

平成 23 年 5 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：基板研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591481

研究課題名（和文） 経皮的血管形成術後の血栓閉塞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 thrombosis after percutaneous transluminal angioplasty.

研究代表者

田村 正三（TAMURA SYOZO）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60150439

研究成果の概要（和文）：経皮的血管形成術後の血栓性閉塞の予防目的として種々の抗血栓、抗凝固薬が使用されているが、出血等の合併症のため、継続的に使用できない場合も多い。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障害血管壁で血栓形成に關与する 2 種類の遺伝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検討した。この結果、局所への遺伝子導入により、ラットの動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が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Anticoagulation is the usual treatment for prevention of thrombosis after percutaneous transluminal angioplasty. But excessive or spontaneous bleeding may be a side effect of anticoagulation. The present study examines whether local gene transfer suppress platelet aggregation and thrombus formation after adenovirus-mediated gene transfer to injured arterial wall. Conclusion; the local gene transfer to injured arterial wall might prevent thrombosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：血栓、遺伝子、ADAMTS13, 静脈、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

経皮的血管形成術は今日においては広く施行される IVR 手技であり、特に腸骨動脈領域においては、十分な抗血栓療法が併用できる場合には合併症の発生率も低く抑えられ良好な成績が得られている。問題となるのは、

出血性疾患の合併などにより周術期あるいは経過観察中における十分な抗凝固、抗血小板療法が困難となる場合が少なからず存在することである。ここで我々は、これまでに行った組換えアデノウイルスを用いた血管壁への遺伝子導入の経験から、局所遺伝子導

入による急性期および遅発性血栓閉塞予防の可能性に着目した。経皮的血管形成術の現状での問題は、全身投与による抗凝固が必要な点である。局所に対する遺伝子投与の利点としては、基本的に全身への影響はなく、必要な局所においてのみ効果を発揮することである。更に血管形成術にとって好都合な点は、手術などで抗血栓剤の投与を一時的に止めたい期間のみに、血管壁への遺伝子導入の追加により、必要な期間、局所での抗血栓効果が期待できる点である。現時点で考えられる他の方法では、血管形成術後の経過観察時に局所のみこのような抗血栓環境を追加で構築することは困難である。

我々のこれまでの血管壁に対する遺伝子導入の検討により、障害血管壁への局所遺伝子導入にて、全身への止血、凝固機能に影響を来すことなく、局所での血栓形成を抑制可能ことが示された。本研究ではこの結果を更に臨床応用に近づけることを目的とする。

2. 研究の目的

これまでの検討で我々は、遺伝子導入による局所での血栓抑制効果が可能であることを示したが、これまでの実験モデルの問題は血管形成術後の血栓形成機序と若干異なる点が存在することである。これまでの我々の検討では、レーザー照射により血管内にスーパーオキシドを発生させ、その血小板や内皮細胞への障害機序を介して強制的に血栓を作成している。そこで本研究においては臨床応用を目指して、実験動物に動脈硬化性病変を作成した後に、同病変に対し実際にバルーン PTA あるいはステント留置を施行し、遺伝子導入により血栓を抑制することを検討する。この過程においては、血栓形成機序はほぼ臨床とほぼ同様の状態と考えられる。

遺伝子導入する蛋白に関しては、すでに我々が過剰発現にて抗血栓作用を有することを示した二つの酵素 (Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase および ADAMTS13) を使用する予定である。Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase の過剰発現では血小板凝集および血管収縮における最大因子である ADP を分解することにより血栓閉塞、血管収縮を抑制することを示し、新たな治療薬としての可能性が示唆されている。一方 ADAMTS13 は超高分子フォンビルブランド因子の分解酵素であり、血小板の血管壁への粘着に重要な役割を果たしている活性型フォンビルブランド因子の形成に携わっている酵素である。これらの酵素の遺伝子を組換えたアデノウイルスを使用し、実験動物での血管形成術後の血栓抑制の検討を行う。本研究で行う血管形成術後の観察、遺伝子投与の検討はこれまで検討されてなく、国内外の他施設からの報告はな

い。

検討内容：

経皮的血管形成術後の血栓性閉塞の予防においては、望ましい部位 (血管形成術後) では抗血栓性を有し、望ましくない部位 (全身の正常部) では止血目的での血栓形成への影響がない薬剤が理想である。これまで多くの抗血栓薬が試行されてきたが、全身への影響は無視できず、この目的を達するものは存在しない。局所での遺伝子導入はこの問題を克服できる可能性を有している。

本研究で導入予定の遺伝子は Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase および ADAMTS13 を予定しているが、生体内ではこれらの wild type (野生型) 以外に変異体が存在することが知られている。変異体はそれらの構造から考えると wild type と同等あるいは若干弱い酵素活性を有し、その発現期間や半減期などが異なるものと予想されるが、その存在意義は不明なままである。変異体が発現効率や血中への分泌などの点で遺伝子導入、治療に適していることも考えられ、本研究では血管形成術後の血栓抑制効果が期待される wild type に加え、これらの変異体の遺伝子導入を行うことにより、これまで未知であった蛋白の生体内での効果も検討する。

そこで、今回の研究では、

- (1) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase および ADAMTS13 の変異体 (各々1, 3種類) の組換えアデノウイルスベクターを新たに作成し、培養血管平滑筋細胞に導入することにより、それぞれの酵素活性、分泌能、遺伝子導入効果を検討する。
- (2) 次に、動脈硬化性病変の作製のために実験動物の動脈を air injury で障害し、内膜傷害を起こさせる。この動脈に対して、wild type および変異体の組換えアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入した後バルーン PTA を施行し、生体内での酵素活性と発現期間、血栓形成の抑制能を分子学的、組織学的に検討する。
- (3) 上記の結果を踏まえ、最も遺伝子導入に適すると考えられる type を用い、実験動物の傷害動脈に遺伝子導入を行い、ステント挿入後の血栓形成の評価を行う。

予想される結果：

- (1) ステント留置を含め、血管形成術後の血栓形成に対して高度の血栓形成抑制効果が得られることが予想される。
- (2) 各酵素の変異体は基質を認識する領域の全領域あるいは一部分を有しているが、生体内での実際の酵素活性には、この領域以外に膜貫通領域や蛋白の立体構造などが関与し

ている。これらの検討はこれまでほとんど検討されておらず、本研究の結果によって、高い酵素活性を有しかつ蛋白発現の持続が得られる変異体の発見が期待される。

(3)これまでの予備実験の結果から、傷害後血管壁に導入された遺伝子は導入後2週間程度の持続蛋白発現と酵素活性を示すことが示された。遺伝子導入により、適度な抗血栓予防の追加も可能と予想され、臨床応用への発展が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換えベクターの作製

Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase および ADAMTS13 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週前後)の頸動脈を露出・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、経時的に頸動脈を採取し、血管壁の蛋白量を 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、動脈内血栓の程度、性状についての評価を組織学的に行う。また、遺伝子導入後の血管壁に対し、経時的に追加の血管内障害あるいはステント留置を行い、同様に血栓の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 組換えアデノウイルスは、Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase および ADAMTS13 の変異体について

の作成、評価を行った。また、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。ただ、ADAMTS13 に関してはアデノウイルス粒子として作成に難渋した。使用した組換えアデノウイルスキットの不安定さによるものと判断し、種々の方法を繰り返したが満足な結果が得られなかった。したがって、本報告内の実験においては、ADAMTS13 の結果に関しては、発現 plasmid を用いて実験をおこなった。引き続き、組換えアデノウイルスの作成が確認されたら、今後実験を追加予定である。

(2) 培養ヒト血管内皮細胞および平滑筋細胞に対してこれらの遺伝子の導入を行った。これらの培養細胞の RNA 解析、Western blot 解析を行い、目的蛋白の発現を確認した。また、免疫染色において蛋白の分布を評価すると、細胞膜に沿って蛋白の発現が認められ、細胞外基質に対しての効果が期待される状態であった。さらに、最終的にはラットにおける血栓評価を行う予定であるため、ラットの血管壁細胞での評価も行った。ラットの頸動脈を取り出し、この壁内の細胞を培養することにより、同様の評価を行った。結果はヒトの培養細胞と同様の結果であり、これらのヒト遺伝子がラットでも同様に発現することを確認した。この評価の後、Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase に関しては、ボランティアのヒト静脈血およびラットの静脈血を採取し、生体外における血小板凝集反応への影響を評価した。静脈血より作成した PRP と遺伝子導入した培養細胞を混在させた状態で、ADP 凝集およびコラーゲン凝集反応を評価すると、血小板凝集が有意に抑制された。また、ADAMTS13 に関しては、培養細胞液中でのフォンビルブランド因子分解活性の上昇が見られ、酵素としての高発現が示唆された。

(3) 以上の生体外での実験に引き続き、ラットの頸動脈における実験を行った。麻酔下にラットの頸動脈を露出し、air 障害にて内膜損傷を起こさせ、血管壁障害モデルを作成した。この血管壁障害モデルに対して、作成した組換えアデノウイルス(約 1.0×10^8 pfu/ml)あるいは発現 plasmid を含む溶液を結紮した動脈内に注入した。遺伝子導入5日後に頸動脈を採取し、動脈壁における目的蛋白の発現程度を検討した。Western blot 法および免疫染色では、遺伝子導入群においては、LacZ 遺伝子導入群に比べ、動脈壁内の蛋白の発現が多い傾向が認められた。この遺伝子導入血管における血栓形成への影響に関しては、再度の air 障害により PTA モデルを作成し、血栓形成への影響を検討することとした。組換えアデノウイルスの作成に難渋したため

ラットを用いた実験数が少なく、血栓に関しては詳細な評価は継続が必要であるが、これらの遺伝子導入群においては血栓形成の程度が少なく、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ている。

(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。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。

結論：遺伝子導入により障害血管壁で Ecto-nucleoside triphosphate diphospho-Hydrolase および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、遺伝子導入による局所蛋白発現では、障害血管壁における抗血栓効果の可能性も示唆された。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。

経皮的血管形成術後の血栓性合併症に対して抗血栓薬などを用いた研究もいくつか報告されているが、満足のいく結果は少ない。また、最近では諸酵素に対する抗体の有効性が報告されてきているが、in vivo での報告は少ない。本研究の局所遺伝子導入を用いた経皮的血管形成術後の検討は国内外においてほとんどなく、本研究の継続は臨床応用への発展も期待できるものである。

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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
所得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 正三 (TAMURA SYOZO)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：60150439

(2)研究分担者

矢野 貴徳 (YANO TAKANORI)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：20315378

畠山 金太 (HATAKEYAMA KINTA)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：60325735

山下 篤 (YAMASHITA ATUSHI)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：90372797

(3)連携研究者