

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591816

研究課題名(和文)分子標的を応用した新たな静脈血栓塞栓症治療

研究課題名(英文)Treatment of venous thromboembolism with molecular targeting

研究代表者

古小路 英二(Furukoji, Eiji)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00423723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット下大静脈に静脈血栓を作成した後、血栓溶解後に遺伝子導入を行い、血栓の予防効果を検討することを目的としている。

遺伝子組換えアデノウイルスの作製後、生体内外での評価を行った。生体内ではSDラットの下大静脈を露出し、結紮下で下大静脈に形成される静脈血栓の質的評価を行った。同部に対して血栓溶解の後、組換えアデノウイルスを用いて遺伝子導入を行った。この結果、血栓溶解を組み合わせた評価が期待され、今後は薬剤との関連検討を更に進める予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine the effects of the gene transfer after thrombolysis in rat inferior vena cava (IVC). We exposed rat IVC and venous thrombosis was induced by ligation of the IVC. After thrombolysis, we performed gene transfer using recombinant adenovirus. As a result, it was expected that we could evaluate the association between thrombolysis and gene transfer in this animal model.

研究分野：血管内治療

キーワード：静脈 血栓 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

静脈血栓塞栓症の重要性が認知されているが、依然としてその発症頻度は高い。我々の施設でも肺塞栓予防として IVC フィルター留置や深部静脈血栓の溶解・除去など、IVR による対策、治療が項を奏しているが、血栓吸引後に使用する血栓溶解剤や抗凝固剤の副作用による脳出血死亡例、薬剤継続困難のための血栓残存・増悪例などの治療困難例を多数経験した。これらの経験より痛感したことは、既存の薬剤、治療法の限界である。

静脈血栓に関する血小板や血液凝固因子の相互作用、分子生物学的評価等に関してはまだ不明確な点も多い。これまでに本学病理学教室と共同で、IVR にて下肢深部静脈より吸引した血栓を解析することにより、静脈血栓の免疫組織学的評価、形成抑制に関して検討を行ってきた。このなかで静脈血栓抑制を目的とした生体実験においては、ラット血管壁に抗血栓因子の遺伝子を過剰発現させることで、静脈血栓形成を抑制できることが示唆された。この検討においては、正常血管壁に抗血栓因子を過剰発現させた後に血栓形成を惹起して検討しているが、より臨床応用を目指すためには、血栓溶解後などに抗血栓因子を過剰発現させ、静脈血栓形成を抑制する検討が必要である。これは、静脈血栓塞栓症の治療を考慮した場合、局所での血栓抑制環境を維持、継続するためには血栓吸引・溶解を行なうことによってある程度血管壁を露出させた状態で抗血栓因子の過剰発現を起こさせる必要がある、この環境での静脈血栓抑制効果の検討など、実際の IVR 状況に応じた研究の継続、発展が必要と考えられるためである。そこで本研究においては、まずラット下大静脈に結紮あるいはレーザー照射にて血栓形成を行った後、血栓溶解を行う。その後、同部に抗血栓因子を過剰発現させ、血栓形成抑制効果を検討することを目的とする。抗血栓因子としては、これまでに血栓抑制効果を示した ADP 分解酵素 (Ecto-ATPase) および von Willebrand factor 分解酵素 (vWF-CP) の応用を予定している。

血栓の主な成分は血小板とフィブリンであるが、ADP 分解酵素は血小板凝集を抑制し、von Willebrand factor 分解酵素はフィブリン形成を抑制する。本研究においては、この二種類の抗血栓因子を血栓溶解後のラット静脈に過剰発現させ、種々の状況に合わせた静脈血栓形成を抑制しようとするものである。

静脈血栓には血液凝固因子の関与が主体とされてきたが、静脈血栓の形成場所、期間などにより内部性状が異なることが予想され、これまでの我々の検討により、血小板機能阻害、フィブリン形成阻害ともに静脈血栓抑制に重要と考えられる。上記二種類の抗血栓因子を応用することは、これまでにない新たな静脈血栓治療として、臨床への応用が期

待されるものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの臨床経験および研究を組み合わせることにより、新たな静脈血栓症の治療、管理を確立することである。カテーテルによる局所投与はいわゆる究極のドラッグデリバリーシステムであり、この手技と局所サイトカイン投与および遺伝子過剰発現を組み合わせることにより、これまでにない治療法の確立が可能となる。局所遺伝子発現は局所の血栓形成を抑制可能であり、かつ全身の合併症発生を抑制可能であることをこれまでの検討により示すことができたが、血栓溶解との組み合わせの検討など、まだ臨床応用への壁は多い。本研究ではこれまでの研究を臨床に応用することを目的として、ラット血栓形成モデルにて血栓溶解を行った後、抗血栓因子の分子を標的としてこれらの遺伝子を過剰発現させることにより、局所での静脈血栓形成を抑制することを検討する。

これまでの検討では、正常血管壁に遺伝子を過剰発現させることで静脈血栓抑制効果が得られることが示唆された。これらの結果を更に臨床に応用するためには、血栓溶解後の環境で静脈血栓抑制効果が得られるか検証が必要である。

本研究においては、まずラットの下大静脈に血栓モデルを作成する。その後静脈血栓の溶解を行ったのち、遺伝子の過剰発現を行い、静脈血栓の抑制効果を検討する。遺伝子の過剰発現としては抗血栓因子の発現プラスミド局所投与とアデノウイルスベクターによる投与を予定している。発現プラスミドはアデノウイルスベクターと比べ遺伝子導入効率は劣るが、炎症反応などの生体反応が弱いため、臨床応用を目指して同様に検討する予定とする。

静脈血栓の管理は慢性期も含め複雑であり、容易に治療を達成することは困難である。静脈血栓はその形成場所、発生からの期間、患者背景などを考慮する必要がある、静脈血栓の性状に基づいた検討が必要である。これまでに IVR にて吸引した静脈血栓の詳細な解析は少なく、検討されている施設は少ない。本研究ではこの解析結果も踏まえ静脈血栓抑制効果を検討する予定であり、この研究の特徴は、静脈血栓の性状に合わせた抗血栓因子を血栓溶解後に使用することにより、静脈血栓の治療に応用することである。また、抗血栓因子等の分子の局所発現は出血など全身的な合併症を抑えるために重要で、かつ強力な静脈血栓抑制効果を示すと考えられる。この結果が示せば、カテーテルを用いた臨床応用により近づけるものと考えられる。

以上のことを踏まえ、今回の研究では以下のごとく実験を行い、抗血栓因子の局所高発

現下での静脈血栓抑制効果を検討する。

(検討内容)

1) Ecto-ATPDase、vWF-CP 発現プラスミドおよびこれらの遺伝子を組換えアデノウイルスベクターを作製する。これを培養血管内皮細胞に導入することにより、その活性、分泌能、遺伝子導入効率、血小板凝集反応への影響を in vitro にて検討する。

2) 次にラットの静脈血栓モデルで血栓溶解を行った後、上記ベクターを使用し同部に遺伝子を過剰発現させ、生体内での血栓形成抑制効果を組織学的、分子生物学的に検討する。

(予想される結果と意義)

1) これまでの研究結果から、血管壁に導入された遺伝子は長期間蛋白発現と活性を示すと予想される。蛋白発現は目的静脈でのみ見られ、全身の凝固状態には影響はもたらさないと予想される。

2) 血栓溶解後の状況において、遺伝子過剰発現による静脈血栓抑制効果が予想される。

3. 研究の方法

平成 24 年度には、生体外実験として血管内皮培養細胞を用いた遺伝子導入による血栓形成抑制効果、細胞機能への影響評価、ベクターの力価確認を行う。平成 25 年度および 26 年度には、ラットの下大静脈に静脈血栓モデルを作成する。同部に対して遺伝子の過剰発現を行い、その後血栓形成抑制効果の検討を行う。ラットは血小板の反応性が強く、本研究に適した動物実験である。種々のラットについて検討し、SD ラットが最も適していることを確認している。実験動物における血管病変の作成、血栓形成の手技に関しては実践済みであり、本研究でもその手技を応用する。

(平成 24 年度)

1) 遺伝子組換えアデノウイルスの作製

Ecto-ATPDase、vWF-CP 発現プラスミドおよびこれらの遺伝子組換えアデノウイルスを作製する。蛋白質の cDNA を shuttle vector へクローニングした後、その vector を用いてアデノウイルスの遺伝子組換え体を作成する。これまでに遺伝子組換えアデノウイルスを作成した経験が複数回あり、同様の手技で遺伝子組換え体を作製する。

2) 培養細胞への導入実験

作製した発現プラスミドおよび遺伝子組換えアデノウイルスによる遺伝子導入効率を培養細胞にて検討する。培養細胞にはヒト血管内皮細胞を使用する。この細胞に対し遺伝子導入を行い、遺伝子導入の効率、目的蛋白の発現、活性、力価を測定する。

(平成 25 年度)

1) 動物実験モデルの作製

SD ラット(、生後 8 週前後)の下大静脈を露出し、血栓形成を行う。血栓形成は結紮あるいはレーザー照射(ローズベンガル+緑色光照射)にて行う。

2) 遺伝子導入、評価

上記の下大静脈血栓モデルにおいて血栓溶解を行い、静脈血栓の変化、血管壁の性状評価を行う。この評価の後、血栓溶解後の静脈に発現プラスミドおよび遺伝子組換えアデノウイルスベクターを用いた遺伝子過剰発現、血栓抑制効果の検討を行う。ラットは経時的に安楽死させ、血管壁の Ecto-ATPDase、vWF-CP 蛋白量および活性の評価、静脈内血栓の量、性状、抑制効果を検討する。

(平成 26 年度)

1) 動物実験モデルの作製

平成 25 年度同様に、SD ラットの下大静脈に対し血栓形成を行う。

2) 遺伝子導入、評価

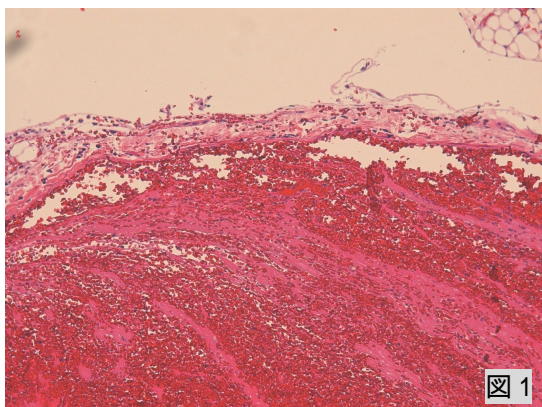
検討項目は、平成 25 年度と同様にラットの下大静脈血栓モデルにおいて血栓溶解後の局所遺伝子過剰発現による血栓抑制効果を検討する。経時的に動物を安楽死させ、静脈内血栓の量、性状、抑制効果を検討する。

4. 研究成果

平成 24 年度には、初年度としての実験計画に基づき、目的遺伝子の発現プラスミドおよびこれらの遺伝子組換えアデノウイルスを作製、精製、力価確認を行った。組換えアデノウイルスはサイトメガロウイルスの初期プロモーターの末梢に Ecto-ATPDase、vWF-CP の cDNA を入れ込んだ状態で作成した。培養細胞を用いた遺伝子導入による蛋白の発現量および活性の評価、細胞機能への影響評価を行った。蛋白発現は RT-PCR による RNA 評価、ウエスタンブロットによる蛋白評価で確認した。活性は採取血液を用いた血小板凝集実験にて評価した。この結果、目的蛋白の発現を確認し、血小板凝集反応でも目的とした蛋白機能発現を確認した。

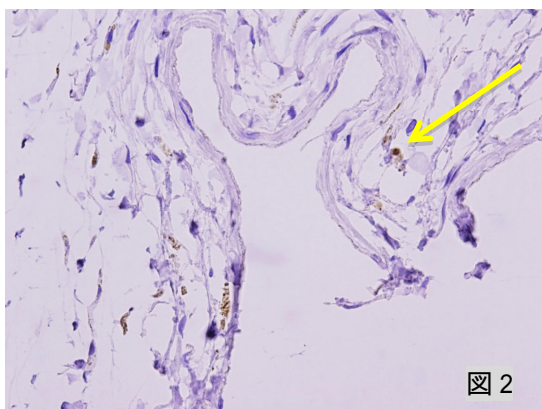
平成 25 および 26 年度には、生体外での実験結果および実験計画に基づき、ラットでの

静脈血栓モデル作製、血栓評価を行った。SDラットの下大静脈を麻酔下で露出し、腎静脈下での下大静脈結紮により静脈血栓モデルの作製を行った。この腎静脈下での下大静脈結紮にて2日後には閉塞性静脈血栓が形成されていた(図1)。

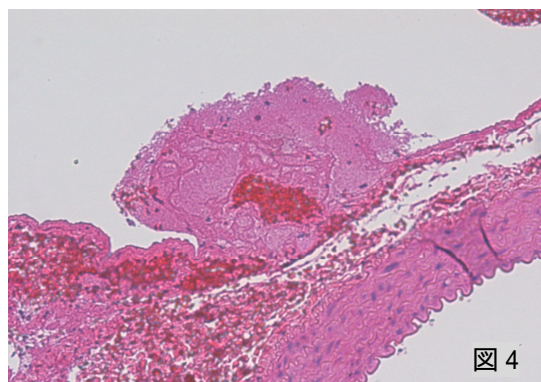
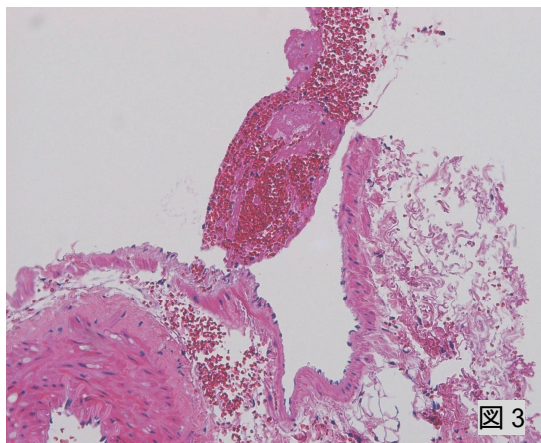


静脈血栓の性状は赤血球と血小板、フィブリンが混在した血栓であり、その程度は結紮部からの距離で差が見られた。また、血栓は腎静脈下の結紮直下で最も大きく、結紮部から尾側へ距離が離れるに従って下大静脈の血栓量は減少した。静脈血栓に関しては、血管結紮により今回の実験で評価可能なレベルで静脈血栓が形成されることが確認された。

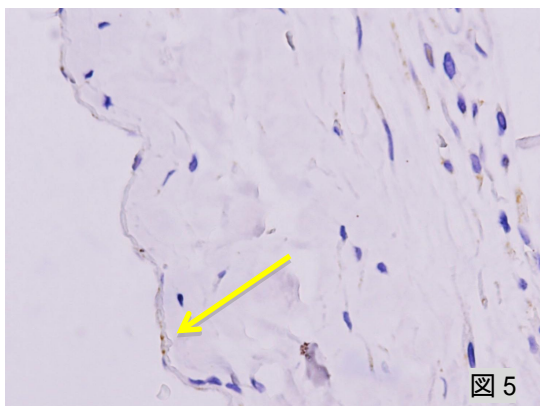
この結果を元に、形成された静脈血栓に対し血栓溶解剤(ウロキナーゼ)の投与および組換えアデノウイルス遺伝子導入を行い、血栓の変化と遺伝子導入効率を検討した。結紮にて形成された2日後の下大静脈血栓に対し血栓溶解剤を投与したところ、血栓量の減少が見られた。この後組換えアデノウイルスを投与し遺伝子導入を行った結果、静脈周囲に蛋白の発現が見られた。当初予想された発現部位は静脈壁であったが、静脈壁での発現は少なく、その周囲の細胞で確認された。発現が見られた細胞は CD68 陽性細胞であり、マクロファージと考えられた(図2)。



この結果を元に、血栓溶解後の遺伝子投与による蛋白発現部位についての検討を行った。静脈血栓が形成された部位では壁の構造に変化が見られ、内皮細胞や平滑筋細胞などの性状が変化していることが予想された。そこで、比較的短時間で形成される下大静脈血栓で実験を行うこととした。結紮後に経時的に血栓形成の程度を検討した結果、15分でも少量の血栓が形成され(図3)、30分でその血栓量が増加することがわかった(図4)。



この結果を踏まえ、下大静脈を1時間結紮した後の静脈血栓に対し、血栓溶解剤投与と組換えアデノウイルス投与を検討したところ、血栓量の減少と静脈壁への遺伝子導入が示唆された(図5)。



この結果、血栓溶解後の遺伝子導入にて静脈壁での目的蛋白発現と血栓への影響が示唆された。しかし形成された血栓量はこの時点では少ないことが予想され、全体として血栓形成および血栓溶解の影響評価としては不明な点も多い。今回は形成された血栓量が比較的少ない時期での検討となったが、実際の臨床では形成後長期間の血栓も治療対象となる。今後この点を考慮に入れ、検討する必要がある。

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 (FURUKOJI 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

(3)連携研究者

該当なし