

総説

動き出した循環器疾患の遺伝子治療

青木元邦*, 森下竜一**, 荻原俊男*

はじめに

当初先天性疾患の治療として始まった遺伝子治療は、現在、癌をはじめ各種疾患を対象とできるものになった。遺伝子治療は遺伝子欠損症に対する遺伝子補充療法である第一世代から、多因子疾患に対する第二世代に確実に広がってきているのである。循環器疾患もその対象に含まれ、慢性動脈閉塞症 (ASO) や狭心症の遺伝子治療は既にアメリカで開始されている (図1)。そしてその効果は予想以上であった。循環器領域における遺伝子治療は、実験的な状態から確実に現実の医療の場へ歩を進めているのである。

バルーン傷害後再狭窄に対する遺伝子治療

バルーン傷害後再狭窄に対する治療法を開発する上で、再狭窄の病態の理解は必須である。その病態として、1) 傷害による易血栓性の増加による血栓形成、2) 平滑筋細胞増殖による新生内膜形成、及び、3) 内皮機能障害を含むリモデリングの悪化、などが主な機序とされている。図2に

示すようにこのそれぞれに対して遺伝子治療ストラテジーが考案されている。

a) 血管平滑筋細胞増殖抑制療法

血管平滑筋細胞増殖抑制療法としては、1) 平滑筋細胞を”自殺させる”自殺療法、2) 細胞周期進展を抑制する細胞周期調節療法、3) 細胞内シグナル遮断療法、などがある (図2)。自殺療法として、癌に対する遺伝子治療に使用されるチミジンキナーゼ遺伝子導入によるブタバルーン傷害モデルでの成功が報告されている²⁾。著者らは、細胞周期調節遺伝子群の発現に必須であるプロモーター領域の転写調節因子 E2F 結合配列に対するおとり型二重鎖核酸化合物 (デコイ) を導入し、バルーン傷害により誘導される PCNA 及び cdc2 キナーゼの遺伝子発現を阻害 (図3)、血管内膜新生が抑制できる事が報告した¹⁾。既に著者らは E2F デコイを用いた PTA, PTCA 後再狭窄予防が申請しており (Japan Trial to Prevent Restenosis after Angioplasty using ODN transfer of E2F decoy as Gene Therapy = J-PLANET)、今春にも1例目を実施予定である。申請に先駆けて行ったブ

ASO	VEGF	plasmid+hydrogel adenovirus
Restenosis	VEGF	plasmid+hydrogel adenovirus
	c-myc antisense	catheter adenovirus
	TK with GK	adenovirus
Graft Failure	E2F decoy	Intra-operation
Myocardial Infarction	VEGF	plasmid+hydrogel adenovirus
Angina	FGF-4	adenovirus

図1 FDAで認可された第2世代遺伝子治療のストラテジー

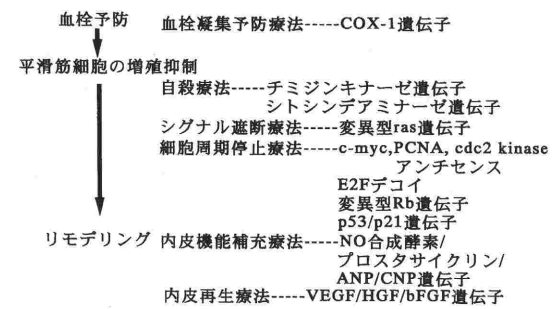


図2 再狭窄に対する遺伝子治療ストラテジー

*大阪大学大学院医学系研究科加齢医学講座
**大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学講座

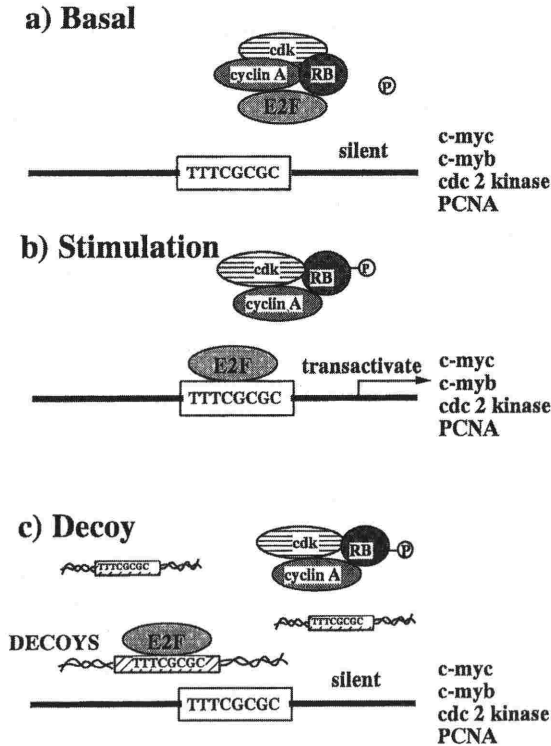


図3 E2F デコイによる血管平滑筋細胞増殖抑制の機序
 静止期において E2F 蛋白は Rb 蛋白などにトラップされているが、血清刺激あるいは増殖因子による刺激が加わると、Rb の不活性化に伴いリリースされ、DNA 上の E2F 結合部位に結合。下流にある細胞周期調節遺伝子群が活性化され、細胞周期が進展、細胞増殖が始まる。結合部位と同じ配列を持つデコイ（二重鎖核酸医薬）をおとりとして導入しておくことにより、この部位への結合を阻害し、細胞増殖を抑制しうる。

タバールン障害モデルにおいて、hydrogel balloon catheter による naked-oligo の投与は、再狭窄を有意に抑制した。一方、Dr. Dzau らは、E2F デコイの有効性をグラフトモデルにおいて確認し、E2F デコイの臨床試験の許可を1996年10月 FDA より得た。現在、2000例（E2F デコイ；800例、コントロールオリゴ；400例、未治療；800例）のダブルブラインド・ランダムライズドの臨床試験が開始され、現在40名程度が終了している。患者の静脈グラフトへの ex vivo でのデコイの投与は約75%のグラフト閉塞率を約25%にまで改善し、E2F デコイの有効性が確認されている（図4）。ただオリゴの効果あるいは遺伝発現は限られたもので

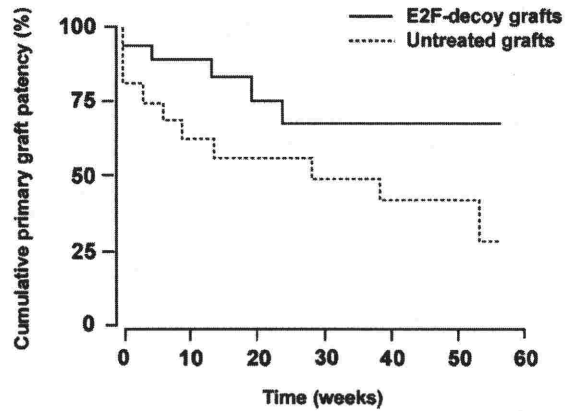


図4 グラフトへの E2F デコイ導入によるグラフト不全の予防 (Mann MJ et al, Lancet; 1999)

あり、長期予後が今後の課題となりうる。

b) 再狭窄に対するリモデリング改善療法

再狭窄の最初のイベントが、内皮細胞の変性及び脱落による動脈硬化の進展であることを考え、リモデリングに注目した遺伝子治療が提唱されている（図2）。即ち、再狭窄部位では内皮細胞変性により血小板の付着が起こりやすく、積極的な内皮修復が臨床的に望ましい。また、内皮より平滑筋細胞増殖に対し抑制的に働く物質が放出されており、内皮修復促進は平滑筋細胞増殖抑制の面からもより積極的な治療効果も期待される。そこで、新しい再狭窄抑制法としてリモデリングに注目し、平滑筋細胞に影響を与えず、内皮細胞のみを特異的に増殖する内皮特異的増殖因子の遺伝子導入による内皮再生療法が注目された。内皮特異的増殖因子として VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) が報告されており、その臨床応用は既に海外では始まっている²⁾。

一方著者らは、HGF (Hepatocyte Growth Factor) の内皮選択的増殖作用に注目して、大阪大学中村教授との共同研究により、ヒト HGF 遺伝子の導入による内皮細胞増殖による遺伝子治療の基礎的検討を行った³⁾。当初、肝細胞増殖因子としてクローニングされた HGF には強力な内皮細胞増殖作用があることが明らかになった。他の内皮細胞増殖因子 VEGF, b-FGF などに比し強い増殖作用を呈し、したがって、HGF は VEGF 同様血管新生作用があることが予想された。HGF はまた内

皮細胞特異的な増殖因子であり b-FGF とは異なり平滑筋細胞は増殖させないので、VEGF 同様その臨床応用が期待される。

また、HGF は強力な内皮細胞増殖因子であると同時に内皮細胞保護因子でもある。培養血管内皮細胞を低酸素状態におくと内皮細胞死が生じるが、この細胞死は HGF 蛋白添加により濃度依存性に防ぐことができる。同様の効果は他の内皮細胞増殖因子である VEGF でも見られるが、VEGF がこのような内皮細胞障害時に発現が上昇すると対照的に HGF はその発現が低下している。VEGF は HRE (Hypoxia Responsible Element) を転写部位にもつためその発現が上昇するが、HGF は低酸素刺激による c-AMP の発現低下あるいは TGF- β の発現上昇により発現が低下すると考えられる (図 5)。実際、HGF がその転写部位に c-AMP Responsible Element, TGF- β Inhibitory Element をもつことは既に知られている。このような細胞死抑制は HGF の抗アポトーシス作用によると考えられ、著者らは HGF によるアポトーシス抑制因子 bcl-2 の発現上昇がそのメカニズムのひとつと予想している。また、この効果は高血糖状態においても認められる。高血糖 (High Glucose) 状態では HGF は発現が低下しているが、そこに HGF を補充することにより内皮細胞死を

防ぐことができる^{4,5)}。すなわち、高血圧、糖尿病、虚血性疾患など血管内皮細胞機能に異常が起こる疾患においては障害組織において HGF が低下していることが予想され、その低下がますます内皮細胞の修復、機能改善の遅延を加速させる病態が考えられる。したがって、これらの疾患において HGF を補うことは非常に生理的に血管における内皮再生、虚血に対する側副血行路の発達を促進すると考えられ、VEGF が追加療法であるのに対し、HGF は補充療法であると言える。ラットのバルーン障害血管を用いて検討したところ、障害 2 週間後の対照群では組織 HGF 濃度の低下とともに、血管平滑筋細胞増殖である著明な新生内膜肥厚がみられた。しかし、ヒト HGF 遺伝子を血管壁に導入することによりこの肥厚は抑制された。さらに、内皮が再生された血管が、果たして正常な血管と同じような反応を示すかということが疑問であるので、アセチルコリンによる血管拡張能を検討した。対照群に比べて、HGF 遺伝子導群では、アセチルコリンによって拡張能を示した。アセチルコリンによる血管拡張は、NO の阻害薬である L-NAME 投与により消失する。また、内皮再生された血管では、血管壁の NO が増えており、再生された内皮が NO を産生していることが確認された。このように、HGF を用いた血管障害の遺伝子治療は非常に有用であると考えられた。

また、内皮型一酸化窒素合成酵素の遺伝子導入による療法も考案された。これは、内皮より通常放出される一酸化窒素 (NO) が血管拡張能と cGMP カスケード活性化による平滑筋細胞増殖抑制作用を持つことに注目した戦略である。事実、内皮型一酸化窒素合成酵素の遺伝子導入は、バルーン障害後血管内膜新生の抑制と、血管の弛緩性の回復を引き起こすことが報告されており⁶⁾、NO がコレステロール付着抑制や血栓付着を抑制することから、血栓症に対しても治療効果が期待されている。一方、国立循環器病センターの田辺らは、内皮より分泌され、平滑筋細胞増殖抑制作用と血栓形成阻害作用を示すプロスタグランジン (PG) I₂ に注目した。PGI₂ 合成の律速段階である PGI₂ 合成酵素遺伝子の平滑筋細胞への導入を検討し、増殖抑制が見られることを明らかにした⁷⁾。更に、血管拡張反応と血栓形成にも

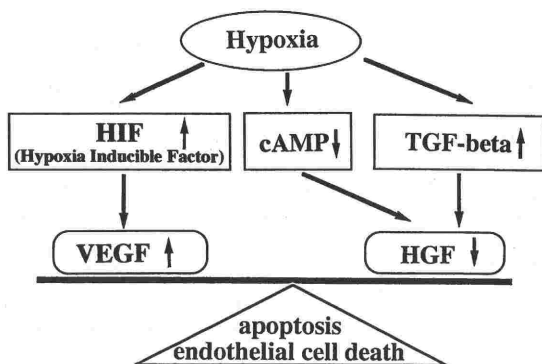


図 5 HGF 制御機構

虚血、低酸素刺激は TGF- β 、Angiotensin II の発現上昇あるいは c-AMP の減少を介して HGF を抑制する。VEGF が HIF を介して低酸素時に発現が減少するのは対照的である。また、c-AMP、PGI₂などは HGF の産生を促進する。また HGF 自体が HGF の stimulator でもある。

効果があるものと期待される。

虚血再灌流障害の遺伝子治療

冠動脈を狭窄すると当然血流の遮断が引き起こす酸素欠乏により下流の心筋細胞は死に至る。血流を再開してやれば、酸素欠乏が改善し心筋細胞死が防げるが、実際には心筋梗塞サイズは変化しない。これが、虚血再灌流障害と呼ばれる現象である。その病態は未だすべてが明らかにされているわけではないが、酸素が再開されることがむしろ心筋梗塞を促進していることより、酸化ストレスの関与が示唆されている。遺伝子治療のターゲットとして転写因子 NFκB が注目されている。虚血再灌流モデルは虚血及びそれに引き続く血流再開がトリガーになることより、転写因子の活性化がこの一連のプロセスを促進していると考えられる。心筋梗塞モデルにおける各種サイトカインや接着因子の発現亢進が報告されているが、これらサイトカインや接着因子はそのプロモーター領域に転写因子 NFκB 結合部位をもつ。実際、心筋梗塞モデルにおいて NFκB 活性の上昇が報告されている。NFκB デコイを左冠動脈閉塞によるラット再灌流障害モデルに投与し、冠動脈結紮前の投与によって、梗塞サイズは約35%から25%に減少したことが報告されている。さらに、NFκB デコイの冠動脈結紮後の投与でも同様に梗塞サイズも減少が認められ、心筋梗塞の遺伝子治療のターゲットとして NFκB 制御が有用であることが示唆されている⁸⁾。

血管新生療法

約20年前、Folkman らにより血管新生関連因子による治療の可能性が提唱され⁹⁾、さらに近年の分子生物学の進歩は血管新生のメカニズムをかなり解明した。血管新生にはプロテアーゼによる基底膜や間質のマトリックスの消化、血管内皮細胞の遊走、増殖、さらに内皮細胞間の再接着と管腔形成というステップが必要であるが、その中でも内皮細胞の増殖にかかわる因子は極めて重要な役割を果たしており、血管新生療法における主役である。種々の増殖因子が実際に生体内の血管新生惹起時にどの程度の割合で関与しているかは定かではないが、内皮細胞増殖作用の程度などから、VEGF、HGF が主として検討されている。これら

の recombinant protein を用いた治療の可能性、さらに遺伝子導入の技術の向上とあいまって局所への遺伝子導入による治療の可能性が検討されてきた。既に米国では VEGF を用いた慢性閉塞性動脈硬化症に対する遺伝子治療が始まっており効果をあげている。血管新生療法は循環器領域において明らかに新しい大きな治療方法の一つになりつつある。

著者らは上述の HGF に注目し、ラットの下肢虚血モデル（大腿動脈結紮モデル）を作成、下肢筋肉への HGF 遺伝子導入による血管新生作用を検討した。下肢虚血部位での組織 HGF 濃度は減少しており、再狭窄病変と同様、HGF の遺伝子導入による補充は生理的であると考えられた。HGF の過剰発現は血管新生を引き起こし、Laser Doppler Image において著明な血流改善を認めた（図6）。実際ヒト閉塞性動脈硬化症の病変部位などの内皮細胞障害組織では HGF 濃度は低下しており、HGF の遺伝子導入による補充療法は VEGF 同様 ASO に対する遺伝子治療の有用なターゲットになりうるのである。既に著者らは HGF を用いた慢性動脈閉塞症あるいはパージャーカー病に対する遺伝子治療を申請しており（TREAT-HGF=Japan Trial to Treat Peripheral Arterial Disease by Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer）、その効果が期待される。

HGF の血管新生作用は狭心症に対しても有用である。ラット冠動脈結紮モデルにおいて、局所 HGF 濃度は低下しているが、HGF 遺伝子導入による補充は著明な血管新生を誘導する。対照群では血管内皮細胞で DNA 増殖はほとんど起こっていないが、HGF 遺伝子導入群では、血管内皮細胞に一致して、PCNA で染色される細胞が確認される。HGF 遺伝子導入によって PCNA で染色される内皮細胞数は約8倍に増加する。新生血管は、非常に小さい microvascular から、microvascular が融合した結果ででき上がってくる中小血管も確認される。10 μm 以下の小さい血管で6倍から7倍、10 μm 以上の中小サイズ以上の血管で2倍から3倍増加する。

虚血性疾患に対する遺伝子治療の実際

Tufs 大学の Isner らは、VEGF を用いた血管新

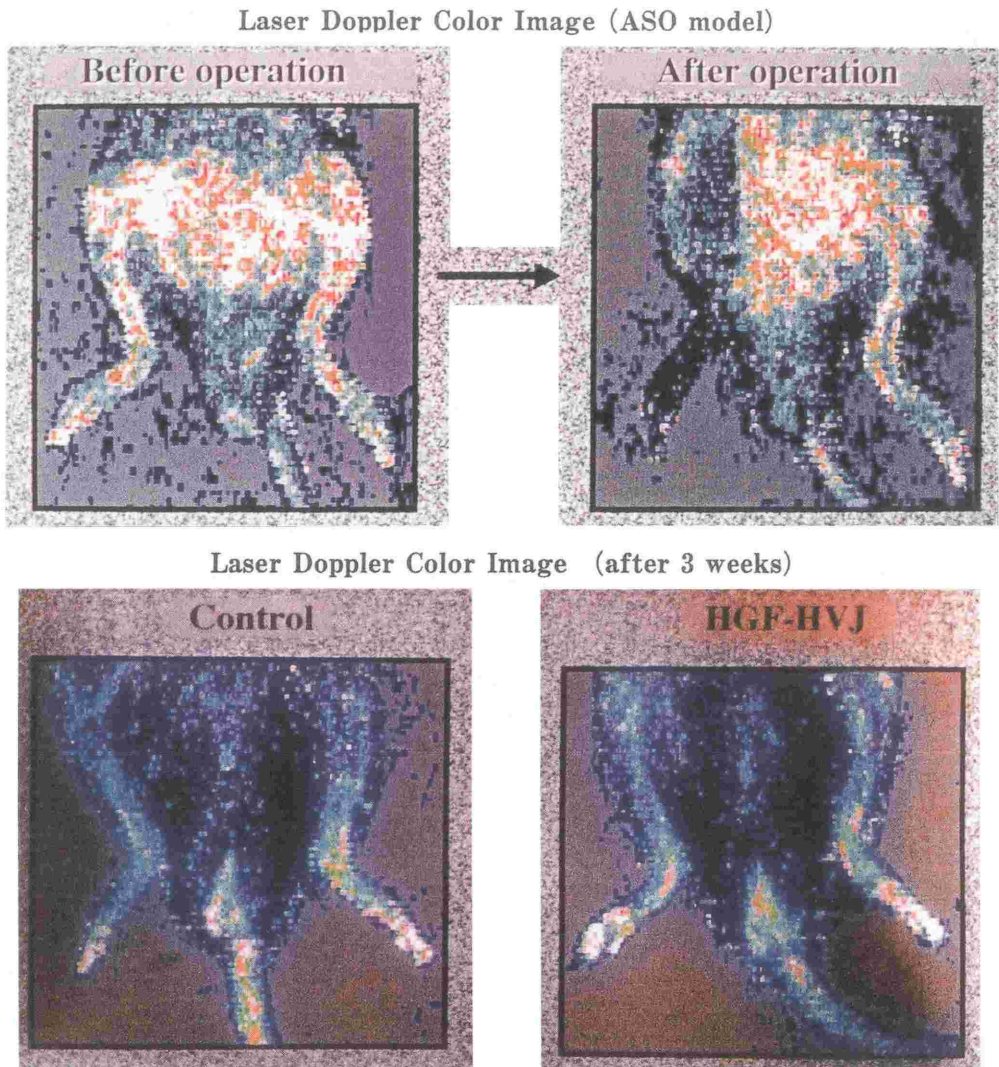


図6 ラット大腿動脈結紮モデルにて血流改善効果

Laser Doppler image は皮下1mmも血流を検出し、色調で画像化する。上段に示すように、大腿動脈結紮モデルでは患肢の著明な血流低下が見られる（暗い色調が血流の低下を示し、明るい色調は血流の多い部分である）。遺伝子を投与していないコントロール群においても側副血行路の発達による血流の改善が認められるが、HGF 遺伝子をこのモデルの患肢筋肉に注射すると導入後2週間後局所 HGF 濃度の上昇に伴い、さらに患肢末梢の血流は増加する。

生療法による ASO、狭心症の遺伝子治療を既に始めている^{10,11)}。このアプローチの有利な点は分泌蛋白を産生する遺伝子を筋注により delivery する点であろう。ベクターの安全性が未だ確立せず、用い難い現状では、筋肉は nakid plasmid でも導入しうる最大の gene reserver であることが大きなポイントになる。さらに、VEGF は分泌蛋白であ

るので、すべての細胞に導入される必要がなく、筋肉において得られる efficiency で局所の蛋白濃度を上げることが十分可能である。実際彼らは安静時疼痛を有する ASO 患者の下肢に 2 mg の VEGF の nakid plasmid を筋注し、著明な血流改善効果を報告している。ABI (Ankle-Brocheal Index) あるいは toe pressure は著明に上昇し(図7),

難治性潰瘍の改善も認め、従来の治療では不十分な重症虚血肢に有効な治療であることを示した。狭心症に対する遺伝子治療の効果も劇的であった。対象患者は5例、それぞれPTCAあるいはCABGあるいは両方の治療歴があるが、全員が狭心症による重度の生活障害をもち、もはやPTCAあるいはCABGの適応外の患者である。彼らはVEGF遺伝子を500 μg (8 ml)をMID-CABにて心筋に直接注入し、血管新生による虚血の改善を検討した。VEGF遺伝子導入により、

狭心痛に対して服用するニトログリセリンの数量は各患者において劇的に減少し(遺伝子治療前: 53.9+10.0 tab/week, 遺伝子治療後: 9.8+6.9 tab/week, P<0.03), 血管造影においても各患者で著明な血管新生を認めた。また, SPECT (a dobutamine single photon emission computed tomography)にて正常血流領域の拡大, 欠損部位の減少を認め, 虚血性心疾患に対するこの治療の有用性を示している。

著者らもまた, HGF遺伝子を用いた同疾患に対する遺伝子治療を申請している(TREAT-HGF)。アプローチとしてはVEGFによる遺伝子治療と同様, 下肢筋肉への naked plasmidの筋注である。当初の対象となるべき患者は, 安静時痛を有する, すなわちFontaine分類でⅢ度以上あるいはRutherford分類でⅡ度4群以上の重症虚血肢である。虚血性潰瘍の有無は基本的には問わないが, 従来の治療(内科的及び外科的)に抵抗性であることが条件となる。また, HGFによる血管新生が悪化を招き得る疾患を有する患者, すなわち癌あるいは進行性糖尿病性網膜症を有する患者は除外基準となる。間歇性跛行の患者への適応はこのアプローチの安全性が確認された後に検討されることになろう。おおまかなプロトコルは図8に示す通りである。評価としては, 臨床状態(ABI, Toe pressure, 自覚症状など)の改善度(Rutherfordの改善基準に準じる), 血管造影, 下肢MRA, 下肢造影CT, Laser Doppler血流計, 経皮酸素ガス濃度(TcPO₂)などを用いて評価する。

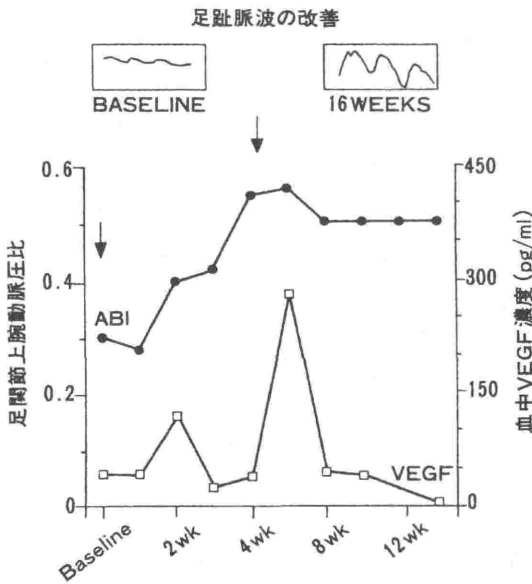


図7 VEGF 遺伝子導入による Toe pulse wave, ABI, TP の改善 (文献⁶より改編)

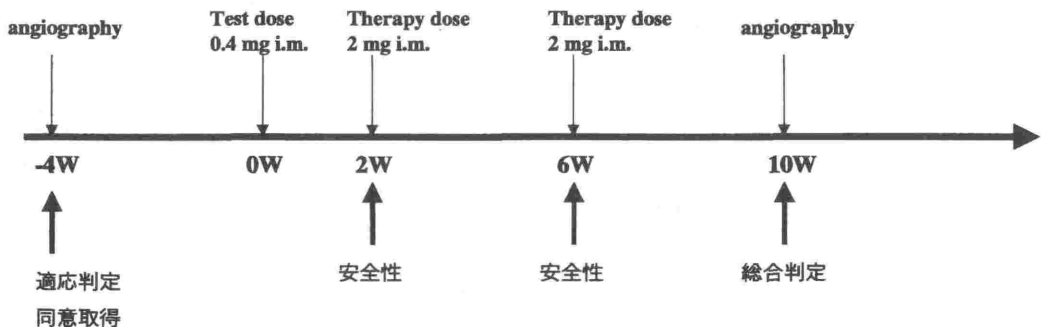


図8 TREAT-HGFのプロトコル

安全性を確認するため, test doseの投与を行い, 安全性確認後治療doseの投与とする。また少なくとも導入後3年までの追跡を予定している。

HGFによる心筋症に対する遺伝子治療の可能性

心筋症では間質に線維化が起こってくる。間質では、肥大した心筋細胞、あるいは死んだ心筋細胞のreplaceをするためにコラーゲンの増生、蓄積が起こり、さらに心筋及び小動脈の拡張障害、そのことによる心筋細胞での血流低下などの現象が起こっている。HGFは血管新生、あるいは血管の内皮機能の維持に重要な因子であるので、HGF産生低下はこのような心筋細胞での血流減少を増悪させる。肝硬変モデルを作成すると、線維化が進展するが、組み替え型HGFの連日投与により線維化が抑制されることを明らかになっている。HGFの抗線維化作用に関しては、未だ不明な点が多いが、1つのメカニズムとして、u-PA (plasminogen activator) やu-PAレセプターを増強させることが考えられる。あるいは、マトリックス分解酵素であるコラゲナーゼなどの発現をetsを介して増強させる。また、TGF- β の発現を阻害するなどのHGFの抗線維化作用がすでに明らかになっている。

心筋局所では、TGF- β やアンジオテンシンIIの産生増強によってHGFが減少することが、恐らく線維化に対してさらに促進する方向につながっているのではないかと考えられる。心筋症ハムスターモデルを用いて、12週から20週齢においてアンジオテンシンIIを阻害することによって、線維化と心臓のHGF産生を検討した。心臓のHGF濃度は、正常ハムスターに比べ心筋症ハムスターでは有意に心臓のHGF濃度は低下していたが、ACE阻害薬とATII受容体拮抗薬投与によって、正常レベルにまで心臓のHGF濃度は回復した。回復したHGFが抗線維化作用を示して、心筋症ハムスターにおいて線維化を改善するのではないかと期待される。事実、正常に比べ心筋症ハムスターでは線維化は3倍になっているが、ACE阻害薬やATII受容体拮抗薬投与で線維化が抑制されていた。さらに直接HGF遺伝子を導入することで線維化を防ぎ、心筋症の治療になりうることが考えられる。

おわりに

循環器疾患における遺伝子治療は、ここ数年の研究をもとによりやくヒトで開始され始めたばかりである。

しかし、動物実験での効果は従来報告されていた治療より優れており、また中間報告でも驚くべき成績が報告されている。今後、狭心症・ASO・再狭窄に対する遺伝子治療がひとつのポピュラーな治療法となることは可能性は高く、それと同時に心筋症などの難治性疾患に対しても移植以外の新しいアプローチが可能になると思われる。

文 献

- 1) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, et al : A novel molecular strategy using cis element "Decoy" of E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 5855-5859, 1995
- 2) Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, et al : Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation* 94 : 3291-3302, 1996
- 3) Hayashi S, Morishita R, Higaki J, et al : Autocrine-paracrine effects of over-expression of hepatocyte growth factor gene on growth of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 220 : 539-545, 1996
- 4) Morishita R, Nakamura S, Nakamura Y et al : Potential role of endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes mellitus. *Diabetes* 46 : 138-142, 1997
- 5) Morishita R, Higaki J, Hayashi S et al : Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation: Prevention of high D-glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor. *Diabetologia* 40 : 1053-1061, 1997
- 6) Leyen HVL, Gibbons GH, Morishita R, et al : Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of ec-nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 1137-1141, 1995
- 7) Hara S, Morishita R, Tone Y, et al : Overexpression of prostacyclin synthase inhibits growth of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 216 : 862-867, 1995
- 8) Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al : Application of transcription factor "decoy" strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular diseases. *Circulation Research* 82 : 1023-1028, 1998
- 9) Folkman J : Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285 : 1182-1186, 1971
- 10) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al : Constitutive expression of phVEGF after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97 : 1114-1123, 1998
- 11) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al : Gene therapy for myocardial angiogenesis: Initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98 : 2800-2804, 1998