

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18904

研究課題名(和文)慢性創傷に対するb-FGF遺伝子搭載センダイウイルスを用いた遺伝子治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of gene therapy using b-FGF gene-loaded Sendai virus for chronic wounds.

研究代表者

緒方 英之(Ogata, Hideyuki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60646024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性創傷に対するb-FGF導入センダイウイルスの使用を検討する準備として慢性創傷がなぜ生じるか、メカニズムを解明する必要があった。Werner症候群(WS)は、難治性の皮膚潰瘍を発症する確率が高い疾患であり、皮膚潰瘍の発生や進行に関与する因子やメカニズムを解明するためのモデルとして有用である。本研究ではWS患者の潰瘍部の病理組織学的探究を行った。その結果、潰瘍部皮下に生じている石灰化がリンパ管内局在していること明らかにした。また、リンパ管内皮細胞内に異常なWRN蛋白が蓄積していることを明らかにし、この結果は石灰化の蓄積がリンパ管の老化によって生じている可能性を示唆するものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はWS患者の慢性創傷においてリンパ管の老化現象に似た異常が生じていることを明らかにした。このことはWS患者の創傷治癒遅延のメカニズムの解明に寄与する可能性がある。また、WSではない一般的な難治性創傷においても、リンパ管の異常が関係している可能性があり、本研究の成果がこれらの現象が創傷治癒に及ぼす影響を評価するための指標や手法を提供するものと考えられる。また当初の目的であった、慢性創傷に対するb-FGF導入センダイウイルスの使用においてもその効果の機序の解明や評価方法に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In preparation for considering the use of b-FGF-transfected Sendai virus for chronic wounds, it was necessary to elucidate the mechanism of why chronic wounds occur. Werner syndrome (WS) is a disease with a high probability of developing intractable skin ulcers and is useful as a model for understanding the factors and mechanisms involved in the development and progression of skin ulcers. In this study, we first performed a histopathological exploration of the ulcer site in WS patients. The results revealed that the calcification under the skin of the ulcer was located in the lymphatic vessels. They also used immunochemical staining to show the accumulation of abnormal WRN protein in lymphatic endothelial cells, suggesting that the accumulation of calcification may be caused by aging of lymphatic vessels.

研究分野：形成外科

キーワード：慢性創傷 Werner症候群 リンパ管 老化

1. 研究開始当初の背景

- (1) 慢性創傷とは、治癒が遅延したり不完全なままになったりする創傷のことで、糖尿病や動脈硬化などの基礎疾患や加齢による免疫力の低下などが原因となる。高齢化に伴って慢性創傷の患者数は増加しており、日本では2019年に約200万人、2025年には約250万人に達すると推計されている。慢性創傷の治療は長期間にわたり、多くの医療費や介護費を要する。日本では2019年の慢性創傷に関連する医療費は約1兆円、介護費は約1.5兆円と推計されている。慢性創傷は患者の生活の質(QOL)を低下させるだけでなく、感染や壊死などの重篤な合併症や死亡率の上昇にもつながる。慢性創傷の予防や早期発見・治療が重要であり、成長因子や細胞を応用した新しい治療法も開発されているが、その作用機序や安全性、効果性などについてはさらなる研究が必要とされている。
- (2) 正常な創傷治癒では数多くの種類の成長因子がお互いに影響しながら、そのプロセスを進めていく。しかし慢性創傷では物理的、化学的、生物学的な要因によって、成長因子の産生が阻害され、創傷治癒の正常な進行が妨げられている。そのため、現在までに成長因子の補充を行う数々の治療法が提唱され、その有効性が証明されてきた。b-FGFはその中でも代表的な成長因子の一つであり、その局所的噴霧による創傷治癒促進効果が証明され、臨床でも現在多くの場面で使用されている。しかし、化学的に不安定であり頻回の投与が必要となること、噴霧された潰瘍表面の細胞にしか作用しないことなどの問題点がある。その解決法の一つが遺伝子治療である。遺伝子治療では、成長因子の遺伝子を搭載したベクターにより、標的とした細胞に目的の遺伝子を導入し、成長因子を発現させることでその産生を促進する。さらに投与部位を工夫することで、標的とする細胞を明確にした効果的な治療が可能となる。しかし、その導入効率や安全性に関しては多くの問題点が残っている。
- (3) センダイウイルス(以下 SeV)はマウスの肺炎の原因となるウイルスであるが、ヒトには病原性が無く、また感染した細胞の染色体に影響を与えないため、理論的安全性が高いと考えられている。このウイルスに b-FGF 遺伝子を搭載しベクターとして用いた下肢慢性動脈閉塞症患者に対する遺伝子治療の臨床試験では下肢血流改善に対する有効性が示唆されている。しかしこの治療は下肢骨格筋に SeV-FGF-2 を投与し、下肢の中動脈からの血管新生を促進することが目的であり、創傷に直接投与した場合の有効性についてはまだ明らかにされていない。
- (4) Werner 症候群とは、思春期以降に白内障、白髪禿頭、メタボリックシンドロームや動脈硬化、悪性腫瘍などの老化徴候が早発する単一遺伝子による早老症である。Werner 症候群の原因は、WRN 遺伝子の変異による WRN タンパク質の欠損である。WRN タンパク質は DNA ヘリカーゼやエキソヌクレアーゼとして機能し、DNA 修復やテロメア維持に関与する。WRN タンパク質の欠損は、ゲノム不安定性やテロメア短縮を引き起こし、細胞老化や老化関連疾患の発症につながると考えられている。Werner 症候群は、ヒトの老化のモデル病態と言われ、この疾患の機序解析からヒトの一般老化の機序解明につながることを期待されている。Werner 症候群の患者は、皮膚の萎縮や硬化に伴って四肢末梢に難治性皮膚潰瘍を発症しやすく、感染や切断などの重篤な合併症を起こすことが多い。皮膚潰瘍は、皮膚の再生能力の低下や血行障害などにより治癒が困難であり、疼痛や関節可動域の低下により日常生活動作が著しく制限される。皮膚潰瘍は Werner 症候群の診断基準や重症度分類においても重要な指標となっている。一般的な高齢者の創傷は、血行障害や感染、栄養不良などの要因により創傷治癒が遅延するものであり、下肢静脈瘤性潰瘍や糖尿病性足潰瘍などが代表的である。高齢者の創傷治癒は、細胞分裂能力や血管新生能力などの低下により遅れるだけでなく、炎症反応やエクストラセルラーマトリックス(ECM)の産生・分解・再構築などのバランスが乱れることで正常な治癒過程が阻害されると考えられている。Werner 症候群と高齢者の創傷は、ともに DNA 修復やテロメア維持などの細胞老化関連因子が創傷治癒に影響を及ぼしており、Werner 症候群の創傷に関する研究は一般的な高齢者の創傷治癒の解析にも応用可能であると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、慢性創傷に対する新たな局所療法として、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の有効性を検証することを目的とする。
- (2) 本研究は、下肢慢性動脈閉塞症患者に対する SeV-FGF-2 を用いた遺伝子治療が臨床試験の段階まで進行し、有用性が示唆されていることに基づいて立案された。しかし、これまでの研究は下肢の骨格筋に投与し血管新生を促進させることが目的であり、創傷に直接投与してその治癒を促進させる効果はまだ検証されていない。そこでわれわれは慢性創傷に直接 SeV-FGF-2 を投与し、局所の細胞から持続的に b-FGF を産生させることで創傷治癒の促進効果が得られると考えた。
- (3) 本法のメインターゲットとする疾患としてわれわれは Werner 症候群を選定した。本法

のメインターゲットとする疾患としてわれわれは Werner 症候群を選定した。遺伝性の早老症である Werner 症候群では下肢に有痛性の石灰化をともなう皮膚潰瘍をしばしば生じる。この潰瘍は既存の治療に対して強い耐性を示し、極めて難治性である。本法は既存の治療法とは一線を画した新規の治療法であるため、Werner 症候群の皮膚潰瘍の知用にも有用となる可能性が期待される。また、Werner 症候群での有用性が示され、手技が確立されれば、糖尿病性足潰瘍や静脈性潰瘍、褥瘡など一般的な難治性潰瘍にも応用され得るものであると考えられた。しかし Werner 症候群の皮膚潰瘍はその発生機序に未解明な部分も多い。そこでわれわれはまず Werner 症候群患者の皮膚潰瘍を一般的な末梢動脈疾患患者の潰瘍と組織学的に比較分析し、その難治性のメカニズムを解明する探究に着手した。

3. 研究の方法

- (1) Werner 症候群 (WS) 患者と末梢動脈疾患 (PAD) 患者の皮膚生検標本を用いて、石灰化を伴う潰瘍周囲の皮膚の組織学的解析を行った。石灰化の程度と成分を評価するために、免疫染色、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を行った。
- (2) WS 患者と PAD 患者のリンパ管の形態学的比較を行うために、リンパ管内皮細胞マーカーである D2-40 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。リンパ管の内腔断面積 (LA) とリンパ管微小血管密度 (MLVD) を測定した。
- (3) WS 患者と PAD 患者のリンパ管内皮細胞における WRN タンパク質の分布と蓄積を調べるために、WRN 抗体と D2-40 抗体を用いて蛍光免疫組織化学染色を行った。WRN タンパク質の細胞質への移行率と細胞質内での蓄積率を測定した

4. 研究成果

(1) WS では潰瘍周囲の皮膚のリンパ管に石灰化が生じる
肘に潰瘍のある WS 患者 4 人の X 線写真では、すべての患者で潰瘍のある肘関節の皮下組織に石灰化が認められた。同じ潰瘍から採取した皮膚組織では、4 人中 3 人に石灰化が見られた。WS 患者 (WS2) の皮膚組織では、走査型電子顕微鏡で皮膚の石灰化を観察した。真皮下の管腔構造に結晶物質の沈着が見られた。次に、結晶物質のエネルギー分散型 X 線 (EDX) 分析を行ったところ、結晶物質がリン酸カルシウムであることを示唆するリンとカルシウムの特性 X 線が高カウントで検出された。管腔構造以外の組織にカルシウムが含まれているかどうかを調べるため、管腔構造、真皮結合組織、組織を含まない領域のカルシウム含有量を EDX で比較した。各領域で 3 点を測定し、3 領域で同様の測定を行った。管腔構造のカルシウム含有量は、真皮結合組織のカルシウム含有量よりも有意に高く ($P < 0.0001$)、真皮結合組織のカルシウム含有量は、非組織領域のそれと有意差がなかった ($P < 0.0001$)。ポドブラニン、CD31、SMA 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、石灰化物が沈着した内腔構造を同定した。石灰化周辺の管腔構造は、D2-40 抗体で陽性、CD31 抗体で弱陽性、SMA 抗体で陰性であった。これらの結果は、この管腔構造がリンパ管内皮細胞 (LEC) であることを示している。

(2) WS 患者における潰瘍周囲のリンパ管新生の亢進とリンパ管腔の発達障害
WS 患者におけるリンパ管の組織学的特徴を明らかにするため、WS 患者 4 名の非潰瘍部の皮膚 (非潰瘍 WS 群) と潰瘍周囲の皮膚 (潰瘍 WS 群)、末梢動脈疾患 (PAD) 患者 3 名の足潰瘍周囲の皮膚 (潰瘍 PAD 群) でポドブラニン抗体を用いた免疫組織化学染色を比較検討した。非潰瘍 WS 群では、リンパ管は内腔が狭く、密度もまばらであった。潰瘍 WS 群では、内腔の発達が不十分なリンパ管が不規則な配置で増殖していた。潰瘍 PAD 群では、リンパ管腔が拡大し、直線的に整列していた。3 群のリンパ管の内腔断面積 (LA) を測定した (表 1)。潰瘍 WS 群の LA は、非潰瘍 WS 群よりも大きく ($P = 0.0034$)、潰瘍 PAD 群よりも小さかった ($P < 0.0001$)。微小リンパ管密度 (MLVD) は、3 群のグループすべてで測定した。潰瘍 WS 群の MLVD は、非潰瘍 WS 群 ($P < 0.0001$) および潰瘍 PAD 群 ($P < 0.0001$) より高かった。

(3) WS の LEC において、WRN タンパク質は細胞質に集積している
WS 患者 2 名 (WS1、WS4) および PAD 患者 1 名 (PAD1) の潰瘍皮膚組織のリンパ管内皮細胞における WRN タンパク質の細胞内局在について共焦点顕微鏡を用いて調べた。PAD 患者では、WRN タンパク質は主に核周辺病変部に存在し、核内では核小体様染色を示した。逆に、WS1 および WS4 では、LEC と同定されたポドブラニン陽性細胞の細胞質内に拡散的に発現が増加し、分布していることが確認された。細胞質で WRN タンパク質が増加した LEC は、構造異常のあるリンパ管からなる再生 LEC に出現した。さらに、WS4 では、細胞質および核で WRN タンパク質の増加が見られた。つまり、変異した WRN タンパク質の細胞質への蓄積は、リンパ管の異常の発生と関連している可能性がある。WS 患者では、WRN の細胞質への蓄積が、加齢に伴うリンパ管の変性や異常なリモデリングを引き起こし、その結果、リンパ管に異常が生じ、ドレナージ機能の低下により内腔結晶が発達することが、もっともなメカニズムの一つであると考えられる。

(4) 今後の展望

今回、WS の潰瘍周囲の皮膚で未熟なリンパ毛細血管が増殖し、内腔にリン酸カルシウムが蓄積

していることが確認された。WS 患者のリンパ管内皮細胞の細胞質では、WRN 変異タンパク質が高濃度で蓄積していた。これらの結果から、変異タンパク質の蓄積によりリンパ管内皮細胞が傷つき、老化と同様のリンパ管の変化が起こり、その結果、WS ではリンパ管のドレナージ機能が低下していると考えられる。このリンパ管のドレナージ機能の低下は、皮下組織の石灰化、炎症の長期化、創傷治癒の遅延の原因のひとつと考えられる。一方、過去の報告では b-FGF がリンパ管の代謝を制御することで、リンパ管の分化と成熟に必要な因子である Prox1 の安定性を高めることが示されている。b-FGF はリンパ管内皮細胞においてヘキソキナーゼ 2 (Hk2) の発現を誘導し、Hk2 はグルコース代謝を促進して Prox1 の分解を防ぐことで、リンパ管の発達を促進すると考えられている。WS の難治性皮膚潰瘍においても SeV-FGF-2 の局所投与により b-FGF が組織内で産生されることでリンパ管の成熟を安定させ、ドレナージ機能の改善をもたらす創傷治癒の一助となる可能性がある。今後は WS モデルマウスを使用し、SeV-FGF-2 の局所投与の安全性や有効性、リンパ管に与える影響を検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogata Hideyuki, Akita Shinsuke, Ikehara Sanae, Azuma Kazuhiko, Yamaguchi Takashi, Maimaiti Maihulan, Maezawa Yoshiro, Kubota Yoshitaka, Yokote Koutaro, Mitsukawa Nobuyuki, Ikehara Yuzuru	4. 巻 13
2. 論文標題 Calcification in Werner syndrome associated with lymphatic vessels aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 25717 ~ 25728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.203789	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 緒方 英之
2. 発表標題 Werner症候群の石灰化と難治性皮膚潰瘍はリンパ管の異常老化と関連する
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 緒方 英之
2. 発表標題 Werner症候群における皮下組織石灰化の組織学的局在の解明
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------