

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 慢性虚血肢に対する血管新生を目的とした遺伝子治療の応用
指導教官 重松 宏 助教授
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
外科学専攻
氏名 大原 信介

背景

高齢化による動脈硬化症の増加に伴い、血行再建術の必要な患者が増えている。手術手技、材料の進歩による外科的血行再建術の成績向上にも拘わらず、血行再建不能症例は依然として多数存在する。一方、生体には動脈閉塞が生じた際に自ら動脈側副血行路を発達させる働きがあり、このメカニズムを利用して更なる血管新生を誘導することにより側副血行路の発達を促進し、下肢慢性虚血を著しく改善することができれば、外科的血行再建手術が不可能な症例に対する‘治療的血管新生’という概念の有効な治療手段となりうる。

下肢慢性虚血に対する遺伝子を用いた治療的血管新生に関してはより有効かつ安全な方法の検討が必要とされているが、今回我々は、下肢慢性虚血に対する血管新生を目的とした新たな治療方法を提示し、その効果をウサギ下肢慢性虚血モデルにおいて検討した。本研究では、インターロイキン 2 (IL-2) の分泌シグナルを挿入した組み換え bFGF 遺伝子をアデノウイルスベクターにて宿主ウサギから初代培養した線維芽細胞に ex-vivo で導入し、虚血肢内腸骨動脈内に留置されたカテーテルから選択的に細胞投与する方法を用いた。

アデノウイルスベクター

Original human bFGF と IL-2 の分泌シグナルを挿入した組み換え bFGF の cDNA から非分泌型 bFGF 遺伝子組み込みアデノウイルスベクター (AxCAJSbFGF) と分泌型 bFGF 遺伝子組み込みアデノウイルスベクター (AxCAMAssbFGF) を作製した。対照群として LacZ 遺伝子組み込みアデノウイルスベクター (AxCALacZ) を使用した。

アデノウイルス導入細胞における bFGF 発現の検討

AxCAJSbFGF (非分泌型)、AxCAMAssbFGF (分泌型) の各ウイルスを日本白色ウサギ皮膚切片より初代培養した 5×10^6 個の線維芽細胞に 20 pfu/個で導入した。ウイルス導入細胞から発現される bFGF について、時系列に細胞培養液と細胞溶解液を採取し、Western 法と ELISA 法で線維芽細胞内外に発現する bFGF 蛋白の定性、定量分析を行い、分泌された bFGF の細胞分裂促進活性をトリチウムサイミジン法にて計測した。その結果、bFGF 分泌型ウイルスベクター導入細胞からは、一定期間にわたり高い細胞分裂促進能を有する bFGF 蛋白が細胞外へ発現していることが認められ、bFGF 分泌型ウイルスがウサギ下肢慢性虚血モデルにおける血管新生を目的とした遺伝子治療の検討に相当であると判断した。

ウサギ下肢虚血モデルにおける血管新生についての検討

材料と方法

日本白色兎 (雄、2.5~3.0kg) の左大腿部で大腿動脈を分枝を含めて完全に切除し、左大腿部の動脈血行が左内腸骨動脈から発達する側副血行路に依存するウサギ下肢慢性虚血モデルを作製し、同時に左大腿部皮膚切片からウサギ宿主線維芽細胞を初代培養した。虚血モデル作製後 20 日目に 5×10^6 個の線維芽細胞に AxCAMAssbFGF (bFGF 群、n=11)、AxCALacZ (LacZ 群、n=12) 各ウイルスを 20 pfu/個で導入し、導入 24 時間後に各ウイルスベクター導入細胞を経カテーテル的に虚血側内腸骨動脈内投与した。

まず、虚血肢内腸骨動脈内投与したウイルスベクター導入細胞の体内分布、細胞分布と局所組織血流量との関係について $^{111}\text{In-oxine}$ 、 ^{51}Cr マイクロスフィアーを使用して検討した (n=5)。次に、bFGF 群、LacZ 群において細胞投与後 28 日目の虚血肢における血管新生の発達に関して、①選択的血管撮影、②calf blood pressure ratio、③angiographic score、④虚血側半膜様筋の capillary density、⑤虚血

側内腸骨動脈の安静時、最大血流量を検討した。一方で、ウィルスベクター導入細胞投与後 1, 4, 7, 14, 21, 28 日目の血清 bFGF 濃度、アデノウイルス抗体を時系列計測した。また、下肢内転筋、肺、肝臓等の組織を採取し、虚血側内転筋で捕捉される遺伝子導入細胞数を免疫染色にて組織学的に検討し、各組織内に発現される bFGF レベルを heparin-Sepharose を用いた Western 法にて定性した。

結果

内腸骨動脈内投与された細胞の体内分布については、左虚血下肢における有意に多量の細胞集積を認めた（約 45%）。また、各臓器組織への細胞分布と局所血流量の関係については、両側下肢筋肉における細胞分布率と局所血流量が高度な相関関係を示し、正常血行の右下肢筋肉の細胞分布率と局所血流は虚血左下肢筋肉の各数値より有意に高値であった。

ウィルスベクター導入細胞投与後のウサギ下肢慢性虚血モデルにおける血管新生についての検討では、①選択的内腸骨動脈撮影では、LacZ 群において側副血行路発達をほとんど認めることができなかつたのに対して、bFGF 群では著明に多数の側副血行路発達を認めた。また、②calf blood pressure ratio (0.756 ± 0.050 vs 0.584 ± 0.049, $P < 0.01$)、③angiographic score (0.695 ± 0.082 vs 0.330 ± 0.126, $P < 0.01$)、④capillary density (190 ± 18 vs 122 ± 19 /mm², $P < 0.01$)、⑤blood flow (rest: 21.7 ± 1.9 vs 12.9 ± 1.9 ml/min, maximum: 50.3 ± 5.7 vs 33.1 ± 8.0 ml/min, $P < 0.01$)と計測した全項目で、bFGF 群は著明な側副血行発達による虚血の改善を示した。

血清 bFGF 濃度、血中ウィルス抗体価の有意な上昇は認められなかつた。また、虚血側左内転筋の免疫染色では bFGF 陽性細胞が 1, 4, 7 日目において組織学的に認められたが、対照群では陽性細胞をほとんど認めなかつた。bFGF 陽性細胞は 7 日目以降漸減し、14 日目以降は対照群と同様にほとんど認められなかつた。組織内 bFGF 発現定性では、左内転筋にて充分量の bFGF 発現が 4, 7 日目をピークとして 28 日目迄示されたが、肺、肝臓に関しては有意な bFGF 発現を認めなかつた。

考察

今回、我々は下肢慢性虚血に対する血管新生を目的とした新たな治療方法を提示した。本法では、分泌シグナルを挿入した bFGF 遺伝子をアデノウイルスベクターを使用して ex-vivo 法でウサギ線維芽細胞に導入し、虚血肢内腸骨動脈内に経カテーテル的に投与したが、その結果、ウサギ下肢慢性虚血肢モデルにお

いて著明な側副血行路の発達と組織血流の改善を示した。

本研究の特徴は、まず Ex vivo での遺伝子導入細胞を経カテーテル的に虚血側左内腸骨動脈に選択的投与し、投与細胞を虚血肢の筋肉組織内に有意に集積させることができたことである。虚血側大腿部筋肉内に集積した遺伝子導入細胞数、分泌された bFGF 蛋白量ともに他の組織、臓器と比較して有意に多量であることが示された。

次に、第一世代アデノウイルスベクターを用いたことである。本研究では Ex-vivo 法によりアデノウイルスベクターを用いてウサギ線維芽細胞に bFGF 遺伝子を導入してから宿主動脈内に細胞投与するため、高い導入効率を保つことが可能であり、液性免疫反応を示さないので、遺伝子導入細胞の繰り返し投与が可能となる。一方で、T 細胞による細胞性免疫反応の誘導により比較的短期間の機能に限られることを考慮すると、目的遺伝子の体内における発現量および期間をある意味で制御していることになる。

bFGF 蛋白には血管新生を誘導する機能が認められており、本研究においても遺伝子導入細胞から分泌された bFGF が動脈末梢部で側副血行路新生を誘導したと考えられる。本来 bFGF には分泌シグナルが存在しないが、IL-2 の分泌シグナルを挿入したことによりウイルスベクター導入細胞からの bFGF 蛋白分泌が誘導され、虚血組織内で血管新生が生じたと考えられる。

最後に、本法は虚血組織における血管新生を目的とした遺伝子治療法であり、遺伝子導入細胞から分泌される bFGF による、他の組織への影響について検討した。投与細胞が肺や肝臓をはじめ他の臓器にも至っていることが RI 実験で示され、他臓器に捕捉された遺伝子導入細胞から一定期間内 bFGF 蛋白が分泌されることによる副作用出現について検討したが、組織学的にも非虚血組織における bFGF 分泌を原因とする明らかな副作用は認められなかった。

結語

本研究にて、我々は慢性虚血組織に対する血管新生を目的とした新たな遺伝子治療法を提示した。ウサギ下肢慢性虚血モデルにおいて、IL-2 の分泌シグナルを挿入した組み換え bFGF 遺伝子をアデノウイルスベクターによりウサギ自家線維芽細胞に Ex-vivo で導入し、虚血側内腸骨動脈に経カテーテル的に投与し、有意な新生血管の発達による虚血の著明な改善が認められた。