

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390326
 研究課題名 (和文)
 心筋血管再生治療のための新しい生体内遺伝子発現イメージング法の確立と応用
 研究課題名 (英文)
 Radionuclide reporter gene imaging for cardiac gene therapy.
 研究代表者
 犬伏 正幸 (INUBUSHI MASAYUKI)
 独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員
 研究者番号：70399830

研究成果の概要：近年、虚血性心疾患に対して、血管新生因子を発現する遺伝子を投与することによって血管を再生させる血管新生遺伝子治療の研究が活発に行われている。しかしこれまでは治療遺伝子の発現部位や量を生体内で確認することができず、治療効果を正確に評価することが困難であった。本研究では、治療遺伝子の発現を生体内で画像として捉える方法を確立し、さらに幹細胞/前駆細胞の細胞移植治療における移植細胞の追跡への応用を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：画像診断学 (含放射線診断学、核医学)、分子イメージング、レポーター遺伝子、再生医療、遺伝子治療、循環器、虚血性心疾患、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は現代人にとって癌と並ぶ脅威であり、特に難治性冠動脈疾患に対して、人為的に血管再生を誘導して虚血心筋を救済する血管再生治療法の確立が望まれている。心筋血管再生治療法には、虚血心筋に対して血管新生因子を持続的に補う血管新生遺伝子治療と、幹細胞や前駆細胞を移植して血管へと分化させる細胞移植治療があるが、いずれにおいても小動物 ex-vivo 実験とヒト in-vivo 臨床試験の間を橋渡しするトランスレーショナル研究 (小動物 in-vivo 実験) が欠

落し、生体内での十分なエビデンスが得られていないことが大きな問題となっている。

我々の究極の目標は、核医学 (分子イメージング) の手法を活用しながら、小動物生体内の生理的あるいは病的環境下における血管再生のメカニズムの解明に寄与するとともに、ヒトにおいて十分なエビデンスに基づいた血管再生治療法の開発と実施に貢献することである。

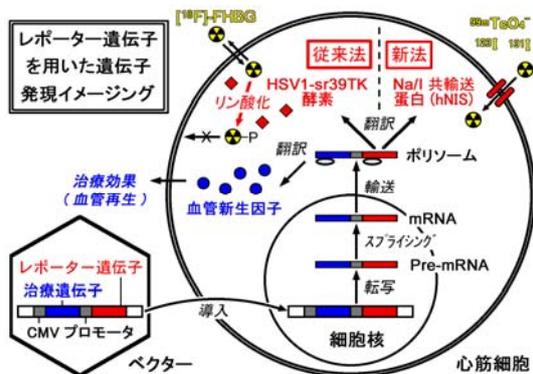
2. 研究の目的

本研究では、(1)小動物からヒトまで同一原理で適用可能な新しい生体内遺伝子発現イメージングの手法の確立、(2)ラットを用いた in-vivo 実験による現在日本で臨床試験が行われている血管新生遺伝子治療法の検証、(3)細胞移植治療における生体内移植細胞モニタリングへの応用を目的とし、そのために3段階の実験を行う。

3. 研究の方法

(1) 小動物からヒトまで同一原理で適用可能な新しい生体内遺伝子発現イメージングの手法の確立

測定しやすいタンパク質を産生する遺伝子のことをレポーター遺伝子と呼ぶが、本課題では、ヒト由来の Na⁺/I⁻共輸送蛋白 (hNIS) 遺伝子をレポーター遺伝子として、放射性ヨードや ^{99m}Tc をレポータープローブとして用いる(下図)。



まず、治療遺伝子として、肝細胞増殖因子 (HGF) をサブクローニングし、別々のサイトメガロウイルス (CMV) プロモータで制御される HGF 治療遺伝子と hNIS レポーター遺伝子を連結した遺伝子組換えアデノウイルス (Ad-CMV-HGF-CMV-hNIS) を作成する。培養細胞を用いた in vitro 実験として、Western blotting および ^{99m}Tc 集積試験を行い、NIS 発現量と HGF 発現量を評価するとともに、両者が相関することを確認する。

この間、小動物用 SPECT/CT 装置を用いて予備実験を行い、撮像条件の最適化を行う。

その後、Wistar ラット (10 週齢♂) に麻酔をかけて開胸下に左冠動脈前下行枝を結紮し、ラット心筋梗塞モデルを作製する。梗塞周辺心筋に直接 Ad-CMV-HGF-CMV-hNIS を注入する。3-5 日目に、^{99m}TcO₄⁻-SPECT により遺伝子発現を、¹⁸F-FDG-PET により心筋糖代謝を、^{99m}TcO₄⁻tetrofosmin-SPECT により心筋血流を評価する。

この実験を通じて、小動物用 SPECT/CT 装置の撮像条件について検討するとともに、小動物からヒトまで同一原理で適用可能な生体内遺伝子発現イメージングの手法を確立

する。

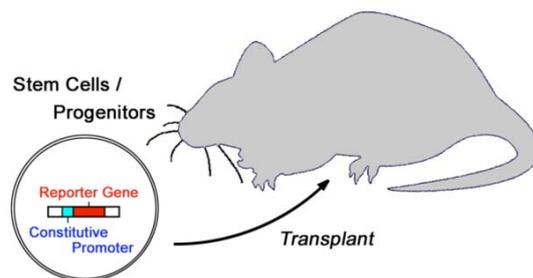
(2) ラットを用いた in-vivo 実験による現在日本で臨床試験が行われている血管新生遺伝子治療法の検証

実験(1)と同様に、ラット心筋梗塞モデルを作製し、梗塞周辺心筋に Ad-CMV-HGF-CMV-hNIS または陰性対照 Ad-CMV-hNIS を注入する。翌日、7.0T 小動物用 MRI 装置を用いてシネ MRI を撮像し、左室拡張末期容積 (EDV) および左室駆出率 (EF) を測定する。2 日目および 4 日目に、小動物用 SPECT/CT 装置を用いて、^{99m}TcO₄⁻-SPECT により遺伝子発現を、^{99m}TcO₄⁻tetrofosmin-SPECT により心筋血流を評価する。治療群と陰性対照群の間で梗塞サイズと遺伝子発現量がほぼ同じラットを選び出し、10 週間経過観察した上で、再度 MRI と SPECT/CT を実施する。実験の最後には、安楽死により屠殺して心臓を摘出し、細小動脈 (α-SMA) および毛細血管 (CD31) を検出する免疫蛍光染色に供する。また一部では、二光子蛍光顕微鏡を用いて、微小血管の 3 次元構造を観察する。

この実験を通じて、in vivo ラット生体内で治療遺伝子の導入・発現のエビデンスを確認した上で治療効果を判定し、新しい HGF 血管新生遺伝子治療法の検証を行う。

(3) 細胞移植治療における生体内移植細胞モニタリングへの応用

ラットから骨髄間葉系幹細胞を無菌的に抽出・培養して、Ad-CMV-hNIS を導入する。実験(2)と同様にラット心筋梗塞モデルを作成し、hNIS 安定導入骨髄幹細胞を用いて細胞移植を行う。その後、^{99m}TcO₄⁻-SPECT により生体内遺伝子発現イメージングを繰り返し行って移植細胞をモニタリングすることによって、移植細胞の遊走・生着のエビデンスを確認した上で治療効果を判定する(下図)。

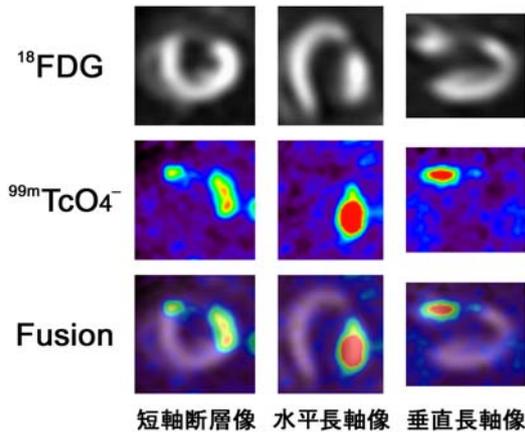


この実験を通じて、生体内移植細胞モニタリング法を確立し、幹細胞/前駆細胞が血管再生に関わるメカニズムについて検討し、今後の細胞治療 (および cell-based gene therapy) の可能性について探る。

4. 研究成果

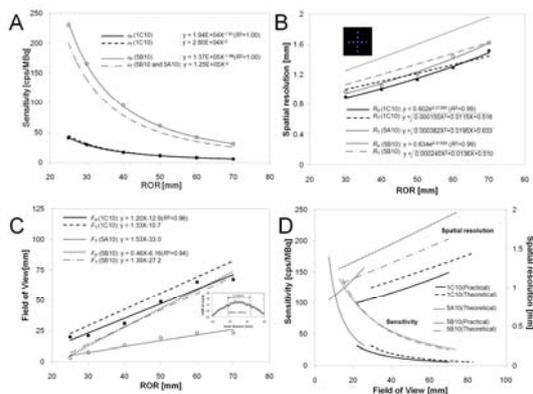
(1) 小動物からヒトまで同一原理で適用可能な新しい生体内遺伝子発現イメージングの手法の確立

Western blotting では、HGF と hNIS の発現レベルがアデノウイルス濃度 (MOI) の上昇とともに増加し、互いに有意な相関を示した ($r=0.93$)。 ^{99m}Tc 集積試験では、 ^{99m}Tc 集積が MOI の上昇に応じて、非導入細胞と比べて最大 582 倍まで増加し、遮断薬 KClO_4 によって ^{99m}Tc 集積も完全に阻害されることが示された。 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ SPECT では、導入された遺伝子の発現が局所トレーサ集積として明瞭に描出され、その部位は、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ tetrafosmin-SPECT による血流低下や ^{18}F FDG-PET による糖代謝障害の領域の辺縁であることが確認できた (下図)。従って、この hNIS レポーター遺伝子を用いた新しい生体内遺伝子発現イメージングの手法は、治療遺伝子の発現を非侵襲的にモニタリングすることによって HGF 血管新生遺伝子治療の有効性を評価するのに役立つと考えられた。



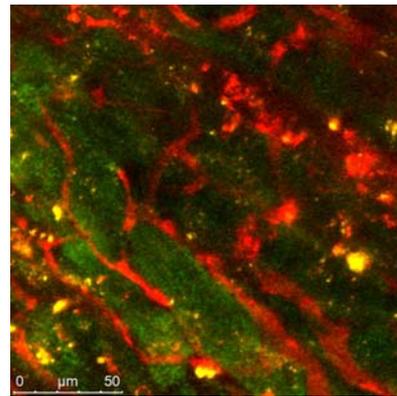
短軸断層像 水平長軸像 垂直長軸像

また、この間の小動物用 SPECT の撮像条件についての検討を通じて副次的に得られた、小動物用 SPECT 特有の単孔および多孔のピンホールコリメータの使い分けのための原理的指針についても、学会報告し論文投稿した。コリメータの性能を、従来のように回転半径の関数としてではなく、撮像視野の関数として表し、独自の選択指針を提唱した (下図)。



(2) ラットを用いた in-vivo 実験による現在日本で臨床試験が行われている血管新生遺伝子治療法の検証

梗塞範囲の大きさは、HGF 血管新生遺伝子治療を行った群でも陰性対照群でも、治療直後から経過観察後にかけて明らかな差は見られなかった。シネ MRI では、治療群でも陰性対照群でも 10 週間後に EDV も EF も増悪していることが示されたが、治療群の方が増悪の程度が弱い傾向が見られた。免疫蛍光染色で染まる細小動脈の数も両者で差は見られなかったが、毛細血管の数は治療群で有意に高かった。二光子蛍光顕微鏡では、治療群の心臓の梗塞辺縁部でのみ、極めて細い不整な血管の増生が見られた。以上のことから、HGF 遺伝子を単独で用いる血管新生遺伝子治療では、赤血球が流れないような未熟な血管しか新生できないということの直接的な証拠が得られた。これによって、確かに毛細血管は増生するが、心機能は改善しないという他の結果も説明できる。これまで、基礎研究分野では良好な結果が得られていたにもかかわらず、臨床研究では有効性の確たる証拠が



得られなかったが、本研究はそのギャップを埋める有力な情報を提供したと考える。

(3) 細胞移植治療における生体内移植細胞モニタリングへの応用

ラットから骨髄間葉系幹細胞を無菌的に抽出・培養したところ、およそ 8 回の継代で増殖能が明らかに落ちることが分かったため、Ad-CMV-hNIS を導入することが困難であることが判明した。そこで hNIS を全身的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、抽出した段階ですでに hNIS が導入されている骨髄間葉系幹細胞を得ようと試みたため、残念ながら健康な胎仔を得ることができなかった。

本課題で研究を行った NIS を用いた生体内遺伝子発現イメージングは日本初であるが、欧米からの報告も急増している。本研究課題からも様々な派生的研究、発展的研究が見込まれる。本研究成果を基盤として、さらなる工夫や新たな切り口を加えて、国際的に互する研究へと繋げていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 4 件)

- ① Inubushi M, Tamaki N: Radionuclide reporter gene imaging for cardiac gene therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34:S27-S33, 2007. Peer reviewed.
- ② 犬伏正幸, 金永男, 玉木長良: 次世代の画像診断 - 心筋レポーター遺伝子イメージングでここまで可視化できる. *Vascular Medicine* 3: 249-253, 2007 年. Non-reviewed.
- ③ 犬伏正幸, 久下裕司, 塚本隆裕, 納谷昌直, 森田浩一, 玉木長良: 新しい心臓核医学イメージング - 北海道大学での取り組み -. *動態核医学* 24: 1-6, 2007 年. Non-reviewed.
- ④ Inubushi M, Yoshinaga K, Morita K, Tamaki N: Myocardial reporter gene expression imaging. *Nippon Rinsho* 65:308-313, 2007. Non-reviewed.
- ⑤ 犬伏正幸, 玉木長良: 循環器の分子イメージング, *BIO Clinica* 21: 36-41, 2006 年. Non-reviewed.
- ⑥ 犬伏正幸, 玉木長良: 核医学検査による心不全の評価, *医学のあゆみ* 216:1151-1156, 2006 年. Non-reviewed.
- ⑦ 犬伏正幸: 遺伝子発現イメージング, *日本心臓核医学会ニュースレター* 8: 6-7, 2006 年. Non-reviewed.
- ⑧ 犬伏正幸, 玉木長良: 血管新生遺伝子治療における遺伝子発現モニタリングのための心筋PETレポーター遺伝子イメージング, *循環器専門医* 14: 49-54, 2006 年. Non-reviewed.
- ⑨ 犬伏正幸: 心筋血管再生治療のための分子イメージング: レポーター遺伝子を用いた核医学イメージング, *医学のあゆみ* 216: 137-143, 2006 年. Non-reviewed.

[学会発表] (計 5 3 件)

- ① Inubushi M, et al: Ideata-base: an intelligent database management system of a body of knowledge. *Radiological Society of North America Annual Meeting* 2009, Chicago, 2009.11.29-12.4.
- ② 犬伏正幸, 他: 低酸素PETイメージングによる放射線治療抵抗性評価への取り組み. 第 45 回日本医学放射線学会秋季臨床大会, 和歌山, 2009.10.29-31.
- ③ Inubushi M, et al: Practical performance evaluation of a commercial small animal SPECT system with a single-pinhole or 5-hole collimator. *Annual Congress of the European*

Association of Nuclear Medicine '09, Barcelona, 2009.10.10-14.

- ④ Murai C, Inubushi M, et al: Radionuclide reporter gene imaging of mouse xenograft model of human colon cancer cell lines stably expressing human sodium-iodide symporter (hNIS). *Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine '09*, Barcelona, 2009.10.10-14.
- ⑤ 犬伏正幸, 他: 単孔または 5 孔のピンホールコリメータを装着した小動物用 SPECT システムの実用性能評価. 第 49 回日本核医学会学術総会, 旭川, 2009.10.1-3.
- ⑥ 村井知佳, 犬伏正幸, 他: ヒト Na⁺/I⁻ 共輸送蛋白 (hNIS) 遺伝子安定発現大腸癌細胞株マウス担癌モデルのレポーター遺伝子イメージング. 第 49 回日本核医学会学術総会, 旭川, 2009.10.1-3.
- ⑦ 村井知佳, 犬伏正幸, 他: ヒト Na⁺/I⁻ 共輸送蛋白 (hNIS) 遺伝子を利用した新しい癌の in vivo イメージング法の開発. 第 33 回日本頭頸部癌学会学術集会, 札幌, 2009.6.11-12.
- ⑧ Inubushi M, et al: Assessment of hypoxia-responsive elements for hypoxia-targeting imaging and therapy. *Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine '08*, October 11-15, 2008, Munich, Germany.
- ⑨ Inubushi M, et al: Na/I symporter (NIS) reporter gene imaging system for evaluating angiogenic gene therapy using hepatocyte growth factor (HGF). *The 1st World Molecular Imaging Congress*, September 10-13, 2008, Nice, France.
- ⑩ 犬伏正幸, 他: 低酸素遺伝子イメージングのためのレポーターベクターの開発. *日本分子イメージング学会 第 4 回学会総会・学術集会*, 2008 年 5 月 23 日, 大宮.
- ⑪ 金永男, 犬伏正幸, 他: ラット心筋梗塞モデルにおける肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた血管新生遺伝子治療のための Na/I 共輸送蛋白 (NIS) レポーター遺伝子イメージング. *日本分子イメージング学会 第 4 回学会総会・学術集会*, 2008 年 5 月 22 日, 大宮.
- ⑫ 犬伏正幸: 核医学による遺伝子治療・再生医療の評価. *日本放射線技術学会 第 64 回総会学術大会*, 2008 年 4 月 4 日, 横浜.
- ⑬ Inubushi M: Optical and radionuclide reporter gene imaging for cardiovascular regeneration therapy. *The 72nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*, March 30, 2008, Fukuoka.

- ⑭ Inubushi M, et al: Molecular Imaging in Heart Failure. The 11th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society, September 9, 2007, Urayasu.
- ⑮ Lee KH, Bom HS, Inubushi M: Molecular Imaging Seminar - Lesding Edge in Cardiovascular Molecular Imaging (Invited Lecture). The 1st Congress of Asian Society of Cardiovascular Imaging, April 28, 2007, Seoul, Korea.
- ⑯ Inubushi M, et al: Molecular Imaging for Cardiac Neuronal Transmission (Invited Lecture). The 1st Congress of Asian Society of Cardiovascular Imaging, April 28, 2007, Seoul, Korea.
- ⑰ 犬伏正幸, 他: PETによる心筋viabilityの評価. 日本医学放射線学会 第66回学術集会, 2007年4月14日, 横浜.
- ⑱ Inubushi M, et al: Beta-adrenergic receptor imaging (Invited Lecture). Korean Society of Nuclear Medicine Spring Meeting, April 4, 2006, Jeon-ju, Korea.

[図書] (計8件)

- ① 犬伏正幸, 金永男. 編集幹事: 石田隆行, 桂川茂彦, 藤田広志, 担当編集: 片渕哲朗. オーム社. 「医用画像ハンドブック」第5編 核医学画像, 第10章 分子イメージング. 印刷中.
- ② 犬伏正幸, Aung Winn. 監修: Jagat Narula, 今泉勉, 編集: 田原宣広. 永井書店. 「心・血管病の分子イメージング」第IV章 分子イメージングの基礎, 5. 遺伝子発現. 印刷中.
- ③ Tamaki N, Kuge Y, Inubushi M. Iodinated fatty acid imaging. In: "Nuclear Cardiac Imaging: Principles and Applications" 4th Ed. Edited by Iskandrian AE, Garcia EV. Oxford University Press. 2008. pp. 462-476.
- ④ 犬伏正幸, 孫田恵一. 編集: 日本核医学技術学会出版委員会. 山代印刷. 「核医学技術総論」第2章 PETの臨床, 第2節 心筋. 2008年. pp. 408-416.
- ⑤ 犬伏正幸, 金永男. 編集: 佐治英郎, 田畑泰彦. メディカルドゥ. 遺伝子医学MOOK 9号 「ますます広がる分子イメージング技術」 第3章 1. 1) 遺伝子治療・細胞治療の分子イメージング. 2008年. pp. 272-278.
- ⑥ 玉木長良, 吉永恵一郎, 犬伏正幸. 編集主幹: 伊藤正敏. 先端医療技術研究所. 「臨床医のためのクリニカルPET -病期・病態診断のためのガイドブック-」 PETによる病態診断, 2007年, pp. 211-215.
- ⑦ 玉木長良, 森田浩一, 犬伏正幸. 編集: 松

森昭. メジカルビュー. 「新・目でみる循環器病シリーズ15 心筋症」IV. 肥大型心筋症/診断, 核医学検査, 2007年, pp. 132-137.

- ⑧ 玉木長良, 森田浩一, 犬伏正幸. 監修: 今泉勉, 編集: 古賀義則. 日本医事新報社. 「肥大型心筋症ハンドブック Life-long diseaseとしてのマネジメント」 5章 臨床所見, 7. 核医学検査, 2007年, pp. 139-144.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬伏 正幸 (INUBUSHI MASAYUKI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・
分子イメージング研究センター・研究員
研究者番号: 70399830

(2) 研究分担者

玉木 長良 (TAMAKI NAGARA)

北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30171888

森田 浩一 (MORITA KOICHI)

北海道大学・医学研究科・講師
研究者番号: 20210172

志賀 哲 (SHIGA TOHRU)

北海道大学・医学研究科・助手
研究者番号: 80374495

鐘ヶ江 香久子 (KANEGAE KAKUKO)

北海道大学・大学病院・医員
研究者番号: 30326855

井上 哲也 (INOUE TETSUYA)

北海道大学・大学病院・医員
研究者番号: 10431363

岡本 祥三 (OKAMOTO SHOZU)

北海道大学・大学病院・医員
研究者番号: 20431364

平田 健司 (HIRATA KENJI)

北海道大学・大学病院・医員
研究者番号: 30431365

吉永 恵一郎 (YOSHINAGA KEIICHIRO)

北海道大学・医学研究科・特任助手
研究者番号: 30435961

(3) 研究協力者

畠山 昌則 (HATAKEYAMA MASANORI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号: 40189551