

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790901

研究課題名（和文） 深部静脈血栓症予防に対する局所遺伝子導入の検討

研究課題名（英文） The local gene transfer for prevention of deep vein thrombosis

研究代表者

古小路 英二（FURUKOUJI EIJI）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00423723

研究成果の概要（和文）：深部静脈血栓症の発症予防には抗凝固療法などの対策が有効であるが、出血などの副作用により十分な対策が取れない場合も少なからず存在する。本研究では、組換えアデノウイルスを用いた遺伝子導入により静脈壁でフォンビルブランド因子切断酵素を持続的に高発現させ、局所での血栓形成を抑制することを検討した。この結果、局所への遺伝子導入により、ラットの静脈血栓モデル血管において目的蛋白の持続的発現が確認され、抗血栓効果の可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：Anticoagulation is the usual treatment for deep vein thrombosis. But excessive or spontaneous bleeding may be a side effect of anticoagulation. The present study examines whether vWF-CP suppress platelet aggregation and thrombus formation after adenovirus-mediated gene transfer to venous wall. Conclusion; The local expression of vWF-CP in rat inferior vena cava might prevent venous thrombosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：深部静脈血栓症、遺伝子導入、静脈、vWF-CP

## 1. 研究開始当初の背景

深部静脈血栓症の治療に携わってきた経験から、発症予防、特に周術期における発症予防の重要性が痛感される。抗凝固療法やストッキングなど十分な対策が可能である場合では発症予防が期待できる。ところが出血性疾患の合併や下肢麻痺など十分な対策が

取れない場合も少なからず存在し、肺塞栓症という重篤な合併症を来すことが危惧されている。

本研究では、これまで遺伝子導入の手技を用いて血管壁における持続的な蛋白発現を検討した経験に基づいて、静脈血栓の予防が可能である点に着目した。遺伝子組換えアデ

ノウイルスを用いた遺伝子導入では、血管壁において蛋白発現が見られるのは一般的に 1～2 週間である。したがって、周術期静脈血栓症の予防においては、局所においてのみ抗血栓効果を有し、必要な場所（下肢静脈）、および必要な時（周術期）でのみ効果を発する、非常に有効な手段と考えられる。

## 2. 研究の目的

この研究では、遺伝子導入により局所の静脈壁で抗血栓因子を持続的に高発現させ、局所での血栓形成を抑制することを目的とした。この目的を達成するにあたり、事前に静脈血栓の形成機序の解析を行った。従来、静脈血栓形成に関してはフィブリンを中心とした赤色血栓であり、血小板の関与は少ないとされてきたが、詳細な機序は不明であった。そこで実際に吸引した深部静脈血栓を免疫染色にて解析すると、血小板付着因子であるフォンビルブランド因子が広範に存在しており、静脈血栓形成、特に初期段階における血小板の重要性が示された。このことは、ウサギを用いた動物実験（静脈血栓モデル）において同様の結果が示された\*。

\*深部静脈血栓・肺血栓塞栓におけるフォンビルブランド因子の局在とその役割、高橋良咲，山下篤，盛口清香，古小路英二，浅田祐士郎，日本血栓止血学会誌、17 巻 5 号、613、2006

上記の結果から、フォンビルブランド因子の機能を阻害することにより静脈血栓の形成抑制が得られる可能性が示唆された。そこで本研究では、フォンビルブランド因子の活性に関与する酵素を静脈血管壁において過剰発現させることにより、静脈血栓形成が抑制されるか否かを検討することとした。フォンビルブランド因子は主に血管内皮細胞で非活性体の超高分子として産生され、血中のフォンビルブランド因子切断酵素 (von Willebrand Factor Cleaving Protease、以下 vWF-CP) で活性体へと切断される。静脈血栓形成には超高分子のフォンビルブランド因子の関与も示唆されており、本研究では血管壁における vWF-CP の過剰発現効果を検討することとした。

深部静脈血栓症に対して、全身投与下での抗血栓薬の効果はこれまでに報告されているが、遺伝子投与による報告は少なく、治療面への検討は国内外においてまだ報告されていない。遺伝子投与による治療は、その発現場所および期間をコントロール可能であり、臨床への応用が非常に期待されるものである。この研究の特徴は、遺伝子導入を用いた局所蛋白持続発現による静脈血栓の予防、治療を確立することである。

検討内容：

(1) 抗血液凝固作用を有する遺伝子を組換えたアデノウイルスベクターを作製し、これを培養血管内皮細胞に導入する。遺伝子導入後の酵素活性、分泌能、遺伝子導入効果を検討する。

(2) 次に実験動物の静脈壁に遺伝子導入し、生体内での血栓形成の抑制能を画像的、組織学的に検討する。

予想される結果：

(1) これまでの予備実験の結果から、血管壁に導入された遺伝子は導入後 2～10 日間の持続蛋白発現と酵素活性を示すと予想され、目的期間でのみ蛋白発現を持続できると予想される。

(2) 静脈血栓に対しては、抗血小板薬の予防的投与の効果は少ないとされているが、局所での蛋白高発現下では、高い抗血栓作用が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子組換えベクターの作製

vWF-CP の発現 plasmid および組換えアデノウイルスを作製する。この蛋白質の cDNA を遺伝子ライブラリーより PCR 法にて作製する。この plasmid にはサイトメガロウイルスの初期プロモーターが組み込まれており、その末梢に目的蛋白の cDNA を入れ込むことにより、動物細胞内にて蛋白を強制発現させる plasmid を作製する。

組換えアデノウイルスは、アデノウイルス遺伝子の E1、E3 領域を欠落させ、自己増殖能を欠落させたアデノウイルスに対し、上記の発現ベクターから切り出した遺伝子を入れ込むことにより作製する。

### (2) 培養細胞への導入実験

作製した遺伝子組換えベクターによる遺伝子導入効率を培養細胞にて検討する。培養細胞にはアフリカミドリサル腎臓由来の COS7 およびヒト血管内皮細胞を使用する。これらの細胞に対し、発現 plasmid および組換えアデノウイルスにて遺伝子を導入し、遺伝子導入効率、目的蛋白の発現、酵素活性を測定する。

### (3) 動物実験モデルの作製、遺伝子導入、評価

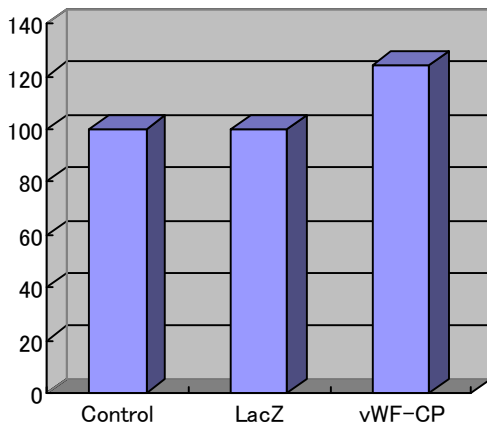
SD ラット (♂、生後 8 週間後) の下大静脈を露出・結紮した後、内部に組換えアデノウイルスベクターを注入し、遺伝子導入を行う。遺伝子導入の後、経時的に下大静脈を採取し、

血管壁の vWF-CP 蛋白量を Western blot 法、免疫染色および酵素活性を検討し、導入遺伝子の評価を行う。また、静脈内血栓の程度、性状についての評価を組織学的に行う。

#### 4. 研究成果

(1) 組換えアデノウイルスは、vWF-CP 遺伝子、および比較のため、生理活性を有しない遺伝子として、LacZ 遺伝子を組換えたものを作成した。これらの組換えアデノウイルスを用い、培養ヒト血管内皮細胞に対して両遺伝子の導入を行った。LacZ 遺伝子導入群と vWF-CP 遺伝子導入群で比較した結果、vWF-CP 遺伝子を導入した血管内皮細胞においては、目的の蛋白発現が認められ、培養液中の vWF 分解活性が高い傾向が認められた。

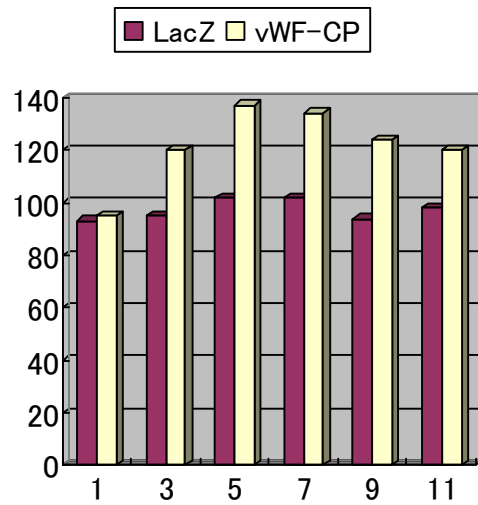
vWF 分解活性



非遺伝子導入群の培養液中の vWF 分解活性を 100 とした。

(2) 以上の結果を踏まえ、ラットの静脈血栓症モデルを用いて、vWF-CP の抗血栓作用を検討することとした。ラットの下大静脈を露出した後、作成した組換えアデノウイルスを含む溶液 (約  $1.0 \times 10^8$  pfu/ml) を結紮した静脈内に注入した。この状態で遺伝子導入をおこなったが、まず、遺伝子導入後の蛋白発現期間を検討するため、経時的に下大静脈を採し検討した。結果、遺伝子導入 3 日後より静脈壁に蛋白発現が認められるようになり、発現は 11 日後の静脈でも確認された。このうち、遺伝子導入 5 日後の下大静脈において比較的高度の蛋白発現を認めたため、以後の実験では、遺伝子導入 5 日後に静脈内血栓の評価を行うこととした。

vWF-CP 蛋白発現期間



Western blot 法で測定。非遺伝子導入ラットの静脈壁の vWF-CP 蛋白量を 100 とした。

(3) 遺伝子導入 5 日後に下大静脈を採取し、下大静脈壁における vWF-CP 蛋白の発現程度を検討した。Western blot 法および免疫染色では、vWF-CP 遺伝子導入群においては、LacZ 遺伝子導入群に比べ、静脈壁内の vWF-CP 蛋白の発現が多い傾向が認められた。また、静脈内血栓に関しては、詳細な評価はまだ終了していないが、vWF-CP 導入群においては血栓形成の程度が少なく、vWF-CP 蛋白の過剰発現が血栓形成を抑制している可能性が示唆された。

(4) 全身の血小板凝集能、血液凝固能への影響を調べる目的で、ラットの血液を採取し、検討を行った。

#### 検討項目

最大血小板凝率 (ADP 刺激、Collagen 刺激)、血液凝固能測定 (PT ; プロトロンビン時間、APTT ; 活性化部分トロンボプラスチン時間)

	Control	LacZ	vWF-CP
ADP (%)	85.3 ± 3.8	85.0 ± 3.0	82.0 ± 3.5
Collagen (%)	87.5 ± 5.1	86.5 ± 5.9	88.3 ± 5.3
PT sec	8.8 ± 0.7	8.4 ± 0.4	8.9 ± 0.8
ATPP sec	14.9 ± 0.3	14.0 ± 0.5	14.2 ± 0.4

遺伝子導入の有無、種類に関わらず、全身の血小板凝集能、血液凝固能への影響は認めなかった。

(3)連携研究者  
該当なし

結論：遺伝子導入により静脈壁でフォンビルブランド因子切断酵素を持続的に高発現させ、局所での血栓形成を抑制することを検討した。この結果、現時点で最終的な結論は得られていないが、組換えアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入による局所蛋白発現では、静脈における抗血栓効果の可能性も示唆された。静脈血栓量の有意差や血栓の性状など、詳細については現在評価中である。

静脈血栓の主体は、血小板の関与は少なく、血液凝固因子の関与が主体であるとされ、この背景の下、深部静脈血栓症の予防には抗凝固薬の投与が行われてきた。しかし、抗血小板剤も含め、全身投与における薬剤の効果・程度は不明なところが多い。

深部静脈血栓症に対して全身投与下での抗血栓薬の効果はこれまでに報告されているが、遺伝子投与による報告は少なく、治療面への検討は国内外においてまだ報告されていない。遺伝子投与による治療は、その発現場所および期間をコントロール可能であり、また、全身の副作用発現が抑制できる有効な手段であり、臨床への応用が非常に期待されるものである。

#### 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

古小路 英二 (FURUKOUJI EIJI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00423723

##### (2)研究分担者

該当なし