

平成21年 5月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790965
 研究課題名（和文）血小板由来内皮細胞成長因子を用いた動脈硬化性疾患に対する治療の研究
 研究課題名（英文） PD-ECGF gene therapy for atherosclerotic disease.
 研究代表者
 高森 督（TAKAMORI ATSUSHI）
 福井大学・医学部・助教
 研究者番号：80397273

研究成果の概要：ラットの大動脈血管平滑筋細胞にアンジオテンシンⅡにて動脈硬化環境とし、これに対する PD-ECGF の作用を確認したところ細胞の増殖能や遊走能及び活性化因子に対し抑制的に働くことを明らかにした。しかしその他の血管新生因子である VEGF との比較においては活性化因子の一部を除いて有意差を認めなかった。また、遺伝子欠損マウス動脈瘤形成モデルにおいて、瘤形成後 PD-ECGF を投与したが瘤径の縮小効果は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：動脈硬化、血管新生因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 当研究グループではこれまでにヒト血小板由来内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF/別名 Thymidine Phosphorylase；以下 PD-ECGF) を用いた遺伝子治療の研究を行い、慢性虚血心筋モデルにおいて血管新生促進作用、心筋細胞のアポトーシス抑制作用、心機能改善効果を確認 (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004) するとともに、虚血肢モデルにおける血管新生促進作用についても確認している (J Vasc Surg. 2006)。

一方で、PD-ECGF は血管傷害モデルにおいて傷害部の血管内膜肥厚を抑制すること、血管バイパス術における静脈グラフトにおい

て新生内膜肥厚を抑制することなどを確認しており、これらはいずれも血管内皮細胞の増殖・遊走能の亢進と、傷害血管に起こる内膜肥厚に主要な役割を果たす血管平滑筋の増殖を抑制した結果である。

現在、国内外において種々の血管新生因子 (ex VEGF, bFGF, HGF...) や骨髄単核球を用いた血管新生療法の研究が盛んに行われているが、一方では平滑筋細胞の増殖等による動脈硬化性疾患への影響を懸念する文献も散見される。このように血管新生療法の効果を検討する場合、その基礎疾患としての動脈硬化性疾患に対する影響を無視することは

きない。

この点において、我々は上記に加え、*in vitro* でも PD-ECGF が正常血管平滑筋細胞の増殖を抑制することを確認し、そのメカニズムの一端を明らかにしている。

これらのことは PD-ECGF の血管新生療法における安全性を示唆するものであり、さらには基礎疾患となる動脈硬化性疾患に対する治療への応用の可能性を伺わせるものである。

(2) PD-ECGF は悪性腫瘍における血管新生促進やアポトーシス抑制等、腫瘍関連分野において多くの研究が行われてきた。当研究グループでは PD-ECGF の持つ血管新生促進作用に着目し、虚血性疾患に対する治療法として効果を確認し、研究を進めてきた。

また同時に、PD-ECGF が傷害血管や静脈グラフトにおける新生内膜肥厚を抑制し、動脈硬化を予防したことも確認した。血管新生療法を行う場合、基礎疾患として動脈硬化は当然考えられるべき疾患であり、これに対する影響を含め安全性を確認することが不可欠である。この点において、PD-ECGF には上記の通り動脈硬化を抑制する作用も確認されており、虚血性疾患に対する安全な血管新生療法となり得るのみならず、動脈硬化性疾患自体への治療効果も期待できるものと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では動脈硬化モデルにおける血管細胞に対する PD-ECGF の効果・影響を明らかにし、動脈硬化性疾患に対する PD-ECGF の安全性及び治療効果を検証することを目的とする。

(2) また同時に PD-ECGF とその他の血管新生因子についても比較検討し、相対的な評価を行うことで PD-ECGF 遺伝子治療の安全性・優位性を確認する。

3. 研究の方法

我々が血管新生治療の研究に用いている PD-ECGF の動脈硬化性疾患に与える効果・影響について *in vivo* 及び *in vitro* 動脈硬化モデルを用いて検証し、PD-ECGF の血管新生療法における安全性を確認するとともに、動脈硬化性疾患に対する治療法への応用の可能性を追求することを目的とする。更にその他の血管新生因子においても同様に比較・検討し、血管新生治療における PD-ECGF の優位性を確認する。

(1) 動脈硬化細胞培養モデルにおける血管新生因子の影響 (*in vitro*)

In vitro における動脈硬化モデルに対する

効果・影響を確認する項目として、細胞増殖能、遊走能、及びそれに関係する遺伝子・タンパクの発現、更に細胞接着因子発現について検討する。

①正常ヒト冠状動脈血管内皮細胞及び平滑筋細胞を、低酸素脂質負荷培養またはアンギオテンシン II 投与にて動脈硬化環境を作成する。

②PD-ECGF、VEGF を投与する。

③細胞増殖能を MTT assay により経時的に評価する。

④細胞周期の変化を検討した結果により、細胞増殖及び細胞周期調節に関与する因子の発現について確認・検討する。mRNA レベルにおいては、LightCycler を用いた Real-time PCR 法により定量的に検討する。

⑤動脈硬化に重要な役割を果たすと考えられる白血球の接着、及び細胞の活性化に関する VCAM-1、ICAM-1 についても定量 PCR 法、にて評価する。

(2) Apolipoprotein E 欠損マウスを用いた動脈硬化モデルにおける血管新生因子の影響 (*in vivo*)

Apolipoprotein E (以下 apoE) は血中における脂質代謝に重要な役割を果たしているリポタンパクの構成成分である。apoE 遺伝子を欠損したマウスは高コレステロール血症による動脈硬化モデルとして用いられており、またアンギオテンシン II を持続投与することで、動脈硬化及び大動脈瘤を形成するモデルを作成可能である。

本実験では、このマウスを使用し、*in vivo* における血管新生因子の動脈硬化及び動脈瘤に与える影響を比較・検討する。apoE 欠損マウスは日本チャールズ・リバー社を介して購入する。

①apoE 欠損マウスの皮下に minipump (Alzet model 2004; ALZA Corp.) を用いアンギオテンシン II を持続投与し動脈硬化及び大動脈瘤モデルを作成する。

②apoE 欠損マウスを血管新生因子の投与方法により

アンギオテンシン II と同時投与する群
アンギオテンシン II 投与 4 週間後、動脈瘤形成確認・瘤径測定後に持続投与する群
動脈瘤形成確認・測定後、瘤壁に生体分解性 gel を用いて経動脈壁的に投与する群
に群分けする。

血管新生因子投与後 4 週にて大動脈を摘出する。

③ ドラッグデリバリーシステム (DDS) の検討

ヒアルロン酸ゲル、フィブリンゲル、キトサンゲル、エラスチンゲル、プルロニックゲルを候補として細胞毒性、生体溶解性、組織寛容性の検討を行う。

細胞毒性に関してはラット大動脈平滑筋細胞を用いた MTT assay (in vitro) にて評価する。

組織寛容性に関しては、ゲルをラット後肢内転筋に挿入、2、4 週後に周囲組織ごと摘出し免疫組織学染色にて炎症細胞及び異物型巨細胞浸潤の程度、Masson's trichrome 染色にてゲル周囲における繊維化の程度を比較する。

また同時にゲル内に遺伝子を取り込ませ、その発現についても評価を行う。

④ 動脈硬化病変 (新生内膜/中膜) 及び大動脈瘤径を組織切片にて計測する。

⑤ 動脈硬化病変を免疫組織化学染色 (H-E 染色、EVG 染色、脂肪染色 etc) にて評価する。動脈硬化壁の新生内膜、弾性線維や中膜の状態、及び白血球 (マクロファージ)、脂質の沈着を組織切片にて評価する。

4. 研究成果

(1) 動脈硬化細胞培養モデルにおける血管新生因子の影響 (in vitro)

① ラットの動脈血管平滑筋細胞を培養。この培地にアンジオテンシン II (Ang II) を 10^{-7} mol/l 添加し、動脈硬化環境とした。

この状態にて増殖能、遊走能をそれぞれ MTT assay、wound healing assay にて評価したところ、両者とも通常状態と比較し促進されていることが確認された。また mRNA レベルにて増殖関連因子 Egr-1、KLF5 や細胞活性化因子 VCAM-1、ICAM-1 の発現も促進していた。

② 次に培養培地に対し、それぞれ PD-ECGF 4ng/ml、VEGF 1.6ng/ml を投与した。

このうち PD-ECGF を添加した細胞では、細胞の増殖能や遊走能において抑制的に働き、上記の細胞増殖・活性化因子においても Ang II の作用に対し抑制することが明らかになった。

しかし PD-ECGF 添加培地と VEGF 添加培地の比較では、細胞増殖能において、MTT assay にて有意差を認めなかった。また、細胞増殖調節因子においても明らかな差を認めなかったが、細胞活性化マーカーである ICAM-1 において PD-ECGF 投与群で抑制されることを認めた。

(2) Apolipoprotein E 欠損マウスを用いた動脈硬化モデルにおける血管新生因子の影響 (in vivo)

動脈瘤モデルの作成

① apoE KO マウスに対し全身麻酔下にて、背部皮下に minipump を用い Ang-II を持続投与した。

Ang-II 投与後 4 週に犠牲死させ確認したところ、胸部下行大動脈から腹部大動脈にかけて明らかな動脈瘤の形成を確認した。

② DDS の検討

前述のゲルを用いドラッグデリバリーシステム (DDS) の検討を行った。

細胞毒性に関しては、MTT assay にてキトサンゲル及びエラスチンゲルで細胞増殖能の低下を認めた。

また生体溶解性に関して、2 週後ではフィブリンゲル、プルロニックゲルは完全に溶解していた。その他のゲルについては 4 週後もまだ残存していた。

組織寛容性の検討では 2 週後はキトサンゲル及びエラスチンゲルで炎症細胞の浸潤・異物型巨細胞の浸潤を多く認めたが、4 週後ではフィブリンゲル、プルロニックゲルがその他のゲルと比較して抑制されていた。

周囲の繊維化においてもキトサンゲル及びエラスチンゲルで増加していた。

また、導入された遺伝子の発現に関してはゲルの溶解性に比例していると考えられ、フィブリンゲル、プルロニックゲルにおいて優れていた。

この結果、及び当施設におけるこれまでの報告に基づき、プルロニックゲルを DDS として用いることとした。

③ 血管新生因子による動脈瘤形成に対する遺伝子治療。

マウス動脈瘤モデルにて、Ang-II 投与 4 週後 (動脈瘤形成確認後) に、PD-ECGF 遺伝子を投与し治療効果を検討した。

投与方法はプルロニックゲルを DDS として PD-ECGF 遺伝子 500 μ g を動脈瘤周囲に投与した。

更に対照群として LacZ 遺伝子を同様に投与した。

遺伝子投与後 4 週にて動脈瘤形成に対するの治療効果を検討した。

当初、PD-ECGF の動脈硬化に対する抑制作用にて、動脈瘤径の縮小が望めると考えていたが、対照群と比較して動脈瘤径等、大動脈瘤の縮小効果を認めることはできなかった。

(3) 考察

当研究グループではこれまでも PD-ECGF による傷害血管及びバイパスグラフトの対する新生内膜肥厚の抑制などを確認しており、これらは動脈硬化性疾患に対する治療効果を期待させるものである。

今回の結果でも、in vitro において Ang-II の効果を抑制する結果が得られた。このことは動脈硬化性疾患に対する PD-ECGF の治療効果を示唆するものであると考えられる。

その他の血管新生因子との比較において、VEGF と比較して、一部の活性化因子を除き差違を認めることはできなかった。今後は更に条件や測定項目を変更し動脈硬化性疾患に対する安全性の確認を行う必要がある。

PD-ECGF の動脈瘤形成に対する治療効果においては、瘤形成後では十分な効果が認められなかった。これまでの研究で明らかにされた PD-ECGF の動脈硬化に対する効果を踏まえると、Ang-II 投与時期に対する PD-ECGF 遺伝子の投与時期の検討が必要であると考えられた。

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 件)

- ① Li W, Tanaka K, Morioka K, Takamori A, Handa M, Yamada N, Ihaya A. Long-term effect of gene therapy for chronic ischemic myocardium using platelet-derived endothelial cell growth factor in dogs. J Gene Med. 2008 Apr;10(4):412-20.、査読有
- ② Handa M, Li W, Morioka K, Takamori A, Yamada N, Ihaya A. Adventitial delivery of platelet-derived endothelial cell growth factor gene prevented intimal hyperplasia of vein graft. J Vasc Surg. 2008 Dec;48(6):1566-74.、査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高森 督 (TAKAMORI ATSUSHI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：80397273