

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590993
 研究課題名（和文）センダイウイルスベクターを用いた脳微小血管構築を標的とする
 脳梗塞遺伝子治療の研究
 研究課題名（英文）Gene therapy with Sendai virus vector tgeting for microcirculatory
 construct in brain infarction
 研究代表者
 大星 博明（Oboshi Hiroaki）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：10311838

研究成果の概要：齧歯類の実験的脳虚血モデルを用い、脳虚血作製後の治療開始であっても、可溶性 Flt-1 の遺伝子導入が血管透過性亢進の著明な阻害作用を示し、脳浮腫ならびに脳梗塞を軽減することを明らかにした。また、国産の遺伝子導入ベクターであるセンダイウイルスベクターを用いた脳への遺伝子導入がアデノウイルスベクターと同様の有効性を示すことを認めた。脳虚血部位における微小血管構築の破綻と血管透過性亢進に対する保護作用が期待され、国産技術による臨床的な遺伝子治療の開発につながる成果が得られたと考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：遺伝子治療、ベクター、脳梗塞、遺伝子導入、脳虚血、血管透過性

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えてますます臨床的な重要性を増している脳血管障害であるが、その後遺症を軽減する画期的な治療法は未だ開発されていない。近年脳梗塞の形成過程における分子機構・シグナル伝達が明らかになりつつあるが、なかでも vascular endothelial growth factor (VEGF) は脳梗塞急性期の梗塞領域で発現が亢進し、血管構築破綻との関与が示唆されつつある。また、脳梗塞急性期に生じる脳浮腫はしばしば致命的な合併症となるが、VEGF は脳虚血 6 時間後から発現して 24 時間後をピークとし、

7 日後まで発現すると報告され、血管内皮増殖作用の他に、著明な血管透過性亢進作用を有しており、脳浮腫を修飾している可能性がある。VEGF 投与が脳浮腫と脳梗塞に対して保護効果を示すとの報告 (Hayashi et al: J CBF Metab 1998) がある一方で、血液脳関門の破綻を生じて両者を増悪させるとの報告 (Zhang et al: J Clin Invest 2000) もあり、脳梗塞急性期における VEGF の役割は未だ明らかではない。

申請者はこれまでに、脳梗塞に対する新規治療法としての遺伝子治療の可能性を検討してきており、これまでの検討で、脳虚血後の導入であっても抗アポトーシス作用を有する midkine

(Takada et al: Gene Ther 2005) や広範な抗炎症作用を有する interleukin-10 (Ooboshi et al: Circulation 2005) などの遺伝子導入が脳梗塞を著明に縮小することを明らかとし、従来の薬物療法に比較して、画期的な治療効果を発揮していることを報告してきた。そこで本研究では、新たな遺伝子導入ベクターを用いた遺伝子治療が、重症脳梗塞の増悪において重要な役割を果たしていると考えられる血管構築破綻を抑制し、そのシグナル伝達が治療標的となりうるか否かを明らかとすることを目的とした。

遺伝子治療における最も重要な因子は、遺伝子導入ベクターである。これまでに各種のベクターが開発されているが、多くは海外で開発され、特許も海外の施設が有するものを用いた研究が大部分である。本研究では、これまで我々の施設で用いてきたアデノウイルスベクターと、国産ベクターであり細胞質型 RNA ベクターとしてその発展が期待されているセンダイウイルス(SeV)ベクターを用い(図1)、その導入が十分検討され

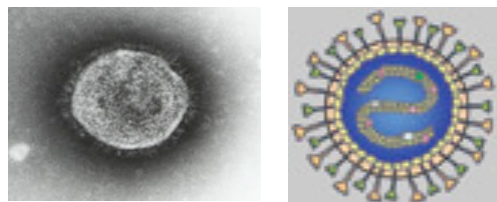
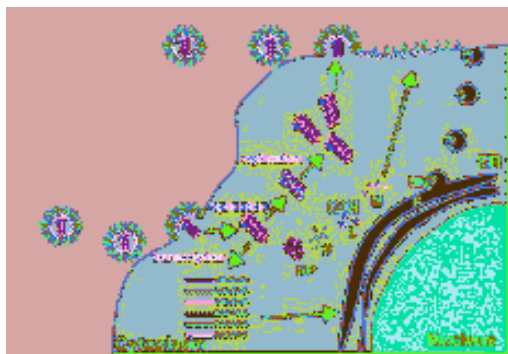


図1 センダイウイルスベクター

ていない脳血管や脳組織を対象として臨床的な有用性に関する検討を行い、国産技術による遺伝子治療の開発を目指したものである。

2. 研究の目的

本研究で新たに遺伝子導入に用いる SeV ベクターは、従来のベクター と比べて、導入効率が極めて高く(マウス肺では、数千倍～数万倍)、ベクター投与量を少なくできる可能性がある。また、短時間の細胞との接触で十分量の遺伝子導入ができ、血管内皮細胞には 5 分以内での導入が可能とされている。しかしながら、SeV ベクターが脳梗塞に対して応用可能か否かは未だ十分検討されておらず、本研究では我々の施設で従来用いてきたア

デノウイルスベクターとの比較を行うことで、指摘投与方法や導入効率、安全性に関する検討を行った。

また、脳梗塞の病態における微小血管構築の重要性ならびに治療標的としての意義を探索するため、強力な vascular permeability factor でもある VEGF ならびにその下流シグナルの阻害を遺伝子導入により行った。すなわち、VEGF の拮抗因子 soluble Flt-1 (sFlt-1)をベクターにより遺伝子導入し、血管透過性ならびに脳浮腫、脳梗塞、神経機能を解析するとともに、臨床に応用できる遺伝子治療としての可能性を探索した。sFlt-1 は VEGF receptor 1 (Flt-1) の遊離型 splicing variant であり(図2)、それ自体は膜通過ドメインを有さず、VEGF との結合能を有することから VEGF の特異的抑制作用を示す。

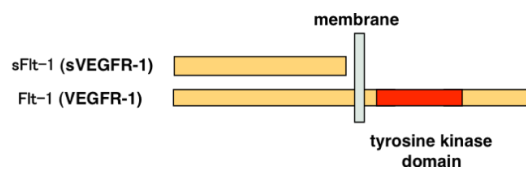


図2 soluble Flt-1 と VEGFR-1 の構造

したがって、今回の研究では、脳梗塞に対する sFlt-1 遺伝子導入の治療効果とともに、脳虚血における VEGF 受容体の下流シグナルに関する新たな知見が得られると考えている。

3. 研究の方法

脳虚血の作製には、当研究室で開発したクリプトンレーザー照射による血栓性中大脳動脈閉塞モデル (Stroke 1996)を用いた(図3)。

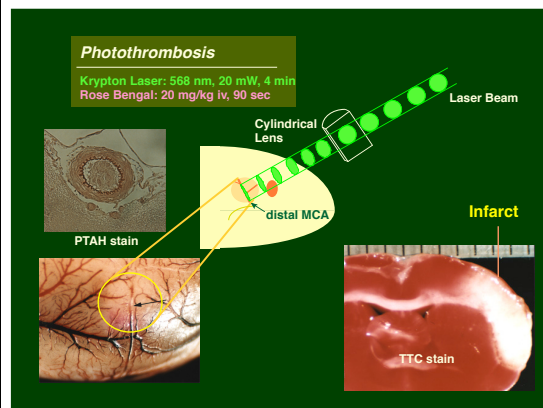


図3 血栓性中大脳動脈閉塞モデル

本モデルは局所での血栓形成を利用するため、臨床的な脳梗塞の病態に類似し、かつ、再現性の良い梗塞巣の作製が可能であり、臨床応用を念頭に置いた in vivo モデルでの遺伝子治療の有効性を検討しうる。

近年遺伝子導入による虚血性神経細胞障害の有効性が基礎実験で示されつつあるが、

あらかじめ遺伝子が導入された状態で脳虚血保護効果を検討したものが多く、脳虚血発症後に開始された遺伝子導入によって脳梗塞への治療効果を示した成績は少ない。本研究では、脳虚血発症後に治療効果が期待される遺伝子を導入し、臨床応用の可能性を検討した。これまでの検討に基づき(Kumai Y et al, JCBFM 2004; Ooboshi H et al, Circulation 2005)、脳虚血作製後 90 分の時点で、側脳室内に遺伝子導入ベクターを投与し、脳室壁に導入遺伝子を発現することで、治療効果を検討した。

我々はすでに sFlt-1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作製しており、まずこのベクターを用いて脳虚血作製後に sFlt-1 遺伝子を脳室内に導入し、sFlt-1 遺伝子導入の治療効果を検討した。

VEGF は浮腫誘発因子として知られ、脳虚血組織においては血液脳関門の破綻による組織障害作用が報告されているとともに、脳虚血後早期に認められる単球/マクロファージの浸潤に関与している可能性が示唆されている。本研究では VEGF 受容体の下流シグナルの活性化を分子生物学的手法を用いて明らかとし、focal adhesion kinase などの血管構築や血管透過性に関与するとされる因子の動態と治療標的としての意義を探索した。また、懸念される血管新生に及ぼす影響を分子生物学的ならびに免疫組織学的手法を用いて解析した。

本研究で用いる SeV ベクターに関しては、ディナベック社において標識遺伝子である β ガラクトシダーゼならびに sFlt-1 を組み込んだベクターを調整した。アデノウイルスベクターと本ベクターを用いて、脳室内投与による遺伝子導入の有効性・安全性に関する基礎的検討を行った。

4. 研究成果

sFlt-1 遺伝子導入による血管透過性亢進抑制効果

アデノウイルスベクターに VEGF 受容体の natural splicing variant である sFlt-1 を組み込み、脳虚血後 90 分の時点でベクターを側脳室内に投与して脳室壁に遺伝子導入を行うと、虚血組織の血管における VEGF 受容体の下流シグナル focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化が著明に抑制された(図4)。

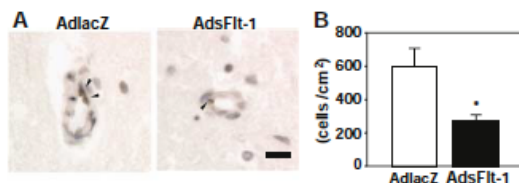


図4 Focal adhesion kinase のリン酸化

また、虚血1日後の脳浮腫および脳梗塞容積の有意な縮小効果が認められた(図5)。この脳梗塞の縮小効果は虚血7日後においても持続していた。

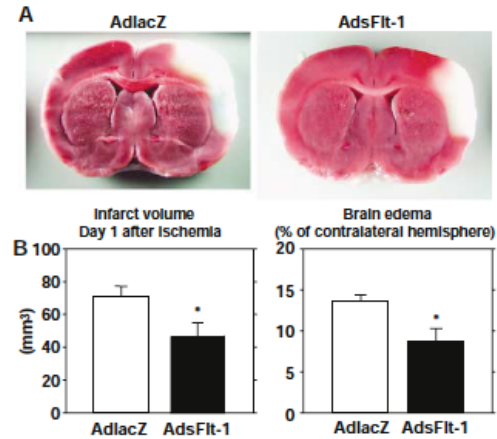


図5 脳浮腫および脳梗塞への効果
TTC 染色による評価

また、脳虚血1日後および7日後の梗塞巣への単球・マクロファージの浸潤は有意に抑制された(図6)。

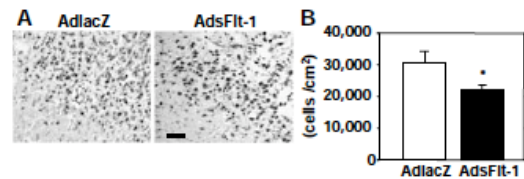


図6 梗塞巣への炎症細胞浸潤

一方、sFlt-1 の過剰発現は導入7日後でも認められたが、同時期における血管新生に対する抑制作用は認められなかった(図7)。

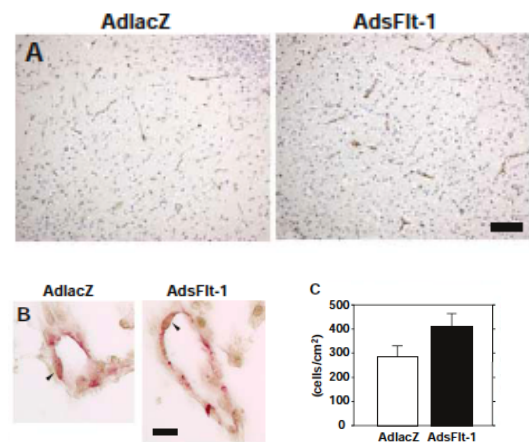


図7 血管新生への影響
vWF と Ki67 の二重染色による評価

さらに、脳梗塞急性期における血管透過性の亢進に対する効果を Evans Blue を用いた漏出現象で評価すると、脳虚血1日後の血液

脳関門の破綻は、sFlt-1 導入により著明に (70%) 軽減した(図8)。

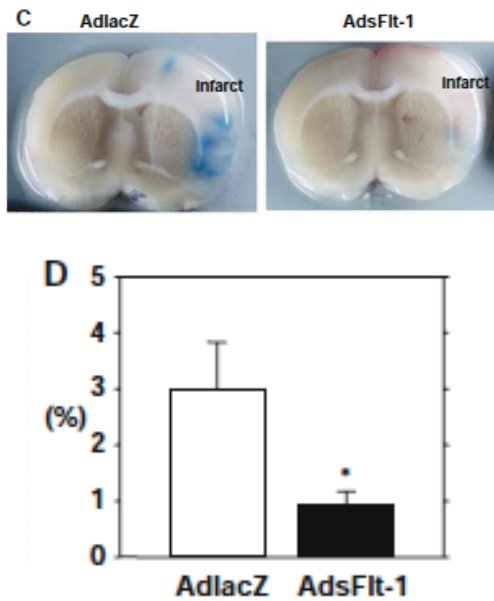


図8 血管透過性軽減効果

今回の検討から、VEGF シグナルが neurovascular protection の重要な機構であることが判明したが、種々のシグナルが脳梗塞における血管透過性の亢進に関与しており、今後さらに微小血管構築の障害に関与する分子機構の検討が必要である。

次に、SeV ベクターの脳梗塞に対する有用性を検討するために、標識遺伝子 (β ガラクトシダーゼ) および sFlt-1 を SeV ベクターに組み込んで脳室内に投与し、発現様式を検討した。遺伝子導入1日後の標識遺伝子の発現は、脳室壁に良好に認められた(図9)。

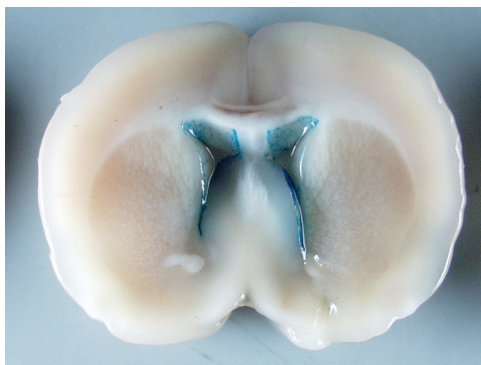


図9 SeVによる脳室壁への遺伝子導入

また、導入遺伝子発現の時間経過を ELISA 方によって脳脊髄液中の sFlt-1 量で検討すると、発現のピークはアデノウイルスベクターでは1日後であるのに対し、SeV では導入4日後にかけてさらに上昇し、1週間後にも発現が維持されており、脳虚血急性期の治療への応

用に適していることが示唆された(図10)。

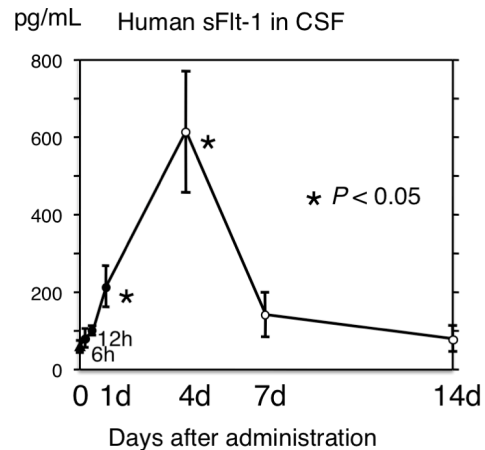


図10 SeVによるsFlt-1の遺伝子導入

今回、国産ベクターであり細胞質型RNAベクターとしてその発展が期待されているSeVベクターを用い、脳内に遺伝子導入を行うと、脳室壁および脳脊髄液中に良好な導入を示し、脳梗塞に対する遺伝子治療ベクターとしての有用性が示された。今後さらに血管系を介した遺伝子導入やex vivo導入による細胞療法などの有効性を検討することで、脳虚血部位におけるneurovascular unit、すなわち微小血管構築の破綻と血管透過性亢進に対する治療の有用性が明らかとなり、国産技術による臨床的な遺伝子治療の可能性を追求できると考えられる。

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 10 件)

1. Nakamura K, Kamouchi M, Kitazono T, Kuroda J, Shono Y, Hagiwara N, Ago T, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M: Amiloride inhibits hydrogen peroxide-induced Ca²⁺ responses in human CNS pericytes. *Microvasc Res* 77: 327-34, 2009
2. Hagiwara N, Kitazono T, Kamouchi M, Kuroda J, Ago T, Hata J, Ninomiya T, Ooboshi H, Kumai Y, Yoshimura S, Tamaki K, Fujii K, Nagao T, Okada Y, Toyoda K, Nakane H, Sugimori H, Yamashita Y, Wakugawa Y, Kubo M, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Ibayashi S, Iida M; Fukuoka Stroke Registry; Hisayama study:

- Polymorphism in the sorbin and SH3-domain-containing-1 (SORBS1) gene and the risk of brain infarction in the Japanese population: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Eur J Neurol* 15: 481-486, 2008
3. Hagiwara N, Kitazono T, Kamouchi M, Kuroda J, Ago T, Hata J, Ninomiya T, Ooboshi H, Kumai Y, Yoshimura S, Tamaki K, Fujii K, Nagao T, Okada Y, Toyoda K, Nakane H, Sugimori H, Yamashita Y, Wakugawa Y, Kubo M, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Ibayashi S, Iida M: Polymorphisms in the lymphotoxin alpha gene and the risk of ischemic stroke in the Japanese population. The Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama Study. *Cerebrovasc Dis* 25: 417-422, 2008
 4. Nakamura K, Kamouchi M, Kitazono T, Kuroda J, Matsuo R, Hagiwara N, Ishikawa E, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M: Role of NHE1 in calcium signaling and cell proliferation in human CNS pericytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1700-H1707, 2008
 5. Kumai Y, Ooboshi H, Ago T, Ishikawa E, Takada J, Kamouchi M, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M: Protective effects of angiotensin II Type 1 receptor blocker on cerebral circulation independent of blood pressure. *Exp Neurol* 210: 441-448, 2008
 6. Ifuku M, Färber K, Okuno Y, Yamakawa Y, Miyamoto T, Nolte C, Merrino VF, Kita S, Iwamoto T, Komuro I, Wang B, Cheung G, Ishikawa E, Ooboshi H, Bader M, Wada K, Kettenmann H, Noda M: Bradykinin- induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca²⁺ influx via reverse-mode activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci* 27: 13065-13073, 2007
 7. Kuroda J, Kitazono T, Ago T, Ninomiya T, Ooboshi H, Kamouchi M, Kumai Y, Hagiwara N, Yoshimura S, Tamaki K, Kusuda K, Fujii K, Nagao T, Okada Y, Toyoda K, Nakane H, Sugimori H, Yamashita Y, Wakugawa Y, Asano K, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Ibayashi S, Iida M: NAD(P)H oxidase p22phox C242T polymorphism and ischemic stroke in Japan: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Eur J Neurol* 14: 1091-1097, 2007
 8. Kamouchi M, Kitazono T, Ago T, Wakisaka M, Kuroda J, Nakamura K, Hagiwara N, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M: Hydrogen peroxide-induced Ca(2+) responses in CNS pericytes. *Neurosci Lett* 416: 12-16, 2007.
 9. Ota K, Kitazono T, Ooboshi H, Kamouchi M, Katafuchi T, Aou S, Yamashita Y, Ibayashi S, Iida M: Role of substantia innominata in cerebral blood flow autoregulation. *Brain Res* 1135: 146-153, 2007
 10. Kumai Y, Ooboshi H, Ibayashi S, Ishikawa E, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T, Egashira K, Iida M: Postischemic gene transfer of soluble Flt-1 protects against brain ischemia with marked attenuation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1152-1160, 2007
- [学会発表] (計 7 件)
1. 大星博明: Neurovascular Protection を目指した遺伝子治療. <シンポジウム 脳卒中の先端治療研究 -臨床への道-> 第 32 回日本脳卒中学会総会. 2009. 3. 20, 島根
 2. 大星博明: 脳梗塞に対する遺伝子治療の展望. <シンポジウム 脳虚血における脳保護・再生> 第 20 回日本脳循環代謝学会総会. 2008 年 11 月 6 日, 東京
 3. Ooboshi H, Ishikawa E, Kumai Y, Takada J, Nakamura K, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M: Neuroprotection and neurogenesis by post-ischemic gene transfer of midkine. 6th World Stroke Conference 2008. 9. 26, Vienna, Austria.
 4. 石川英一, 大星博明, 熊井康敬, 中村晋之, 萩原のり子, 黒田淳哉, 鴨打正浩, 北園孝成, 井林雪郎, 飯田三雄: 脳虚血後のテルミサルタン投与は降圧作用を介さずに出血性梗塞を抑制する. 第 33 回日本脳卒中学会総会. 2008. 3. 20, 京都
 5. Ishikawa E, Ooboshi H, Kumai Y, Takada J, Ibayashi S, Iida M: Augmentation of neurogenesis by post-ischemic gene transfer of midkine. CSHL Conference In Vivo Barrier to Gene Delivery, Cold Spring Harbor, 2007, 11
 6. Ooboshi H, Ishikawa E, Kumai Y, Takada J, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M: Neurovascular protection of brain infarction by postischemic gene transfer. 2nd Meeting of Asian Stroke Forum, Kyoto, 2007, 9
 7. Ooboshi H: Neuroprotective role of CCB up-to-date. International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2007. 5. 22, Osaka
- [図書] (計 1 件)
1. Ooboshi H, Ishikawa E, Kumai Y, Shichita T, Takada J, Ibayashi S: Research Signpost: Potentials of gene therapy for neuroprotection and neurogenesis in brain ischemia. *Recent Advances in Neurogenesis, Neuroregeneration and Neuroprotection*. in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大星 博明 (Ooboshi Hiroaki)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10311838

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし