

Ex vivo遺伝子導入法による 新しい血管新生療法の有効性と特性

小山 博之^{*,**} 石井 誠之^{*,**} 宮田 哲郎^{*}
重松 宏^{*} 二宮 幹雄^{***} 高本 眞一^{***}

要 旨：虚血部位への側副血行路を発達させる血管新生療法は、閉塞性動脈疾患に対する新しい治療法として注目されている。われわれは、有効で安全な血管新生療法を実現するためには(1)arteriogenesisの誘導が重要であり、(2)治療ターゲットはdonor artery末梢の小口径部位が望ましく、(3)治療継続期間は厳密に限定されるべきであると考えた。これらの要件を満たすべく開発されたのが、アデノウイルスベクターを用いた線維芽細胞増殖因子のex vivo遺伝子導入法であり、ウサギ虚血肢モデルやブタ狭心症モデルでの検討では、ともに有意な側副血行路の発達と組織血流の改善が認められた。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; 43: 595-601)

Key words: Angiogenetic therapy, Basic fibroblast growth factor, Ex vivo gene transfer, Adenovirus

はじめに

血管新生の誘導により虚血部の血流を改善させる血管新生療法は、重症虚血肢や虚血性心疾患に対する新しい治療法として注目を集めている¹⁾。この治療法の基本概念は、血管新生を誘導する作用のある因子(以下、血管新生因子)や細胞をデリバリーすることにより、虚血部に対する血流供給源である側副血行路の発達を促進させるというものである。われわれはかねてより、何をどのようにデリバリーすれば効果的で安全な血管新生療法を実現することができるのかについて検討してきた。そしてその結果として、アデノウイルスベクターを用いた塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)遺伝子のex vivo導入法による血管新生療法(以下、ex vivo血管新生法)を考案するに至った。本稿では、まず優れた血管新生療法の要件に関するわれわれの考えについて論じ、次にex vivo血管新生法を考案するに至った経緯と動物モデルを用いた検討の要点を述べたい。

効果的で安全な血管新生療法の要件

(1)何をデリバリーするか？

現在まで発表されている数多くの血管新生療法のプロトコルは、デリバリーするものという観点で大きく二種類に分類できる。その一つは、bFGFや血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)などの血管新生因子をデリバリーする方法であり、蛋白の直接投与法¹⁾と遺伝子導入による方式^{2,3)}とがある。そしてもう一つは、最近わが国において盛んに研究されるようになってきた、血管内皮前駆細胞などの細胞をデリバリー(細胞療法)する方法である^{4,5)}。いずれにしても、何をデリバリーするべきかということを考えるためには、どのような生体反応を惹起させることを目標とするかが重要であろう。いわゆる血管新生は、vasculogenesis, angiogenesis, arteriogenesisの三つの概念を包括している⁶⁾。Vasculogenesisは、血管内皮前駆細胞が分化・増殖して原始血管叢を形成する過程であり、angiogenesisは、既存の血管壁内皮細胞が増殖しsproutingなどの機序を通じて新たな血管を形成する過程を示す。一方、arteriogenesisは血管の成熟を示し、リモデリングなどによって血管径が拡大する過程を含む。虚血部位への側副血行路を発達させるためには、

* 東京大学医学部血管外科

** 東京大学医学部血管再生医療

*** 東京大学医学部心臓外科

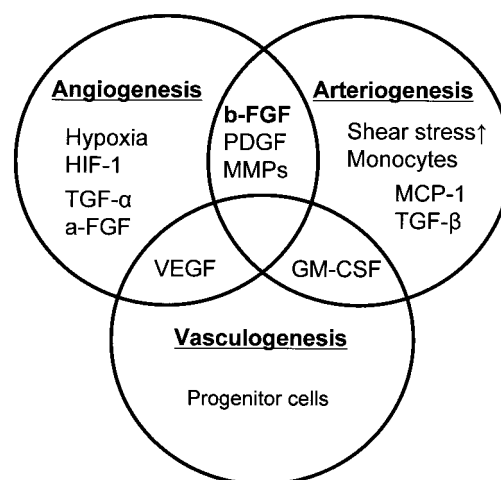
2002年12月24日受付 2003年7月25日受理

これら三つの機序のどれもが有効であることはいうまでもない。しかし、より多くの血流を供給するには「太い側副血行路」が必要であり、そのためにはarteriogenesisの機序が不可欠であると思われる。当然、arteriogenesisのみで事足りるわけではなく、vasculogenesisやangiogenesisとのコンビネーションの方がより効果的であろう。Fig. 1にデリバリーするものと、それによって期待できる血管新生効果との関係について示した⁶⁾。われわれは、後にも述べるが、arteriogenesisとangiogenesisの両方を誘導する効果のあるbFGFを用いることとした。当然、デリバリーするものは一つに限る必要はなく、ここにあげたもののうちのいくつかを組み合わせて使用する方法もある。

(2)どのくらいデリバリーするか？

デリバリーの対象が決まった場合、次に重要なのは、それをどの程度の量と期間でデリバリーすべきかを明らかにすることであるが、ここでは半減期の短いbFGFやVEGFなどの血管新生因子を用いた場合について論じてみたい。まずデリバリーの量であるが、これは投与の方式に大きく依存するため、一概に規定することは困難と思われる。治療のゴールは、ターゲットとなる組織に対して、必要十分量の血管新生因子をデリバリーすることであるが、そのターゲットにいかに関与のよいデリバリーができるかによって、投与する血管新生因子の総量が決まると考えられる。ターゲットが明確に特定され、デリバリーがそこに絞り込まれるほど、治療に要する血管新生因子の総量は少量で済むはずであるが、どこを治療ターゲットとするべきかについて掘り下げている研究は意外と少ない。次項において、治療ターゲットに関するわれわれなりの考えを述べているが、これもあくまで仮説にすぎない。したがって、当面は各投与方式に応じたデリバリー量を個別に模索していくしかないのではないだろうか。

一方、デリバリーの期間であるが、これはすでに発表された遺伝子導入による血管新生療法の研究から、おおむね類推することができる。血管新生因子蛋白の直接投与法では単回または数回のbolusなデリバリーが主となるのに対し、遺伝子導入による方法では数週間から数カ月にわたる長期間のデリバリーが可能であるためである。そして遺伝子導入による方法を採用した数多くの基礎研究のうち、虚血肢治療を想定した研究



From ref.6 with modification

Figure 1 A variety of factors induce vasculogenesis, angiogenesis and arteriogenesis.

では、そのほとんどが投与から1カ月以内で有意な血管新生効果を確認している^{2,3)}。したがって、通常必要とされるデリバリー期間は、長くとも1カ月以内が妥当と考えて良いのではないだろうか。また逆に、これ以上の期間にわたる投与継続は過剰なデリバリーとなる可能性も否定できない。血管新生因子の過剰なデリバリーは、発癌や糖尿病性網膜症増悪の原因となり得るため、可能な限り回避する必要がある。

(3)どこへデリバリーすべきか？

血管新生療法は、側副血行路を誘導することにより虚血部の組織血流を増加させることが目的である。そのためには、血流供給源となる動脈(donor artery)から虚血部位に至る側副血行路を発達させる必要がある。いくら虚血部位に血管新生を促しても、そこに血液が供給されなければ虚血は改善されないし、もともと血流の乏しい動脈から虚血部位へ側副血行路を発達させても同様に意味をなさない(Fig. 2)。また、血管新生のうちvasculogenesisは何もない部位においても血管形成をすることができるが、angiogenesisとarteriogenesisは、動脈末梢部の小口径部位において観察される現象である。したがって、angiogenesisとarteriogenesisを促すことによって血流豊富な側副血行路を誘導するためには、donor arteryとなる動脈の末梢の小口径部位を治

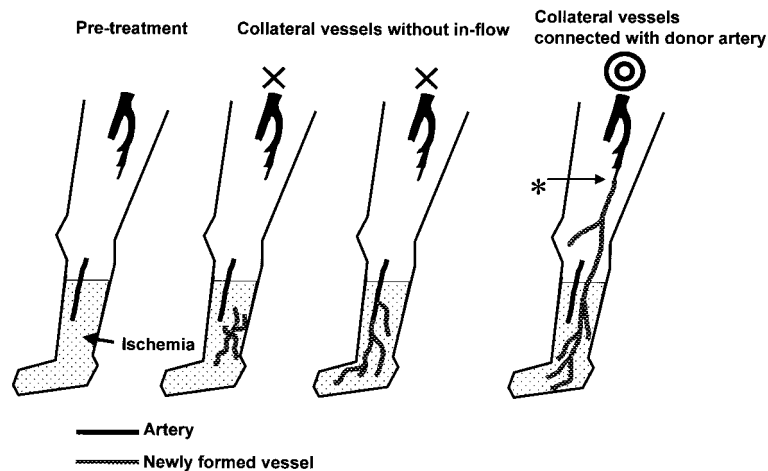


Figure 2 Collateral vessels, connected with donor artery (*), could promote sufficient blood supply to ischemic tissues.

療ターゲットとするべきである。虚血の治療が目的のため、治療ターゲットとして虚血組織そのものに注意が向かいがちであるが、donor arteryとなり得る動脈を虚血部位に応じて明確に見極めて治療計画を立てる必要があるのではないだろうか。

効果的で安全な血管新生療法を実現する 治療ストラテジー

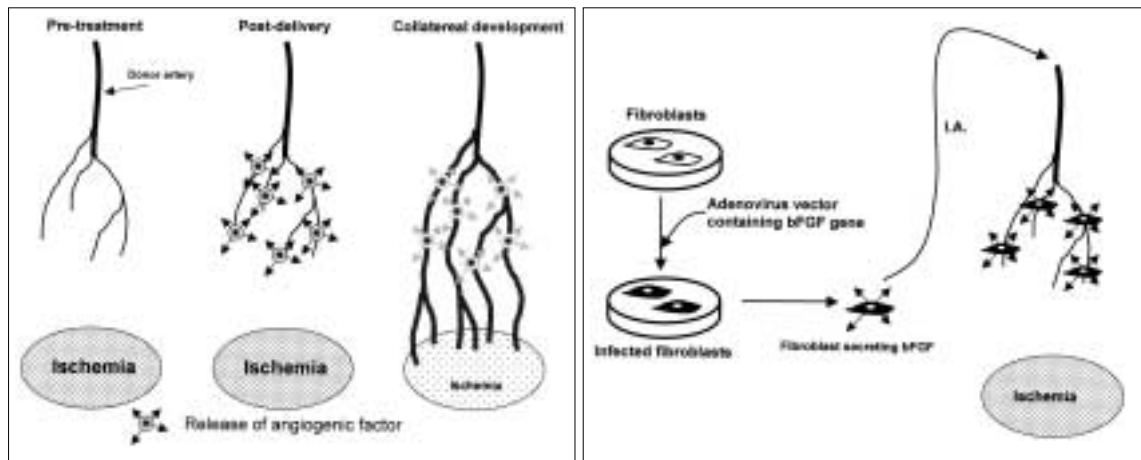
上記の三つの要件を満たす治療法として想定されるのは、**Fig. 3A**に示すようなシステムであろう。すなわち、bFGFを1カ月以内の期間持続的に放出する「何らかの仕組み」をdonor artery末梢に選択的にデリバリーするシステムである。そしてこれは機能を停止した後は、宿主にとって無害なものとなることが望ましい。われわれはこの「何らかの仕組み」として、シグナル配列付加bFGF遺伝子を、ex vivo導入した非血球自家細胞を用いることとした(**Fig. 3B**)。bFGFは本来分泌シグナルを持たないため、通常の条件下では細胞外へ放出されることはないが、シグナル配列(本法ではインターロイキン2のシグナル配列を使用)を付加することにより、遺伝子導入された細胞はbFGFを分泌できるようになる⁷⁾。また非血球細胞を用いることにより、これをdonor arteryに動注すると、その末梢の小口径部位に物理的に捕捉されて、想定どおりのデリバリーが可能となる。用いる細胞は、採取・培養が容易という理由で、宿主皮膚由来の線維芽細胞とした。またわれわれ

は遺伝子導入の手段として、第一世代アデノウイルスベクターを採用した。アデノウイルスベクターは、遺伝子導入効率が極めて高いことが特徴であるが、その一方でウイルス蛋白の一部が感染細胞表面に提示されるため、宿主の細胞性免疫を誘導して感染細胞のin vivoでの寿命が限られるという一面も合わせ持っている^{8,9)}。しかしこの特性は、効果持続期間が長くても1カ月以内という要件を満たすためにはかえって都合がよい。ちなみに、われわれの用いた第一世代アデノウイルスによって遺伝子導入された細胞は、投与後2週間以内に宿主より排除されることが明らかになっている。さらに長期の効果持続が必要な場合、宿主の細胞性免疫の誘導がより少なく工夫された第二世代あるいは第三世代のアデノウイルスベクターを使用することも可能である。

Ex vivo 血管新生療法の動物モデルを用いた検討

(1)ウサギ慢性虚血肢モデルによる検討¹⁰⁾

日本白色ウサギの左大腿動脈全長を切除することにより下肢虚血モデルを作成したが、この手術と同時に創より皮膚片を採取して自家線維芽細胞を分離・培養した。必要数の線維芽細胞の培養には2週間あまりを要するが、この期間にウサギ下肢の慢性虚血状態が準備される。手術後20日目に、培養自家線維芽細胞にin vitroでヒトbFGF遺伝子を組み込んだアデノウイルスベ

**Figure 3**

A: A prototype of ideal angiogenic therapy. bFGF must be released at small diameter artery located in the distal of donor artery, and the release of bFGF should be ceased no later than 1 month at the longest after cell administration. B: Protocol of the ex vivo angiogenic gene therapy. Cultured auto-fibroblasts were infected with adenovirus vector containing modified bFGF gene. Since the modified bFGF gene was fused with signal sequence, the auto-fibroblasts became to secrete bFGF. The gene-transduced fibroblasts were administrated to donor artery, and trapped at peripheral parts of the donor artery. After bFGF secretion for less than 2 weeks, the gene-transduced fibroblasts were eliminated by cytotoxic immune reaction of host.

A | B

クターを感染させた(20pfu/cell)。LacZ遺伝子をマーカーとして用いた予備実験で、この操作によりほとんどの線維芽細胞において、遺伝子導入がなされることが明らかになっている(**Fig. 4**)。また前にも触れたがbFGF遺伝子には、インターロイキン2のシグナル配列が付加されているため、遺伝子導入がなされた線維芽細胞はbFGFを細胞外に放出する能力を付与されたこととなる。感染翌日(手術後21日目)に、このbFGF分泌自家線維芽細胞を 5×10^6 個、カテーテルを用いて左内腸骨動脈内に動注した(bFGF group)。大腿動脈が全長にわたり切除されているため、虚血に陥った左下肢への側副血行路を発達させ得るdonor arteryは同側の内腸骨動脈となるためである。またLacZ遺伝子を導入した自家線維芽細胞と同様の条件で投与する群を作成し対照群(control group)とした。

この治療で注意すべきことは、細胞が動脈末梢に補足されるために、塞栓症を惹起し虚血状態を増悪させる可能性があることである。そのため細胞動注の前後で、虚血側下腿血圧の健側下腿血圧の比である下腿血圧比(calf blood pressure ratio)を測定したが、有意な血圧の低下は認められなかった(**Fig. 5**)。また、動注した線維芽細胞が、どの程度左下肢に分布するかを検討す

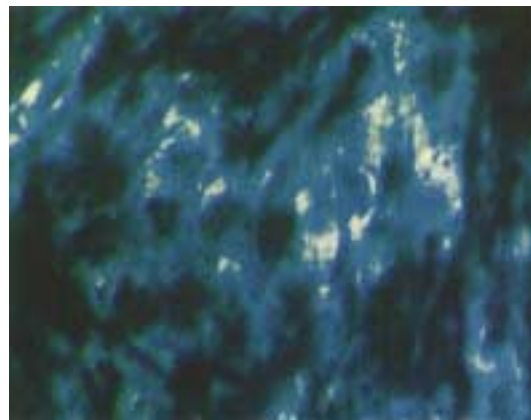


Figure 4 Photomicrographs shows X-gal staining of cultured auto-fibroblasts at 4 days after infection with adenovirus vector containing LacZ gene. Almost all cells turned positive (blue).

るため、インジウム-111でラベルした線維芽細胞を同様に動注したところ、全動注量の約45%の細胞が補足されていることが明らかになった。左下肢のほかは、肺に5.4%、肝に2.7%の細胞が分布していたが、統計的な有意性は認めなかった。

血管新生効果の判定は細胞動注後28日目に行った

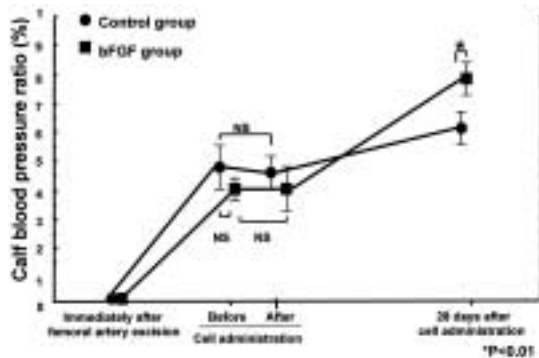


Figure 5 Calf blood pressure ratio immediately after femoral artery excision, immediately before, immediately after and 28 days after cell administration. Values are shown as mean $\pm$ s.d. (*P<0.01). NS, no significant difference.

が、下腿血圧比(**Fig. 5**)、選択的内腸骨動脈造影によるスコア評価(angiographic score, **Fig. 6**)、内腸骨動脈の血流量測定、左半膜様筋の毛細血管密度測定のすべてにおいて、bFGF groupが対照と比べ有意に改善しており、本治療法の有効性が示された。また全身諸臓器の組織学的な検討(ヘマトキシリン・エオジン染色およびエラスチカ・ワンギーソン染色)に加え、血中のbFGF濃度とアデノウイルスに対する抗体価を経時的に測定したが、すべてに有意な変化は認められなかった。

(2) ブタ狭心症モデルによる検討¹¹⁾

狭心症モデルは、肋間アプローチでLWDブタの左冠動脈回旋枝の根部に、アメロイドコンストリクターを装着して作成した。アメロイドコンストリクターは周囲の水分を吸収して徐々に膨張し、装着後28日以内に回旋枝を完全閉塞に至らしめる。徐々に閉塞するため心筋梗塞とはならず、狭心症状態を誘導することができる。この間に、手術時に創から採取した皮膚片より自家線維芽細胞を分離・培養した。手術後27日目、培養自家線維芽細胞にbFGF遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを上記と同様に感染させてbFGF分泌能を付与し、その翌日、カテーテルを用いて左冠動脈前下行枝と右冠動脈にそれぞれ 2.5×10^6 個ずつ動注した(治療群)。回旋枝が閉塞しているため側副血行路のdonor arteryは前下行枝か右冠動脈となるためである。動注した細胞はdonor artery末梢の小口径部位に補足されるが(**Fig. 7**)、投与前後での心電図変化はなく、CPK

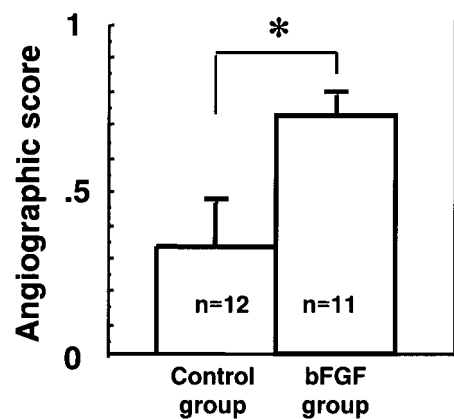


Figure 6 Selective internal iliac arteriograms of rabbit from the control group (A) and the bFGF group (B) at 28 days after cell administration. Development of collateral vessels was quantified by the angiographic score (C). Values are shown as mean $\pm$ s.d. (*P<0.01).

A
B
C

の上昇も認められなかった。細胞投与前と投与後28日目に心エコーによるejection fraction値測定、冠動脈造影のrentrop score評価、NOGAシステムによる心機能(local shortening)の三次元マッピング(**Fig. 8**)などを施行し、すべてにおいて対照と比べ治療群の有意な改善を認め

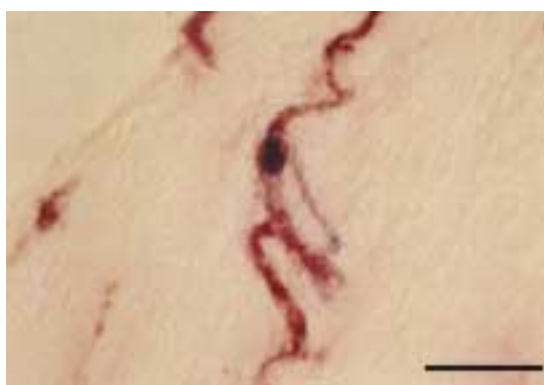


Figure 7 Photomicrographs shows that injected fibroblast was trapped in small artery between myocardium. Seven days after injection of fibroblasts transduced with LacZ gene in the same manner, myocardial specimen from the inferior wall was stained with X-gal and indoxyl-tetrazolium method. Trapped fibroblast is stained blue, and endothelial cells are stained violet. Bar: 10 μ m

た。以上より、本治療法による側副血行路の誘導効果とそれによる心機能の改善が示された。

おわりに

現在まで数多くの血管新生療法が発表されてきた。これらの治療法はそれぞれ独自のコンセプトに基づくものであり、動物実験でも良好な成績が報告されている。そして、一部のプロトコルはすでに臨床試験に進んでおり、その将来性が期待されている。本稿で示したex vivo血管新生療法は、独自に考案した「血管新生療法の要件」をベースとして開発されたものであり、既存の治療法に対するalternativeとして位置づけられる。今回のウサギ慢性虚血肢モデルとブタ狭心症モデルによる検討では、有意な血管新生効果と虚血状態の改善が認められ、重症虚血肢や虚血性心疾患の治療法として、有用である可能性が示唆された。今後は実用化を目指し、さらなる検討を加えていきたいと考えている。

文 献

- 1) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M et al: A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 662-670.
- 2) Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M et al: Direct

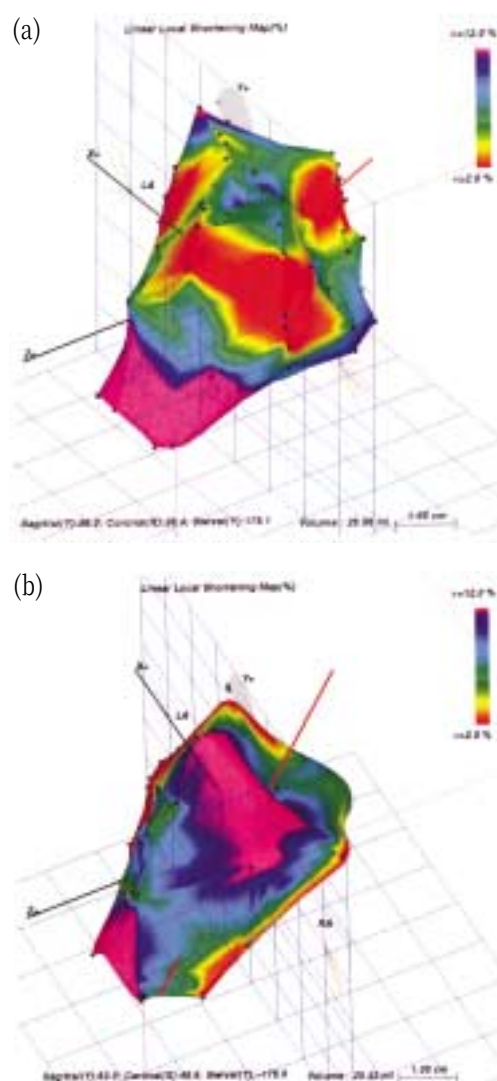


Figure 8 Three-dimensional local shortening (LS) maps of the left ventricle obtained from a pig in the bFGF group (a) before and (b) 28 days after fibroblast injection. The postero-lateral region, facing the front, exhibited (a) decreased (red, yellow, or green) and (b) increased (blue or purple) LS, respectively.

intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*, 1996, **94**: 3281-3290.

- 3) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H et al: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models:

- preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Therapy*, 2001, **8**: 181-189.
- 4) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897-903.
- 5) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S et al: Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 2001, **104**: 1046-1052.
- 6) van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefer I et al: Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*, 2001, **49**: 543-553.
- 7) Sasada R, Seno M, Watanabe T, Igarashi K: Expression of modified bFGF cDNAs in mammalian cells. *Ann New York Acad Sci*, 1991, **638**: 149-160.
- 8) Wilson JM: Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *New Engl J Med*, 1996, **334**: 1185-1187.
- 9) Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE et al: Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 4407-4411.
- 10) Ohara N, Koyama H, Miyata T, Hamada H et al: Adenovirus-mediated ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes collateral development in a rabbit model of hind limb ischemia. *Gene Therapy*, 2001, **8**: 837-845.
- 11) Ninomiya M, Koyama H, Miyata T, Hamada H et al: Ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor improves cardiac function and blood flow in a swine chronic myocardial ischemia model. *Gene Therapy*, 2003, **10**: 1152-1160.

Collateral Vessel Development Induced by Adenovirus-mediated Ex vivo Gene Transfer of Basic Fibroblast Growth Factor

Hiroyuki Koyama^{*,**}, Shigeyuki Ishii^{*,**}, Tetsuro Miyata^{*}
Hiroshi Shigematsu^{*}, Mikio Ninomiya^{***}, and Shin-Ichi Takamoto^{***}

* Division of Vascular Surgery, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo.

** Department of Vascular Regeneration, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo.

*** Department of Cardiothoracic Surgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo.

Key words: Angiogenetic therapy, Basic fibroblast growth factor, Ex vivo gene transfer, Adenovirus

Induction of collateral vessel development is a promising approach for the treatment of vascular occlusive disease. We have developed a new therapeutic strategy for gene transfer of angiogenic growth factor to ischemic tissue, and demonstrated significant augmentation of collateral development and tissue perfusion in a rabbit model of hind limb ischemia and a swine model of angina pectoris. In this strategy, auto-fibroblasts, adenovirally transduced with modified bFGF gene, were injected into an artery located nearby the ischemic lesion (ex vivo method). The artery for cell administration needs to have a sufficient blood in-flow as a donor artery of collateral vessels, and the modified bFGF gene was fused with signal sequence of interleukin-2 for extracellular secretion. The injected auto-fibroblasts were physically trapped in peripheral sites of the artery and secreted bFGF, possibly inducing effective development of collateral vessels connected with the donor artery. Further, a cytotoxic immune reaction of host restricted the lifetime of gene transduced fibroblasts, which might preclude potential side effects caused by excessive secretion of bFGF. In this study, we present the rationale of this strategy, and summarize the data obtained from the animal experiments.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; **43**: 595-601)