

リンパ浮腫に対する遺伝子治療法の開発

齊藤 幸裕¹ 中神 啓徳² 東 信良¹ 森下 竜一³ 金田 安史⁴ 笹嶋 唯博¹

要 旨：リンパ浮腫は有効な根治治療法がなく次世代治療法が望まれる。本研究では肝細胞増殖因子(HGF)のリンパ管新生作用を証明しリンパ浮腫への遺伝子治療効果を検討した。リンパ管内皮細胞には HGF 受容体が発現し HGF 刺激で、ERK および Akt の活性化を伴う増殖能、遊走能の増加が認められた。さらにラットリンパ浮腫モデルで HGF 遺伝子治療効果が得られた。HGF がリンパ浮腫の次世代治療法となる可能性が示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 447-452)

Key words: lymphedema, gene therapy, hepatocyte growth factor

はじめに

リンパ浮腫はリンパ管の原因不明な低形成・無形成による原発性リンパ浮腫と寄生虫感染、外科手術や放射線治療などによる二次性リンパ浮腫に分けられる。いずれもリンパ流障害により患肢に高度の腫脹を惹起し、患者の quality of life を著しく障害する難治性疾患である。この疾患に対し根治的治療法の開発が過去 1 世紀以上にわたり試みられているが、残念ながらその解決には至っていない。

1980 年代以降の血管新生に関する分子生物学の発展に伴い、その副産物としてリンパ管新生の新たな知見が報告されるようになってきた。例えば vascular endothelial growth factor (VEGF)-C⁽¹⁻⁴⁾ や fibroblast growth factor (FGF)-2⁽⁵⁾、Angiopoietin (Ang)-1⁽⁶⁾ などリンパ管新生作用が見いだされた。さらにインドシアニンググリーンを用いた赤外光によるリンパ管撮影法はリンパ管研究の画像評価を後押しした⁽⁷⁾。

これらの状況を踏まえわれわれはリンパ浮腫の根治的治療法を開発するために遺伝子治療に着目した。また治療分子として本邦で施行された血管新生療法開発でヒトに応用された実績のある肝細胞増殖因子(hepatocyte

growth factor; HGF)を用いることとした⁽⁸⁾。本研究の目的は HGF によるリンパ管新生作用を細胞レベルで証明し、さらに小動物モデルを使用し HGF 遺伝子治療の効果を確認することである。

方 法

1)細胞培養

リンパ管内皮細胞(LEC)はイヌ胸管より単離し培養細胞系を確立した⁽⁹⁾。培地は 20% FBS 添加 EGM-2 培地で培養し、5~8 継代の細胞を実験に使用した。

2)増殖能、遊走能の検討

増殖能は MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] assay(Promega, Madison, WI)または c-fos promotor の転写因子結合部位下流に Luciferase 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を用いた c-fos promoter assay にて検討した。遊走能は modified Boyden chamber で検討した。

3)免疫学的検討

免疫染色には以下の抗体を使用した。PECAM-1(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), VEGFR-3 (CHEMICON, Temecula, CA), LYVE-1, Podoplanin, Prox1(RESERCH DIAGNOSTICS, INC., Flanders, NJ), c-Met(Santa Cruz Biotechnology, Inc.), AlexaFluor488, AlexaFluor546(Molecular Probes, Eugene, OR)。また Western blot には以下の抗体を使用した。phospho-spe-

¹ 旭川医科大学循環・呼吸・腫瘍病態外科² 大阪大学小児発達学研究科健康発達医学³ 大阪大学臨床遺伝子治療学⁴ 大阪大学遺伝子治療学

2011 年 2 月 28 日受理

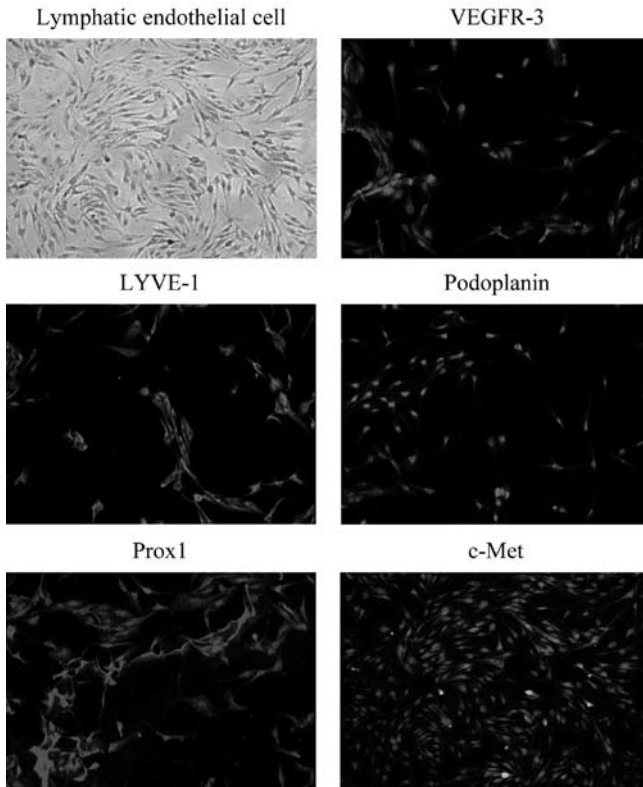


Figure 1 Lymphatic endothelial cell culture.

Representative image of cultured cells obtained from canine thoracic ducts, showing a monolayer with a uniform cobblestone appearance. These cells are positive for the lymphatic endothelial cells markers, VEGFR-3, LYVE-1, Podoplanin, Prox1, and HGF receptor, c-Met ($\times 100$ magnification).

cific, total ERK, phospho-specific, total Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)。

4) ラット動物モデル

すべての動物実験は旭川医科大学動物実験委員会の承認のもと施行された。既報の方法¹⁰⁾でラット尾リンパ浮腫モデルを60匹作成し無作為に6つに群分けした。また胸筋温存乳房切除術に準じた方法で手術を施行し上肢リンパ浮腫モデルを20匹作成し無作為に2つに群分けした。遺伝子の導入は浮腫側筋肉内に naked plasmid を注射した。

5) 統計

統計学的検定はANOVAにて施行し、コントロール群との比較はTukey法を使用し多群間での比較にはDunnnett法を使用した。

結 果

1) リンパ管内皮細胞の培養系確立とリンパ管マーカー発現の検討

雑種成犬胸管より内皮細胞を採取し初代培養細胞系を

確立した。これらの細胞は免疫染色上リンパ管内皮細胞特異マーカーである VEGFR-3, LYVE-1, Podoplanin, Prox1 すべてに對し陽性であった。さらに HGF の受容体である c-Met がリンパ管内皮細胞に発現していることも確認し、この細胞が HGF に反応しうることが示唆された (Fig. 1)。

2) リンパ管内皮細胞の HGF への反応

LEC にヒト recombinant HGF (0, 2, 10, 50 ng/ml) を添加し細胞増殖能 (MTS assay) を検討したところ、濃度依存性に増殖能の増加を認めた (Fig. 2A)。また同様に遊走能の検討 (Boyden chamber assay) を行ったところ、遊走能の増加も濃度依存性に認められた (Fig. 2B) (* $p < 0.05$ vs. HGF 0 ng/ml; † $p < 0.05$ vs. HGF 10 ng/ml)。さらにヒト HGF プラスミド DNA と、c-fos プロモーターの転写因子結合部位下流に Luciferase 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子をリンパ管内皮細胞に共導入して c-fos プロモーター活性を測定したところ、コントロールに比べ有意に増殖能の増加を認めたが、ヒト VEGF-A プラスミド DNA を導入した群では増殖能の増加は認められなかつ

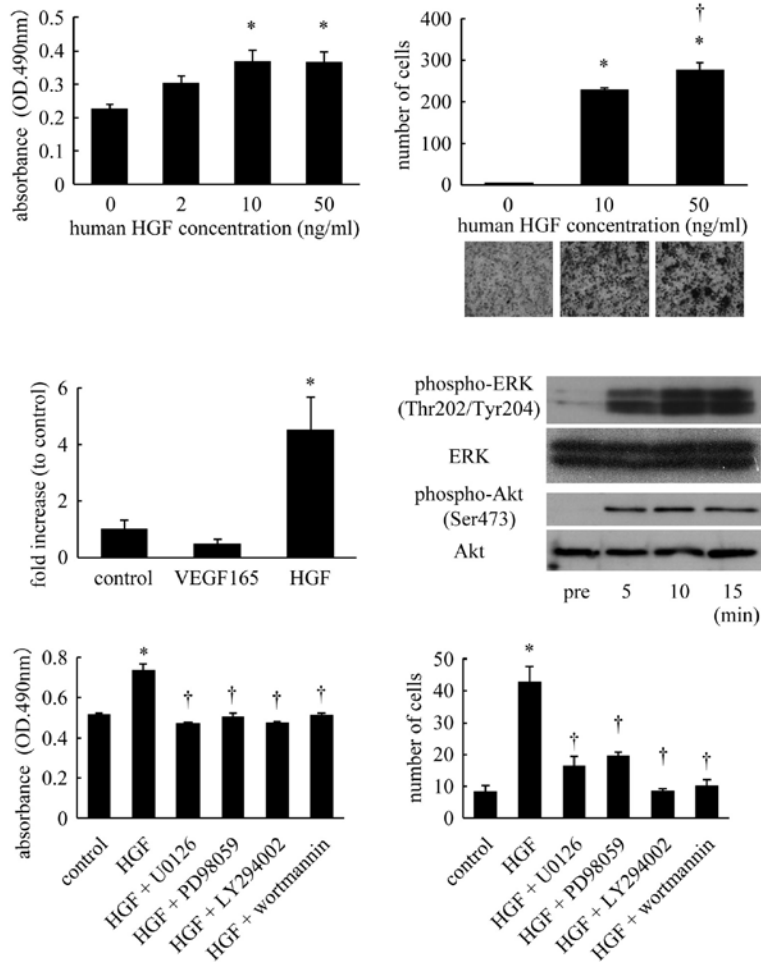


Figure 2 HGF promotes LEC proliferation and migration.

A, B: Effect of recombinant HGF on cLEC, as demonstrated by the MTS and migration assay. * $p < 0.05$ vs. HGF 0 ng/ml; † $p < 0.05$ vs. HGF 10 ng/ml. C: Effect of HGF plasmid on *c-fos* promoter activity in LEC. * $p < 0.05$ vs. control, VEGF165. D: Typical western blot of ERK or Akt and phosphorylated ERK or Akt in cLEC before and 5, 10, and 15 minutes after treatment with human recombinant HGF (50 ng/ml). E, F: Effect of MEK inhibitors, U0126 (50 μ mol/l) or PD98059 (30 μ mol/l), and PI3K inhibitors, LY294002 (50 μ mol/l) or wortmannin (100 nmol/l), in the proliferative or migratory pathway of HGF on cLEC, as demonstrated by the MTS and migration assay. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. HGF.

た(**Fig. 2C**)(* $p < 0.05$ vs. control)。以上の培養細胞による検討から HGF がタンパク、遺伝子のいずれにおいてもリンパ管内皮細胞の増殖・遊走作用を有することが明らかとなった。

3)細胞内シグナルの同定

これまでの報告から HGF-c-Met シグナルでは ERK と Akt のリン酸化が重要であることが知られている¹¹⁾。そ

こで LEC をヒト recombinant HGF(50 ng/ml)で刺激したのち回収し Western blot で解析した。ERK, Akt とともに HGF 刺激により 10 分後をピークとするリン酸化が認められた(**Fig. 2D**)。さらに HGF 刺激前に MEK inhibitor (U0126 と PD98059)あるいは PI3K inhibitor(LY294002 と wortmannin)で処理すると、いずれの inhibitor でも LEC の増殖能、遊走能が阻害されたため(**Fig. 2E**)、ERK,

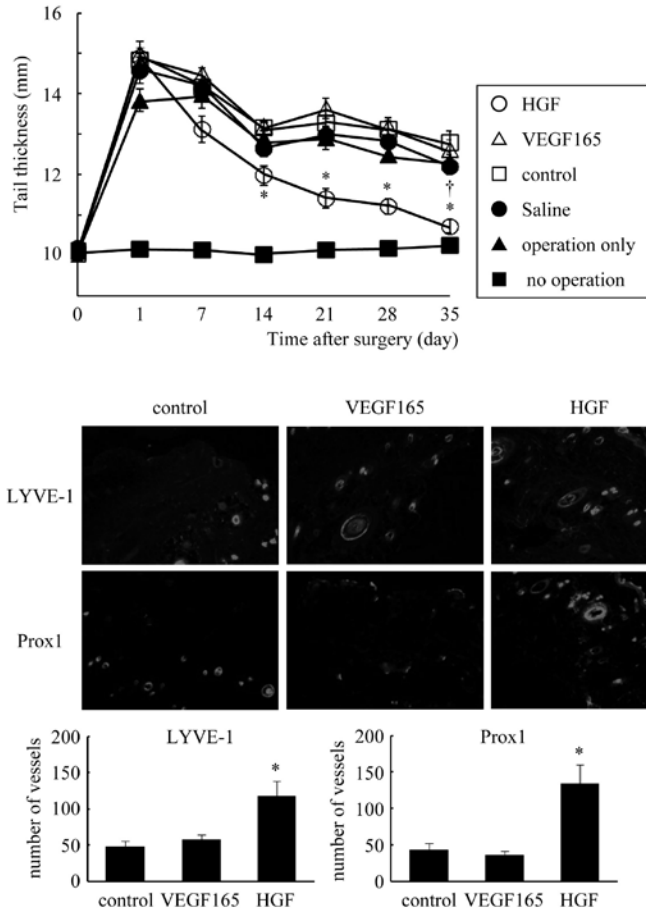


Figure 3 Gene therapy with HGF plasmid in the rat tail lymphedema model.

A: Measurement of tail thickness in each group. "HGF" indicates human HGF plasmid (200 µg/ 0.1 ml), "VEGF165" indicates human VEGF165 plasmid injection (200 µg/ 0.1 ml), "control" indicates GFP plasmid injection (200 µg/ 0.1 ml), "Saline" indicates saline injection (0.1 ml), "operation only" means no injection, and "no operation" indicates no operation. * $p < 0.0001$ vs. VEGF165, control, Saline, operation only; † $p = 0.1449$ (no significance) vs. no operation. B: Immunofluorescent staining of LYVE-1 and Prox1 in the rat tail and quantitative analysis of stained vessels in each group. * $p < 0.01$ vs. VEGF165 and control.

Akt シグナルが LEC 活性化に重要であることが証明された(* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. HGF)。

4) ラット尾モデルでの治療効果

細胞レベルでの実験結果を踏まえ、小動物でリンパ管新生遺伝子治療効果を検討することとした。そこでまずラットの尾のリンパ管を選択的に切除してリンパ浮腫モデルを作製し、naked HGF プラスミド DNA を浮腫側尾筋肉内に導入した。導入した遺伝子は Real Time PCR で発現していることを確認した。各群を比較するとヒト HGF 遺伝子導入群のみが他群に比べ有意に浮腫が改善し、35 日目で非手術群と変わらないまでに改善していた(**Fig. 3A**)(* $p < 0.0001$ vs. VEGF165, control, Saline, operation only; † $p = 0.1449$ (no significance) vs. no operation)。さらにこれらの組織を免疫染色にて検討したところ、リンパ管内皮細胞マーカーである LYVE-1, Prox1 ではヒト HGF 遺伝子導入群で有意に脈管が増加

しており、HGF がリンパ管新生を誘導したことが確認された(**Fig. 3B**)(* $p < 0.05$ vs. VEGF165 and control)。

5) ラット上肢モデルでの治療効果

さらに乳癌術後を想定したラット上肢リンパ浮腫モデルを作成し検討した。尾モデルと同様に HGF 遺伝子導入群では浮腫が有意に改善していた(**Fig. 4A**)(* $p < 0.05$ vs. control)。さらに PDE でリンパ流を観察すると、術後 21 日目の HGF 遺伝子導入群で浮腫側リンパ管が既存のリンパ管に接続しリモデリングされており、前胸壁、腹壁から対側の腋窩リンパ節に流入している像が描出された(**Fig. 4B**)。

考 察

われわれの研究から HGF には血管新生作用に加えリンパ管新生作用があり、この分子を用いたリンパ浮腫遺伝子治療の可能性が示唆された。われわれは HGF プラ

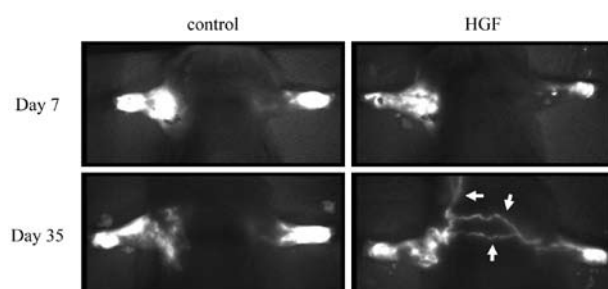
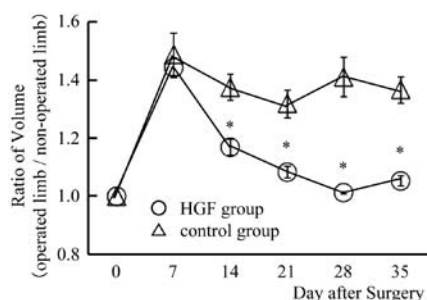


Figure 4 Gene therapy with HGF plasmid in rat axillary lymph node-excised model.
 A: Measurement of limb volume in each group. * $p < 0.05$ vs. control. B: Serial lymphangiography by PDE system revealed progressive extension of neo-lymphvascularization (arrows) in HGF-treated animals.

スミド DNA を用いた本邦における血管新生治療の治験 (TREAT HGF) に参加した⁸⁾。この経験から HGF 遺伝子治療がリンパ浮腫治療に向いている以下の理由に思い至った。1) リンパ浮腫は主に四肢に発生するため体表からアプローチでき、遺伝子導入が容易である。2) リンパ浮腫病変部は正常部と境界が比較的明瞭であり、遺伝子導入部位の特定が容易である。3) VEGF 遺伝子を導入すると血管透過性の亢進から浮腫が高率に発生するが¹²⁾、HGF 遺伝子導入では成熟した血管が誘導されることからこのような浮腫は起こらず、まさにリンパ浮腫の治療用分子としては向いている。4) VEGF 遺伝子導入では血中の VEGF タンパク濃度の上昇を認め、悪性腫瘍の増悪など全身に対する安全性が問題となるが、HGF 遺伝子導入では局所のタンパク濃度上昇は認めるが血中のタンパク濃度上昇は認めず¹³⁾、全身に対する安全性は比較的高いと考えられる。ただし安全性に関しては今後とも十分な検討が必要と考えている。

近年、顕微鏡下で施行されるリンパ管細静脈吻合術の報告が多数あるが、この術式ではリンパ管壁にすでに肥厚をきたしリンパ管機能が破綻した進行例に対してはドレーナージルートを確保する理学療法への補助的な意義しか見いだせない。もちろんリンパ管機能が温存されている症例に対しては極めて有効な術式となることが期待

されるが、現状では多くの患者が進行例である。このような症例に対しては多くの治療を集学的に施す必要があると考えるが、基本的にリンパ管機能の再生が重要なテーマであり、遺伝子治療、再生医療といった先端医療が果たす役割が益々増大していくものと考えている。

結 語

HGF のリンパ管新生作用およびラットを用いたリンパ浮腫モデルでの遺伝子治療効果を証明した。今後の臨床応用が期待される。

文 献

- 1) Jussila L, Alitalo K: Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002; **82**: 673–700
- 2) Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; **5**: 74–80
- 3) Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, et al: Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001; **7**: 199–205
- 4) Yoon YS, Murayama T, Gravereaux E, et al: VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates

- rates secondary lymphedema. *J Clin Invest* 2003; **111**: 717–725
- 5) Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F, et al: Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 11658–11663
 - 6) Morisada T, Oike Y, Yamada Y, et al: Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood* 2005; **105**: 4649–4656
 - 7) Unno N, Inuzuka K, Suzuki M, et al: Preliminary experience with a novel fluorescence lymphography using indocyanine green in patients with secondary lymphedema. *J Vasc Surg* 2007; **45**: 1016–1021
 - 8) Shigematsu H, Yasuda K, Iwai T, et al: Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene Ther* 2010; **17**: 1152–1161
 - 9) Tan Y: Basic fibroblast growth factor-mediated lymphangiogenesis of lymphatic endothelial cells isolated from dog thoracic ducts: effects of heparin. *Jpn J Physiol* 1998; **48**: 133–141
 - 10) Slavin SA, Van den Abbeele AD, Losken A, et al: Return of lymphatic function after flap transfer for acute lymphedema. *Ann Surg* 1999; **229**: 421–427
 - 11) Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, et al: Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and AKT in endothelial cells. *Hypertension* 2001; **37**: 581–586
 - 12) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; **348**: 370–374
 - 13) Matsuki A, Yamamoto S, Nakagami H, et al: No influence of tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic angiogenesis gene therapy in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **315**: 59–65

Therapeutic Lymphangiogenesis for Lymphedema by Gene Therapy of Hepatocyte Growth Factor Plasmid DNA

Yukihiro Saito,¹ Hironori Nakagami,² Nobuyoshi Azuma,¹ Ryuichi Morishita,³ Yasufumi Kaneda,⁴ and Tadahiro Sasajima¹

¹Asahikawa Medical University, Asahikawa, Hokkaido, Japan

²Division of Vascular Medicine and Epigenetics, United Graduate School of Child Development, Osaka University, Osaka, Japan

³Division of Clinical Gene Therapy, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

⁴Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

Key words: lymphedema, gene therapy, hepatocyte growth factor

Treatment for lymphedema remains limited and largely ineffective. The goal of the present study was to investigate the therapeutic efficacy of hepatocyte growth factor (HGF) in animal models with lymphedema. Immunofluorescent analysis of lymphatic endothelial cell (LEC) was positive for lymphatic specific markers and the HGF receptor. The treatment of LEC with human recombinant HGF resulted in a dose-dependent increase in cell growth and migration. Weekly HGF gene transfer in a rat tail lymphedema model by disruption of lymphatic vessels resulted in a decrease in thickness of the lymphedema. In addition, HGF plasmid DNA was transferred into an axillary lymph node-excised rat model. The volume of lymphedema was significantly decreased in the HGF group. Serial lymphangiography by the PDE system revealed progressive extension of neo-lymphvascularization in HGF-treated animals. This data demonstrates that the expression of HGF via plasmid transfer improves lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. Further study to determine the clinical utility of this approach would be of benefit to patients with lymphedema. (J Jpn Coll Angiol, 2011, **51**: 447–452)