

血管リモデリングの病理 - FGF-2 遺伝子導入による機能的血管新生 -

居石 克夫

要 旨: 1) 動脈硬化における血管新生は、炎症反応と positive feedback loop を形成して炎症の遷延化、過剰修復反応に関与していること, 2) FGF-2 は、種々の血管新生因子の産生を促進し、また 3) 内皮細胞・周皮(平滑筋)細胞相互反応を制御して「機能的血管新生」に関与していること、最後に 4) SeV-FGF-2 遺伝子導入は、「統合的血管新生療法」に向けた治療戦略の一つとなりうることに ついて概説した。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 85-98)

Key words: Vascular remodeling, Therapeutic angiogenesis, Ischemia, FGF-2, Sendai virus vector

1. 緒 言

血管新生は、個体発生時の血管樹形成期のみならず成熟個体の生理的な組織改変、また病的な炎症・組織障害に引き続く修復過程に不可欠な生体反応の一つである。近年、分子生物学的研究の進歩に伴い、血管新生促進・抑制因子の発見による血管新生機構の詳細が解明されるとともに、遺伝子改変マウスの導入により生理的新生血管の構造的・機能的特徴に関する標的分子が明らかにされ、これら分子間ならびに細胞間協調性が注目されている¹⁾。しかしながら癌や慢性炎症性疾患で認められる過剰な、そして病的な血管新生機構の解明には、基礎疾患の病態の理解が基盤となる為に未解決な問題が多く残されている。この過剰血管新生は基礎疾患の進展因子の一つとなりうることから、これら基礎疾患は血管新生病とも概括されている²⁾。

さて動脈硬化と血管新生の関係は、1) 動脈硬化の進展における硬化病変内血管新生の病態学的意義、2) 動脈硬化により惹起された臓器虚血の運命を決定する側副血行路形成と血管新生の2点について議論されるべきである。

ヒト大動脈や冠動脈のプラーク内に新生血管が認められることは古くから知られていたが、その形成機序ならびに病態学的意義については多くの議論を残している。我々は、炎症細胞浸潤が目立つプラーク深部や肩部にはしばしば新生血管が増生していることに着目

し、プラーク内新生血管が動脈硬化の進展に関与している可能性を考え、ヒト冠動脈硬化内膜ならびに外膜に認められる新生血管の病理形態学的特徴を検討してきた。その結果から、プラーク内に炎症細胞浸潤を伴う増生血管の存在は、同部の動脈硬化が活動性、進行性であることを示す病理形態学的一指標となりうると考えている³⁾。

一方、組織・臓器虚血に対しては血管新生因子による血管新生/側副血行路形成を目標とした治療的血管新生療法が注目されている。現在、我々は虚血組織に血管新生因子遺伝子を導入することにより誘導される新生血管の形成過程とその機能効率を解析し、さらに臨床に応用するための戦略を構築する目的で、センダイウイルスベクター(SeV)-線維芽細胞増殖因子(FGF)-2を軸にした血管内皮増殖因子(VEGF)-A/C、肝細胞増殖因子(HGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)などの血管新生因子間の機能的階層性/協調性についての検討を進めている。これらの知見について述べ、FGF-2 遺伝子による虚血組織に対する「統合的血管新生療法」の概念を提示したい。

2. ヒト粥状動脈硬化と血管新生

ヒト動脈硬化病巣には内膜内新生血管が広く認められる³⁾。我々は、動脈硬化の発生・進展における血管新生の病態学的意義を検討する為に、これら新生血管の病理形態学的特徴とともにVEGF-A、VEGF-C蛋白の

分布について免疫組織化学的に検討してきたので、これらの知見について以下に述べる。

(1) 病理形態学的特徴

造影剤Microfil®を用いてヒト冠動脈の死後血管造影を行い、有機溶媒にて透徹した後に冠動脈を3次元的に観察した所見を Fig. 1 に示している⁴⁾。冠動脈本管の周囲に区域性に不規則に増生した微小血管網が認められる。この微小血管網はしばしば内腔狭窄を伴う動脈硬化の高度な部に認められ、また外膜小動脈と連続している像もよく認められる(Fig. 1)。また、このような部を光顕的に観察すると、これら侵入血管の多くは外膜動脈と連続し、中膜を貫通後、内膜内で不規則に分布する微小血管網を形成している(Fig. 2)。冠動脈内腔と直接連続する血管網も極めて稀には存在するが、これらの血管のほとんどは肥厚内膜の表層に限局して認められた⁴⁾。また粥腫の肩部の光顕所見(Fig. 3)に見られるように、増生血管の周囲にはしばしばリンパ球やマクロファージの浸潤を、また新鮮もしくは陳旧性の出血を伴っている。

冠動脈切片の硬化内膜内に認められるこれら新生血管の頻度とAHA分類による動脈硬化病変タイプとの関連を検討すると⁵⁾、タイプIからVIに進行するにつれて新生血管が認められる頻度が増加している(Fig. 4)。特

に、綿状脂肪沈着に相当するタイプIIから粥腫移行期のタイプIII、また粥腫形成期のタイプIVにかけて新生血管の出現の頻度が急増している。一方、適応性組織変化と考えられている瀰漫性内膜肥厚(diffuse intimal thickening, DIT)には新生血管が全く認められないことは特徴的である。

(2) VEGF-A, VEGF-C / 受容体連関

硬化内膜内の血管新生機序を検討する為に代表的な血管新生因子であるVEGF-Aの分布を免疫組織化学法にて検索すると⁵⁾、HAM56 陽性泡沫マクロファージ

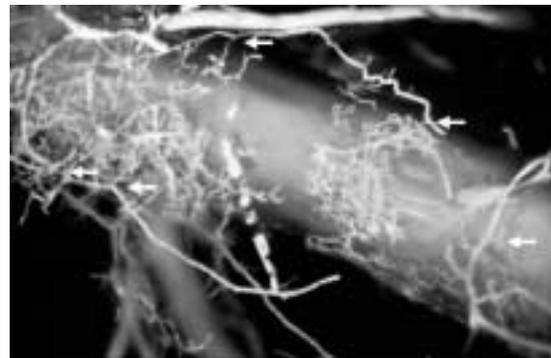


Figure 1 冠動脈硬化と血管新生(Microfil®による死後アンジオ)

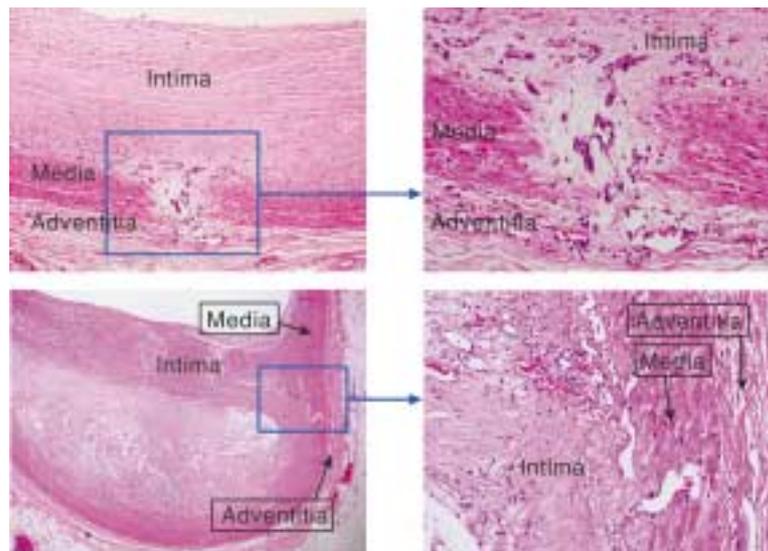


Figure 2 外膜由来の硬化内膜内新生血管

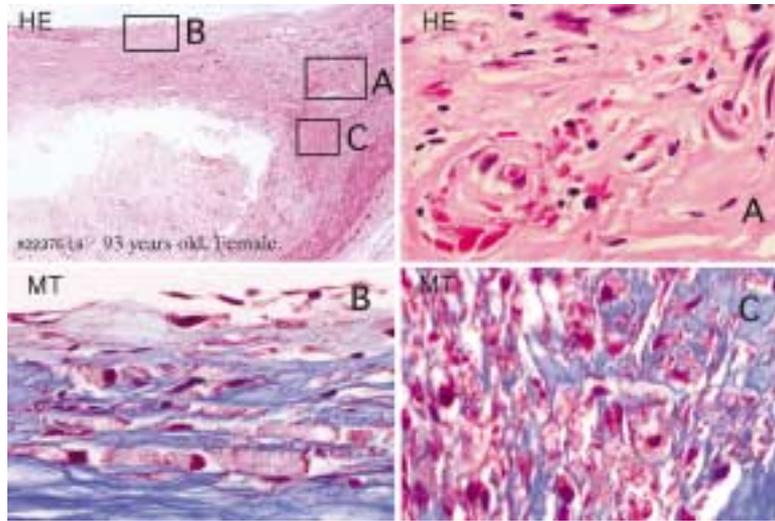


Figure 3

(Fig. 5)とHHF35陽性平滑筋細胞(Fig. 6)が硬化内膜での主なVEGF-A産生細胞であった。VEGF-Aの受容体であるFlt-1ならびにKDR/Fik-1(それぞれVEGF受容体-1, 2に相当する)は、免疫組織化学的に血管内皮細胞と一部の血管平滑筋細胞に陽性であった。

硬化内膜内におけるこのVEGF-Aの発現程度は、Fig. 7に示すように血管新生の出現頻度とよく相関している。また、動脈硬化部位の中膜平滑筋細胞のVEGF-A陽性頻度とその程度は低いことから、これら内膜内細胞のVEGF-A産生促進には低酸素や炎症性サイトカインが関与している可能性が示唆される。一方、この硬化内膜内で発現が亢進しているVEGF-Aは多機能サイトカインの一つであり⁶⁾、血管新生とともに血管透過性亢進、さらにはマクロファージの遊走因子として作用している可能性も推定されている⁷⁾。

さらに成熟個体でのリンパ管新生、また病的血管新生の一部に関与していると考えられているVEGF-C、VEGF-D^{8,9)}の免疫組織化学的検索を行うと、VEGF-Cは主として泡沫マクロファージが、またVEGF-Dは平滑筋細胞とマクロファージの両者が発現している(Fig. 8)。この内膜内VEGF-Cの陽性細胞出現程度は、VEGF-Aの場合と同様、血管増生の程度と良く相関していた。また、VEGF-Cの主な受容体としてはKDR/Fik-1(VEGF受容体-2)とFlt-4(VEGF受容体-3)が知られている⁸⁾。Lyve-1発現を指標にしたリンパ管新生の程度を

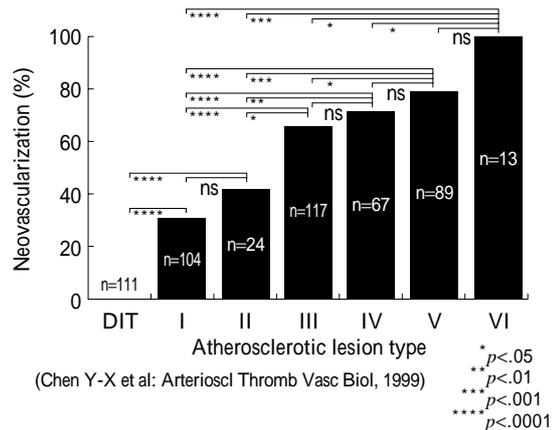
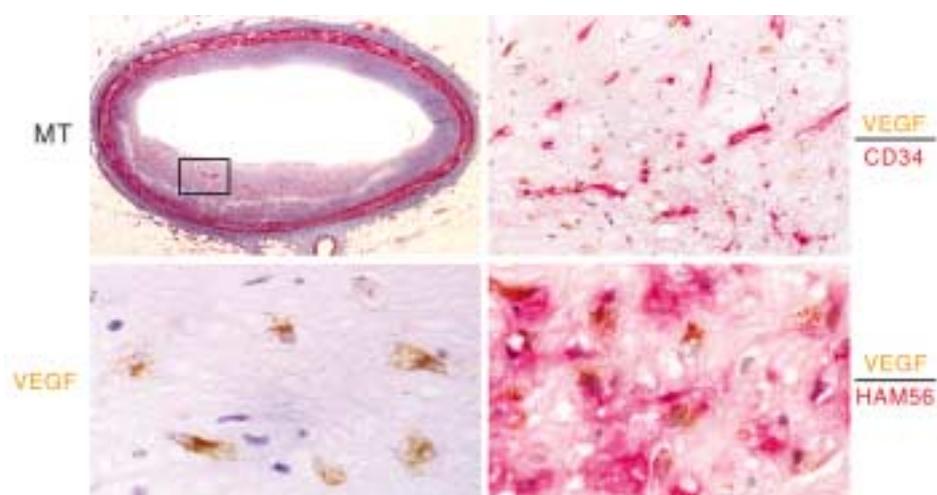


Figure 4 ヒト冠動脈硬化と内膜内血管新生

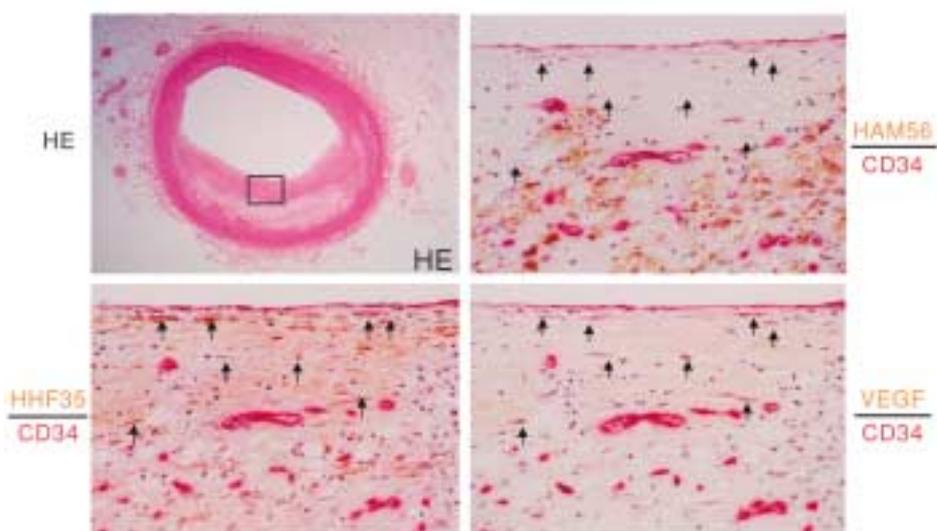
硬化内膜病変で検索すると、大変興味深いことに、CD-31/34陽性血管新生に比べてリンパ管形成は極めて稀であり、VEGF-Cの発現はリンパ管新生よりも血管新生に関与しており、さらにこのリンパ管形成が少ないことは動脈硬化内膜の炎症の遷延化に関係している可能性が示唆された。

VEGF-Aが内膜内血管新生に関与しているか否かをより直接的に検討する目的でヒトVEGF₁₆₅遺伝子をHVJ-リポソーム法を用いて家兔総頸動脈の中膜平滑筋細胞に導入すると¹⁰⁾、Fig. 9に示すように、平滑筋細胞と細胞間基質の増生による高度な内膜の肥厚とその部



(Chen Y-X et al: Arterioscl Thromb Vasc Biol, 1999)

Figure 5 VEGF is expressed by foamy macrophages in type III atherosclerotic lesion



(Chen Y-X et al: Arterioscl Thromb Vasc Biol, 1999)

Figure 6 VEGF is expressed by smooth muscle cells (AHA type IV)

に著明な血管腫様の血管増生を招来したことから、VEGF-Aの血管壁内における過剰発現は内膜内血管新生に密接に関連していると考えられる。一方、高度な内膜肥厚の原因は不明であるが、VEGF-Aの透過性亢進による血漿蛋白の浸潤、また中膜からの平滑筋細胞遊走促進作用による平滑筋細胞増生による内膜肥厚を招来した可能性が考えられる。

以上の所見に加えて、ヒト冠動脈硬化内膜内の血管

新生の程度は周囲のマクロファージとリンパ球浸潤の程度とも強く関連していることから、我々は硬化内膜内の血管新生は活動性炎症・修復過程の一病理形態学的指標と考えている。この硬化内膜内の血管新生機序にはマクロファージと平滑筋細胞によるVEGF-Aの、またマクロファージによるVEGF-Cの過剰発現が関与している可能性を考えている。

(3) 動脈硬化内膜に認められる血管新生の病態学的意義

以上の病理学的所見から、プラーク内に認められる血管新生過程は内膜の障害に対する修復反応の一病理形態像であり、また周囲に密なマクロファージとリンパ球の集簇を伴った新生血管を認める動脈硬化巣は活動性、進行性であることを示唆している。それでは血管新生を抑制、促進すると動脈硬化の進展はどのように修飾されるのか、またいかなる機序が関与しているのかこれまでの報告をレビューしたい。Table 1 に示すように、1) Folkmanらは、apoE ノックアウトマウスの粥腫形成期に血管新生抑制因子であるendostatin、TNP470を投与すると大動脈のプラーク形成が有意に抑制され、その理由としてプラーク形成部に増生していたvasa vasorumが減少したことを¹¹⁾、2) 逆に、Cellettiらは高脂血症家兎にVEGFを投与すると大動脈硬化が促進されること、その機序に骨髄由来内皮前駆細胞によるvasa vasorum形成亢進が関与している可能性を¹²⁾、また3) Zhao、江頭らはNO産生阻害剤であるL-NAME持続投与により誘発されるラット動脈硬化が、可溶性Flt-1遺伝子を導入することにより動脈硬化進展が抑制されること、その機序として可溶性Flt-1がVEGF-A/受

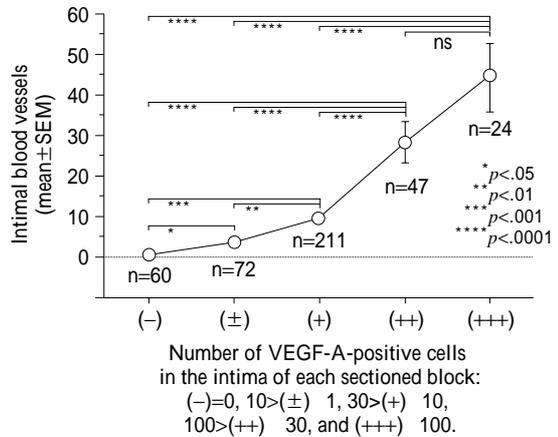


Figure 7 ヒト冠動脈硬化内膜内におけるVEGF-A陽性細胞出現の程度と血管新生

容体連関を阻害して単球/マクロファージの硬化巣への浸潤を抑制する為であると報告している¹³⁾。また、4) 最近、Folkmanらがangiostatinを用いて以前の報告を追認している¹⁴⁾。これらの報告は、先に述べた我々の「内膜内血管新生が動脈硬化進展を促進する」との仮説を支持するものであり、多機能サイトカインとしてのVEGFが、血管新生のみならず炎症促進にも関与しているこ

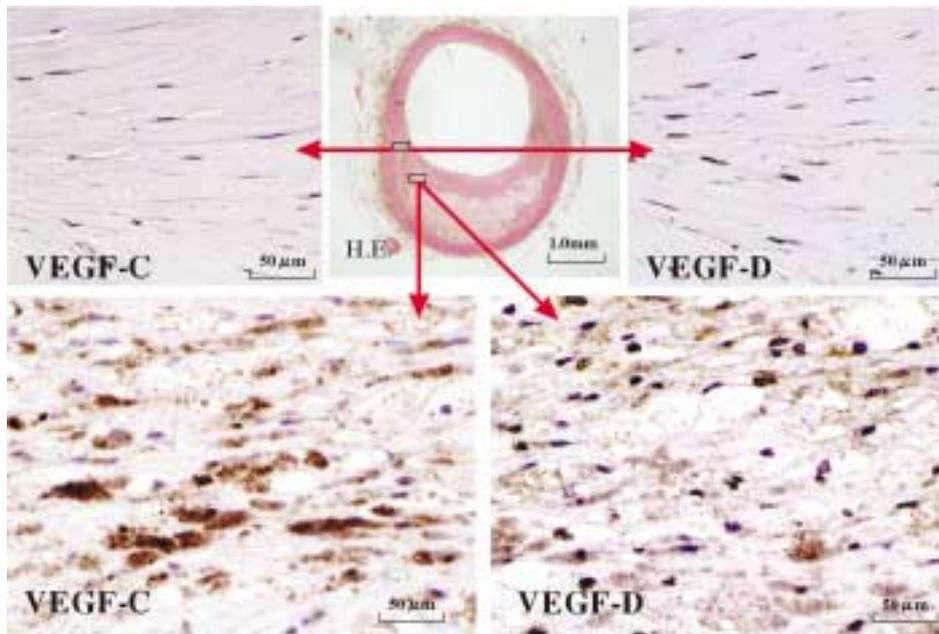
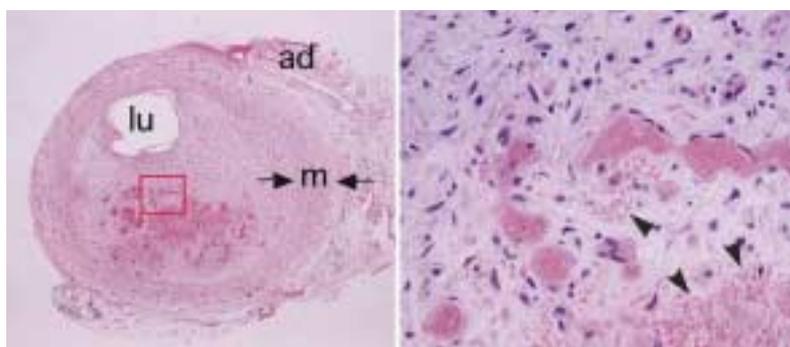


Figure 8 冠動脈硬化病変におけるVEGF-CおよびVEGF-Dの発現(AHA IV型)



(Yonemitsu Y et al: Lab Invest, 1996)

Figure 9 Neointimal formation and angioma-like endothelial proliferation in uninjured rabbit carotid artery induced by VEGF-A gene transfer

Table 1 ヒト冠動脈硬化と血管新生

- 動脈硬化内膜内の新生血管の存在は、活動性「炎症・修復過程」の一病理学的指標となりうる。
- この血管新生過程に、マクロファージや平滑筋細胞が産生する VEGF-A と VEGF-C / 受容体機能が関与している。
VEGF / 受容体関連の機能変化は動脈硬化の進展を修飾する？
1) Endostatin, TNP470 投与が粥腫形成を抑制 (Moulton KS et al: Circulation, 1999, 99: 1726-1732)
2) VEGF-A 投与がプラーク形成を促進 (Celletti FL et al: Nature Med, 2001, 7: 425-429)
3) 可溶性 Flt-1 遺伝子導入は L-NAME 誘発動脈硬化の発生, 進展を抑制 (Zhao Q et al: Circulation, 2002, 105: 1110-1115)
4) Angiostatin 投与が粥腫形成を抑制 (Moulton KS et al: Proc Natl Acad Sci, 2003, 100: 4736-4741)

とを示唆する所見として注目される。

従って、動脈硬化内膜に認められる新生血管は、Table 2 に示すように、内膜の栄養供給のみならず白血球細胞の浸潤経路として、またしばしば随伴する新生血管周囲のフィブリン沈着や出血による同部の凝固亢進はトロンビン産生亢進、フィブリン分解産物沈着や血小板由来増殖因子の内膜内沈着を促進して内膜での炎症を亢進させることが考えられる。また、新生血管の血栓形成は壊死コアの拡大を生じ粥腫の機械的脆弱性を促進する可能性があること等から、我々は、一般に提唱されている不安定性粥腫の特徴¹⁵⁻¹⁷⁾としての、1) 粥腫の菲薄な線維性被膜、2) 豊富な脂質沈着、3) 偏心

Table 2 粥状動脈硬化内膜内新生血管の病態学的意義

1. 粥腫の栄養供給 粥腫の発育
2. 粥腫への白血球動員経路 炎症促進
3. 透過性亢進・出血による粥腫内凝固亢進 炎症促進, 内圧亢進
トロンビン産生, フィブリン沈着, FgDP/FDP
血小板由来生理活性物質(PDGF, VEGF, TGF-β1 など)
4. 新生血管の血栓形成 壊死コアの拡大



粥腫の破綻

- 血管新生
- 菲薄な線維性被膜: Mφ浸潤(MMPs), 少ない平滑筋細胞
- 豊富な脂質(コレステロールエステル)
- 偏心性粥腫

性粥腫，などとともに硬化内膜内新生血管も粥腫の不安定性を助長し，破綻の危険性を増す要因の一つと考えている。

3. 虚血組織に対する遺伝子血管新生療法

動脈硬化病変における過剰な血管新生は，動脈硬化の進展要因の一つとなりうることを述べてきたが，血管発生・新生は，他方では虚血組織の側副血行路形成に関与している。従って動脈硬化の進展抑制には血管新生抑制療法が，一方，虚血臓器の機能回復の為に血管新生/側副血行路形成を目標にした治療的血管新生療法が注目されている。

成熟個体に見られる血管新生過程は，一般に，毛細血管の周囲を取り囲む周皮細胞の脱落，基底膜の融解期，内皮細胞の発芽・増生・遊走期，管腔形成期に分けて考えられている。この管腔形成初期の毛細血管は，周皮細胞を欠いた機能的/構造的に未熟な血管であり，後に周皮細胞が遊走してきて管腔を取り囲み，血流を伴う血管に成熟すると考えられている。D'Amoreら¹⁾は，血管新生のスイッチの切り替え機序について，内皮細胞の増生・遊走，周囲間質の分解にVEGFが，周皮細胞の取り囲みを伴う成熟過程にはAng1/Tei2/PDGF連関が，血管の安定化/不安定化にはAng1の有無が，さらに退縮にはAng2の存在とVEGFの欠如もしくは低下が重要であると考えている。しかしながら，他の血管新生因子との相互作用や細胞間反応過程，更には虚血時のこれら因子の動態についてはほとんど明らかにされていない。

現在，我々は虚血組織に血管新生因子遺伝子を導入することにより誘導される新生血管の形成過程とその機能効率を解析し，さらに臨床に応用するための戦略を構築する目的で，SeV-FGF-2を軸にしたVEGF-A/C，HGF，PDGFなどの血管新生因子間の機能的階層性/協調性についての検討を進めている。これらの知見について述べ，FGF-2遺伝子による虚血組織に対する「統合的血管新生療法」の概念を提示したい。

1) FGF-2 遺伝子搭載SeVによる血管新生

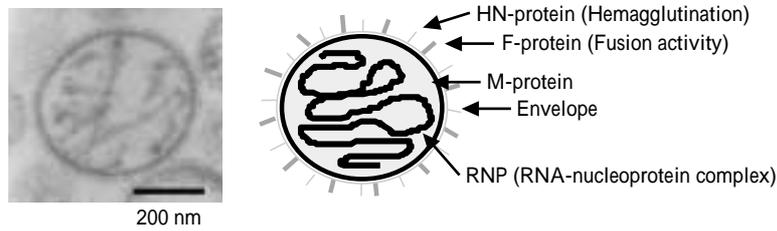
(1) SeVベクターによる遺伝子導入法

さて，生体内遺伝子機能の解析法として，近年，発生工学的ならびに遺伝子導入技術が開発され，広く研究に応用されており，両者には以下に述べるようなそ

れぞれの特徴がある。トランスジェニック，ノックアウト，ノックイン法などの発生工学的技術には，利点として胎生期から成熟個体に至るまでの特定遺伝子の機能を時間系列的に解析することが可能であるが，欠点として時に過剰発現や欠失が致死的となり，また相補的遺伝子の代償性機能により表現型に至らないことなどがある。一方，生体内遺伝子導入技術には，正常な成熟個体での特定遺伝子の機能解析が可能であり，得られたエビデンスとその技術は直ちに遺伝子治療に向けた戦略構築へ応用可能であることなどの利点がある。従って，我々は虚血組織に対する側副血行路形成の機能的血管新生機序を解析する為に，1) 発現効率の高いSeVの開発，2) 機能的血管新生，即ち，血流回復に役立つ特異的な標的血管新生遺伝子，また3) 虚血組織に限定された発現遺伝子を同定することを目的に検討した結果を以下に述べる。

我々が開発し，病態解析に利用しているSeVベクターのウイルス学的，生物学的特性をFig. 10に示す。SeVは，エンベロープ表面に感染成立に重要な血球凝集素 - neuraminidase蛋白や宿主細胞膜との癒合に重要なF蛋白などを有している一本鎖RNAウイルスである。その主なウイルス学的特性として，1) 細胞質で転写を行う為に宿主染色体との相互作用が無く，従って，SeVベクターはinsertional mutagenesisを誘発する可能性が極めて低いこと，2) 宿主細胞への感染が迅速で，多くの細胞では10分以内の接触で感染は最大限に達すること，3) ゲノムに挿入した外来遺伝子の転写，発現効率が高いこと，即ち，この発現効率は遺伝子治療に広く用いられているアデノウイルスベクターに比較して3~4桁以上に及ぶこと，4) ヒトへの病原性が報告されていないこと，5) 多くの哺乳動物細胞に感染可能であること¹⁸⁻²³⁾，などを挙げることができる。しかし，ウイルスベクターの特性として，本ベクターに組み込まれた外来遺伝子の発現は，感染ウイルスが宿主の免疫により排除される為に2~4週と短期である。

我々が開発し，作成した種々の下肢虚血動物モデル²⁰⁾を用いて，上述のFGF-2，VEGF-A，VEGF-C，HGF，PDGFなどの血管新生促進因子の機能的相互関連性，またこれら血管新生因子による組織の虚血回復効果，即ち「機能的血管新生」の形成機序について検討してきた結果を以下に述べる。



Sendai Virus (SeV)

- 1) 細胞質で転写を行うため、宿主染色体へ相互作用しない。
- 2) 感染が極めて迅速である。
- 3) 外来遺伝子の転写・発現効率が極めて高い。
- 4) ヒトへの病原性が報告されていない。
- 5) 多種類の細胞へ感染可能である。
- 6) 遺伝子発現は安定であり、大きく減衰しない (*in vitro*)。

気道上皮細胞	- Nature Biotechnol 2000, Gene Ther (in press).
血管壁	- FASEB J 2001.
関節滑膜	- J Immunol 2002.
眼球網膜	- Exp Eye Res 2002.
活性化T細胞	- Gene Ther (in press).
骨格筋	- Circ Res 2002 (1), Gene Ther 2000, Circ Res 2002 (2).
ヒトCD34陽性細胞	- Gene Ther (in press). など

Figure 10 組み換えセンダイウイルスベクターの構造と特徴

(2) FGF-2 / VEGF-A 関連

Fig. 11 に balb/c ノードマウスの上肢ならびに下部大腿動静脈とその主要分枝を結紮後、これらの動静脈を抜去して作成する重症下肢虚血モデルを示している。このモデルでは10日以内に8割以上の動物の下肢が壊疽に陥り脱落する。このモデル動物の下肢骨格筋に、血管結紮・抜去術直後に 10^7 pfu の SeV-FGF-2 遺伝子を投与しておくとして約8割の救肢効果が得られるが、血管新生因子として良く知られている VEGF-A 遺伝子の投与では救肢効果が全く認められない²⁰⁾。

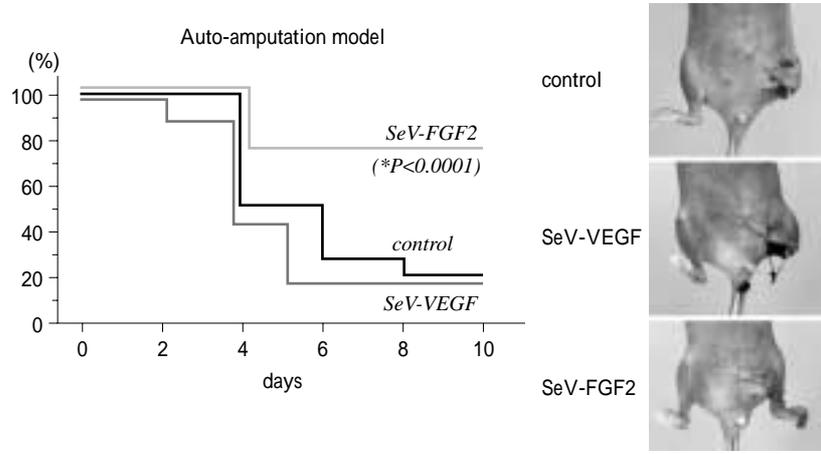
これらマウスの10日後の組織を検索すると、FGF-2 遺伝子非投与群では広範な筋肉組織の壊死が明らかで、壊死骨格筋の周囲には少数の筋芽細胞の再生を認めるに過ぎない。VEGF-A 投与群では、壊死領域はコントロール群より更に拡大しており、同部の好中球を主体とした炎症細胞の浸潤と間質の浮腫がより高度で、また筋芽細胞の再生はほとんど認められない。一方、FGF-2 遺伝子投与群では、壊死領域が明らかに減少し、さらに筋芽細胞の再生もより顕著である。レーザー Doppler 法による血流量測定でも、FGF-2 遺伝子導入は血流量を著明に回復させたが、VEGF-A ではこ

の効果が全く認められなかった。

従って、代表的な血管新生因子である VEGF-A 遺伝子投与では、血流増加が得られないばかりか、むしろ VEGF-A の透過性亢進作用によると思われる間質の浮腫が助長され、結果的に虚血状態が悪化したと考えられた。

さて、マウス VEGF-A に特異的な抗体を用いた ELISA 法により組織内の内因性 VEGF-A の蛋白量を測定すると、内因性 VEGF-A 量は虚血負荷のみにも上昇し、VEGF-A ならびに FGF-2 遺伝子投与にて更にこの発現量が増加しており、特に、VEGF-A 投与ではその上昇が顕著である (Fig. 12)。

Fig. 13 に示すように、10日後の生存骨格筋組織における血管内皮細胞の PECAM-1 発現を指標にして血管密度を計測すると、対照の luciferase 遺伝子投与群に比べて VEGF-A、FGF-2 遺伝子投与により血管密度が高められ、その程度は同程度であった。しかしながら、 α -平滑筋アクチン (α SMA) を指標に周皮細胞を随伴している血管の比率を検討すると、FGF-2 遺伝子投与群では約6割に陽性であるが、VEGF-A 投与群では約2割に過ぎない²⁰⁾。従って、FGF-2 は、VEGF-A に比べて新



(Masaki I et al: Circ Res, 2002)

Figure 11 マウス重症虚血下肢モデルにおけるFGF2-SeV遺伝子導入の救肢効果

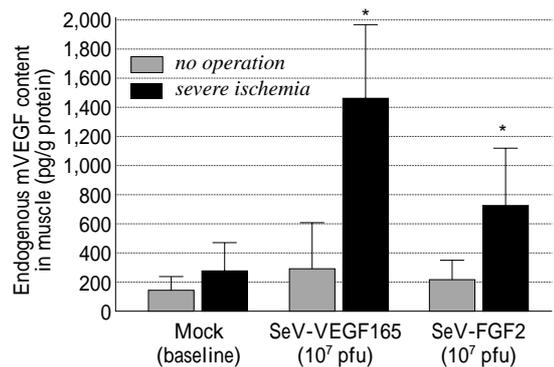
生血管の内皮・周皮細胞連携による機能的・構造的成熟を促進して、虚血下肢の救肢効果を高めた可能性が示唆される。しかしながら、このFGF-2 遺伝子投与による虚血下肢の救肢効果はVEGF-A中和抗体の同時投与で完全に消失した (Fig. 14)。

以上の所見から、内因性VEGF-AはFGF-2 誘導血管新生作用に不可欠であるがVEGF-A遺伝子導入により誘導された外来性ならびに内因性VEGF-A単独の顕著な発現亢進は血管透過性亢進等の副作用を顕在化させて虚血症状を助長したと考えられた。従って、FGF-2 遺伝子導入により誘導された外来性FGF-2と内因性VEGF-A発現は、相互に協調しあって高い救肢効果を示したものと推測される。

(3) FGF-2 / HGF / PDGF 関連

次に、虚血下肢ならびにFGF-2 遺伝子投与時のHGFならびにPDGFの動態について述べる。培養平滑筋細胞や線維芽細胞のHGF産生は低酸素下では低下することが知られている²⁴⁾。ところが、虚血下肢でのHGF蛋白濃度をELISA法で測定すると、HGFは、Fig. 15に示すように、FGF-2と同様に低酸素により明らかに発現が亢進している。しかもこの組織内HGF蛋白の濃度はFGF-2 蛋白濃度の変化と良く相関していることから、in vivoでの低酸素によるHGF産生亢進にはFGF-2 など低酸素により誘導される他の因子の影響が関係している可能性が示唆される。さらに、FGF-2 遺伝子導入に

FGF-2 によるVEGFの誘導は虚血条件により促進される



(Masaki I et al: Circ Res, 2002)

Figure 12 VEGF/FGF-2: FGF-2 遺伝子導入は内因性VEGF蛋白の発現を促進する

より、このHGF産生は低酸素の有無に関係なく著明に促進される²⁵⁾。

このFGF-2 刺激によるHGF発現亢進の機序をヒトならびにウシ培養平滑筋細胞、マウス線維芽細胞を用いて検討すると²⁵⁾、これら細胞のHGF mRNA発現は刺激後3~6時間での早期のみならず24時間後まで二峰性ないし持続性に発現が亢進していることが明らかとなった (Fig. 16)。

培養24時間後のFGF-2 刺激によるHGF蛋白発現亢進機序に関する細胞内シグナル伝達経路について各種

VEGFとFGF-2は血管新生を誘導するが、FGF-2による周皮細胞被覆がVEGFに比してはるかに顕著である

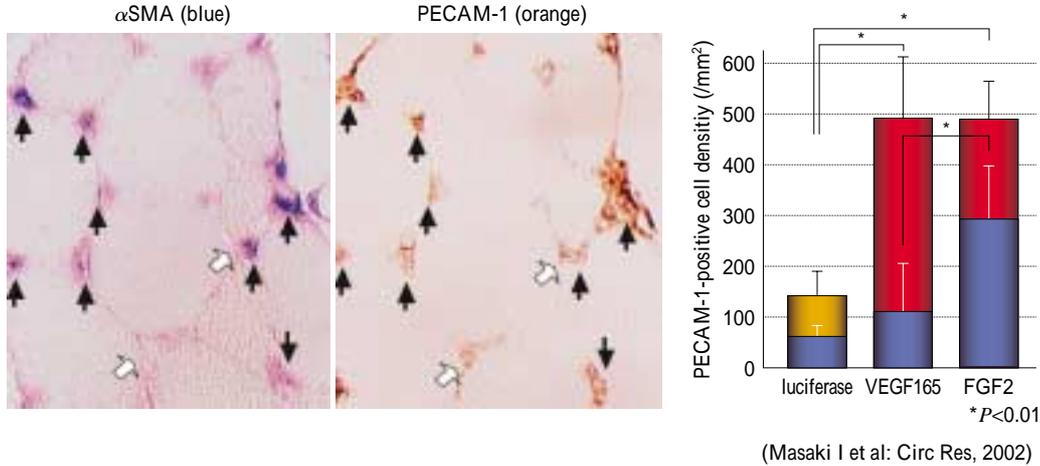


Figure 13 VEGF/FGF-2: FGF-2遺伝子導入は成熟毛細血管の形成を促進する

インヒビターを用いて検討すると、MEK阻害剤によりほぼ完全に、またRasとp70^{S6K}阻害剤により部分的にHGF蛋白の産生が抑制された。このRasとp70^{S6K}経路はPDGFシグナル伝達に関与していることが知られている²⁶⁾。実際に、FGF-2刺激による培養平滑筋細胞のPDGF-AAの産生、分泌亢進がWestern blot法で確認されるし、また、このHGF産生亢進はPDGF中和抗体により部分的に抑制される。このことから、FGF-2により誘導されるHGF発現の後期促進効果には、誘導もしくは促進されたPDGF自己分泌回路が関与していることが示唆される。

以上の結果から、FGF-2の平滑筋細胞、線維芽細胞のHGF産生に与える主要なシグナル伝達経路は、Fig. 17に示すように、まず、Raf-1/MEK活性化を介する早期のHGF産生亢進経路が挙げられる。この経路は、同時にPDGF-AAの産生をも亢進させ、このPDGF-AAがオートクライン的に自らのPDGF受容体を介して、1) PKCとPI3kinase/p70^{S6K}経路による、また2) Rasを介するMEK活性化経路からの、二つの伝達経路により後期のHGF産生亢進を誘導すると考えられる。以上のFGF-2によるHGF産生亢進回路は、VEGF-AのFGF-2による産生亢進回路と全く同じである。

マウス虚血下肢モデルにおけるFGF-2遺伝子導入による血流回復効果に与える内因性HGFの役割を検討する為に、HGFに対する中和抗体を同時に全身投与して

VEGF中和抗体投与により、FGF-2遺伝子治療の効果は完全に遮断される

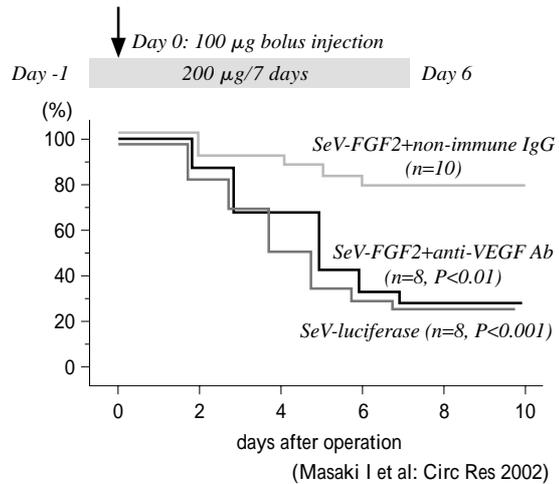
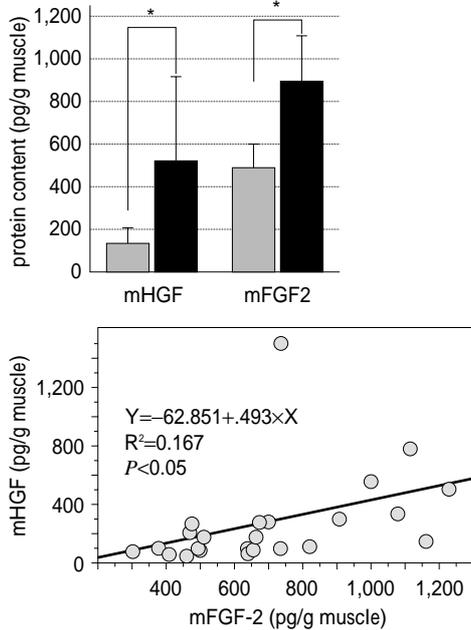


Figure 14 FGF-2 遺伝子導入により誘導された内因性 VEGFの役割

その影響を比較検討すると、FGF-2により誘導された血流回復効果は抗HGF中和抗体によりほぼ完全に消失した。従って、FGF-2遺伝子導入による虚血下肢の血流回復効果は、FGF-2自体の効果に加えて、FGF-2により産生が亢進された内因性VEGFとHGFが協動的に作用した結果であることが明らかとなった。

A. HGF, FGF2 蛋白産生に与える低酸素の影響



B. SeV-FGF2遺伝子導入はHGF蛋白の産生を促進する

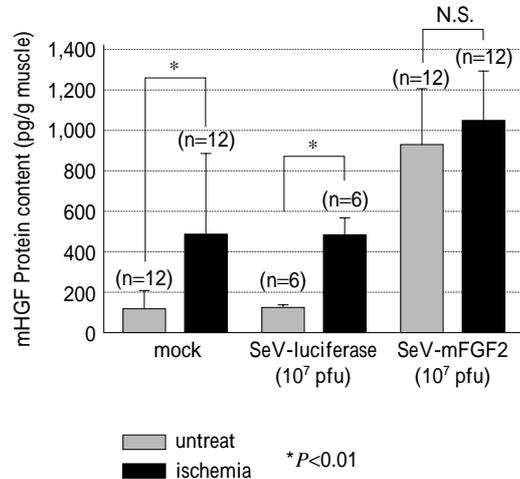


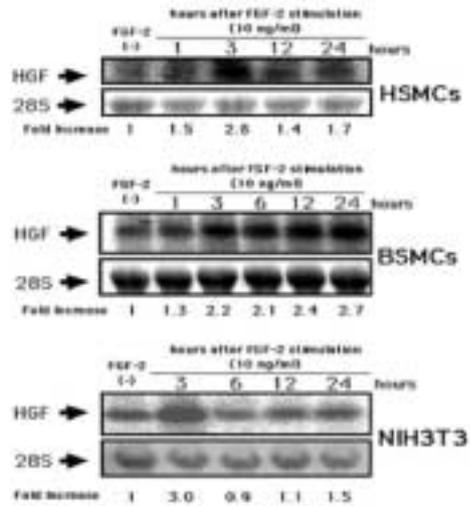
Figure 15 組織内HGFは虚血刺激, FGF-2 により発現が増強する

(4) FGF-2 / VEGF-C / PDGF 関連

虚血下肢マウスモデルにおけるVEGF-CとPDGFの動態についての知見を紹介する。虚血直後から28日目までの筋組織におけるFGF-2, VEGF-Cとその受容体VEGFR-3 (Flt-4) のmRNAの発現変化を調べると, FGF-2 mRNAは虚血により, 特に虚血後早期に著明に発現が亢進し, FGF-2 刺激によりさらにその発現亢進が増強される。VEGF-Cならびにその受容体mRNAの発現は虚血下で変化していないが, FGF-2 刺激により3~7日時のこれら因子の発現が促進された。さらに興味深いことに, Fig. 18に示すように, FGF-2 遺伝子導入によるマウス虚血下肢の救肢効果は, Flt-4 中和抗体投与により部分的に抑制される。

以上のことから, Fig. 19に示すように, FGF-2 は, FGF-2 自体の血管新生促進効果に加えて, VEGF-A / 受容体機能を介した血管新生促進作用とともに, VEGF-C / Flt-4 を介するリンパ管新生促進がVEGFR-2 を介した血管新生促進機序とともに虚血組織の血流回復に関与している可能性が示唆された。従って, 組織の虚血改善には血管とリンパ管両者の新生 / 再生を目標にした「機能的血管 / 脈管新生」に向けた戦略を考慮する必

FGF-2刺激はヒト, ウシ平滑筋細胞, 線維芽細胞のHGF発現を二峰性, 持続性に促進する



(Onimaru M et al: Circ Res, 2002, 91: 723-730)

Figure 16 FGF-2 刺激によるヒト, ウシ平滑筋細胞と線維芽細胞のHGF mRNA発現

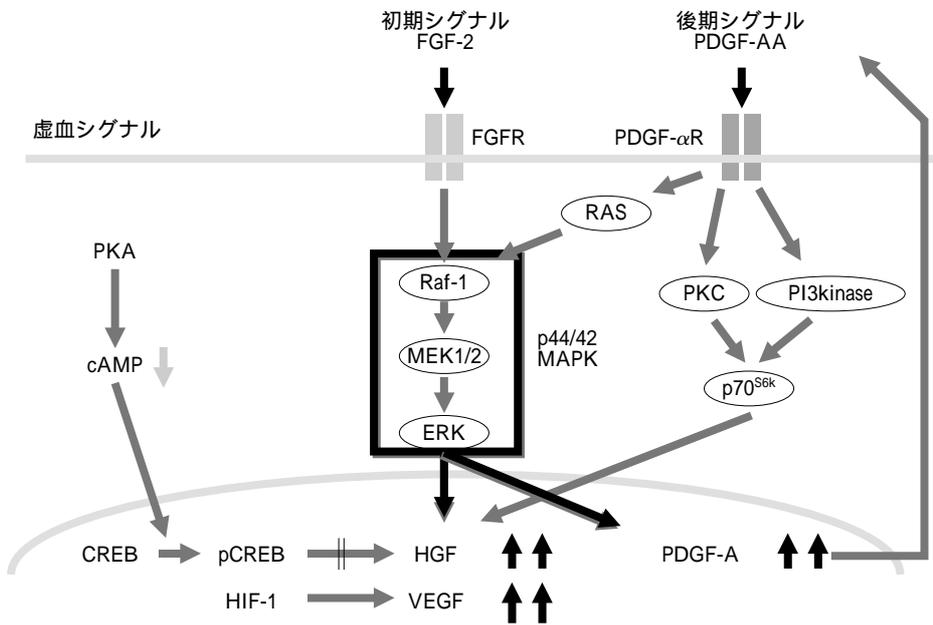


Figure 17 細胞内シグナル経路

要があるのかも知れない。

2) 血管新生因子の階層性, 協調性

以上の所見から, 虚血組織で産生が亢進したFGF-2の血管新生促進に関わる主な効果は, 以下の2点にまとめることができる。1) FGF-2の内皮細胞に対する直接的促進効果として, '血管新生促進'とともに

内皮細胞のVEGFR-2発現とAng2産生を促進することなど, 2) 平滑筋(周皮)細胞と線維芽細胞活性化を介した間接的効果として, HGF, VEGF-A/C発現促進による血管/リンパ管新生促進とともに FGF刺激によるこれら細胞のPDGF-AA産生促進と, これら細胞が産生するVEGF-Cによる内皮細胞のPDGF-BB産生促進により, HGFとVEGFの持続的な発現促進に関与するpositive feedback loopを形成すること, である。従って, FGF-2 遺伝子導入は, 種々の血管新生因子の発現を階層的, かつ統合的に促進し, その結果として血管/リンパ管の新生と成熟を促進し, 血流を伴う「機能的」血管/リンパ管新生を促進することができたと考えられ, FGF-2 遺伝子は虚血組織に対する統合的な「治療的血管

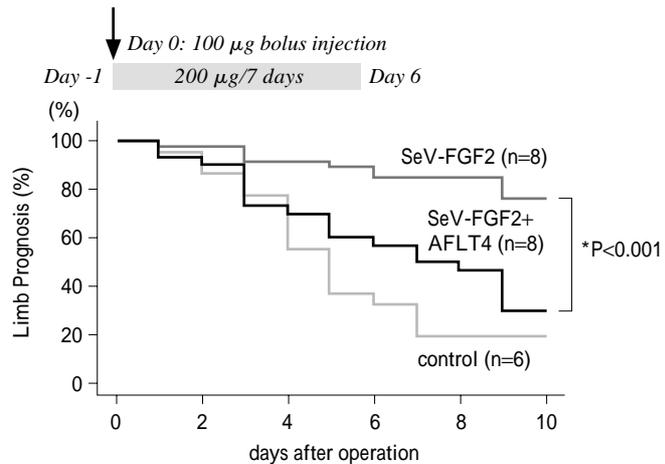


Figure 18 FGF-2によるマウス重症虚血下肢救肢効果はVEGFR-3中和抗体(AFLT4)にて部分的に抑制される

新生療法」の為の有効な標的遺伝子の一つとなりうると考えられる。

3) FGF-2 遺伝子による統合的血管新生療法

以上の証左と原理を基礎にして, 九州大学第二外科(消化器・総合外科学)の血管グループと協力して, 閉塞性動脈硬化症, Buerger病による慢性重症虚血下肢に

対する *FGF-2* 遺伝子搭載非伝播型組み換えSeVベクターによる血管新生遺伝子治療の臨床研究を立ち上げ、現在、厚生労働省/文部科学省の遺伝子治療専門委員会で審査を受けている。

4. 結 語

以上、1) 動脈硬化における血管新生は、血管新生・慢性炎症細胞浸潤のpositive feedback loopを形成して炎症の遷延化、過剰修復反応に関与していること、2) *FGF-2* は、種々の血管新生因子(VEGF-A, VEGF-C, HGF, PDGF)の産生を階層的に促進し、これら因子が協調して「機能的血管新生」に関与していること、3) PDGF/受容体シグナルは、内皮細胞・周皮(平滑筋)細胞相互反応を促進し、また $p70^{S6K}$, Ras 経路を介して VEGF-A, HGFの持続発現に関与していること、最後に4) SeV-*FGF-2* 遺伝子導入は、「統合的血管新生療法」に向けた治療戦略の一つとなりうることに概説した。

ここで紹介した標的遺伝子の生体組織内導入法により得られた血管新生に関する組織形態的ならびに機能的エビデンスは、今後、動脈硬化病変のみならず動脈硬化性虚血病変の病態解析と遺伝子治療を含めた新規治療法の開発の為の戦略を構築する為の基礎となることを期待したい。

文 献

- 1) Ramsauer M, D'Amore PA: Getting Tie(2)d up in angiogenesis. *J Clin Invest*, 2002, **110**: 1615-1617.
- 2) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science*, 1987, **235**: 442-447.
- 3) Sueishi K, Yonemitsu Y, Nakagawa K et al: Atherosclerosis and angiogenesis. Its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor. *Ann NY Acad Sci*, 1997, **811**: 311-324.
- 4) Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K: Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol*, 1995, **26**: 450-456.
- 5) Chen YX, Nakashima Y, Tanaka K et al: Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in atherosclerotic intimas of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 131-139.

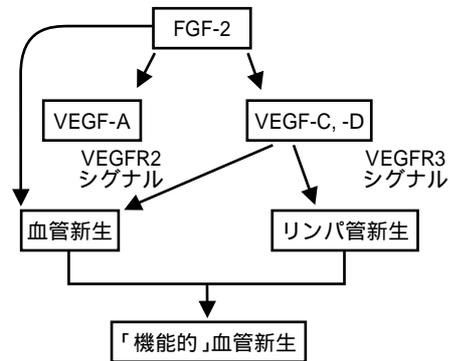


Figure 19 FGF-2 は VEGF-A/C の産生を促進して血管/リンパ管新生を誘導する - 「機能的」血管新生には両者が重要である -

- 6) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003, **9**: 669-676.
- 7) Clauss M, Gerlach M, Gerlach H et al: Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*, 1990, **172**: 1535-1545.
- 8) Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A et al: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, 1996, **15**: 290-298.
- 9) Plate KH: From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nat Med*, 2001, **7**: 151-152.
- 10) Yonemitsu Y, Kaneda Y, Morishita R et al: Characterization of in vivo gene transfer into the arterial wall mediated by the Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan) liposomes: An effective tool for the in vivo study of arterial diseases. *Lab Invest*, 1996, **75**: 313-323.
- 11) Moulton KS, Heller E, Konerding MA et al: Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999, **99**: 1726-1732.
- 12) Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG et al: Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*, 2001, **7**: 425-429.
- 13) Zhao Q, Egashira K, Inoue S et al: Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation*, 2002, **105**: 1110-1115.
- 14) Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D et al: Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumula-

- tion and progression of advanced atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**: 4736–4741.
- 15 Davies MJ, Thomas AC: Plaque fissuring—the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. Br Heart J, 1985, **53**: 363–373.
- 16 Lee RT, Libby P: The unstable atheroma. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, **17**: 1859–1867.
- 17 Burke AP, Farb A, Malcom GT et al: Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. N Engl J Med, 1997, **336**: 1276–1282.
- 18 Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K et al: Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. FASEB J, 2001, **15**: 1294–1296.
- 19 Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S et al: Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. J Immunol, 2002, **168**: 450–457.
- 20 Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A et al: Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia. Acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor₁₆₅ but not of fibroblast growth factor-2. Circ Res, 2002, **90**: 966–973.
- 21 Ikeda Y, Yonemitsu Y, Sakamoto T et al: Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer into adult rat retinal tissue: efficient gene transfer by brief exposure. Exp Eye Res, 2002, **75**: 39–48.
- 22 Jin CH, Kusuha K, Yonemitsu Y et al: Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells. Gene Therapy, 2003, **10**: 272–277.
- 23 Shoji F, Yonemitsu Y, Okano S et al: Airway-directed gene transfer of interleukin-10 using recombinant Sendai virus effectively prevents post-transplant fibrous airway obliteration in mice. Gene Therapy, 2003, **10**: 213–218.
- 24 Hayashi S, Morishita R, Nakamura S et al: Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral arterial disease: downregulation of HGF in response to hypoxia in vascular cells. Circulation, 1999, **100** (19 suppl): II-301–II-308.
- 25 Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M et al: Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. Circ Res, 2002, **91**: 923–930.
- 26 Simm A, Hoppe V, Karbach D et al: Late signals from the PDGF receptors leading to the activation of the p70^{S6}-kinase are necessary for the transition from G1 to S phase in AR-2B cells. Exp Cell Res, 1998, **244**: 379–393.

Pathology of Vascular Remodeling Functional angiogenesis by *FGF-2* gene transfer using *Sendai* virus vector (SeV)

Katsuo Sueishi

Pathophysiological and Experimental Pathology,
Department of Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Key words: Vascular remodeling, Therapeutic angiogenesis, Ischemia, FGF-2, *Sendai* virus vector

Angiogenesis is an essential process in not only the development of tissue/organ but also the tissue remodeling following tissue injuries-inflammation. This paper renewed the mechanism of FGF-2-induced angiogenesis in ischemic limb animal models, the utility of *FGF-2* gene transfer using SeV as an effective therapeutic tool for ischemic tissue/organ and the functional hierarchy/coordination of FGF-2-induced angiogenesis with other endogenous angiogenic factors such as VEGF-A, -C, HGF and PDGF, which would be expressed by endothelial cells, smooth muscle cells/pericytes and fibroblasts. On the other hand, angiogenesis can accelerate the progression of basic diseases in angiogenic diseases. In fact, angiogenesis plays a role in the progression of atherosclerosis, which is the major cause of ischemic diseases in human organs, especially in the heart, brain and lower extremities. Therefore, therapeutic angiogenesis could play the bi-directional functions like a two-edged sword for patients with atherosclerotic diseases in the promotion of atherogenesis itself besides the rescue of ischemic organs. However, the FGF-2-induced effects on exogenous and endogenous expression of angiogenic factors are limited to be local, not systemic. The findings indicate that the *FGF-2* gene transfer using SeV can be an innovative and effective therapeutic tool for ischemic atherosclerotic diseases in developing functional collateral vessels. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 85–98)