

循環器疾患における分子治療の可能性

長嶋浩貴*, 川名正敏*, 笠貫 宏*

はじめに

疾患における病態を考えると、その疾患が存在する臓器の機能不全としてとらえることができる。さらに臓器の機能不全はその臓器を構成する細胞の機能不全と考えることもできる。最近の分子生物学、分子医学の進歩による知識、技術の集積により、細胞機能不全の分子レベルでのメカニズムがしだいに明らかになってきた。分子治療は、疾患の治療をする際に、その分子レベルでのメカニズムに何らかの手を加えることにより、より病態の本質に即した治療を行おうというものである。遺伝子を操作することによって治療に応用しようとする遺伝子治療はその典型である。循環器疾患においては、心臓、血管の構成細胞である心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の機能不全を遺伝子レベル、分子レベルで治療するということになるであろう。

循環器疾患における分子治療の対象となり得る疾患は、狭心症、心筋梗塞といった虚血性心疾患、拡張型、および肥大型心筋症、さらにそういった基礎心疾患による心不全などが考えられる。このような疾患に対して、どのような分子をターゲットに治療戦略をたてるかがポイントとなる。現在まで様々な分子をターゲットに研究が進んでいる(表1)。しかし、どのような疾患が対象になろうと、どのような分子がターゲットになろうと、分子治療を行う際には、よく考えなければならない原則がいくつかあるように思われる(表2)。こうした原則を考慮した上で、何を投与するか、どのような形で投与するか、どのような方法で投与するかを考えることもまた重要な課題である。

表1 循環器疾患における分子治療の標的分子

Target Molecule
Angiogenesis-related protein
Transcription factor
Cell cycle protein
Apoptosis-related protein
Oncoprotein/Tumor suppressor protein
Others

表2 循環器疾患における分子治療の原則

Molecular therapy
Safety
Efficiency
Specificity
Regulation

このように、これから考えなければならない課題や解決しなければならない問題はあつたものの、遺伝子治療を含めた分子治療は循環器領域においても非常に魅力的な選択のひとつになり得る可能性がある。今回はその中でも特に興味深い、血管新生と心筋新生・再生という2つのテーマに絞って、最近の基礎・臨床の研究の進歩と将来の可能性について解説したい。

血管新生

血管新生は、正常の生物学的過程だけでなく、癌、創傷治癒、動脈硬化、そして虚血といった様々な病態において重要な役割を果たしている。血管新生療法は、虚血部位に対する血管新生を促し血流を増大させることにより虚血を緩和することを目的にした治療として注目されている。

Tsurumi Yらは、外腸骨動脈を結紮して下肢閉塞性動脈硬化症のモデル動物を作製し、側副血行

*東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所内科

路である内腸骨動脈に、筋肉内注射かあるいは Hydrogel-coated balloon catheter を用いて vascular endothelial growth factor (VEGF) の遺伝子を導入した。その結果、VEGF 導入動物では、対照群と比較して有意に側副血行路の形成が増幅されていた¹⁾。VEGF 療法は米国ではすでにヒトに対しても行われており、下肢切断以外に他に治療法の選択がないような重症の下肢閉塞性動脈硬化症患者に対する治療法として選択肢のひとつになりつつある。さらに当然の流れで、VEGF 導入療法は冠動脈疾患への応用も試みられている。Vale らは、重度の身体的機能低下や生活障害があるために通常の PTCA や CABG などの治療適応外の狭心症患者 16 名に対し、胸部小切開から直接心筋内に VEGF 遺伝子を注入し、その後 90 日間経過観察した。すると予想通り、ほとんどの症例で狭心症は改善し使用薬物も減少した。症例数が少ないことや対照群との比較が困難であるなど、この臨床研究の問題点はあるものの虚血性心疾患に対する新たな治療法として期待される。その他、PTCA や CABG と併用する形での VEGF 導入も試みられている。

ここでひとつだけ指摘しておきたいことは、下肢閉塞性動脈硬化症の場合も狭心症の場合も投与方法は異なるものの、投与したのは naked plasmid DNA であり、それによって十分な効果が得られたという点である。β-gal 遺伝子を前述と同様の Hydrogel-coated balloon catheter を用いて導入した場合、X-gal による染色で評価すると導入効率が非常に低く、そのために、いかに導入効率を上げるかが大きな問題とされており、ウィルスベクターをはじめとするベクター開発はまさにそのために行われている。しかし、β-gal 蛋白に対する抗体で染色してみると、意外にも、かなりの細胞が陽性になり、遺伝子導入効率はそれほど悪くないのである。この結果は、naked plasmid DNA の投与で十分な臨床効果が出たとする研究結果と非常によく合う。副作用をできるかぎり少なくすることは言うまでもなく、臨床の場で患者に投与するときには十分検討する必要がある問題であると思われる。

心筋新生・再生

心不全の究極の治療は、取り替えるか、作り直

すかである。取り替えるのは心臓移植であり、作り替えるのが心筋の新生・再生である。たとえば、心筋梗塞後の低心機能に基づく心不全は、梗塞をおこした心筋細胞が生き返らず、残された心筋細胞が増殖しないためにおこるものである。もし、皮膚細胞や肝細胞のように新生・再生が可能であれば、低心機能による心不全は完全に治癒する疾患になるかもしれない。心筋細胞の新生・再生は、何かを材料にして心筋細胞を作るというものと、心筋細胞を分裂させるというもののふたつに大別して考えることができる。

心筋細胞を作る

1987年、Robert L. Davis らは、各種の線維芽細胞にある単一の遺伝子を導入すると、骨格筋細胞に形質転換するような遺伝子を見いだした。すなわち、骨格筋細胞を骨格筋細胞たらしめる Myo D 遺伝子の発見である²⁾。この遺伝子の発見は、非常に衝撃的なものであった。なぜならば、Myo D の存在は、それに相当するような各臓器特異的な遺伝子の存在を示唆したからである。循環器領域でも、Myo D に相当するような心筋細胞特異的な遺伝子の同定に関する研究が進んだ。その候補として、現在まで、心臓の発生に非常に重要であると考えられるいくつかの転写因子遺伝子が発見されているが(図1)、Myo D のように単一遺伝子で線維芽細胞から心筋細胞への形質転換を可能にする遺伝子はいまだに同定されていない。

その他、未分化な心筋細胞の前駆細胞を見つけて、それを心筋細胞に分化させようという試みも盛んになされている。心筋細胞の前駆細胞として機能する可能性がある細胞として、骨髄細胞や

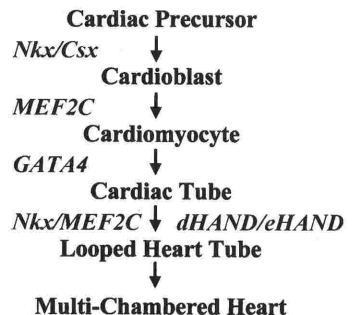


図1 心臓の発生と転写因子

ES (Embryonic stem) cell (胎生幹細胞) などが考えられている。Ferrari G らは、骨髄細胞由来の骨格筋前駆細胞が完全に骨格筋細胞に分化することを示した³⁾。また、Thomson JA らは、ヒトの ES 細胞の株化に成功した⁴⁾。ES 細胞は、いかなる細胞にも分化する能力を持っているわけであるから、この細胞株を用いれば、いかなる臓器のいかなる細胞も作り出せることになる。さしずめ、臓器牧場である。ごく最近の研究によれば、マウス心筋細胞の前駆細胞の単離に成功したという。もしも、これが臨床的に応用可能な程度にまで発展させられれば、心筋梗塞、心筋症、心不全などの循環器疾患の臨床への応用範囲は非常に広い。問題は、こうした細胞が、一個の心臓の中で、心筋細胞としての機能を発揮できるかどうかである。つまり、正常に電氣的興奮をして正常に収縮するか、また周囲の心筋細胞とジャンクションを形成し、シンクロナイズするかということである。さらに、マウスとヒトの間にはまだ大きな壁がある。こうした問題が解決され、前述の血管新生療法とも組み合わせれば、将来非常に期待される治療法であるといえる。

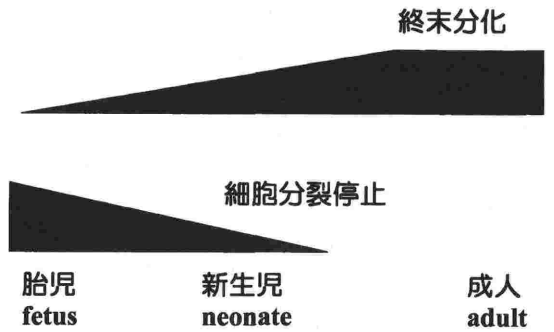


図2 心筋細胞の分化と細胞分裂

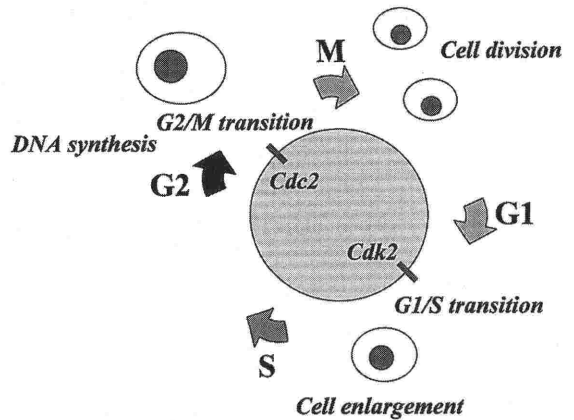


図3 細胞周期

心筋細胞を分裂させる

心筋細胞は、胎児期は細胞分裂しているが、生まれてまもなく終末分化の状態になってしまい、成人の心筋細胞はもう二度と分裂、増殖することはないと信じられている (図2)。果たして本当にそうなのであろうか。最近、心筋細胞が本当に終末分化しているかどうか議論になっている。以前から動物の心筋細胞が分裂していることは知られていたが、Kajstura J らは、ヒト心筋細胞の分裂像を示し、さらに、心臓移植を受けた重症心不全患者の心臓では、正常心で見られる分裂像よりはるかに多数の心筋細胞が細胞分裂して増殖しており、代償機転として細胞周期が働いている可能性を示唆した⁵⁾。

そこで、細胞周期機構の制御にとって非常に重要な役割を果たすと考えられるふたつのリン酸化酵素、Cdk2 と Cdc2 について (図3)、それぞれのトランスジェニックマウスを作製し、心臓の形態を評価した。ベクターは、アルファミオシン重鎖のプロモーターを用い、その下に Cdk2 と Cdc2 の遺伝子を組み込むことにより、心筋細胞

にのみこれらが発現するようなトランスジェニックマウスを作製した。Cdk2 は、G1/S 期の移行を制御する蛋白であると考えられており、Cdc2 は、G2/M 期の移行を制御する蛋白であると考えられている。ただし、Cdc2 は、酵母においては、G2/M のみならず G1/S をも制御しているため、Cdc2 トランスジェニックマウスの心筋細胞が G1/S、G2/M ともに越えて細胞周期が回り、再び細胞分裂するのではないかと考えた。ところが、実際には、Cdk2 トランスジェニックマウスの心臓は心肥大をおこし心不全で死亡するが、Cdc2 トランスジェニックマウスは正常に発育し、心臓も正常であった。

Cdk2 と Cdc2 のトランスジェニックマウスの差はなぜ生じるのか。これを明らかにするために、PCR, Northern blot, Western blot で DNA, RNA,

蛋白の発現を検討した。すると興味深いことに、Cdk2 トランスジェニックマウスの心臓では、DNA、RNA、蛋白いずれも発現が確認されたが、Cdc2 トランスジェニックマウスでは、DNA、RNA は発現しているが、蛋白は全く検出できなかった (図4)。一方、Cdc2 遺伝子を導入した線維芽細胞では、蛋白は検出された (図5)。つまり、Cdc2 遺伝子を導入したときに、線維芽細胞では検出できる蛋白が心筋細胞では検出できないのである。心筋細胞においては、Cdc2 遺伝子に関して、何らかの転写後の制御機構が存在することが考えられた。今までいくつかのトランスジェニックマウスで心筋細胞の細胞周期をまわそうという試みが G2/M 期の移行で失敗している原因は

ここにあるのかもしれない⁶⁾。この制御機構の詳細は不明であるが、これを明らかにし、その壁を越えることができれば、心筋細胞を再び分裂させることも夢ではなくなる可能性がある。

おわりに

はじめて ADA 欠損症に対して遺伝子治療が行われて以来、多くの臨床試験がなされてきた結果、遺伝子治療が当初予想されていたほどにはすばらしいものではない現実が明らかになってきた。それをふまえて、NIH は基礎研究をもっと充実すべきであるという見解を発表した。しかし、逆に、動物実験で有効であったものがヒトでは全く効果がないということが多いのも事実であり、「ヒトは大型のマウスではない」ことは広く認識されている。そのため、臨床試験をもっと積極的に行うべきであるという声もある。

遺伝子治療はさまざまな問題を包含しているが、なお非常に魅力的な治療法であることは間違いない。特に循環器疾患においては、血管新生にしても、心筋新生・再生にしても、今まさに夜明け前の感があり、これからが非常に期待される場所である。しかし、これは循環器領域に限らないことであるが、基礎研究と実際の臨床の現場との距離はかなりあると言わざるを得ない。今後は、From Bench To Bedside と From Bedside To Bench を両輪にして、基礎にたずさわる者は臨床上での意味を考え、臨床にたずさわる者はその機序を基礎的な視点でとらえ、お互いに相補していく努力が必要であると思われる。

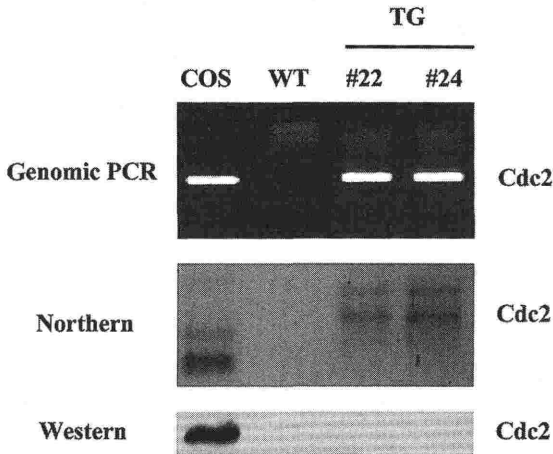


図4 Cdc2トランスジェニックマウスにおける蛋白発現

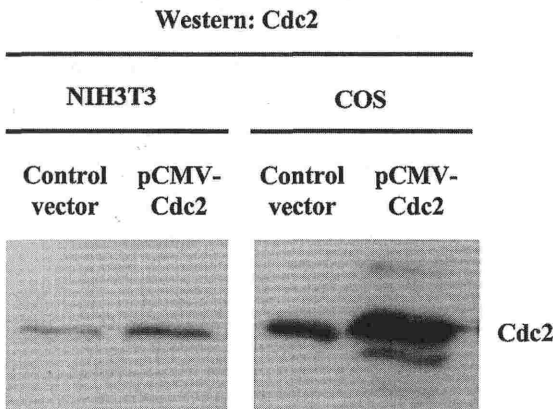


図5 Cdc2遺伝子導入による蛋白発現

文 献

- 1) Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, et al : Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation* 96 (9 Suppl): II-382-388
- 2) Robert L. Davis, Harold Weintraub, Andrew B. Lassar : Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51 : 987-1000, 1987
- 3) Ferrari G, Cussela-De Angelis G, Coletta M, et al : Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279 (5356):1528-1530, 1998
- 4) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391) : 1145-1147, 1998
- 5) Kajstura J, Leri A, Finato N, et al : Myocyte proliferation in end-staged cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (15) : 8801-8805, 1998