血管平滑筋細胞の増殖制御

—— 遺伝子治療に向けて ——*

森 下 竜 一** 檜 垣 実 男** 青 木 元 邦**
 林 真一郎** 木 田 岩 男** 荻 原 俊 男**

I. はじめに

分子生物学の進歩は、従来の医療で治療困難であった疾患に対し遺伝子治療という新しい治療法を与えた。その流れは、現在循環器領域にもおよびつつあり、すでにアメリカでは多くの臨床治療が始まっている¹⁻³⁾。本稿では、冠動脈疾患、特に血管拡張術 (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty=PTCA) 後の再狭窄に対する細胞周期増殖制御にターゲットをおいて遺伝子治療をまとめる。細胞増殖の本体は細胞周期の進展によることが明らかになってきた。近年、細胞周期の進展を調節する細胞周期関連遺伝子群が多く発見され、その病的意義が明らかになりつつある。遺伝子治療の対象として細胞周期調節遺伝子は重要である。特に、新しい治療薬として注目を集めているアンチセンスおよびデコイ技術について述べる。

II. 血管への遺伝子導入による遺伝子治療

血管は、遺伝子治療という観点からすれば、非常に魅力的であるため、多くの報告がなされている。生体における血管への遺伝子導入は Nabel らにより、1989 年にはじめて報告された⁴⁾。初期の遺伝子導入法の中心であったレトロウイルスは非分裂細胞に対して遺伝子の導入効率が悪く、Lipofection も生体ではきわめて遺伝子導入効率が低いと考えられていた。これらの問題点を克服するために、各種の遺伝子導入法が開発されてきている。しかし、現在のところそれぞれ長所・短所があり、標的臓器により使い分ける必要があるであろう (Table 1)。われわれは、国内で開発された高効率な遺伝子導入法である HVJ-リポソーム法を血管壁への遺伝子導入に用いた (Fig. 1)。本法は、遺伝子を核蛋白である HMG-1 (High Mobility Group 1) と結合後、脂質の膜に包み込み、

Table 1 遺伝子導入法。

	長所	短所
1) ウイルスベクター		遺伝子サイズに限界 組織特異性がない
レトロウイルス	ジェノムに挿入可能 発現期間が長期	非分裂細胞に挿入不可 発現効率が低い
アデノウイルス	発現効率が低い 非分裂細胞にも導入可	炎症反応を惹起 抗体産生
2) 脂質複合体	遺伝子サイズに限界なし	組織特異性がない
カチオニックリポソーム	安全 安価 非分裂細胞にも導入可	導入効率が低い
HVJ-リポソーム	導入効率が低い 非分裂細胞にも導入可	赤血球に結合しやすい
3) 物理的導入法		
遺伝子銃	簡単	生体に応用しにくい

* 1995 年 3 月, 第 27 回日本動脈硬化学会総会 (名古屋)
 において発表。

** 大阪大学附属病院第四内科

Fig. 1 HVJ-Liposome Gene Transfer Method.

Fig. 2 HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan).

DNA-脂質複合体を形成したのち、不活化したセンダイウイルス (HVJ) を加え、HVJ の融合能を利用し、遺伝子を直接細胞質に導入するものである (Fig. 2)⁶⁻⁷⁾。センダイウイルスの膜表面蛋白であるウイルスの吸着に関係する HN および融合をおこす F 蛋白を利用する方法であり、直接遺伝子もしくはオリゴを細胞質内に導入することが可能である。また、核への移行効率は HMG-1 により増加しており、非分裂細胞にも効率よく DNA を導入・発現できる。しかし、遺伝子発現期間は一過性であり (約 2 週間)、ゲノムに挿入されない。

まず、本法を用いて SV40T 抗原遺伝子の血管内投与によりラット頸動脈血管壁へ遺伝子導入を試みた。HVJ 法

は血管壁の遺伝子導入法としてきわめて高効率で、血管内皮および血管平滑筋細胞に主に導入した。その遺伝子発現効率は、バルーンによる内皮障害モデルでは、通常の動脈壁より高かった (Fig. 3)⁸⁾。本法ではきわめて安全で、動脈壁への遺伝子導入実験でも炎症の誘発などの病理学的な変化はいっさい認められなかった。最近、われわれは内皮型一酸化窒素 (NO) 合成酵素の遺伝子導入によりバルーン障害後血管内膜新生が抑制されることを報告した⁹⁾。さらに、興味深いことに NO 合成酵素の遺伝子導入により、血管のアセチルコリンに対する弛緩性も回復した。また、最近アデノウイルスにより血管壁へ変異型 Rb (Retinoblastoma) 遺伝子やチミジンキナーゼ遺

Fig. 3A 正常血管.

Fig. 3B 傷害血管.

伝子の導入によりブタ動脈において再狭窄抑制の成功も報告された^{10,11)}が、アデノウイルスベクターの抗原性や炎症の誘発なども判明し、遺伝子治療のベクターとしての可能性は今後検討が必要である。また、現在までのところ、これら遺伝子の過剰発現による遺伝子治療は抑制率が50~60%で、後述するアンチセンスやデコイ法ほどではない。その理由は不明だが、遺伝子導入による方法は、導入された遺伝子により蛋白が発現され、機能をもつのに1~3日程度の時間がかかるためかもしれない。

III. 再狭窄のターゲットとしての細胞周期

1) 再狭窄の遺伝子治療としての細胞周期調節遺伝子抑制

PTCA 後再狭窄に対しては、現在までのところ有効な薬物治療は認められていない。再狭窄は、血管平滑筋細胞の再増殖により起こるものと考えられており、各種増殖因子などの関与が示唆されている¹²⁾。そのため、PDGF や FGF の抗体の投与が以前より研究されてきた^{13,14)}。これらの増殖因子に対する抗体の投与は、部分的に再狭窄

を予防するというよりも、むしろ再狭窄の発生時期を遅らせるにすぎない。この理由として、再狭窄が各種増殖因子の発現増加による複合モデルであるためや、抗体の有効期間が短いと考えられる。そこで、われわれは細胞増殖の本体である細胞周期の伸展に注目した。

血管平滑筋細胞は、通常血清無添加の状態に長期間おかれると静止期 (quiescent state: G0 期) になる。静止期の細胞に血清もしくは増殖因子の刺激が加わると G1 期になり、細胞周期の進展が開始される。さらに、細胞は DNA 合成期である S 期を経て、G2 期に移行し、細胞分裂期である M 期に入り、細胞分裂が起こる。細胞は同様な過程を繰り返し、細胞増殖がおこってくる。これらの過程で細胞周期を調節する多くの遺伝子が存在することが酵母の研究より明らかになってきた。まず、cdc2 キナーゼが、細胞周期の中心的原動力であることが明らかにされた。cdc2 キナーゼは、DNA 複製開始 (G1/S 移行)、有糸分裂開始 (G2/M 移行) が必要であると考えられている。さらに、そのホモログである cdk2, cdk3 などや G1 期におけるそれらの活性化因子と示唆されている G1 サイクリン (サイクリン C, D, E) がクローニングされ、その役割がクローズアップされてきた。サイクリン B-cdc2 キナーゼ複合体が M 期進行の引き金となっていることは明らかで、G2/M においてサイクリン B が急激に合成され、p34cdc2 キナーゼと結合して活性化される。一方、cdk2 キナーゼはサイクリン A および Rb と複合体を作り、転写因子 E2F を静止期では不活性化している。血清もしくは増殖因子の刺激により Rb がリン酸化され、転写因子 E2F が放出され、細胞周期の進展に必要な細胞周期調節遺伝子群が活性化され、細胞増殖がおこる (Fig. 4)。また、cdk2 キナーゼとサイクリン A の複合体は G1/S において重要な機能を果たしている。その他にも、cdc2 キナーゼとサイクリン A の複合体や cdk2 キナーゼとサイクリン B の複合体もそれぞれ G1/S あるいは G2/M に重要な役割をもっていると考えられている。近年、DNA 合成 (S 期) に必須と考えられている PCNA もサイクリン D と複合体を形成していることが明らかになり、ますます細胞周期の制御機構は広がりを見せつつある。これらの細胞周期調節遺伝子の mRNA はバルーン障害により増加している¹⁵⁾。また、ヒト再狭窄病変においてサイトメガロウイルスの感染とそれによる変異型 p53 (癌抑制遺伝子) の増加が 1/3 の症例でみられ、細胞周期の異常そのものが再狭窄に関係している可能性が示唆されている¹⁶⁾。

そこで、われわれはこれらの細胞周期調節遺伝子の発現をアンチセンスオリゴで阻害することにより、バルーン障害後の再狭窄が抑制できるか、ラットを用いて行っ

Fig. 4 Schema of decoy against E2F binding site.

た^{15,17-19}。局所への投与法として、ラットの頸動脈にカセーテルを挿入し、バルーン障害後オリゴを含んだ HVJ コンプレックスを動脈内で 10 分間インキュベートした。PCNA と cdc2 キナーゼに対するアンチセンスオリゴの投与は、バルーン障害により促進される DNA 合成を抑

制し (障害 4 日後), 障害 2 週後内膜新生はほぼ完全に抑制した。一方, センスおよびスクランブルオリゴの投与では内膜抑制はみられなかった。単回投与による内膜新生抑制効果は, バルーン障害後 8 週後においても継続しており, 再狭窄の予防にきわめて有用であることが示唆された。この結果は, 従来の増殖因子に対する抗体投与の結果と異なり, 細胞調節遺伝子の抑制が全ての増殖因子の刺激をその下流で阻害するためであろう。

われわれは, さらにいくつかの細胞周期調節遺伝子に対するアンチセンスオリゴを用いてバルーン障害後の内膜新生に対する抑制作用を調べた。その結果, 一つの遺伝子に対するアンチセンスの単独投与では抑制効果はあるが, 完全な抑制には至らず, 最低 2 種類のアンチセンスの投与が必要と考えられた (Fig. 5)。現在, 将来の臨床治験 (米国にて, 現在 FDA に申請中) に向け, より大型動物での実験を進めている。一方, Simon らは, PTCA 後の再狭窄モデルであるラット頸動脈のバルーン拡張術後の血管平滑筋の増殖を前発癌遺伝子である c-mb に対するアンチセンスオリゴ投与により抑制したと 1992 年に報告した²⁰。彼らは, 大量のオリゴ (200 μ M) をポリマーゲルに溶解し, 頸動脈周囲に塗布することで局所へ投与した。同様の投与法を用いて, c-myc²¹ や PCNA 遺伝子²² に対するアンチセンスオリゴも同様な作用をもつことが報告された。しかし, 動脈周囲組織への塗布は, 実際の治療を考えた場合あまり实际的ではない。今後より多くの遺伝子もしくはアンチセンスが, 血管内膜新生抑制作用をもつことが報告されると思われるが, その安全性や長期効果が検討される必要がある。

Fig. 5 細胞同期調節遺伝子に対するアンチセンスによる再狭窄抑制。

Table 2 アンチセンスとデコイ療法の違い.

	アンチセンス	デコイ
遺伝子発現抑制部位	mRNA	プロモーター
効果	特定遺伝子	広範な遺伝子群抑制により効果的
ターゲット特異性	高い	低い
種特異性	高い	低い
目標遺伝子のクローニング	必要	必ずしも必要でない

2) 新しい遺伝子治療法としてのデコイ療法

より有効な遺伝子治療のために、われわれは細胞周期調節遺伝子群に共通する転写因子結合配列に注目した。細胞周期調節遺伝子群のプロモーター領域には E2F 結合配列が存在している。転写因子 E2F は静止期では不活性化しているが、血清などの刺激により放出され、細胞周期の進展に必要な細胞周期調節遺伝子群が活性化され、細胞増殖がおこる。そこで、E2F 結合配列と同じ配列をもつ二重鎖核酸化合物（デコイ）の導入により、転写因子 E2F の結合を阻害することができる（デコイによる遺伝子発現の阻害, Fig. 4）。事実、E2F デコイの血管平滑筋細胞への導入により、血清刺激により誘導される PCNA および cdc2 キナーゼの遺伝子発現が強力に阻害される。この細胞周期調節遺伝子の発現抑制は血清刺激による平滑筋細胞の増殖をも抑制し、デコイにより内因性遺伝子の発現と細胞周期調節が可能であることがはじめて示された²³⁾。事実、われわれは世界ではじめてこの E2F デコイを用いてバルーン傷害後の血管内膜新生抑制にも成功し、その抑制作用はアンチセンスに比べさらに強力であった。Table 2 にアンチセンス療法とデコイ療

法の違いをまとめたが、デコイ療法は新しい遺伝子治療のスタイルとして期待される。さらに、その原理上ガン細胞増殖などにも非常に有効であると期待されるため、現在その応用を検討している。

3) 再狭窄抑制のための内皮細胞修復促進療法の可能性

われわれを含め従来の再狭窄療法は、血管平滑筋細胞抑制に重点を置きすぎてきた傾向がある。本来の病態に戻って再狭窄を考えてみると、その最初のイベントは内皮細胞の変性および脱落による動脈硬化の進展である。確かにわれわれをはじめ多くのグループが成功しているように、平滑筋細胞の抑制は単独でおそらく再狭窄の重要な予防法になりうると考えられる。しかし、患者の実状に即して考えれば、より長期での再狭窄抑制効果が続くのかという問題が存在する。アンチセンスおよびデコイ療法は少なくとも投与後 8 週まで血管内膜新生を抑制しており、なんらかの血管リモデリングがおこっている可能性を示唆している。しかし、内皮修復促進に関してあまり期待できない。一方、再狭窄部位では内皮細胞変性により血小板の付着がおこりやすくなっており、こ

Fig. 6 PTCA 後再狭窄の遺伝子治療.

のことも病変の完成に関与していると考えられる。これらのことを考えあわせると、内皮細胞修復は単にもとの状態に戻すというのみならず、より積極的な治療効果も期待される。事実、内皮細胞と血管平滑筋細胞との混合培養において、内皮細胞より血管平滑筋細胞の増殖に対し抑制的に働く物質が放出されていることが確認されている。そこで、新しい再狭窄抑制法として内皮細胞修復促進を応用するために (Fig. 6)、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細胞特異的増殖因子に注目した。内皮細胞特異的増殖因子として VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) がよく知られており、その臨床応用が期待される。われわれは、肝細胞特異的増殖因子 (HGF=Hepatocyte Growth Factor) に注目した。HGF は、本来肝細胞増殖を強力に刺激する新しい増殖因子として 1989 年に中村らによりクローニングされた²⁴⁾。その後、上皮細胞を含む多くの細胞系に増殖作用をもつことが報告され、注目されているが、血管壁構成細胞における機能はまったく不明であった。われわれの結果は、興味深いことにヒト動脈由来内皮細胞では HGF の増殖作用は VEGF や FGF に比較してきわめて強力であり、われわれの検討した限りでは現在もっとも強力な増殖作用を有していた。FGF は血管平滑筋細胞にも増殖作用を有していたが、VEGF や HGF は増殖に影響を与えなかった。HGF が内皮細胞および平滑筋細胞から産生されていることも見つけており、今後、動脈硬化や再狭窄病変部位における局所 HGF 系の解析が期待され、治療への応用も考えられる。

IV. おわりに

以上述べてきたように、血管平滑筋細胞における細胞周期の制御機構の知見はますます増加してきている。さらに、その病態への関与が明らかになるにつれ、薬剤としてのターゲットとしての可能性も注目されてきている。われわれは、PTCA 後再狭窄に対する遺伝子治療として成功をおさめ、今後、臨床応用が期待される。

本稿の研究は、大阪大学細胞工学センター (金田安史先生)、第四内科およびスタンフォード大学 (V.J. Dzau) との共同研究によるものである。

文 献

- 1) Dzau VJ, Morishita R, and Gibbons GH: Gene therapy in the cardiovascular diseases. *Trends in Biotech*, 11, 205, 1993
- 2) Morishita R, Gibbons GH, and Dzau VJ: Gene therapy as potential treatment for cardiovascular diseases. *Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. eds, Singh BN, PP 51-62, 1994
- 3) 森下竜一他: 循環器領域における遺伝子治療, *Molecular Medicine*, 30: 1450, 1993
- 4) Nabel EG, Plautz G, Boyce FM, Stanley JC, and Nabel GJ: Recombinant gene expression *in vivo* within endothelial cells of the arterial wall. *Science*, 244: 1342, 1989
- 5) 金田安史: 高血圧の遺伝子治療—遺伝子導入法の開発と応用. *Molecular Medicine*, 30: 1440-1448, 1993
- 6) Kaneda Y, Iwai K, and Uchida T: Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science*, 243: 375-378, 1989
- 7) Morishita R, Gibbons GH, Kaneda Y, Ogihara T, and Dzau VJ: Novel and effective gene transfer technique for study of vascular renin angiotensin system. *J Clin Invest*, 91: 2580, 1993
- 8) Morishita R, Gibbons GH, Kaneda Y, *et al.*: In vivo gene transfer into intact blood vessels: a novel and efficient method. *Circulation*, 86: 1-227, 1992
- 9) Leyen HVL, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, and Dzau VJ: Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of ec-nitric oxide synthase gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1137-1141, 1995
- 10) Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, and Nabel EG: Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science*, 265: 781-784, 1994
- 11) Seltzer J, Chang M, Barr E, Parmacek MS, and Leiden JM: Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro* and in vivo by a replication-defective adenovirus encoding a nonphosphorylatable retinoblastoma gene product. *Circulation*, 90: 1-90, 1994
- 12) Casscells W: Migration of smooth muscle and endothelial cells: Critical events in restenosis. *Circulation*, 86: 723-729, 1992
- 13) Lindner V and Reidy MA: Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 3739, 1991
- 14) Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, and Ros R: Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*, 253: 1129-1132, 1991
- 15) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, and Dzau VJ: Single intraluminal delivery of antisense cdc 2 kinase and PCNA oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8474-8478, 1993
- 16) Speir E, Modeli R, Huang Es *et al.*: Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*, 265: 391-394, 1994
- 17) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Leyen HVL, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, and Dzau VJ: Antisense oligonucleotides directed at cell cycle regulatory genes as a target for restenosis therapy. *Transactions of Association of American Physicians*.

- sicians, PP 54-61, 1993
- 18) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Leyen HVL, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, and Dzau VJ: Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides. *Journal of Clinical Investigation*, 1458-1464, 1994
 - 19) Morishita R, Gibbons GH, Kaneda Y, Ogihara T, and Dzau VJ: Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides (cyclin B1 and cdc 2 kinase) in the vessel wall: enhanced therapeutic utility for restenosis by HVJ-liposome method. *Gene*, 149: 13-19, 1994
 - 20) Simons M, Edelman ER, Dekeyser JL, langer R, and Rosenberg RD: Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation *in vivo*. *Nature*, 359: 67-70, 1992
 - 21) Bennett MR *et al.*: Inhibition of vascular smooth muscle proliferation *in vitro* and *in vivo* by C-myc antisense oligonucleotides. *J Clin Invest*, 93: 826, 1994
 - 22) Simons M *et al.*: Antsense proliferating cell nuclear antigen oligonucleotides inhibit intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *J Clin invest*, 93: 2351, 1994
 - 23) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Horiuchi M, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, and Dzau VJ: A novel molecular strategy using cis element "Decoy" of E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, (in press)
 - 24) Nakamura T, Hagiya M, Nishizawa T, Seki M, Shimonishi M, Sugiura A, Tashiro K, and Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 342: 440-443, 1989

Regulation of Vascular Smooth Muscle Cells Growth ——Toward to Gene Therapy——

Ryuichi MORISHITA, Jitsuo HIGAKI, Motokuni AOKI
Shin-ichiro HAYASHI, Iwao KIDA, and Toshio OGIHARA

Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School, Osaka, Japan