

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790038

研究課題名(和文) 生体内血管新生イメージングを基盤とした革新的新生血管誘導療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of innovative angiogenic therapy using with in vivo imaging of angiogenesis

研究代表者

濱田 庸 (Hamada, Yoh)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20611958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の一番目の目的である、血管壁細胞と血管内皮細胞を同時イメージングするために、独自のヘテロ標識二量体のVEGFないしPDGFの作成に成功し、培養細胞においてその生理活性が保たれている事、それぞれの受容体発現細胞にVEGFもしくはPDGF-蛍光粒子複合体を投与した際、有意に高い蛍光強度を示す事に成功した。それを元にしてin vivo imagingを試みたが、血管壁細胞と内皮細胞の同時イメージングの画像取得方法の調整に難航し、また、血管新生療法を実現するウイルス粒子の作成にも難航し、当初の計画の目的を十分に達成する事が出来なかった。今後も研究をつづけ、課題を解決していく予定である。

研究成果の概要(英文)： To establish double imaging technique which can visualize vascular endothelial and mural cells together, we intend to make novel hetero-tagged recombinant VEGF and PDGF. Finally, we succeeded in establishing these proteins. At first, we checked these normal physiological activity. Cells which expressed these receptors showed significantly high fluorescence with protein-fluorescent particle complex. Then, we tried to visualize vascular endothelial and mural cells simultaneously using with animal model. But, there were several difficulty such as auto-fluorescence. It took too much time to decide adequate imaging condition. Moreover, we have much trouble to make virus particles for angiogenic therapy. So, we could not accomplish our aim enough. We want to continue making effort to overcome several problems which we confront.

研究分野：血管新生

キーワード：血管新生治療 血管新生メカニズム

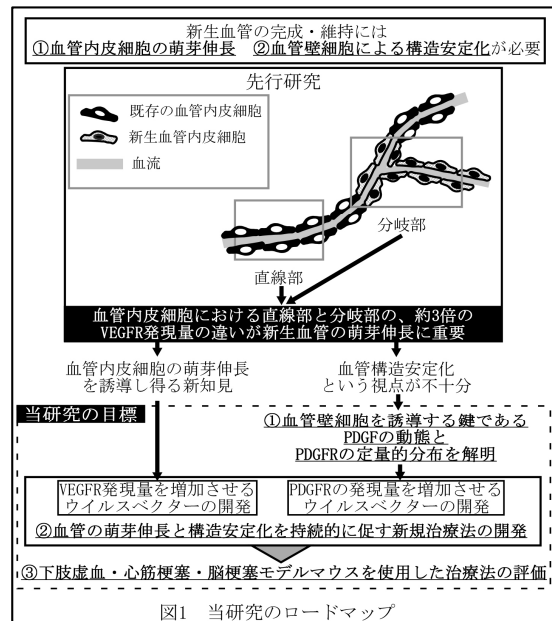
1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患による国内死亡率は30%を超え、癌と匹敵する死亡原因である。罹患率は高齢者で高く、高齢化社会を迎えた日本では新規治療法の開発が重大な意義を持つ。動脈硬化による臓器・組織血流の低下には2つの型がある。即ち、径数cmから数mmの比較的太い動脈に血栓が形成されて血流が減少する型、また、径数 μm の毛細血管が閉塞し血流が低下する型である。前者では、カテーテルによる血管内治療や、バイパス(迂回路)形成術などの確立された治療法がある。しかし、後者では確立された治療法が無い。血管新生因子を用いた毛細血管新生療法などが行われているが、有効性を証明した大規模臨床試験はなく、新しい視点に立つ治療法開発が急務となっている。

申請者は、先行研究で、**血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: 以下 VEGF) の受容体 (VEGF receptor: 以下 VEGFR) 分布の僅か三倍の増加と勾配が、持続的な新生血管の萌芽伸長に重要な役割を示していることを1分子レベルで定量的に生体内イメージングすることに世界で初めて成功した** (Hamada Y, et al. *Blood*, 2011)。その知見から虚血組織において VEGF 受容体の発現量を3倍増加させれば、より効率的に血管新生を誘導できる可能性が存在する事が示唆される。しかし、持続的かつ安定な血流改善を得るためには不十分な視点がある。新生血管の構造を安定化させる為には、新生血管の内皮細胞が血管壁細胞に覆われることが必須である。その為には、壁細胞の誘導を制御する血小板由来成長因子 (Platelet Derived

Growth Factor: 以下 PDGF) の動態とその受容体 (PDGF receptor: 以下 PDGFR) の分布が導く、血管壁安定化の過程を定量的に明らかにし、新規治療法の機構に組み込む事が重要と考えられる。

従って、本研究では、**#1 下肢虚血モデル動物を用いて、虚血組織における PDGF の動態、PDGFR の分布を定量的に生体内イメージングして新生血管の構造安定化の機構を詳細に明らかにし、先行研究の結果も合わせ、#2 血管の萌芽伸長と構造安定化を持続的に誘導する新規血管新生療法を開発する。更に、#3 その治療法を、下肢虚血モデルマウスのみならず、心筋梗塞モデルマウスや脳梗塞モデルマウスにおける生体内分子イメージングを用いて評価すること**を着想した(図1)。



2. 研究の目的

#1、虚血組織における PDGF の動態、PDGFR の定量的・一分子生体内イメージングを行う

PDGF に高輝度で一分子の定量評価が可能な蛍光分子を結合させ、下肢虚血モデルマウスに投与する。虚血組織全体における PDGF の動態を明らかにし、更に一分子生体内イメージング装置を用いて、血管壁細胞における PDGFR の分布を経時的に明らかにし、血管構造安定化に関わる壁細胞の分子メカニズムを定量的に明らかにする。

#2、構造的に安定な新生血管を誘導す

新規血管新生療法を開発する

先行研究と#1の結果を元に、VEGF受容体遺伝子またはPDGF受容体遺伝子と同時に、GFP遺伝子やRFP遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込む。培養細胞において、遺伝子導入効率や細胞分裂に与える効果を多面的評価した後、マウス正常筋組織において、それらの遺伝子が血管内皮や壁細胞に導入されることを生体蛍光イメージングで確かめる。

#3、心筋梗塞モデルマウス、脳梗塞モデルマウス、下肢虚血モデルマウスによる治療評価を行う

先行研究で用いた下肢虚血モデルマウスに加えて、心筋梗塞モデルマウス、脳梗塞モデルマウスを新規に樹立し、それらの分子イメージング技術を確立して主な動脈硬化性疾患を網羅する評価系を確立する。新規治療により誘導される血管新生を生体内で1分子レベルで定量的にイメージングして効果判定を行う。

3. 研究の方法 平成24年度計画

(1)PDGF結合蛍光分子の作成とin vitroアッセイ

遺伝子工学的手法を用い、PDGF蛋白質にビオチン結合蛋白質を導入する。その際、PDGFの生理活性を保つ至適導入部位を綿密に検討する。変異PDGFに蛍光が高輝度で、かつ定量評価可能なアビジン化量子ドットを結合させる(PDGF量子ドット)。これをPDGFR無発現、低発現、強発現細胞に投与して蛍光量の定量分析を行い、選択的反応性を担保する(図2)。

(2)下肢虚血モデルマウスを用いたPDGF蛍光粒子の動態とPDGFR分布の生体内解析

血管新生先端部ではVEGFRの発現が上昇して新生血管の萌芽伸長に寄与されている。申請者は裏付けの一つとして、虚血肢の血管分岐部ではVEGF受容体分布が直線部よりも増加約三倍増加している事を示した(Hamada Y, et al. *Blood*, 2011)。PDGFに関して同様の事が定性的に言われているが、定量的解析はなされていない。本研究ではそれを目標とする。

まず、マウス下肢でのPDGF量子ドットの動態を見るため、励起光を下肢全体に照射し量子ドット由来の蛍光を検出する。虚血肢における有意なPDGF量子ドットの集積を確認し、生体内一分子蛍光イメージング装置を用いて血管壁細胞におけるPDGFRの定量的分布を解明する。生体内で蛍光一分子由来の蛍光を正確に定量し、単位血管長あたりの蛍光粒子数で受容体発現量を定量評価する(図2)。

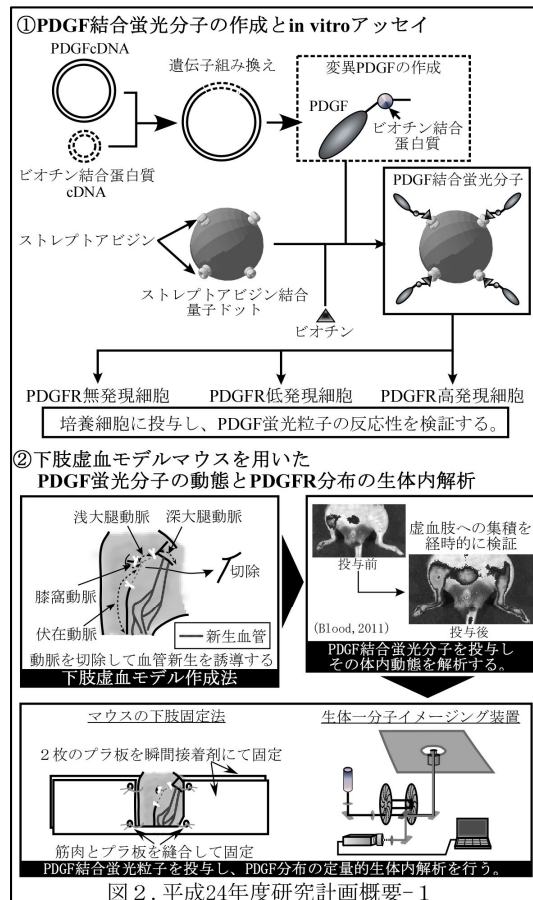


図2. 平成24年度研究計画概要-1

③ VEGFR または PDGFR 遺伝子導入ベクターの作成

え 遺伝子改変を加えてエンベロープに proteinA の抗体結合部位を組み込み、血管内皮細胞、壁細胞に特異的な抗体を結合させ、血管内皮細胞、壁細胞にそれぞれ嗜好性を持つレンチウイルスベクターを作成する(K Morizono et al. 2005, Nat med)。目的遺伝子は、標的細胞の周期に関わらず選択的に導入され、発現は長期間維持される。また目的遺伝子が導入されたことを可視化する為、蛍光蛋白質遺伝子も組み込む。血管内皮細胞に対しては vegfr+gfp 遺伝子(vegfr-gfp)を、血管壁細胞に対しては pdgfr+rfp 遺伝子(pdgfr-rfp)を組み込む(図3)。

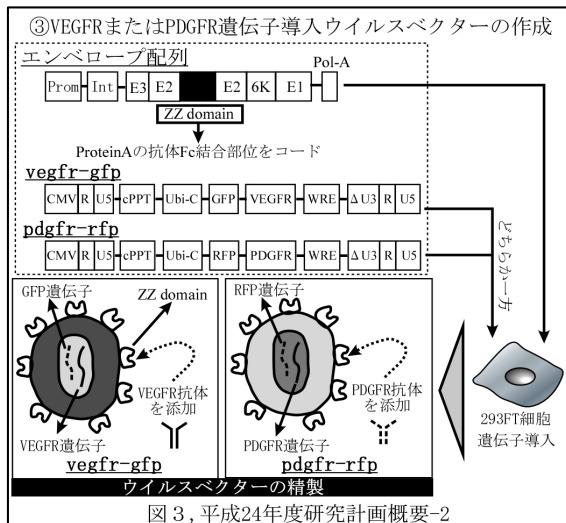


図3,平成24年度研究計画概要-2

平成 25 年度計画

①培養細胞を用いた遺伝子取り込み効率の検証

VEGF 受容体、PDGF 受容体をそれぞれ 1 つ低発現する培養細胞に、24 年度に作成したベクターを投与し、PDGF 結合量子ドットや、PDGF 量子ドットと同様に作成した VEGF 量子ドットを使用したウエスタンブロット等を行い受容体発現を確認する(図4)。

②生体内1分子イメージングによる遺伝子取り込みの検証と、治療効果の評価

ベクターを正常マウスに導入し VEGF

結合量子ドット、PDGF 結合量子ドットを投与して生体イメージングを行って血管内皮や壁細胞の受容体発現量が上昇することを確認する。更に、下肢虚血モデルマウスにベクターを投与して同様に生体イメージングを行い、新生血管先端部での血管構造安定化の過程や、構造的に安定した新生血管の本数を定量評価する(図4)。

平成 26 年度計画

①心筋梗塞モデルマウス、脳梗塞モデルマウスの樹立とイメージング手技の確立

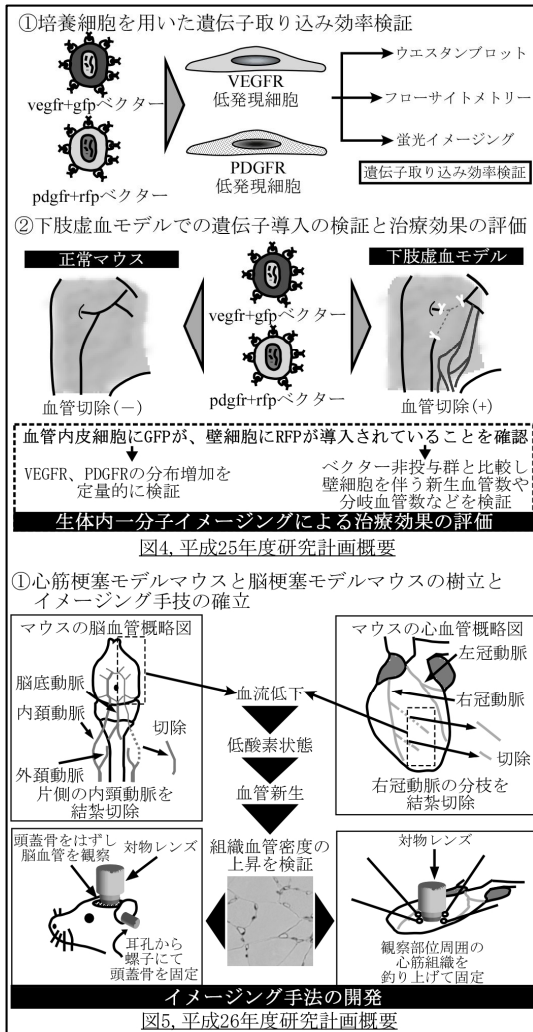


図4,平成25年度研究計画概要

図5,平成26年度研究計画概要

心臓を栄養する冠状動脈、脳を栄養する脳動脈を部分的に結紮して臓器血流を低下させ、心筋梗塞モデル、脳梗塞モデルを作成する。結紮する動脈を詳細に検討し、血管新生を観察可能なモデルを樹立する。イメージング手法は、脳梗塞モ

デルの場合、頭蓋骨を螺子で固定し、心拍動等による体動を最小限に押さえて観察する手法を開発する。また、心筋梗塞モデルの場合、ヒトの心臓手術で、心拍動の影響を低減し微細な手術を可能にする心臓つり上げ手技を応用し心拍動の影響を排除する手法を開発する。研究協力者として、慈恵会医科大学の生理学教室の福田准教授に協力を依頼する予定である(図5)。

(2)心筋梗塞モデルマウス、脳梗塞モデルマウスでの治療評価

心筋梗塞モデルマウス、脳梗塞モデルマウスにベクターを投与する。その後、生体一分子イメージングを行い、下肢虚血モデルマウスと同様に評価する。両者の所見に乖離がないことを検証する。

4. 研究成果

(1)PDGF 結合蛍光分子の作成と in vitro アッセイ結果

遺伝子工学的手法を用いて、His-tag, Strep-tag を C 末端に組み込んだ PDGF 並びに VEGF を作成した。VEGF に関しては、当初計画には盛り込んでいなかったが、後々血管内皮細胞と血管壁細胞の同時 in vivo imaging を行う事を視野に作成した。これらのベクターは大腸菌に組み込み、タンパク発現を行い、封入体内に選択的に発現させる事に成功した。封入体は可溶化処理を施した後、異なる二種のタグを持った PDGF あるいは VEGF を当量ずつ混合、巻き戻し作業、精製作業を経て、二量体の蛋白中に、ストレプトアビジン担持量子ドットに結合できる場所を一か所のみを持った His-Strep tag PDGF、His-Strep tag VEGF を作成した。これこれらの蛋白質は、培養細胞を用いて、細胞分裂能に与える影響が、リコンビナント PDGF または PDGF と統計学的に差異がない事を確認した。また、これらの蛋白質をストレプトアビジン量子ドットと結合させた後、PDGF 発現細胞ないし

VEGF 発現細胞と反応させ、これらの発現細胞が有意に高い蛍光強度を示す事を、一細胞蛍光イメージングで明らかにした。

これらの蛋白質作成に関して、多くの試行錯誤(特に巻き戻し条件について)を必要としたため、当初の計画より遅れて、二年間を必要とした。

(2)下肢虚血モデルマウスを用いた PDGF 蛍光粒子の動態と PDGFR 分布の生体内解析結果

下肢虚血モデルマウスを作成し、PDGF 蛍光粒子を投与して、in vivo imaging を行ったが、観察対象である毛細血管にある血管壁細胞の存在は免疫染色上もまばらであり、当初は、血管壁細胞からと思われる蛍光シグナルは得られるものの確証が得られなかった。そのため、新しく in vivo imaging 画像差分法を開発する必要に迫られ、現在までその条件検討が続いている。

(3)VEGFR または PDGFR 遺伝子導入ベクターの作成

VEGFR、PDGFR 遺伝子導入ベクターを作成するにあたり、図3のようなレンチウイルスベクターを作成する予定であったが、遺伝子コンストラクトを作成に時間がかかり、こちらも現在も作成作業が続いている。

総じて研究成果は当初予定を大幅に下回っているため、課題解決の向けてこれからも鋭意努力していく予定である。

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 5 件)

- (1) Hamada Y, Gonda K, Ohuchi N. In vivo Imaging of Cancer Vasculature with Newly Established Hetero-tagged Vascular Endothelial Growth-Quantum

dots complex. A3 Foresight 4th meeting:
Progress reports, January 18-19, 2015,
Beijing, China.

- (2) Hamada Y, Gonda K, Ohuchi N.
Establishment of Novel Hetero-tagged
Angiogenic Factors which can Apply to
in vivo Fluorescent imaging with high
resolution. Steering meeting of 3rd A3
Foresight Program, September 2-4,
2014, Westin Hotel, Sendai.
- (3) Hamada Y, Gonda K, Ohuchi N. High
resolution imaging of angiogenesis with
nanoparticles. 18th A3 foresight
Program: Steering Meeting meeting,
February 20-21, 2014, Daejeon, Korea.
- (4) Hamada Y, Gonda K, Ohuchi N. In vivo
imaging of the VEGF receptor during
angiogenesis in a mouse model of
ischemia. Kick-off meeting for A3
project, September 3-4, 2013, Beijing,
China.
- (5) Kawamura K, Gonda K, Hamada Y,
Kubota Y, Ohuchi N. High Resolution
Imaging of Angiogenesis in Hind Limb
Ischemic Model Mouse with
Nanoparticles. 7th International
Symposium on Nanomedicine.
November 7-9, 2013, Nakamura
Centenary Hall of Kyushu Institute of
Technology, Kitakyusyu.

〔図書〕(計 0)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
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 濱田 庸
(HAMADA YO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20611958