◆総 説◆

HGF による循環器疾患に対する遺伝子治療

青 木 元 邦^{*1}, 森 下 竜 一^{*2}

HGF-treated Gene Therapy for Cardiovascular Diseases

Motokuni AOKI^{*1}, Ryuichi MORISHITA^{*2}

Key words : Key words : restenosis, angiogenesis, VEGF, ASO, angina, cardiomyopathy

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。そしてその効果は予想以上であった。大阪大学においても HGF による血管新生をアプローチとした ASO の遺伝子治療が申請され、日本においても遺伝子治療が確かな 1 つの治療法として選択されうる時代が来つつある。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。

循環器疾患の遺伝子治療を考える時、現在もっとも研究が進み早い時期の臨床応用が期待されるアプローチとしては、血管新生による狭心症・ASO の治療と冠動脈形成術 (PTCA) 後の再狭窄予防の 2 つであろう。血管内皮細胞増殖因子であり、血管新生作用を有する HGF はそ

の key molecule といえる。

1) 肝細胞増殖因子 (HGF) とは

HGF は、肝細胞のもっとも強力な増殖因子として中村敏一教授 (大阪大学バイオメディカル教育センター) により、発見された。その後、各種臓器において臓器保護作用や再生作用、さらには各種の器官の発生にも大きく関わっていることが明らかにされたユニークな増殖因子である。1980 年代の後半に肝再生因子として発見された HGF は、種々の肝傷害や腎傷害にともなって傷害臓器および肺などの間葉系細胞において産生され、オートクライン・パラクライン・エンドクリン機構によって傷害臓器に供給され、傷害臓器の上皮系細胞に働き、再生を促すことが知られている。また臓器傷害を軽度にする保護作用、さらには上皮細胞-間葉組織間における相互作用をもち、組織器官の恒常性維持に重要な役割をはたしている。近年、循環器疾患、代謝疾患などにおいても重要な病態生理学的意義を有することが次々に明らかにされ、多くの注目を集めている。

もともと HGF は肝細胞増殖因子として発見されたが、血管平滑筋および血管内皮より産生

^{*1}大阪大学大学院医学系研究科加齢医学講座 [〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2]

Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School (2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.)

^{*2}同 遺伝子治療学講座 [〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2]

Division of Gene Therapy Science (2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.)

図1 HGFの発現調節

されること、また高血糖あるいは低酸素の状態での基礎的検討では血管平滑筋細胞および内皮細胞よりのHGF産生は低下しており同時に内皮傷害の進展が認められることなどから、内皮細胞の機能あるいは増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。実際、ヒト培養血管内皮細胞を用いた検討により、VEGFあるいはb-FGFと比較してHGFがより強力な内皮増殖作用を示すことが明らかになってきている¹⁾。HGFはまた内皮細胞特異的な増殖因子であ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。

2) 内皮細胞障害とHGF

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。同様の効果はほか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のと対照的に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²⁾(図1)。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、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される。

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³⁾⁴⁾(図2)。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、HGFは血管内皮障害のトリガーとも考えられる。従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内皮再生、内皮機能改善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。

3) 内皮保護の重要性

内皮は単に血管の内側をカバーしているのではなく、一酸化窒素(NO)やプロスタグランディンI₂などの生理活性物質を血管局所に放出し血管全体の恒常性を維持している。そのため、血管内皮は、1) 抗血栓・凝固作用、2) 血管の緊張あるいは構造の調節作用、3) 平滑筋細胞増殖抑制作用、4) 抗炎症反応、5) 免疫反応調節機能、6) 白血球・血小板凝縮抑制作用、7) 抗酸化作用、8) 血管透過性調節機能、などを調節

図 2 高血糖刺激による HGF の発現低下と HGF 添加による細胞死抑制効果

図 3 再狭窄に対する遺伝子治療の strategy

している。まさに血管内皮は生体の biological で chemical barrier として作用している。従って、HGF による内皮保護は多くの血管病変において治療につながるものと期待される。

4) HGF を用いた再狭窄に対する遺伝子治療

a) 再狭窄と HGF

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、および 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 3 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。

再狭窄の遺伝子治療としては当初、血管平滑筋細胞の異常増殖抑制をターゲットとしていたが、再狭窄の最初のイベントが、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ことを考え、リモデリングに注目した遺伝子治療が最近では提唱されている(図 3)。すなわち、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。実際の臨床試験では内皮特異的増殖因子 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) の遺伝子導入が報告されている⁵⁾。1995 年アメリカでハイドロゲルカテーテルを用いた VEGF 遺伝子導入による内皮再生療法を用いた再狭窄に対する遺伝子治療が許可され、現在米国タフツ大学で施行されている。一方われわれは、HGF (Hepatocyte Growth Factor) の内皮選択的増殖作用に注目して、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ている。われわれは *in vivo* における HGF の抗動脈硬化作用を検討するため、ラットのバルーン障害血管を用いた。障害 2 週間後、コントロール群では組織 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が、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。バルーン障害後 2 週間でエバンスブルーにより内皮細胞の有無を確かめた結果を、図 4 に示す。エバンスブルーで染色を行うと、内皮がない場合はエバンスブルーが血管壁に沈着し青く染まるが、内皮があると、内皮が barrier になってエバンスブルーに染色されず、白く抜ける。対照群では、ほとんど青染されるが、HGF 遺伝子導入群では、青染されている部分は非常に少ない。コンピューターで解析すると、2 週間後では対照群では、再生内皮は 40% しかないが、ヒト HGF 遺伝子導入群では、90% 近く、すでに内皮が再生している。明らかに局所 HGF が増えることによって内皮再生は促されるということがわかる。アセチルコリンによる血管拡張能を検討したところ、対照群に比べて、HGF 遺伝子導入群では、アセチルコリンによって拡張能を示し

た (図 5)。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。

再生内皮は、血小板あるいはマクロファージ沈着に対しても抑制的に作用し、抗血栓作用も示すことが期待されるため、remodeling の観点からみて、理想的な再狭窄治療法と考えられる。血管壁の HGF 産生は再狭窄部位では低下しており、再狭窄治療において、HGF は補充療法であるというコンセプトが成立する (図 6)。すなわち、PTCA 後再狭窄が起これば、アンジオテンシン II や TGF- β の活性化を介して内因性の血管壁 HGF が低下する。そして、血管壁 HGF 低下は内皮再生を遅延させ、再狭窄形成をおこす。ところが、HGF 遺伝子導入で血管壁の HGF を増加させると、内皮再生が促されて再狭窄が抑制され、正常血管と同じように、アセチルコリンによって拡張作用を示す。すなわち、血管拡張能を持った再狭窄抑制という理想的な再狭窄治療につながる可能性がある。事実、ヒト再狭窄症例で、血管壁 HGF の低下と TGF- β の活性化が相関する事が既に示されている。

5) HGF を用いた血管新生療法

約 20 年前、Folkman ら⁶⁾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、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。特に b-FGF、VEGF、HGF などの内皮細胞増殖因子の血管新生作用は当初より注目されており、それらの 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。すでにアメリカでは VEGF を用いた ASO、狭心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

図 5 HGF による内皮再生に伴う血管弛緩能の改善

図 6 再狭窄に対する HGF の補充療法

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きわ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。

a) 慢性動脈閉塞症 (ASO) に対する遺伝子治療

既に米国では VEGF を用いた ASO に対す

る遺伝子治療が開始されているが⁷⁾, われわれは HGF の血管新生作用に注目しその有用性を示してきた。また, 現在 HGF を用いた ASO の遺伝子治療のプロトコルを申請している。

われわれはラットの下肢虚血モデル (大腿動脈結紮モデル) を作成し, 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

図 4 HGF 遺伝子導入による内皮再生

図 7 ASO モデルにおける HGF による下肢血流の改善

図 8 冠動脈結紮モデルにおける HGF の血管新生作用

めた(図 7)。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。

b) 狭心症に対する遺伝子治療

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(図 8)。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 が融合した結果で上がってくる中小血管も確認される。10 μ m 以下の小さい血管で 6 倍から 7 倍, 10 μ m 以上の中小サイズ以上の血管で 2 倍から 3 倍増加する。microsphere で血流を測定すると, HGF による血管新生によって 50% 程度血流量が増える。HGF 過剰発現時には血管新生に必須な転写因子 ets の活性化も認められ, ets を介した血管新生が示唆された。

c) VEGF を用いた遺伝子治療の実例

タフツ大学の Isner らは, VEGF を用いた血管新生療法による ASO, 狭心症の遺伝子治療を既に始めている⁷⁾⁸⁾。彼らは安静時疼痛を有する ASO 患者の下肢に 2 cm の VEGF の naked 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 9), 難治性潰瘍の改善も認めている。

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 μ g (8 ml) を MIDCAB 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。術式は非常に簡便かつ安全なもので合併症は見られていない。また心機能そのものにも術前術後で影響はなかった。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

図9 VEGF遺伝子導入によるToe pulse wave, ABI, TPの改善(参考文献4より改編)

(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。

6) 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, さらに心筋およ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うる。

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している。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あきらかになっている。

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を考えられる。

おわりに

VEGF を用いた遺伝子治療の効果は上述したように非常にすぐれたものであった。HGF による遺伝子治療は未だ開始されていないが, 内皮細胞に対する作用は VEGF 同様あるいはそれ以上に強力であり, その効果は非常に期待できる。さらに循環器疾患以外でも肝硬変に対する有用性が示されている。このように種々の疾患で HGF を key とした遺伝子治療のプロトコルが申請され, 現実の医療の場で検討されることになろう。

文 献

- 1) Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) is a novel member of endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of HGF with basic fibroblast growth factor, but not vascular endothelial growth factor. *J Hypertens* **14**:1067-1072, 1996.
- 2) Nakano N, Morishita R, Moriguchi A, Nakamura Y, Hayashi S, Aoki M, Kida I, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T.: Negative regulation of local hepatocyte growth factor (HGF) expression by angiotensin II and transforming growth factor- β in blood vessels: potential role of HGF in cardiovascular disease. *Hypertension* (in press)
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, Symes JF, Isner JM.: Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation* **94**:3291-3302, 1996.
- 6) Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**:1182-1186, 1971.
- 7) 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.
- 8) Losordo DW, 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.