

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 Ex vivo 法による遺伝子
治療の至適投与量と複数回投与に関する検討

指導教官 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

石井 誠之

【緒言】

重症下肢虚血症例に対し、生体が本来持つ動脈の側副血行路の発達を促進させることができれば、有効な治療法となり、治療的血管新生という概念の臨床的実現が期待できる。血管新生療法においては、どの血管新生因子をどのようにして虚血部位に到達させるかが重要である。

一般に血管新生には、Vasculogenesis、angiogenesis、arteriogenesis の 3 つの過程で成立するが、機能的な側副血行路の発達には arteriogenesis が重要である。bFGF には arteriogenesis を誘導する働きがあり、また angiogenesis にも関与しているとされている。当科の血管新生療法では bFGF を使用した。成長因子タンパクの動脈内投与や、血管新生因子の naked plasmid DNA を虚血筋肉に投与した遺伝子治療は、動物実験では良好な血管新生を認めたが、臨床試

験の成績は満足のものではなかった。

2001年東京大学血管外科は ex vivo 法を用いた新たな遺伝子導入法を提示した。

特徴 1. 血管新生因子の遺伝子の ex vivo 法での虚血組織への導入

ウサギ線維芽細胞を培養し、これに遺伝子を導入し投与した。

特徴 2. 分泌型 bFGF の導入

本来の bFGF 遺伝子に IL-2 の分泌シグナルを挿入し、細胞外に bFGF を分泌するようにした組み換え bFGF 遺伝子を使用した。

特徴 3. アデノウイルスベクターの使用

遺伝子導入効率が高いが、生体内での遺伝子導入細胞が数週間で排除される。

特徴 4. 遺伝子導入細胞の虚血肢内腸骨動脈からの投与

血管新生因子の標的部位は、虚血部位そのものではなく、虚血部位の近傍で側副血行路の拠点となる血流豊富な donor artery が適していると考えられている。

ウサギの下肢慢性虚血モデルに対して上記の方法で遺伝子を導入し、良好な側副血行路の発達を認めた。

未解決の問題としては、治療の効果と安全性を両立させる投与細胞数である。以前の検討では、投与細胞の数は、 5×10^6 個のみであり、至適細胞数を決定する必要がある。またこの方法を複数回施行できるかどうかについても検討する。

【至適投与細胞数に関する検討—側副血行路の発達と組織還流の増加—】

1. 方法と材料

下肢慢性虚血モデル、線維芽細胞培養、ウイルス導入、動脈内細胞投与

ウサギの左大腿動脈を切除し、この時採取した皮膚切片からは線維芽細胞を培養した。 2.5×10^7 個の線維芽細胞を得るには 15~19 日を要し、虚血モデル作製後 20 日目、IL-2 を挿入した分泌型 bFGF 遺伝子組み込みアデノウイルスベクター (AxCAMAssbFGF) を導入した。その 24 時間後に、カテーテルを左内腸骨動脈内に留置し、 2×10^5 個 (2×10^5 群)、 1×10^6 個 (1×10^6 群)、 5×10^6 個 (5×10^6 群)、 2.5×10^7 個 (2.5×10^7 群) のウイルス導入線維芽細胞希釈液をそれぞれ動脈内投与した。2% FBS 添加 DMEM 液も同様に投与した (Vehicle 群)。

側副血行路発達の形態学的、生理学的、組織学的評価

大腿動脈切除直後、細胞投与直前、直後と 28 日後に両下肢後脛骨動脈の血圧を計測し、calf blood pressure ratio = (虚血側下肢血圧 / 健常側下肢血圧) とした。細胞投与 28 日後にドップラーガイドワイヤーを用いて安静時平均血流速度と塩酸パパベリン動脈内投与直後の最大平均血流速度を実測し、左内腸骨動脈の安静時および最大血流量を計算した。左内腸骨動脈選択的血管撮影を施行し、側副血行路発達を定量的に検討するため、angiographic score を算出した。殺処分後左半膜様筋を採取し、毛細血管内皮細胞を染色した。毛細血管の増加の検討のために capillary density を計算した。

2. 結果

2.5×10^7 群の 6 匹のうち 2 匹の Calf blood pressure ratio は細胞投与直後に 0 に低下していた。投与後 28 日目において、 5×10^6 群と 2.5×10^7 群の Calf blood pressure ratio は他の 3 群より有意に高値であった。 5×10^6 群と $2.5 \times$

10^7 群の angiographic score、capillary density、内腸骨動脈最大血流量は他の3群と比較して有意に高値を示した。安静時血流量は、 5×10^6 群と 2.5×10^7 群では Vehicle 群と比較して有意に高値であった。

3. 小括

ウイルス導入細胞投与 28 日後の側副血行路の増加は、 2×10^5 群と 1×10^6 群においては Vehicle 群と差を認めず、この系では少なくとも 1×10^6 個より多くの bFGF 分泌型ウイルス導入細胞を投与する必要があると考えられ、安全性の検討は 5×10^6 個以上の投与に対して施行することとした。また 2.5×10^7 個の細胞投与では末梢への塞栓の危険性を認めた。

【至適投与細胞数に関する検討－副作用と安全性－】

1. 方法と材料

内腸骨動脈内投与後細胞の体内分布率

^{111}In で標識したウサギ線維芽細胞 1×10^6 、 5×10^6 、 2.5×10^7 個をそれぞれウサギ下肢慢性虚血モデル左内腸骨動脈に投与し、5 時間後に両側の膝上部大腿筋肉、膝下部下腿筋肉、各臓器を採取し、各臓器への分布率、分布細胞数を計算した。

In vivo での bFGF 遺伝子の発現と副作用

bFGF 遺伝子導入線維芽細胞の体内における時系列的变化を検討するために、同様に 5×10^6 、または 2.5×10^7 個の遺伝子導入細胞、または 2% FBS 添加 DMEM 液を投与し、7、14、21、28 日目に両側内転筋、各臓器、血液を採取した。

細胞分布の多かった左内転筋、肺、肝臓での bFGF の発現を Western blotting 法により検討した。ELISA 法により、血清 bFGF 濃度を測定した。血清アデノウイルス抗体を中和法により定量した。血算、生化学と各組織の HE、EVG 染色に

よって、細胞投与の副作用を評価した。細胞投与による炎症反応の評価のために、投与7日目の左内転筋をマクロファージ、CD18、T細胞に対してそれぞれ免疫染色した。

ウイルス導入細胞の静脈系への投与

1×10^7 個の bFGF または LacZ 遺伝子導入細胞を正常なウサギの腸骨静脈に投与し、1, 4, 7, 14, 21, 28 日後に動脈血液ガス分析を施行した。投与後 7, 28 日目に肺を HE 染色、EVG 染色し、組織学的に評価した。

2. 結果

投与細胞の体内分布

1×10^6 個と 5×10^6 個の細胞投与では、標識細胞の約 45% は左虚血肢の筋肉に集積したが、 2.5×10^7 個の投与では左下肢筋肉への分布は約 10% で、肺に約 40% 集積した。 5×10^6 個と 2.5×10^7 個の細胞投与では、左下肢筋肉へ集積した細胞数には有意差を認めなかった。

In vivo での bFGF 遺伝子の発現と副作用

左内転筋に発現される bFGF は、 5×10^6 個と 2.5×10^7 個の細胞投与では、Vehicle 投与後と比べて、7, 14 日目に強く認められ、次第に漸減するが、21, 28 日目でも Vehicle 投与後よりは強く発現している。肺、肝臓は対照群と比べて有意な bFGF の発現を認めなかった。血清 bFGF 濃度は、時系列的にも 3 群間にも有意差を認めなかった。血中アデノウイルス抗体価は 2.5×10^7 個の細胞投与群では、 5×10^6 個投与群よりも有意に高値を示した。 5×10^6 個、または 2.5×10^7 個の細胞投与群では、血算、生化学、HE 染色、EVG 染色でも、Vehicle 投与後と比べて各時点で差を認めなかった。炎症細胞に対する免疫染色で 5×10^6 個

の細胞投与群は、Vehicle 投与群と比べて、これらの浸潤に差を認めなかった。

ウイルス導入細胞の静脈系への投与

PaO² と PaCO² は、時系列的にまた対照群とも有意差を認めなかった。肺の HE 染色、EVG 染色でも各群は組織学的繊維化に差は認めなかった。

【複数回投与に関する検討】

1. 方法と材料

下肢虚血モデル作製 21 日後に、ルシフェラーゼ遺伝子組み込みアデノウイルスベクター (AxCALuc) を感染させた線維芽細胞 5×10^6 個を虚血肢内腸骨動脈に投与し (第 1 回投与)、その 21 日後に同細胞を同様に投与した (第 2 回投与)。第 2 回投与 7, 14, 21, 28 日後に左下肢膝上部の筋肉を採取した (反復投与群)。第 1 回投与に非感染線維芽細胞を、第 2 回投与に AxCALuc 導入線維芽細胞を同様に投与された群を対照群として同様に検体が採取された。ルシフェラーゼアッセイにて左膝上部大腿筋肉に含まれるルシフェラーゼの量を計算した。

2. 結果

対照群では、左膝上部筋肉に著明なルシフェラーゼ蛋白の発現を認めたが、反復投与群では、第 2 回投与後ルシフェラーゼの発現はほとんど認められなかった。

【まとめ】

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、新生血管の発達

と安全性について検討した。側副血行路を十分に発達させ、また副作用を最小限にするための遺伝子導入線維芽細胞の最適な投与数は、今回のモデルにおいては 5×10^6 個であった。またこの遺伝子治療は3週間の間隔では繰り返し施行することはできなかった。長期的な効果と安全性や人に対する投与細胞数の検討などが今後の課題である。