

FGF-2による階層的内因性血管新生関連因子発現制御システム

鬼丸 満穂 米満 吉和 居石 克夫

要 旨：われわれはこれまで、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF/FGF-2)により誘導される血管新生の生物学的特徴を検討してきた。FGF-2は、血管平滑筋細胞や線維芽細胞などの間葉系細胞を標的として、複数の代表的な内因性血管新生関連因子の発現を、空間的発現局在や時間的発現動態をも制御しながらバランスよく亢進し、血流回復に寄与する「機能的」血管新生を誘導することが明らかとなり、治療的血管新生療法に対するFGF-2の治療因子としての有用性が示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 579-587)

Key words: basic fibroblast growth factor, Sendai virus vector, angiogenesis, therapeutic angiogenesis, gene therapy

現行の末梢動脈性閉塞疾患に対する 治療と問題点

閉塞性動脈硬化症や、Buerger病を代表とする末梢動脈閉塞性疾患は、進行症例の場合、薬物療法や外科的療法に反応せず、下肢切断を余儀なくされる場合が多い。下肢切断は、患者のQOL(quality of life)を低下させるばかりでなく、生命予後にも悪影響を与えることが知られており、下肢切断を回避する治療法の確立が望まれる。このような臨床的背景のなか、米国のIsnerらは、血管新生因子を虚血組織に投与し、積極的に血管新生を誘導することで虚血状態の改善を目指した、いわゆる「治療的血管新生療法」なる概念を提唱し、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)を用いた臨床試験を世界で初めて行った^{1,2)}。その後、種々の血管新生因子による治療的血管新生療法の臨床試験が行われているが、いまだ新規治療法として確立されるに値する有効性が確認されていないのが現状である。これは、①治療因子の選択、②治療因子の投与方法ならびに安全性、③治療因子の有効域や毒性域、など治療法を確立するうえで必須の科学的検討項目が不十分であることに起因すると考えられる。一

方、われわれは、高い遺伝子発現効率と安全性を兼ね備えた新規国産型センダイウイルスベクター(SeV)を開発した^{3,4)}。この新規ベクターにより血管新生因子を生体局所に高いレベルで発現させることが可能であり、より有効な治療的血管新生療法確立への応用が期待された。

マウス虚血下肢に対する FGF-2遺伝子治療の生物学的特徴

(1)血管新生遺伝子治療の治療効果判定モデルの確立

SeVを用いた血管新生遺伝子治療の効果判定には、下肢の重症虚血状態を再現性よく誘導できる安定したモデルの確立が必須である。われわれは、マウスの大腿動静脈を結紮、抜去する方法でマウス下肢への重症虚血の誘導を試みた。C57BL/6マウスに対しこの虚血誘導を行うと、手術直後にはほぼ血流が遮断されるものの、その後徐々に血流が回復し結果的に下肢の脱落を起こさず(Fig. 1A)、一方、balbCヌードマウスにおいては再現性よく下枝脱落が生じることを見いだした(Fig. 1D)。われわれは、前者をマウス下肢救済モデル(limb salvage model)、後者をマウス下肢脱落モデル(limb auto-amputation model)と称し重症下肢虚血モデルとして確立した⁵⁾。このモデルを用いることで、前者では

九州大学大学院医学研究院病態医学部門病理学講座病理病態学分野

2006年8月1日受理

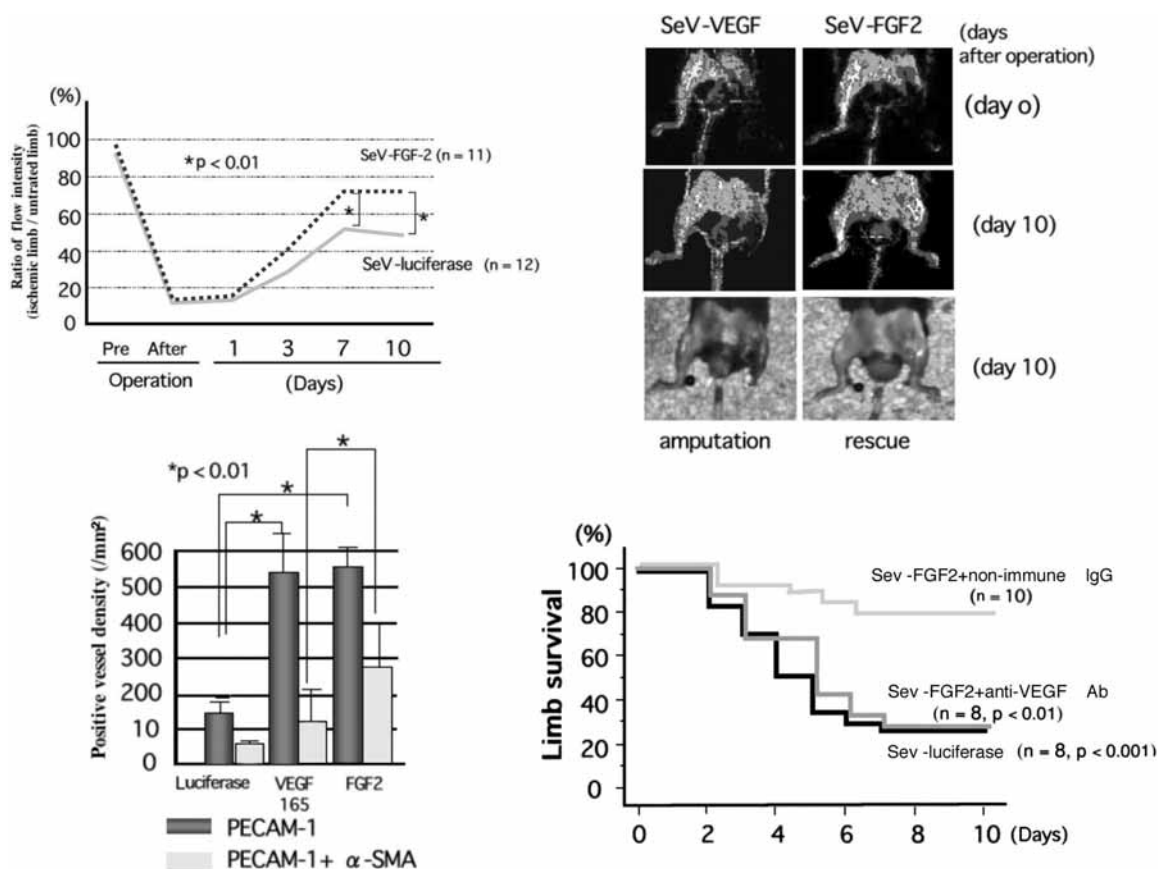


Figure 1
A: Time-dependent restoration of blood flow after SeV-mediated FGF-2 gene transfer (limb salvage model).
B: Laser Doppler perfusion image of limb salvage model (10 days after SeV-mediated human VEGF165 or murine FGF-2 gene transfers).
C: PECAM-1-positive or PECAM-1+ α -SMA double positive blood vessel densities in ischemic thigh muscles of limb salvage model 10 days after SeV-mediated VEGF165 or FGF-2 gene transfers.
D: SeV-mediated FGF-2 gene transfer-induced promotion of limb survival was completely diminished by systemic administration of anti-VEGF neutralizing antibody.

A	B
C	D

血管新生遺伝子治療の血流回復効果を，後者では救肢効果を判定することが可能となった。さらに前者においては，大腿筋肉内の種々の蛋白質や遺伝子発現レベルの経時的变化の検討，さらには下肢の組織学的検討などが可能である。

(2)「病的」血管と「機能的」血管

われわれは最初に，代表的な血管新生因子である VEGF と塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF/FGF-2)に着目し，これらの遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクター(SeV-VEGF,

SeV-FGF-2)を構築し，重症虚血下肢に対する治療効果を limb salvage model を用いて検討した⁵⁾。結果は，SeV-FGF-2 群では有効な血流回復を示したのに対し (Fig. 1A)，SeV-VEGF 群では有効な血流回復を得られないどころか，limb salvage model にもかかわらず下肢が脱落し予後が悪化するという意外なものであった (Fig. 1B)。この結果は，生体局所における VEGF 濃度の過剰な亢進はかえって有害となる可能性を示唆する。われわれは，SeV-FGF-2 群と SeV-VEGF 群の大腿筋肉の血管新生の状態を組織学的に検討した。興味深いことに，両群ともに PECAM-1 陽性血管腔密度(血管密度)

が非遺伝子導入群と比較して5倍程度増加しており両群間において血管新生は同程度促進されていた。一方、PECAM-1, α -SMA両陽性を示す管腔密度(ペリサイトを伴った血管密度)を測定したところ, SeV-FGF-2群がSeV-VEGF群に比べ有意に高いという結果を得た(**Fig. 1C**)。以上の結果は, ①新生血管には構造的に成熟した(ペリサイトを多く伴った)血管とそうでない未熟な血管とがある。②未熟な血管が多く新生されても血流回復に反映されにくい, ということを示唆する。われわれは, 有効な血流回復を誘導する構造的に成熟した血管を「機能的」血管, 有効な血流回復誘導に至らない未熟な血管を「病的」血管と称して区別し, 治療的血管新生療法を確立するためには, いかにして「機能的」血管新生を誘導するかが重要であるとの認識に至った。加えて, FGF-2は「機能的」血管新生を効果的に誘導する機能を有していると考えられ, その分子メカニズム解明を目的とした検討に力を注いだ。

(3) マウス虚血下肢へのFGF-2遺伝子導入による治療効果と内因性血管新生関連因子との関係

われわれは, 過剰なVEGFが虚血組織局所に単独で存在することは, 決して虚血改善に向かわないことを示したが, 一方で, これまでVEGFは主要な血管新生因子として注目されてきたことは紛れもない事実であり, さらに低酸素刺激により誘導される因子である以上, 生体の虚血局所においてその改善に重要な役割を果たしていることは想像にやすい。そこでわれわれは, マウス虚血下肢へのFGF-2遺伝子導入による治療効果に対する内因性VEGFの役割に注目した⁵⁾。興味深いことに, limb auto-amputation modelを用いたFGF-2遺伝子導入による重症虚血下肢の救肢効果は, 内因性VEGF活性を活性中和抗体で抑制することにより完全に消失してしまうことが明らかとなった(**Fig. 1D**)。このことは, FGF-2による「機能的」血管新生誘導には内因性のVEGF活性が必須であることを示唆する。そして, 同様の現象がVEGF以外の内因性血管新生関連因子でも認められた。つまり, 血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor: PDGF)-AA, PDGF-BB, 肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF), VEGF receptor (VEGFR)-3のいずれにおいても, 内因性の活性を活性中和抗体で抑制することにより, FGF-2の治療効果が消失ないし抑制されることを見いだした^{6,7)}。以

上の結果から, 「機能的」血管新生は, 決して血管新生因子単独かつ直接的な機能により誘導されるものではなく, その誘導に対し必須の役割を担った複数の血管新生関連因子の機能の集大成であると考えられる。そして, 生体虚血局所へのFGF-2遺伝子導入は, FGF-2の局所濃度亢進によるFGF-2の直接的な血管新生作用の亢進に加え, 内因性血管新生関連因子群の機能亢進に対しても積極的に関与している可能性が考えられた。

(4) マウス虚血下肢へのFGF-2遺伝子導入による内因性血管新生関連因子の経時的遺伝子発現動態

limb salvage modelにおける虚血下肢の血流回復状況を経時的に観察すると, 虚血誘導後, 約1週間で血流回復がプラトーに達する。SeV-FGF-2導入は血流回復レベルを有意に亢進するが, プラトーに達する時期には特に影響を与えない(**Fig. 1A**)。つまり, 血流回復に寄与する「機能的」血管新生誘導は, 約1週間という過程を経て収束すると考えられる。そこでわれわれは, FGF-2遺伝子導入と虚血下肢の内因性血管新生関連因子群との関係をさらに詳細に把握するべく, SeV-FGF-2導入後の内因性血管新生関連因子の経時的遺伝子発現動態を検討した⁷⁾。その結果, 非常に興味深い遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった。まず, limb salvage modelにおいて内因性のFGF-2, VEGF, HGF, PDGF-Aは虚血誘導後1日目に遺伝子発現亢進のピークを示し, 一方, VEGF-C, PDGF-Bは虚血誘導後7日目に遺伝子発現亢進のピークを示すという特徴的な発現パターンを示した。さらに, 虚血誘導と同時にSeV-FGF-2を導入することにより, これら内因性血管新生関連因子の遺伝子発現レベルが有意に亢進する一方, 発現ピークは変化しないという結果を得た(**Fig. 2A**)。これらの結果から, 血管新生関連因子は「機能的」血管新生過程において, 経時的役割分担なるものが存在し, 血管新生初期に主たる作用時期を有し, 血管新生開始に重要な役割を担う因子や, 血管新生後期に主たる作用時期を有し, 血管の成熟や血管新生の収束に関与すると考えられる因子が存在し, これら因子はそれぞれの時期で, 血管新生過程に必須の役割を果たしていると考えられる。特に, VEGF-Cの受容体であるVEGFR-3やPDGF-BBは血管成熟性の誘導に重要な役割を担う因子として知られており^{8,9)}, 「機能的」血管新生後期の発現亢進は注目に値する。

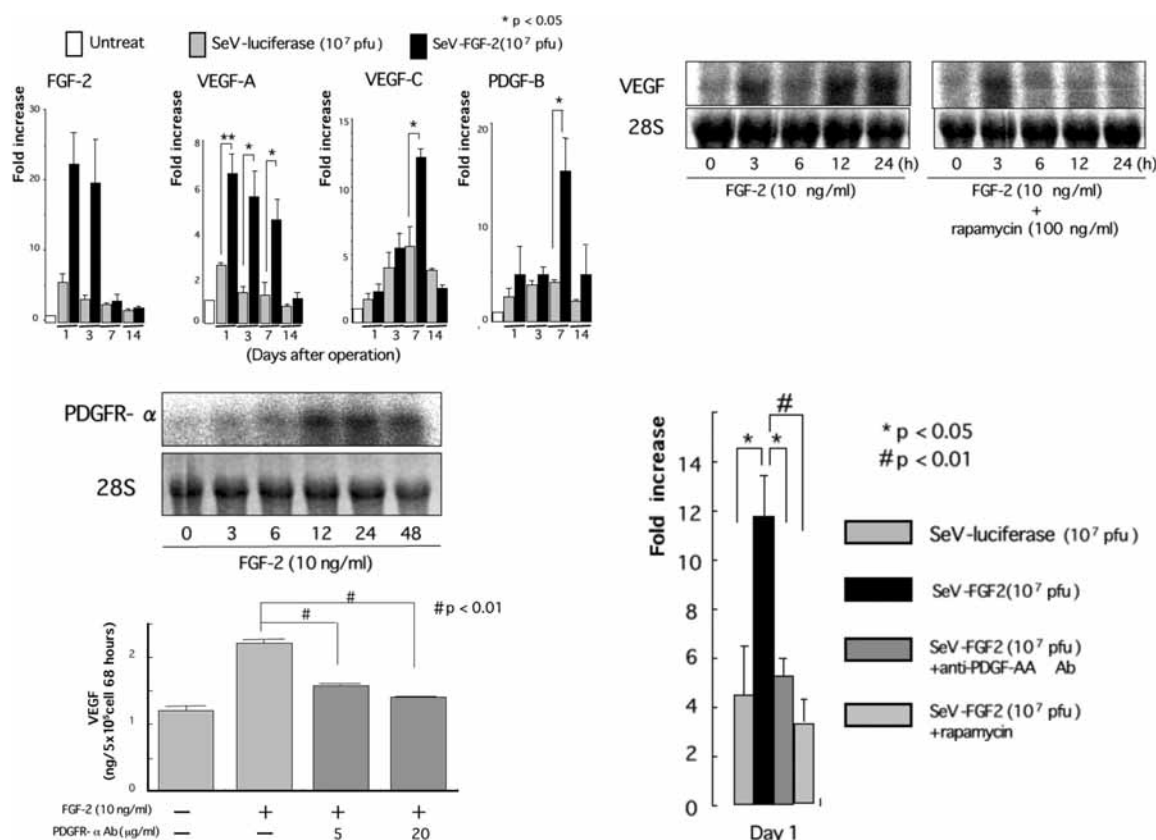


Figure 2

A: Time-dependent relative mRNA expression level of endogenous angiogenesis-related factors in SeV-FGF-2 or SeV-luciferase gene transferred ischemic thigh muscles (limb salvage model).

B: Left; FGF-2-induced VEGF mRNA upregulation in HSMCs in time-dependent manner (Northern blot analysis). Biphasic pattern (early and late phase) is apparent. Right; FGF-2-dependent late phase-upregulation of VEGF mRNA was disappeared under treatment of p70S6 kinase inhibitor, rapamycin (Northern blot analysis).

C: FGF-2-mediated PDGFR-α mRNA expression in time-dependent manner in fetal lung fibroblasts, MRC5 (Northern blot analysis).

D: FGF-2-induced VEGF protein secretion was largely suppressed by blockade of activity of endogenous PDGFR-α in MRC5 (ELISA).

E: SeV-FGF-2 gene transfer-induced upregulation of relative endogenous VEGF mRNA level (day 1) was significantly suppressed by systemic administration of anti-PDGF-AA neutralizing antibody or rapamycin (real-time PCR).

A	B
C	E
D	

FGF-2による 階層的血管新生因子発現制御機構

(1) FGF-2による「機能的」血管新生誘導過程「早期」における内在性血管新生関連因子遺伝子発現制御機構

1) *in vitro* FGF-2依存性VEGF, HGF発現制御機構 (PDGF-AA/PDGFR-α/p70S6 kinaseオートクラインシステムの重要性)

マウス重症下肢虚血モデルにおいて、FGF-2遺伝子導入は内在性の血管新生関連因子の発現を亢進するこ

とが明らかとなった。そこで、FGF-2と他の血管新生関連因子との関係を明らかにするため、*in vitro*による詳細な検討を行った。FGF-2とVEGFとの関係においては、血管平滑筋細胞においてFGF-2がVEGFの発現を亢進し、さらに低酸素環境下において相乗的に発現亢進を誘導するとの報告がなされており¹⁰⁾、われわれの検討においても同様の現象を確認した。FGF-2とHGFの関係については、やはりVEGFと同様、血管平滑筋細胞や線維芽細胞(間葉系細胞)においてFGF-2はHGF発現亢進機能を有することが明らかとなった⁶⁾。さらに間葉

系細胞のVEGFやHGF発現におけるFGF-2時間依存性発現亢進動態を観察したところ、FGF-2刺激早期に亢進したVEGFやHGF mRNAは、その後いったん減少するものの再び亢進するという、持続性あるいは2峰性の発現パターンを示すことが明らかとなった^{6,7)}(Fig. 2B)。われわれは、この持続性ないし2峰性の経時的発現パターンが誘導される機序として、「間葉系細胞はFGF-2で早期に発現亢進が誘導され、かつVEGFやHGF発現亢進を誘導する他のサイトカインを発現しており、このサイトカインがオートクラインシステムを介してVEGFやHGFの発現を誘導することによる」という仮説を立てた。そこで、この未知のサイトカインの同定につながる情報を得るために、FGF-2依存性VEGF、HGF発現誘導に関与する細胞内シグナル伝達機構の詳細を検討した^{6,7)}。その結果、遺伝子レベルでは、FGF-2による早期VEGF、HGF発現亢進に対し、主に関与する細胞内シグナルは、p42/44 mitogen activated protein kinase(MAPK)系であった。FGF-2刺激により活性化されるとの報告があるPI3 kinaseやp70S6 kinaseの阻害剤は、FGF-2による早期VEGF、HGF遺伝子発現亢進には影響を与えなかった。しかし、一方でFGF-2によるVEGF、HGFの蛋白発現亢進は、p42/44 MAPK系の阻害により完全に抑制され、PI3 kinaseの阻害で影響を受けないが、p70S6 kinaseの阻害により部分的に抑制されることを見出した。このことは、FGF-2によるVEGF、HGFの後期遺伝子発現亢進(2峰性発現パターンの第二ピーク形成)にp70S6 kinase系に関与する可能性を示唆する現象と考えられる。そこで、FGF-2時間依存性VEGF遺伝子発現誘導におけるp70S6 kinase阻害剤の影響を検討したところ、p70S6 kinaseの阻害はFGF-2による早期VEGF遺伝子発現亢進には影響を与えず、後期遺伝子発現亢進を完全に抑制した(Fig. 2B)。このことから、先に述べた未知のサイトカインは、p70S6 kinaseを主たるシグナルとしてVEGF、HGFの後期遺伝子発現を誘導していることが示唆された。われわれは、この未知のサイトカインは、p70S6 kinase系を活性化すると報告¹¹⁾があるPDGFであるとの仮説を立て、さらなる検討を加えた。その結果、FGF-2はPDGF-AAやその受容体であるPDGF receptor(PDGFR)- α の発現を亢進し、かつFGF-2によるVEGFやHGFの蛋白発現亢進がPDGF-AAやPDGFR- α に対する活性中和抗体処置により有意かつ著明に抑制されることが明らかとなった

(Fig. 2C, D)^{6,7)}。以上から、FGF-2は間葉系細胞を標的として一過性にVEGFやHGFの発現を誘導するが、さらにPDGF-AA/PDGFR- α /p70S6 kinaseオートクラインシステムを利用して持続的かつ高いVEGF、HGF発現を誘導するシステムの存在が*in vitro*で明らかとなった。2)*in vivo* FGF-2依存性VEGF、HGF発現亢進におけるPDGF-AAならびにp70S6 kinaseシグナルの重要性

次に、*in vitro*で認められた現象が、実際の*in vivo*において機能しているかどうかをマウス重症下肢虚血モデルで検証した。その結果、limb salvage modelでの、FGF-2遺伝子導入による内因性VEGF、HGF遺伝子発現亢進効果やlimb auto-amputation modelにおけるFGF-2の救肢効果が、PDGF-AAの活性中和抗体処置や、p70S6 kinase阻害により有意に抑制されることが明らかとなった(Fig. 2E)^{6,7)}。よって、*in vitro*で確認されたFGF-2のPDGF-AA/PDGFR- α /p70S6 kinaseシステムを介したVEGF、HGF発現誘導システムは*in vivo*において重要なシステムとして機能している可能性が示唆された。

(2) FGF-2による「機能的」血管新生誘導過程「後期」における内因性血管新生関連因子遺伝子発現制御機構

1)*in vitro*におけるFGF-2依存性VEGF-C、PDGF-B発現制御機構

われわれは、マウス重症下肢虚血モデルにおいて認められた、FGF-2による「機能的」血管新生過程後期に発現亢進のピークを示すVEGF-C、PDGF-Bに関して、*in vitro*にてFGF-2によるそれら遺伝子の発現制御機構の詳細を検討した。まず、間葉系細胞におけるFGF-2時間依存性VEGF-C遺伝子発現亢進動態を検討したところ、刺激早期に発現亢進を示すものの、先に述べたVEGFやHGFのような持続性ないし二峰性の発現動態は示さず一過性であった(Fig. 3A)。このFGF-2による早期VEGF-C遺伝子発現亢進に主に関与する細胞内シグナルはVEGF、HGF同様、p42/44 MAPK系であった。一方、血管内皮細胞に対しFGF-2刺激を加えても、血管内皮細胞におけるPDGF-B発現を亢進することはなかった(Fig. 3A)。これら、*in vitro*の結果は、FGF-2遺伝子導入による「機能的」血管新生誘導過程後期の遺伝子発現誘導メカニズムを到底説明することができない。そこでわれわれは、*in vivo*での経時的発現パターンがよく似ているVEGF-CとPDGF-Bの両因子の相互作用

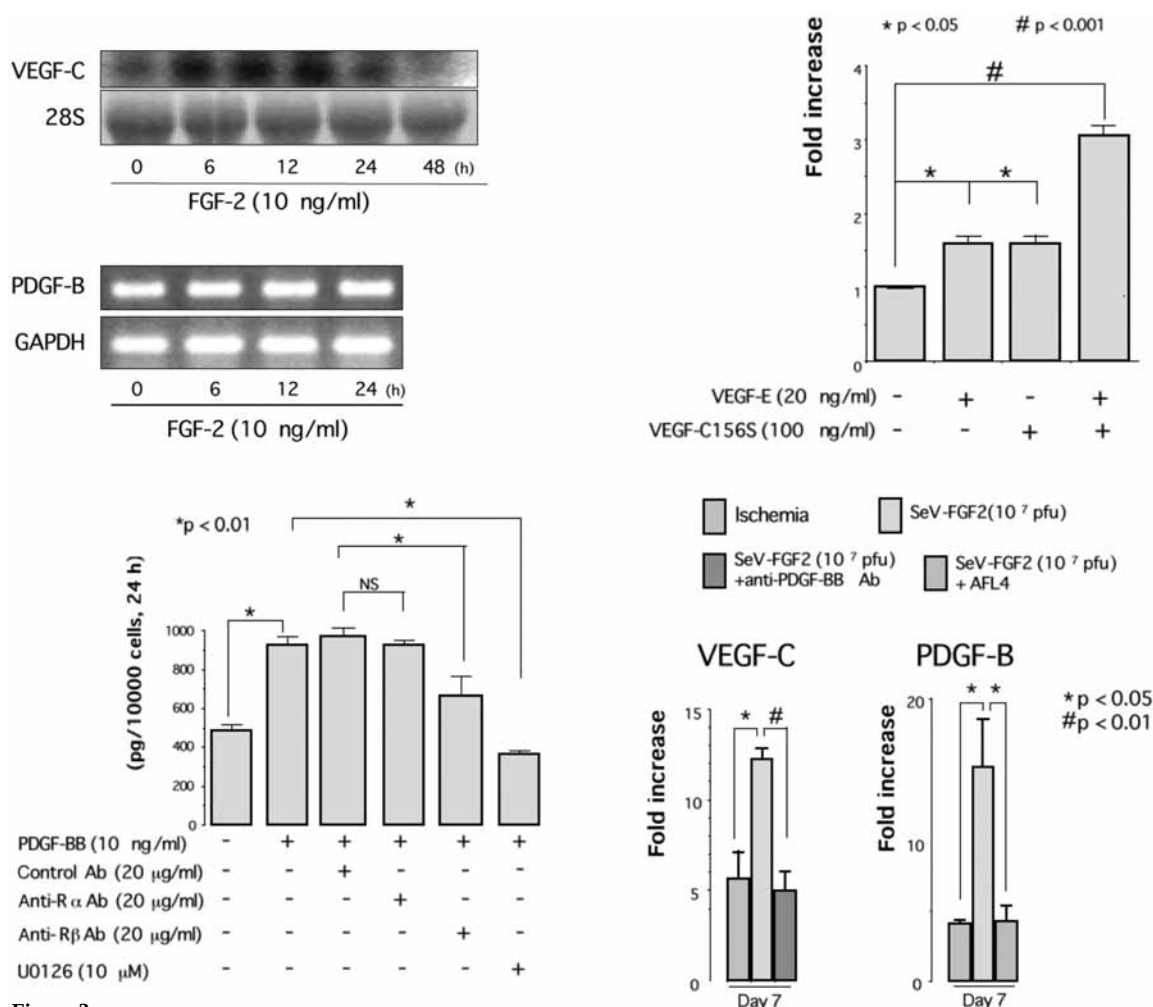


Figure 3

A: Top; FGF-2-mediated VEGF-C mRNA expression in MRC5 in time-dependent manner (Northern blot analysis). Bottom; Effect of time-dependent FGF-2 stimulation on expression of PDGF-B mRNA in bovine capillary endothelial cells, BCEs (semi-quantitative RT-PCR).

B: Either VEGF-C156S or VEGF-E stimulation upregulates PDGF-B mRNA in BCEs. Simultaneous stimulations synergistically induced upregulation of PDGF-B mRNA in BCEs (real-time PCR).

C: PDGF-BB promoted VEGF-C protein secretion in MRC5, and PDGF-BB-dependent upregulation of VEGF-C secretion was partly suppressed by treatment of PDGFR- β neutralizing antibody (anti-R β Ab), and completely suppressed by treatment of MEK1/2 inhibitor, U0126 (ELISA).

D: Left; SeV-FGF-2 gene transfer-induced upregulation of endogenous VEGF-C mRNA (day 7) was significantly suppressed by systemic administration of anti-PDGF-BB neutralizing antibody. Right; SeV-FGF-2 gene transfer-induced upregulation of endogenous PDGF-B mRNA (day 7) was significantly suppressed by systemic administration of anti-VEGFR-3 neutralizing antibody, AFL4 (real-time PCR).

A	B
C	D

用に着目した。

2) *in vitro* 血管内皮細胞における VEGFR-3 ならびに VEGFR-2 シグナルによる PDGF-B 遺伝子発現制御

in vitro において FGF-2 は、間葉系細胞を標的として VEGF-C の発現を一過性に亢進し、血管内皮細胞における PDGF-B の発現亢進効果を示さない一方で、*in vivo*

においては PDGF-B の発現を亢進するという相容れない現象が起こる機序として「FGF-2 によって発現亢進された VEGF-C が間接的に PDGF-B の発現を亢進する」という仮説を立て、その可能性を模索した。VEGF-C は細胞から分泌される際、細胞内でのプロセッシングにより分泌型 (29kDa) となる。この分泌型 VEGF-C は主に

VEGFR-3のリガンドとして機能し、VEGFR-2に対する親和性は低いとされている。分泌型VEGF-Cは、さらに細胞外でのプロセッシングにより、成熟型(21kDa)へと変換される。この成熟型VEGF-CはVEGFR-2との十分な親和性を獲得し、VEGFR-2とVEGFR-3双方のリガンドとして機能し得る¹²⁾。*in vivo*において分泌されたVEGF-Cが主にどちらの形で存在するかを知ることは、VEGF-Cの機能を考えるうえで重要であるが、詳細は不明である。しかし、*in vitro*において培養上清中に分泌されたVEGF-Cは、そのほとんどが血清の有無や細胞種に関係なく分泌型として長く留まるという事実や、ヒト血漿中のVEGF-Cも分泌型が主であることから、生体において細胞から分泌されたVEGF-Cの多くは分泌型VEGF-Cとして存在し、主にVEGFR-3のリガンドとして機能していると推測される。そこで、実験系を単純化するため、VEGFR-3のみに親和性を有する成熟型VEGF-Cの変異型であるVEGF-C156Sを用いて血管内皮細胞におけるVEGFR-3シグナルとPDGF-B発現との関係を検討した。その結果、VEGF-C156Sは血管内皮細胞におけるPDGF-B遺伝子の発現を亢進した(**Fig. 3B**)。一方、VEGFR-2のみに親和性を持つVEGF-Eを用いて血管内皮細胞におけるVEGFR-2シグナルとPDGF-Bとの関係も検討した。その結果、VEGF-EはVEGF-C156Sと同様、血管内皮細胞におけるPDGF-B遺伝子の発現を亢進した(**Fig. 3B**)。さらに、VEGF-C156SとVEGF-Eの刺激を同時に加えることで相乗的な高いPDGF-B遺伝子発現亢進を誘導できることも見出した(**Fig. 3B**)。以上から、血管内皮細胞におけるVEGFR-2やVEGFR-3のシグナルはPDGF-B遺伝子発現亢進シグナルとして機能しており、マウス重症下肢虚血モデルにおいて認められたFGF-2遺伝子導入による内因性PDGF-B遺伝子発現亢進に関与している可能性が考えられた。

3) *in vitro* 間葉系細胞におけるPDGF-B依存性VEGF-C発現制御機構

次に、*in vitro*において、間葉系細胞のVEGF-C発現に対するPDGF-BBの影響を検討した。その結果、PDGF-BBは間葉系細胞に対しVEGF-Cの遺伝子発現を亢進し、VEGF-C蛋白(分泌型)の発現を亢進した。そして、PDGF-BBの受容体であるPDGFR- α やPDGFR- β に対する活性中和抗体や細胞内シグナル阻害剤を用いた検討の結果、PDGF-BB依存性VEGF-C発現亢進効果に

は主にPDGFR- β が関与し、p42/44MAPK系を介して誘導されることが明らかとなった(**Fig. 3C**)。これら*in vitro*の結果は、マウス重症下肢虚血モデルにおいて、FGF-2遺伝子導入により発現亢進するPDGF-Bと同調した内因性VEGF-C遺伝子発現亢進に関わるシステムである可能性が考えられた。

4) *in vivo* におけるVEGF-C/VEGFR-3連関ならびにPDGF-BB/PDGFR- β 連関のパラクライン的相互作用

上記の*in vitro*におけるVEGF-CとPDGF-BBとの関係は、実際の生体においては、血管内皮細胞とその周囲間葉系細胞間のクロストークによる「機能的」血管新生過程後期の血管成熟性を規定する重要なシステムである可能性が考えられた。そこで、実際に*in vitro*で認められた現象が*in vivo*において機能しているかどうかを検討した。その結果、limb salvage modelへのSeV-FGF-2導入による導入7日目の内因性PDGF-B発現亢進は、内因性のVEGFR-3活性を活性中和抗体により抑制することで有意に抑制された。逆にSeV-FGF-2導入による導入7日目の内因性VEGF-C発現亢進は、内因性PDGF-BBの活性を活性中和抗体により抑制することで有意に抑制された(**Fig. 3D**)。言い換えると、FGF-2による内因性PDGF-B遺伝子発現亢進は内因性VEGFR-3活性に依存しており、FGF-2による内因性VEGF-C遺伝子発現亢進は内因性PDGF-BB活性に依存していることを意味する。以上の結果から、血管内皮細胞におけるVEGF-C/VEGFR-3連関とその周囲の間葉系細胞におけるPDGF-BB/PDGFR- β 連関はパラクラインループを形成することで、持続的、増幅的VEGF-C、PDGF-BBの発現亢進を誘導し、特にPDGF-BBにおいては血管の成熟性を誘導する重要なシステムとして機能していると考えられた。一方、FGF-2はこの内因性のパラクラインシステムを作動させることで新生血管の成熟性を誘導すると考えられた(**Fig. 4A**)。

まとめ

生体虚血局所に外来性血管新生因子を投与し、局所における血管新生を積極的に誘導することで虚血状態を改善することを目的とした、いわゆる「治療的血管新生療法」においては、安全性を確保することはもちろんのこと、治療因子の選択は極めて大切であると考えられる。われわれは、これまでの研究で、① 新生血管には、血流回復に寄与する「機能的」血管と、そうでない

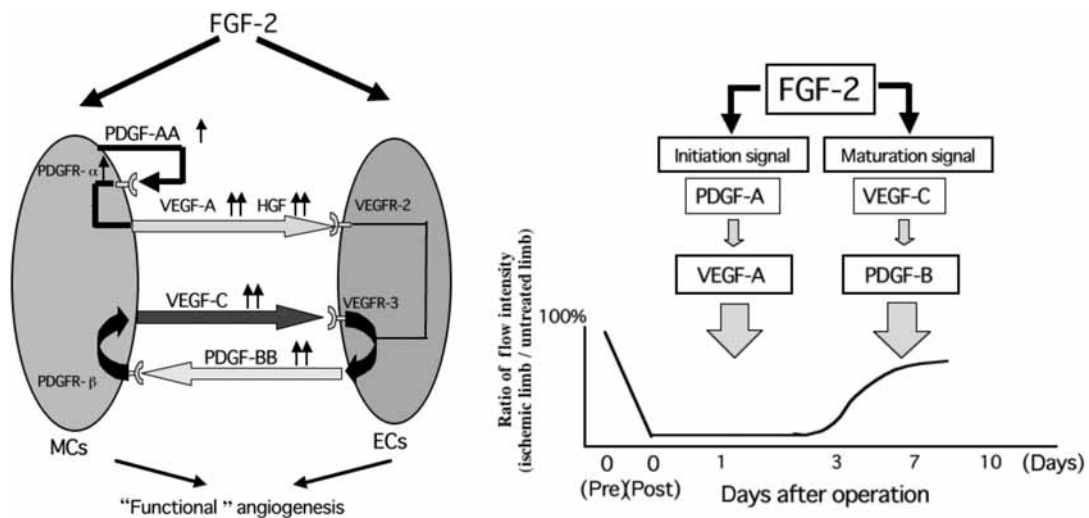


Figure 4

A: Scheme of exogenous FGF-2-dependent spatial hierarchical regulations of endogenous angiogenesis-related factors (interactions of endogenous angiogenesis-related factors between endothelial cells/ECs and surrounding mesenchymal cells/MCs).

B: Scheme of exogenous FGF-2-dependent temporal hierarchical regulations of endogenous angiogenesis-related factors.

A | B

「病的」血管があること、②「機能的」血管新生誘導は種々の血管新生関連因子がおのおの必須の役割を担い、時間的、空間的相互作用 (Fig. 4) を介して誘導される生物学的現象であること、を示唆した。したがって、生体虚血局所に外来性血管新生因子を過剰投与するという治療行為は、ともすると一血管新生因子単独の機能を際立たせ、かつ生体内での時間的、空間的協調を乱す可能性を秘めていることを念頭に置いておく必要があり、より有効な「治療的血管新生療法」の確立を目指す場合には、いかにして「機能的」血管新生誘導を促進するかということを基盤においた研究の発展が必要と思われる。われわれが治療因子として注目した FGF-2 は、① 生体内において特徴的な発現局在を示さず普遍的に存在し、かつ幅広い細胞種に対し作用する因子であること、② 生体虚血刺激に対し早期に誘導される因子であり、血管新生開始を誘導する重要な内分泌性血管新生因子であると推測されること、③ 血管内皮細胞に対する直接作用に加え、間葉系細胞を標的として種々の内分泌性血管新生因子の発現を、時間的一空間的バランスを維持しつつ亢進できること (FGF-2 による内分泌性血管新生因子の階層的制御機構の存在)、などの特徴を有しており、現在のところ「治療的血管新生療

法」において最も有効性が期待できる治療因子の一つと考えている。現在、九州大学病院において、われわれの研究成果を基盤とした、FGF-2 搭載センダイウイルスベクターによる末梢閉塞性動脈疾患に対する遺伝子治療の臨床研究が進行中である。今後、その臨床的有効性が認められ、一般的な治療法として定着することを願ってやまない。

文 献

- 1) Takeshita S, Pu LQ, Stein LA et al: Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*, 1994, **90**: II228-II234.
- 2) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al: Constitutive expression of VEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 1998, **97**: 1114-1123.
- 3) Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S et al: Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 970-973.
- 4) 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 sys-

- tem. *FASEB J*, 2001, **15**: 1294–1296.
- 5) 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 factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res*, 2002, **90**: 966–973.
 - 6) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M et al: Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated down-regulation in ischemic limbs. *Circ Res*, 2002, **91**: 923–930.
 - 7) Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y et al: Essential role of PDGFR α -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFR α during angiogenesis. *Circ Res*, 2004, **94**: 1186–1194.
 - 8) Lindahl P, Johansson BR, Leveen P et al: Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 1997, **277**: 242–245.
 - 9) Kubo H, Fujiwara T, Jussila L et al: Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood*, 2000, **96**: 546–553.
 - 10) Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA et al: Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*, 1995, **92**: 11–14.
 - 11) Simm A, Hoppe V, Karbach D et al: Late signals from the PDGF receptors leading to the activation of the p70S6-kinase are necessary for the transition from G1 to S phase in AKR-2B cells. *Exp Cell Res*, 1998, **244**: 379–393.
 - 12) Joukov V, Sorsa T, Kumar V et al: Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J*, 1997, **16**: 3898–3911.

FGF-2-mediated Hierarchical Regulatory System for Endogenous Expressions of Angiogenesis-related Factors

Mitsuho Onimaru, Yoshikazu Yonemitsu, and Katsuo Sueishi

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

Key words: basic fibroblast growth factor, Sendai virus vector, angiogenesis, therapeutic angiogenesis, gene therapy

Although several angiogenic factors have been proposed for possible therapeutic angiogenesis and several clinical trials for peripheral obstructive arterial diseases (PAD) have been conducted, effective therapeutic strategy has yet to be established. Basic fibroblast growth factor (bFGF/FGF-2) is one of representative angiogenic growth factors, and we have clarified biological characteristics of FGF-2-mediated angiogenesis as follows: 1) Sendai virus (SeV)-mediated FGF-2 gene transfer is an effective therapeutic strategy for murine severely ischemic hind limb. 2) FGF-2-induced newly formed blood vessels are structurally matured and contribute to blood flow restoration. 3) SeV-mediated FGF-2 gene transfer-induced therapeutic effects are completely or partially depended on each activity of endogenous expression of angiogenesis-related factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), platelet-derived growth factor (PDGF)-AA, PDGF-BB and VEGF receptor (VEGFR)-3. 4) FGF-2 also targets non-endothelial mesenchymal cells and induces temporally and spatially well-balanced upregulation of these endogenous angiogenesis-related factors. Together, we propose the hypothesis that FGF-2 hierarchically regulates the expressions of endogenous angiogenesis-related factors and is available for inducing higher therapeutic effects for severe PAD.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 579–587)