

論文の内容の要旨

論文題目 アデノウイルスを用いたヘムオキシゲナーゼ(HO)遺伝子
 導入による血管病変に対する治療の可能性の検討

指導教官 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 鈴木将敏

【背景】ヘムオキシゲナーゼ(Heme oxygenase, HO)は、ヘムをビリルビンに分解する反応の律速段階の酵素であり、ヘムの分解に伴い、一酸化炭素(Carbon monoxide, CO)、自由鉄が放出される。HOには誘導型のHO-1と構成型のHO-2、HO-3の3種類のアイソフォームが存在する。HO-1は、エンドキシン、ヘム、サイトカイン等の酸化障害、生体へのストレスによって誘導され、組織防御的な作用を有するとされる。動物実験モデルにおいて、HO-1の阻害剤の投与により昇圧反応が認められることや、HO-1の誘導が、頸動脈のバルーン障害後に生じる新生内膜の増殖を抑制することなどから、HOが生体内で生理的な役割を担っていることが理解される。一方、HO-1を誘導または抑制する薬物は、非特異的な作用を有するため、HO-1の特異的な作用の検討には適さない、という批判も存在する。そこで、今回の検討では、ratHO-1遺伝子を第二世代のアデノウイルスに組み込み、血管および生体内に導入し、その作用を検討することとした。

まず、生体外において血管にHO-1遺伝子を導入し、phenylephrine(PE)に対する反

応性の検討を行うこととしたが、アデノウイルスを用いた血管への遺伝子導入効率は低いため、遺伝子導入時に静水圧を加え、導入効率改善効果の検討も行うこととした。次に、HO-1 の代謝産物である CO は血管拡張作用を有し、他のガス性分子である一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) と共通の性質を持つことが知られており、NO は血管新生において重要な役割を演じていることが示されている。また、最近の *in vitro* における研究では、HO-1 遺伝子を内皮細胞に導入すると血管形成が促進されることが示されている。これらより、HO が血管新生において何らかの役割を担っている可能性が考えられるため、HO-1 遺伝子導入が、ラット下肢虚血モデルにおいて血流改善効果を有するか否かの検討を行うこととした。

【方法および結果】

1. 静水圧加圧による摘出大動脈への遺伝子導入

ラビット腹部大動脈に対し、静水圧加圧装置を用い Ad-lacZ とともに、最大 8 気圧、10 分間の加圧を行い遺伝子導入を行った。導入後 48 時間組織培養し、X-Gal 染色により組織学的検討を行い、 β -galactosidase 活性測定により導入効率の検討を行った。顕像では、内膜面、外膜面に著明な β -galactosidase 陽性細胞を認め、中膜にはごく少数の細胞に発現を認めるのみであった。加圧による導入効率の検討では、8 気圧の加圧にて、0 気圧 (大気圧下) での遺伝子導入と比較し、約 5 倍の β -galactosidase 活性の上昇を認めた。

2. 血管張力の検討

静水圧加圧により HO-1 遺伝子を導入した血管リングにおいて、PE に対する収縮反応は有意に抑制され、この抑制は HO 阻害剤である tin-protoporphyrin (SnPP) の投与により消失した。

3. ラット下肢虚血モデルに対する遺伝子導入が血流改善に及ぼす効果の検討

右大腿動脈より経動脈的にアデノウイルスを注入し、下肢筋肉に遺伝子導入を行った。その際、大腿静脈を 10 分間クランプし、その後大腿動脈を摘出し、下肢虚血モデルを作製した。血流改善の程度は、レーザードップラー血流計を用いて経時的に測定

し、健常肢と虚血肢の比を用いて検討した。また、摘出した下肢筋肉にアルカリフォスファターゼ染色を行い、毛細血管密度の計測を行った。一部のラットに対しては、虚血作成 2 日前より 7 日後まで、HO の阻害剤である zinc-protoporphyrin(ZnPP)を連日腹腔内投与し、検討を行った。レーザードップラー血流計による検討では、虚血作製 7 日目より、HO-1 群において、有意な血流改善効果を認め、この効果は、HO-1+ZnPP 群では認めなかった。また、術後 14、28 日にて、HO-1 群において有意な毛細血管密度の上昇を認めた。これに対し、HO-1+ZnPP 群では、毛細血管密度はコントロール群と同程度であった。

【考察および結語】

静水圧加圧により、摘出大動脈に対し短時間で高効率の遺伝子導入が得られることが示され、この手法を用いて HO-1 遺伝子を導入した血管リングで、PE に対する収縮反応が抑制された。虚血下肢への HO-1 遺伝子導入では、有意な血流改善効果が認められ、毛細血管密度の上昇も認めたことから、HO には虚血下肢筋肉において血管新生を促進する作用があることが示された。HO-1 はさまざまな刺激により誘導されることが知られており、将来的に、閉塞性動脈硬化症の治療への応用の可能性があることが示唆された。