

## 論文の内容の要旨

論文題目 慢性虚血肢に対する bFGF plasmid を用いた血管新生遺伝子治療 -in vivo エレクトロポレーション法の応用-

指導教員 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

氏名 西蔭 誠二

### 【はじめに】

今日、慢性動脈閉塞性疾患の治療において、側副血行路の形成を促進せしめることが新たな治療法として期待されている。とりわけ、横紋筋が plasmid DNA の形で投与された外来遺伝子を取り込み発現するという特徴を利用した、血管新生因子遺伝子を組み込んだ plasmid DNA の筋注投与方法に関してはその簡便性、安全性などから多くの研究報告がなされてきた。なかでも、血管内皮細胞増殖因子や肝細胞増殖因子に関しては動物実験および臨床レベルにおいても有効性が示されてきた。しかしながら、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) に関して plasmid DNA の筋注投与方法での血管新生療法の有効性をしめしたものはなく、そ

の原因としてわれわれは、筋注投与法の遺伝子導入効率の低さを第一と考えた。一方、近年、骨格筋を含む様々な組織で、in vivo エレクトロポレーション法が遺伝子導入効率を改善することが報告されている。

そこで、本研究においては以下の3点について検討、考察を行った。

- 1). IL-2 の分泌シグナルを挿入した bFGF 遺伝子組込み plasmid をウサギ線維芽細胞に遺伝子導入し、発現蛋白の定性および細胞分裂促進能について検討する。
- 2). ウサギ骨格筋に plasmid DNA を投与した場合の、in vivo エレクトロポレーション法の遺伝子導入効率に与える影響を検討する。
- 3). ウサギ後肢虚血モデルに、分泌型 bFGF 遺伝子組込み plasmid DNA (pCAcchbFGFcs23) を in vivo エレクトロポレーション法により遺伝子導入し、虚血肢における側副血行路形成を形態学的、生理学的に検討する。

### 【方法と材料】

本研究では vector plasmid として pCAGGS を使用した。これに IL-2 の分泌シグナルおよびヒト bFGF cDNA を挿入し plasmid pCAcchbFGFcs23 を作製した。動物実験におけるコントロール plasmid としては、*E. coli* LacZ 遺伝子を同様に組み込んで作製した pCAZ3 を用い、遺伝子導入効率を定量する際には、組換えルシフェラーゼ遺伝子(luc+)を組み込んだ pCAcluc+ を用いた。

まず、pCAcchbFGFcs23 を、日本白色ウサギより採取、培養した線維芽細胞にグリセロール負荷硫酸カルシウム法によりトランスフェクトさせた。培養液を毎日交換し、4 日目に培養液 50 $\mu$ l をサンプルとして採取した。これを、抗マウス bFGF 抗体を用いたウェスタンブロット法で bFGF の発現を確認した。また、培養液中に分泌された bFGF の DNA 合成促進能は  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込み分析法に

より定量した。

次に、in vivo エレクトロポレーション法の実際を以下に示す。麻酔下に日本白色ウサギの半膜様筋を露出し、27G 針を用いて筋表から 5mm の深さに 100  $\mu$ g pCAccluc+ /500  $\mu$ l PBS を筋注投与した。引き続きすみやかに 10mm の間隔で固定されたタングステン鋼電極を筋繊維と垂直方向に 7mm の深さに刺入し、電気刺激装置を用いて 50ms/sec の矩形電圧 3 発を与え、さらに逆向きの電気刺激を同様に 3 発与えた。7 日目に採取した半膜様筋からルシフェラーゼを抽出し、ルシフェラーゼ活性量 (pg) を測定した。電圧を 0V、25V、50V、75V、100V、150V と変化させた 6 群 (各々 n=5) を作製して電圧の差異による導入効率の変化を評価した。また、エレクトロポレーションによる筋組織への影響を評価するために、上記と同じ電圧刺激を与え、1 週間後の電極刺入部近傍の筋組織を組織学的に評価した

最後に pCAcchbFGFcs23 を in vivo エレクトロポレーション法によりウサギ後肢虚血モデルの虚血大腿筋に投与し、側副血行路形成を評価した。ウサギ後肢虚血モデルは、日本白色ウサギで左大腿動脈を切除することにより作製し、10 日後、1 個体あたり 500 $\mu$ g の pCAcchbFGFcs23 または、pCAZ3 を 75V のエレクトロポレーション法により投与した。コントロールとして筋注投与群も作製し、以下の計 4 群のモデルを作製した ; 1) 非エレクトロポレーション pCAZ3 投与群 (LacZ-E<sup>-</sup>群, n = 7)、2) 非エレクトロポレーション pCAcchbFGFcs23 投与群 (bFGF-E<sup>-</sup>群, n = 8)、3) エレクトロポレーション pCAZ3 投与群 (LacZ-E<sup>+</sup>群, n = 7)、4) エレクトロポレーション pCAcchbFGFcs23 投与群 (bFGF-E<sup>+</sup>群, n = 8)。28 日後、下腿血圧比、血管撮影スコア、左内腸骨動脈血流量、毛細血管密度、左内腸骨

動脈径を計測した。また、pCacchbFGFcs23 による遺伝子導入後の in vivo での発現を評価するために、血清 bFGF 濃度、および左内転筋における bFGF 量の経時的変化を、ELISA 法およびウェスタンブロット法によりそれぞれ分析した。

## 【結果】

ウェスタンブロット法では pCacchbFGFcs23 をトランスフェクトされた培養ウサギ線維芽細胞からは 2 種類の bFGF (18 kDa、22 kDa) が分泌されていたことが確認され、また、<sup>3</sup>H-thymidine 取り込み分析からは、pCacchbFGFcs23 をトランスフェクトさせた細胞の培養液は、コントロールの培養液に比して有意に高い DNA 合成促進能を有していた。

遺伝子導入効率に関しては、ルシフェラーゼ発現量は電圧が 100V までは電圧にはほぼ比例して上昇したが、150V では低下した。また、電極周囲には、炎症および筋組織の変性が認められ、電圧と共にその範囲は拡大したが、75V 以下では電極周囲に限局していた。

血管新生効果に関しては、まず、下腿血圧比は遺伝子導入直前においては、LacZ-E<sup>-</sup>、bFGF-E<sup>-</sup>、LacZ-E<sup>+</sup> および bFGF-E<sup>+</sup> の各群間で下腿血圧比に有意差は認められなかった。一方、遺伝子導入 28 日後では、bFGF-E<sup>+</sup> 群はコントロール群 (LacZ-E<sup>-</sup>) より高値を示した (bFGF-E<sup>+</sup> 群 ; 0.69 ± 0.052、LacZ-E<sup>-</sup> 群 ; 0.54 ± 0.020、P < 0.05)。しかしながら、他 2 群に関してはコントロール群との間に有意差は認められなかった (bFGF-E<sup>-</sup> 群 ; 0.053 ± 0.046、LacZ-E<sup>+</sup> 群 ; 0.53 ± 0.061)。血管撮影スコアは比較的直径の太い側副血行の発達を反映していると考えられるが、遺伝子導入 28 日後の各群の血管撮影スコアはそれぞれ LacZ-E<sup>-</sup> 群 ; 0.49 ± 0.14、bFGF-E<sup>-</sup> 群 ; 0.62 ± 0.072、LacZ-E<sup>+</sup> 群 ; 0.54 ± 0.079、bFGF-E<sup>+</sup> 群 ;

0.64±0.091 であり、bFGF-E<sup>-</sup> 群と bFGF-E<sup>+</sup> 群のみコントロール群より有意に高値であった ( $P<0.05$ )。また、この 2 群間においては有意差は認められなかった。次に、遺伝子導入 28 日後の各群の内腸骨動脈安静時血流量はそれぞれ LacZ-E<sup>-</sup> 群 ; 26.4±6.0 ml/min、bFGF-E<sup>-</sup> 群 ; 26.1±6.6 ml/min、LacZ-E<sup>+</sup> 群 ; 26.6±7.6 ml/min、 bFGF-E<sup>+</sup> 群 ; 40.6±7.5 ml/min、また、最大血流量はそれぞれ LacZ-E<sup>-</sup> 群 ; 62.2±11.7 ml/min、bFGF-E<sup>-</sup> 群 ; 63.9±20.0 ml/min、LacZ-E<sup>+</sup> 群 ; 68.8±11.2 ml/min、 bFGF-E<sup>+</sup> 群 ; 96.8±17.4 ml/min であり、bFGF-E<sup>+</sup> 群のみコントロール群より有意に高値であった ( $P<0.05$ )。また、遺伝子導入 28 日後の各群の毛細血管密度はそれぞれ LacZ-E<sup>-</sup> 群 ; 134.7±26.3 /mm<sup>2</sup>、bFGF-E<sup>-</sup> 群 ; 161.0±30.6/mm<sup>2</sup>、LacZ-E<sup>+</sup> 群 ; 145.7±30.2/mm<sup>2</sup>、 bFGF-E<sup>+</sup> 群 ; 192.3±18.1/mm<sup>2</sup> であり、bFGF-E<sup>+</sup> 群のみコントロール群より有意に高値であった ( $P<0.05$ )。さらに、遺伝子導入 28 日後の各群の毛細血管密度はそれぞれ LacZ-E<sup>-</sup> 群 ; 1.1±0.02mm、bFGF-E<sup>-</sup> 群 ; 1.3±0.06mm、LacZ-E<sup>+</sup> 群 ; 1.2±0.09mm、 bFGF-E<sup>+</sup> 群 ; 1.4±0.07mm であり、bFGF-E<sup>+</sup> 群のみコントロール群より有意に高値であった ( $P<0.05$ )。

in vivo における bFGF の発現については、まず、血清 bFGF 濃度に関しては、下腿筋でのエレクトロポレーションによる pCacchbFGFcs23 の導入後、有意な上昇は認められなかった。一方、エレクトロポレーションを用いて pCacchbFGFcs23 を導入した局所筋肉(左内転筋)においては、bFGF の発現量は 1 日目から上昇し、4、7 日目には最大量に達した。その後 bFGF 発現レベルは徐々に減少したが、28 日目においてもコントロール時に比してわずかに高値を示していた。

## 【結論】

本研究において、われわれは血管新生治療のひとつとして、plasmid vector の局所投与に in vivo エレクトロポレーション法を組み合わせた方法を提示した。ウサギ後肢虚血モデルに bFGF 組み込み plasmid vector を筋注投与し 75V の電圧で in vivo エレクトロポレーションを付加した。局所における bFGF 発現量は著しく増加し、21 日後までその効果は持続した。28 日後、著明な側副血行路の形成が認められ、虚血状態が改善された。