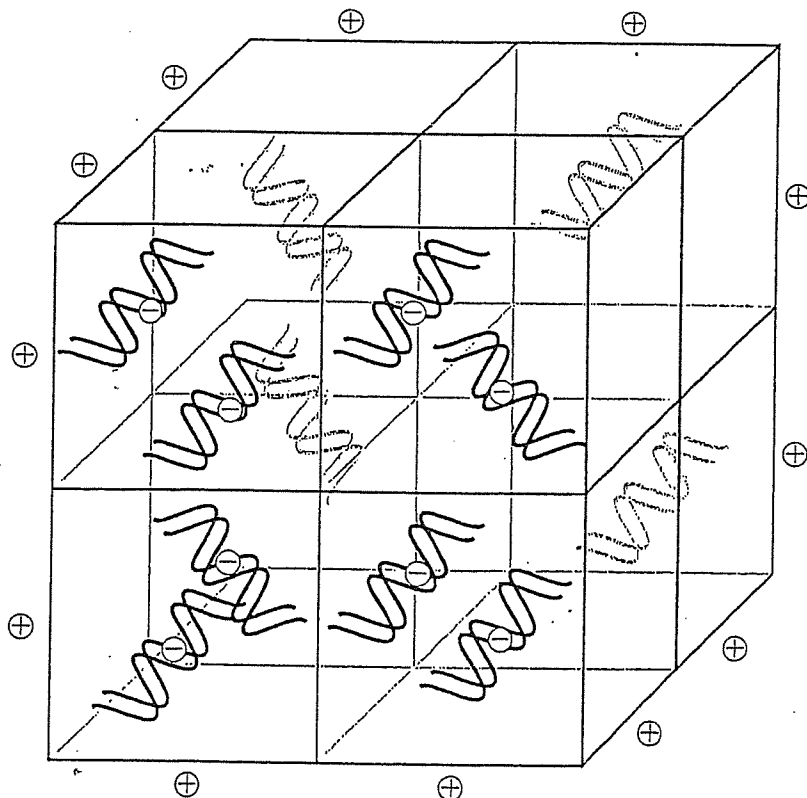
また、近年骨髄からの血管前駆細胞の動員を目的としたG-CSF, GM-CSFの投与によって虚血の改善が期待されている。

そして間接的あるいは直接的に血管新生を促進するアドレノメジュリン等数多くの因子が血管新生をきたすとの報告がある。

2. 遺伝子治療の方法・現状とその問題点

現在行われている遺伝子導入法としては、①プラスミドそのもの (nakedプラスミド)、②ウイルスベクターを用いる方法 (アデノウイルス、ヘルペスウイルス等)、③リポソーム法、④ハイドロゲル法といったものがあげられる。②は、遺伝子導入効率はよいもののウイルスによる感染の問題が指摘されており、安全性の問題から①のnakedプラスミドの筋肉内導入が行われることが多い。この方法はウイルスベクターを用いないので感染の危険性は低いものの、投与したプラスミドDNAが細胞内に導入される前に生体内に存在するさまざまな核酸分解酵素によって分解され、または組織内へ拡散してしまう可能性があり、有効な治療効果を得るには大量の遺伝子が必要となる。

以上の背景をふまえて、安全かつ有効な遺伝子導



○ 図1 生分解性ゼラチンの格子構造模式図

遺伝子はマイナスに荷電しており、プラスに荷電しているゼラチン内に取り込まれることにより安定となり、生体内の酵素の影響を受けにくくなる

入法として考案された生分解性ゼラチンを用いた新しい遺伝子導入法に関するわれわれの最近の知見を中心に、次世代の遺伝子治療について以下に述べていきたい。

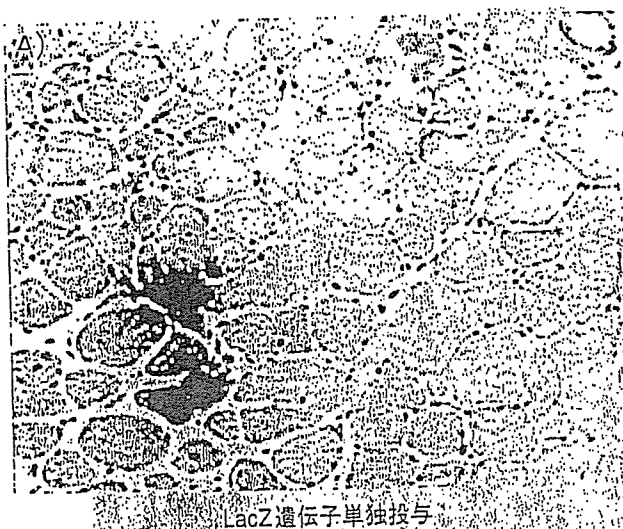
再生医療の最前線

1. セラチン-遺伝子複合体による遺伝子発現強化と徐放化

われわれはゼラチンの構造を格子状にして陰性荷電した遺伝子とイオンを結合させ、ゼラチン-遺伝子複合体を作製した(図1)。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内に封入して生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の代謝が緩徐となり、結果として安全かつ効率的に遺伝子を導入することができる。本法は安全性の問題が指摘されているウイルスベクターを用いずに済むということに加えて、ゼラチン自体も生体内でプロテアーゼにより分解されるという点で優れた方法であると考えられる。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飛躍的に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

の単独投与と比較して約10倍の増加が認められた。

次にわれわれは、家兔の下肢虚血モデルを用いてこのゼラチン-遺伝子複合体の治療効果を調べた。大腿動脈摘除後10日目に血管新生因子であるFGF-4やVEGF₁₆₅を虚血部位へ筋肉内投与した。動脈摘除後17日目においてLacZ遺伝子単独投与群では筋注部位にのみ発現を認める(図2A)が、ゼラチン-遺伝子複合体により投与した群では広い範囲に発現を認めている(図2B)。38日目において遺伝子非投与群と比較して通常の血管造影上有意な血管新生とこれに伴う血流量の有意な増加が観察された(図3)。遺伝子単独投与群とゼラチン-遺伝子複合体投与群の比較において既存の血管造影法では差異は認められなかった。マイクロスフェア法を用いた血流計測法(図4A)と放射光微小血管造影法(図4B)で両群の新生血管の血管拡張物質に対する反応性に有意な差異が確認された。遺伝子非投与群ではアデノシンあるいはアセチルコリンの投与による血管造影上の血管拡張(図4B)および血流量(図4A)の明らかな増大が観察された。一方遺伝子単独投与群では有意な増加が認められなかった。この事実は、ゼラチン-遺伝子複合体による治療群では血流制御能を伴う血管床の再生が実現されていることを示唆している。



○図2 家兔下肢虚血モデルの筋肉内LacZ発現(虚血作製後17日目、筋注後7日目)(巻頭カラー6参照)
LacZ単独投与(A)において刺入部のみに発現を認めているが、セラチンと複合体での投与例(B)では周囲組織内での発現を認めている