

平成23年 6月 7日現在

機関番号:13601
 研究種目:若手研究(B)
 研究期間:2009~2010
 課題番号:21791246
 研究課題名(和文) 虚血性心血管疾患の嫌気的環境を標的とした嫌気性菌ベクターを用いた血管新生療法開発
 研究課題名(英文) Anigiogenic therapy using anaerobic bacterial vector in ischemic cardiovascular disease.
 研究代表者
 和田 有子 (WADA YUKO)
 信州大学・医学部・助教
 研究者番号:30419410

研究成果の概要(和文):マウス下肢虚血モデルおよびミニブタ心筋梗塞モデルを用い、全身あるいは局所投与された *B. longum* 菌の虚血部位への特異的集積、および虚血の改善に伴う病変部位からの *B. longum* 菌の消失を確認した。またマウスを用いた安全性試験において、局所および全身に対する安全性を証明した。*B. longum* 菌は虚血性心血管疾患の嫌気的環境を標的とした嫌気性菌ベクターとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):

We showed the specific accumulation of *B. longum* bacterium injected generally or locally to ischemic organ, and the disappearance of this bacterium from nonischemic organ using ischemic hind limb mouse model, and in cardiac infarction in miniature swine model. We also showed that this anaerobic bacterial vector administration is generally and locally safe using mouse ischemic model. Anaerobic vector using *B. longum* bacterium may be an effective strategy for therapeutic neovascularization in patients with ischemic cardiovascular disease.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・外科学一般

キーワード:血管外科学

1. 研究開始当初の背景

Bifidobacterium longum(*B. longum*) 菌は、ヒトや哺乳類動物の常在菌であり病原性が

ない嫌気性菌である。これまでにこの *B. longum* 菌を用いた嫌気的環境をターゲット

トにした腫瘍特異的な治療法が検討され、嫌気的環境へ特異的に定着することが確認されており固形癌治療におけるドラッグデリバリーシステムとしての有用性が検討されてきた。

一方、従来の薬物治療や内科的・外科的血行再建では対処できない重症虚血心筋や虚血肢に対し、虚血部位に血管新生因子の遺伝子や蛋白などを投与することにより血管新生を促進しようとする治療的血管新生の臨床応用が試みられている。殊に近年、糖尿病患者の増加や透析患者の生命予後の改善などにより、重症下肢虚血に対する血管再生療法のニーズが高まっている。現在、主として血管増殖因子を用いた遺伝子治療と細胞移植治療による血管新生療法が行われているが、その安全性や有効性の点において発展途上の域をでない。

一般的に遺伝子投与の経路としては1、経動脈投与、2、経静脈投与、3、局所投与の三経路が考えられる。ウィルスベクターも naked plasmid も、どちらも全身投与した場合標的部位への特異的集積性はなく、局所での十分な濃度を得るために局所投与がとられる。局所投与は虚血部位に対する複数箇所の筋肉内注射という手段がとられることが多いがこの方法では薬剤の均一な播種という点において限界があり、また新生された血管が血液供給源としての donor artery と連結しているか、検討されるべきである。

一方経動脈的投与では donor artery 内に動注された血管新生因子がその末梢に作用して虚血部位への側副血行を発達させると考えられる。この方法は donor artery に沿って健常部と虚血部の境に播種されると思われ、筋肉内投与に比べ合目的ではあるが、動脈内投与そのものの侵襲もさることながら、ターゲットとする donor artery が体表

からアプローチしづらい場合（特に虚血心筋に対する冠動脈内投与など）、極めて侵襲の高い投与方法となってしまう。

経静脈投与はいわゆる全身投与であるが、ターゲット部位特異性の低い DDS を用いた場合、投与した遺伝子は希釈されてしまい局所への導入効率を上げるためには大量の全身投与を行わなければならない、通常用いられているターゲット部位特異性の低いウィルスベクターや plasmid 投与では非現実的な方法である。しかしターゲット部位（虚血部位）特異性の高い DDS を用いれば極めて低侵襲で、かつ投与された遺伝子は血流によって虚血部に播種されると思われ、最も理想的な投与方法である。

これまで試みられてきた遺伝子を用いた血管新生療法は遺伝子を宿主細胞（主に筋細胞）に導入してその細胞にタンパクを発現・放出させることにより血管新生を促すというもので、遺伝子の導入効率や宿主細胞における発現効率などによって効果が左右される可能性がある。特に発現効率は投与後にはコントロール困難であり、発現効率が副作用を起こすほどに高い場合にも宿主細胞からの自然除去を待つほかないというのは、安全性の面で極めて大きな問題である。逆に治療効果にかかわらず一定の経過で病変部位より消失することも効果持続の点で問題であり、一般的には複数回の投与が行われる。

また現在臨床応用が目されている導入遺伝子は主に血管増殖因子であるため、悪性腫瘍や糖尿病性網膜症などの増殖性疾患を有する症例には禁忌である。高齢者や糖尿病を基礎疾患に持つことが多い閉塞性動脈硬化症や虚血性心疾患において、この限界はきわめて重要な課題となっている。

したがって開発されるべき DDS は1、標的部位特異性が高く、2、ある程度持続的に標

的部位に存在し、3、治癒と共に消失、4、全身投与によっても安全性が高いことが要求される。

経静脈投与によっても虚血部位に集積し、虚血が続くかぎり局所に存在し、かつ虚血が改善されるとともに消失する DDS として、我々は *Bifidobacterium longum*(*B. longum*) 菌に注目した。

本システムはシステムはウイルスベクターなどと異なり、**好气的環境である健常部ではベクターの細菌は生存できず虚血部位のみ集積し、また虚血の消失とともに好气的になった組織では遺伝子を組換えた細菌自体が死滅してしまい二重に安全が確保されている点で、きわめて独創的である。**本ベクターは治療によって虚血が改善した部位では消失していくため、**治療後の治療遺伝子の除去等を考慮する必要はなく、悪性腫瘍の発現や血管の過剰増殖といった従来の血管新生療法に伴って予想される副作用の可能性を減ずることができる。**

また本システムでは全身投与によっても効率的に虚血部位にベクターがデリバリーされるため、**静脈内投与が可能**であり、その結果**虚血部位全体への均一なそして虚血の程度に応じた薬剤の投与が可能**である。虚血が持続していれば *B. longum* 菌は局所で増殖するため、**大量投与や複数回の投与は不必要**であると考えられ、非常に効率的である。血管内投与が可能になることにより最も恩恵を蒙るのは心臓虚血に対する遺伝子治療であろう。本システムを用いることにより、虚血心筋に対する遺伝子の投与はより非侵襲的に効率的に行うことが可能となる。

また本ベクターでは**複数の遺伝子を同時にデリバリーすることが可能**であり、複数の有効な増殖因子を組み込み投与することによって、より効率的かつ非侵襲的な治療が可

能となると考えられる。

再生医療の領域で虚血という疾患の特異性に注目したデリバリーシステムの開発を行っている研究はなく、以上の点によって本方法は従来の投与方法を用いた血管新生療法とは一線を画すものであり、現在次々と開発されつつある増殖因子や血管拡張因子を用いた虚血疾患の治療をより効率的で安全なものへと変化させるだろう。

そこで我々は、*B. longum* 菌をベクターに用いた虚血性心血管疾患に対する DDS の開発を念頭におき、以下に述べるようにマウスの下肢虚血モデルおよびミニブタ心筋梗塞モデルを用いて *B. longum* 菌の虚血部位への集積を確認することを本研究の課題とした。

2. 研究の目的

B. longum 菌をベクターに用いた虚血性心血管疾患に対する DDS の開発を念頭におき、以下に述べるようにマウスの下肢虚血モデルおよびミニブタ心筋梗塞モデルを用いて *B. longum* 菌の虚血部位への特異的集積を確認する。

3. 研究の方法

A: マウス下肢虚血モデル実験

(1) モデル作製

実験動物は8-9週齢、オスのC57BL/6マウスを使用し、以下の手順で下肢虚血モデル(ischemic model)マウスを作製した。麻酔は3.6%抱水クロラールを腹腔内に0.3ml注射した。総大腿動脈から膝窩動脈を結紮し、大腿動脈を切除した。創内を生理食塩水で洗浄後、創を5-0ナイロン糸にて縫合した。また6-7週齢、オスのBALB/cマウスを用いて同様の方法で重度虚血モデルを作製した。

(2) レーザードップラー血流計による血流測定

マウスを麻酔後、レーザードップラー血流計を用いて、(3)の下肢筋肉摘出前に血流測定を行った。下腿部から指先までの血流を両側について定量し、患側/健側比にて表した。血流測定はモデル作製直前、直後、1、2、3、4、5、7、10、14、21、28日後に行った。

(3) *B. longum* 菌投与および検出

pBLES100 プラスミドで形質転換し、スペクチノマイシン耐性菌とした *B. longum* 菌を MRS 培地で2回継代した。2回継代した培養液を、生理食塩水を用いて遠心洗浄を行い、生理食塩水で懸濁して使用した。局所投与モデルとして、下肢虚血モデル作製直後に虚血肢および健肢にそれぞれ上記 *B. longum* 菌を 1×10^9 cfu/ml $\times 0.1$ ml $\times 2$ ヶ所筋肉内注射投与した。全身投与モデルとして、尾静脈に *B. longum* 菌を 1×10^9 cfu/ml の濃度で 0.2 ml 投与した。菌を投与してから1、2、3、4、5、7、10、14日後に、各投与モデルの、左右それぞれの下肢筋肉を摘出した (各 n = 5)。各組織をホモジナイズした後、BLプレートに塗布して37°C、嫌氣的条件下で3日間培養した。培養後に各プレートのコロニー数を測定し、虚血肢および健肢の菌数を求めた。

(4) 組織学的解析

(3)と同様にマウスへ *B. longum* 菌を投与した後、96時間後に下肢筋肉を摘出した。下肢筋肉を20%中性緩衝ホルマリンに48時間浸し組織を固定した。その後パラフィン包埋しパラフィンブロックとした。パラフィンブロックを3μmの厚さにカットし、スライドガラスにのせて24時間44°Cで風乾し、パラフィン組織切片スライドとした。脱パラフィン後グラム染色を行った。

B: 安全性試験

上述の下肢虚血モデル (ischemic model) マ

ウスおよび下肢壊死モデル (necrotic model) マウス両者について安全性試験を行った。菌を投与してから2、3、4、6、7日後に、各投与モデルの、腎臓、肝臓、脾臓、心臓を摘出した (各 n = 3)。各組織をホモジナイズした後、BLプレートに塗布して37°C、嫌氣的条件下で3日間培養した。培養後に各プレートのコロニー数を測定し、各組織の菌数を求めた。

C: ミニブタ心筋梗塞モデル試験

①モデル作製

実験動物は、オスのゲッチング系ミニブタ (15kg) を使用した。ケタラール15mg/kg と硫酸アトロピン (25mg) を筋肉注射したのち、吸入麻酔であるフローセン (2%~5%) により麻酔状態を維持した。開胸後、左冠状動脈前下行枝を3-0シルク糸で結紮した。術中に2%キシロカイン (1ml~2ml) を投与した。閉胸前にラクテック100mlで心嚢内を洗浄した。

②*B. longum* 菌の投与および検出

B. longum 菌を例1と同様に調製し、心筋梗塞モデル作製直後に *B. longum* 菌を 1×10^9 cfu/ml の濃度で、 0.1 ml を1cmおきに等間隔で健常部位と梗塞部位に心筋内投与した。菌を投与してから4日および7日後 (各 n = 2) に心臓を摘出して梗塞部位と健常部位に分け、ホモジナイズした後、BLプレートに塗布して37°C、嫌氣的条件下で3日間培養した。培養後に各プレートのコロニー数を測定し、梗塞部位および健常部位の菌数を求めた。

③組織学的解析

心筋梗塞確認のために塩化トリフェニルテトラゾリウム (TTC) 染色、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびマッソン・トリクローム (MT) 染色を行った。TTC 染色は心筋梗塞モデル作製7日後に摘出し

た心臓を5 mmの厚さにスライスし、1% T TC液中、37°Cで5分インキュベーションした。その後、肉眼的に観察した。

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色は脱パラフィン後、ヘマトキシリンで30秒から1分間染色し、流水にて10分間洗浄した後、0.5%エオジン溶液で30秒染色した。染色後、脱水、透徹および封入し、光学顕微鏡で観察した。

マッソン・トリクローム (MT) 染色は各切片をブアン固定したあと流水水洗を10分間行った。水洗後、10%重クロム酸カリウム10%トリクロール酢酸等量混合液に10分浸した後、鉄ヘマトキシリン染色液に5分間浸し、流水水洗を5分間行った。水洗後、ボンソー酸フクシンアゾフロキシリン液に1分間浸した後2.5%リンタングステン酸溶液に10分間浸した。2%オレンジG液に5分間切片を浸した後、1%酢酸水で洗浄し、ライトグリーン液にて3分間染色した後、1%酢酸水で洗浄した。脱水、透徹、封入はHE染色と同様の過程で行った。

4. 研究成果

下肢虚血マウスへ静注により全身投与された *B. longum* 菌は48時間までに速やかに非虚血肢より消失し (図1)、嫌気性環境である虚血部位にのみ集積することが示された。局所の虚血が続いている間は経時的に同部での増殖を続け菌数を増やすが、血流比で健常部の0.4-0.5まで血流が改善すると自然に *B. longum* 菌は消失する (図2)

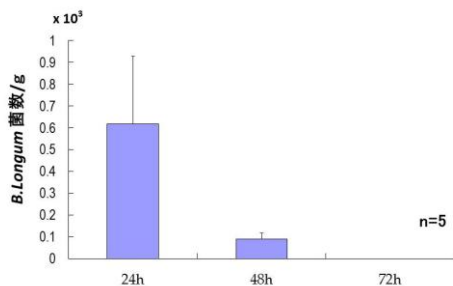


図1 菌全身投与(静注)後の健肢に存在する菌数

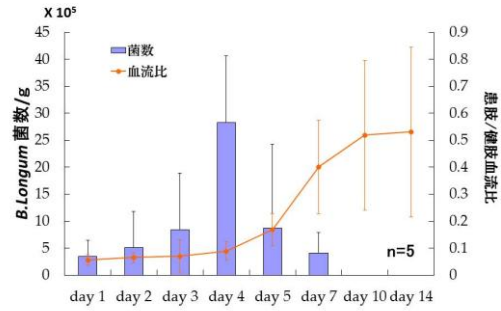


図2 菌全身投与(静注)後の患肢に存在する菌数

虚血程度がより重症なモデルで確認しても同様の傾向をしめした。つまり、局所の虚血が続いている間は経時的に同部での増殖を続け菌数を増やすが、血流比で健常部の0.4程度まで血流が改善すると自然に *B. longum* 菌は消失する (図3)。図2、3の比較でも明らかのように、*B. longum* 菌の菌数は投与後日数ではなく、虚血程度に対応して変化することが明らかになった。

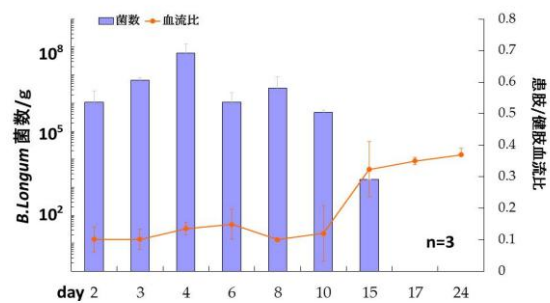


図3 重症虚血モデルにおける菌全身投与(静注)後の患肢に存在する菌数

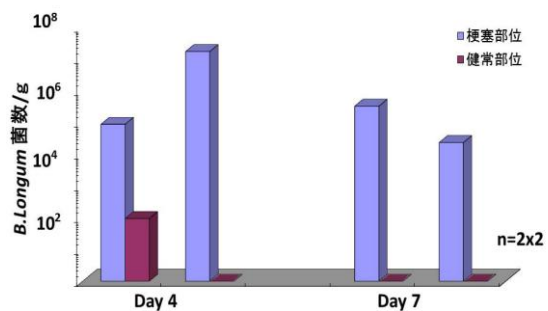


図4 ミニブタ心筋梗塞モデルにおける菌数

また、ミニブタを用いた心筋梗塞モデルに *B. longum* 菌を心筋内筋注した場合、健常部位に筋注された菌は7日目までに消失する一方、心筋梗塞部位では7日目前後も 10^5 cfu/g 以上の菌が存在し続けていることが明らかになった。

安全性についても以下のように確認した。マウス下肢虚血の組織学的検討において、虚血肢の骨格筋細胞間に *B. longum* 菌の集積を認めたが *B. longum* 菌周囲の筋細胞の壊死や脱落、組織間の浮腫などは認めず、*B. longum* 菌集積による細胞障害性も組織学上ないものと思われた。また図5に示すとおり、静注された菌は脾臓・肝臓といった網内系で一過性に検出されるものの、そのレベルは三日目には $10^2 \sim 10^3$ cfu/g 程度と低レベルであり、6日目までにほぼすべての臓器で消失する。血液中からは投与翌日より検出されなかった。また下肢潰瘍・膿瘍形成モデルにおいて、膿瘍より *B. longum* 菌が検出された case はなく、*B. longum* 菌投与群・非投与群の間に虚血程度、潰瘍形成率、下肢脱落率、死亡率に差を認めなかった。以上の結果より、*B. longum* 菌の虚血部位特異的集積と、局所および全身に対する安全性は証明されたと考えられる。

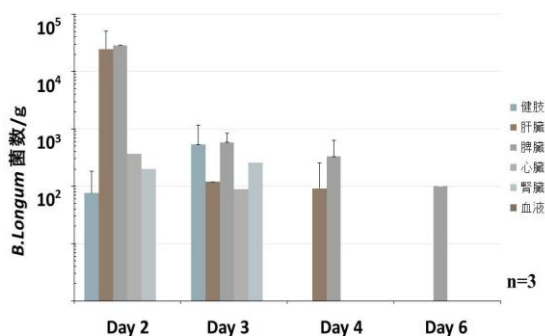


図5 重症虚血モデルにおける各臓器菌数

またこれらの実験はスペクチノマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドベクター (pBLES100) を用いて、培地にスペクチノマイ

シンを添加して行われており、*B. longum* 菌にトランスフェクトされたプラスミドベクターに組み込まれた遺伝子が集積部位で発現することも同時に確認された。

本研究で我々は全身投与された *B. longum* 菌の下肢/心筋虚血部位への特異的集積、および虚血の改善に伴う病変部位からの *B. longum* 菌の消失を示した。またマウスを用いた安全性試験において、組織学上 *B. longum* 菌集積による細胞障害性は認めず、*B. longum* 菌投与群・非投与群の間に虚血程度、潰瘍形成率、下肢脱落率、死亡率に差を認めなかった。以上の結果より、*B. longum* 菌の虚血部位特異的集積と、局所および全身に対する安全性が証明されたと考えられる。

今後はこの研究成果に基づき、虚血性疾患治療薬として最適な血管増殖因子を選定し、この血管増殖因子発現遺伝子を導入した組換え *B. longum* 菌を作製して、その有用性を検証することを目的とし、最終的に、組換え *B. longum* 菌を用いる虚血性疾患治療剤を開発することを目標とする。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 有子 (WADA YUKO)
 信州大学・医学部・助教
 研究者番号：30419410