

VWF-CP 遺伝子導入による、血管内 ステント挿入術後の血栓性動脈閉塞の予防

(課題番号:18591355)

平成 18 年度～平成 19 年度 科学研究費補助金
(基盤研究(C)「一般」)
研究成果報告書

平成 20 年 6 月

研究代表者:田村 正三

(宮崎大学医学部教授)

は し が き

この研究の計画、遂行には放射線医学と病理学の共同が重要でした。研究に協力いただいた諸先生方に深謝申し上げます。

研究組織

研究代表者: 田村正三 (宮崎大学 医学部・教授)
研究分担者: 矢野貴徳 (宮崎大学 医学部・講師)
研究分担者: 畠山金太 (宮崎大学 医学部・講師)
研究分担者: 山下篤 (宮崎大学 医学部・助教)

交付決定額(配分額)

	直接経費	間接経費	合計	金額単位(円)
平成 18 年度	1,800,000	0	1,800,000	
平成 19 年度	1,600,000	480,000	2,080,000	
総計	3,400,000	480,000	3,880,000	

研究発表

1) 学会誌

Furukoji E, Tanaka N, Yamashita A, Matsumoto M, Fujimura Y, Yamamoto R, Tamura S, Asada Y.

Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase inhibits ATP- and ADP-induced vasoconstriction.

Thrombosis Research, 121(4):583-5,2008

目次

1. 研究内容

- (1) 研究目的・・・・・・・・・・4
- (2) 研究の背景、位置づけ・・・・・・・・5
- (3) 研究計画・・・・・・・・・・8
- (4) 研究結果・・・・・・・・・・11
- (5) 考察・・・・・・・・・・11

VWF-CP 遺伝子導入による、血管内 ステント挿入術後の血栓性動脈閉塞の予防

1. 研究内容

(1) 研究目的

閉塞性動脈硬化症をはじめとした難治性血管病変に対する治療として、ステント挿入術が広く行われている。この治療における長年の問題は、内膜肥厚による再狭窄および急性～亜急性の血栓性閉塞である。再狭窄に関しては、免疫抑制剤や抗癌剤をコーティングしたステントの登場により、良好な内膜肥厚抑制、再狭窄予防効果が得られるようになっている。一方血栓性閉塞に関しては、抗血栓薬の経口投与での対処が一般的であるが、出血傾向をはじめとした副作用のため使用困難となる場合も多く、治療部位の血栓形成により血管途絶や生命に危険な状態を来す場合もある。これに対処する1つの方法として、治療部位局所でのみ抗血栓効果を惹起させ、さらにその状態を持続させる方法が挙げられる。

動脈の血栓形成においては、血小板の血管壁への粘着がその始まりであるが、その過程で必要不可欠な物質が von Willebrand 因子(VWF)である。ステント挿入術後の血管では、高度な動脈硬化性病変部と同様、高ずり応力下のもとVWF が過剰に発現・作用し、血管形成術後の血栓形成

を来たしていることが示唆されている。今回の研究では、VWF の切断酵素である VWF cleaving protease(VWF-CP)を遺伝子導入で病変部にのみ持続高発現させることにより、抗血栓作用の有無を検討し、血管内治療後の血栓性閉塞を防止することを目的とする。

(2) 研究の背景と意義、位置づけ

1) 研究の背景と意義

血管内治療後の血栓性閉塞の予防に多数の抗血栓薬ならびに抗血栓因子の投与が試行されてきたが、その効果が満足できるものは少ない。VWF は血管内皮細胞より血中に分泌された後、血管の障害部位において強力な粘着能を発揮し、血小板を障害血管壁に粘着させる。このように VWF は血小板凝集において必要不可欠な因子であるが、血管内治療部位では、多量の VWF 発現により過剰な血栓が形成される。従って VWF を分解する酵素である VWF-CP を病変治療部においてのみ持続発現させることにより、効果的な抗血栓作用を発揮すると期待される。

VWF は、2,050 のアミノ酸残基の多重合体であり、動脈硬化性病変等の高ずり応力下では、ばねのように伸長し、活性化することが示されている。この VWF の分解酵素である VWF-CP は最近クローニングされた蛋白質で、肝臓で産生されたのち血液中に分泌される。この VWF-CP が血液中の VWF を分解することにより、血栓形成をコントロールしている。また、最近では VWF-CP は構造異型が多数存在することが示されるようになって

てきている。

そこで、今回の研究では、

- 1) VWF-CP の構造異形による機能解析を行い、その酵素活性部位を変化、欠落させた遺伝子を作製する。これらの組換えアデノウイルスベクターを用いて培養平滑筋細胞に導入することにより、それぞれの酵素活性、分泌能、遺伝子導入効果を検討する。
- 2) 次に、動脈硬化性病変の作製のために実験動物の動脈をバルーン擦過し、内膜傷害を起こさせる。この動脈に対して、導入効率あるいは酵素活性発現の異なる組換えアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、生体内での VWF 分解能と血栓形成の抑制能を組織学的に検討する。
- 3) さらに実験動物の傷害動脈に同遺伝子導入を行った後、ステントを挿入し血栓性血管閉塞の有無を検討する。

予想される結果：

- 1) VWF-CP は VWF を認識する領域を中央部に有すると考えられているが、C 末端の欠損体でも VWF 分解活性を示しており、分子量の小さい活性型を遺伝子導入に利用できると予想される。
- 2) これまでの予備実験の結果から、傷害後血管壁に導入された遺伝子は導入後 2～10 日間の持続蛋白発現と酵素活性を示すと予想され、ステント挿入術後の急性期血栓予防には十分な発現期間を持続できると予想される。また、遺伝子導入の追加により、適度な抗血栓予防

の追加が可能であると予想される。

- 3) ステント挿入部については、動物実験の結果から VWF の高発現が認められており、血栓形成が誘発されている。このため VWF-CP の高発現による高血栓作用が期待される。

2) 研究の位置づけ

血管内治療後の血栓性合併症に対して抗血栓薬や遺伝子導入を用いた研究もいくつか報告されているが、満足のいく結果は非常に少ない。最近 VWF に対する抗体の有効性が報告されてきているが、*in vivo* での報告は非常に少ない。ましてや VWF-CP 遺伝子導入を用いた治療面への検討は国内外においてまだ報告されていない。

(3) 研究計画

申請書の研究計画は以下の通りである

1) 平成 18 年度

1) 遺伝子組換えベクターの作製

VWF-CP の発現 plasmid および組換えアデノウイルスを作製する。この蛋白質の cDNA を遺伝子ライブラリーより PCR 法にて作製し、あわせて酵素活性部位を変化、欠落させた遺伝子を作製し、その発現 plasmid を作製する。この Plasmid にはサイトメガロウイルスの初期プロモーターが組み込まれており、その末梢に目的蛋白質の cDNA を入れ込むことにより、動物細胞内にて蛋白質を強制発現させる plasmid を作製する。

組換えアデノウイルスは、アデノウイルス遺伝子の E1、E3 領域を欠落させ、自己増殖能を欠落させたアデノウイルスに対し、上記の発現ベクターから切り出した遺伝子を入れ込むことにより作製する。

2) 培養細胞への導入実験

作製した遺伝子組換えベクターによる遺伝子導入効率を培養細胞にて検討する。培養細胞にはアフリカミドリサル腎臓由来の COS7 およびヒト血管壁平滑筋細胞を使用する。これらの細胞に対し、発現 plasmid および組換えアデノウイルスにて遺伝子を導入し、遺伝子導入効率、VWF-CP 蛋白質の発現、VWF 分解酵素活性を測定する。

3) 動物実験モデルの作製、遺伝子導入、評価

SD ラット(♂、生後8週前後)の外頸動脈より2フレンチ径のバルーンカテーテルを総頸動脈内に挿入し、内膜を傷害する。これにより動脈硬化性病変を作製する。さらに同動脈の近位側と遠位側を結紮し、内腔にアデノウイルスベクターを注入後、経時的に屠殺し、血管壁の VWF-CP 蛋白量 (Western blot 法、免疫染色)、遺伝子発現量 (Northern blot、RT-PCR法) および VWF 分解酵素活性と血栓形成 (光学顕微鏡、走査電子顕微鏡) を検討し、導入遺伝子による抗血栓作用の効果を解析する。

※(動物実験承諾番号;2005-018、組換え DNA 研究承諾番号;038)

2) 平成 19 年度

1) 動物実験モデルの作製、遺伝子導入、評価

平成18年度と同様の手技にて日本白色家兎の総頸動脈の内膜を傷害後、作製した VWF-CP の組換えアデノウイルスを導入し、血管壁への遺伝子導入効率、遺伝子発現、蛋白発現および酵素活性を測定する。これにより、遺伝子発現量を決定する。

2) ステント挿入動物実験モデル

上記の結果に基づき、内膜傷害、遺伝子導入後の家兎頸動脈にステントを挿入。挿入後1～4週まで経時的に動物を屠殺し、ステント網に形成

される血栓を内腔面より実体顕微鏡ならび走査顕微鏡で観察し、抑制効果を検討する。

また遺伝子導入2週間後の血管において、内皮細胞によるステントの被覆の程度と内膜肥厚の厚さを組織学的に計測し、あわせて検討する。

(4) 研究結果

- 1) ラットの大動脈より血管平滑筋細胞を採取培養し、アデノウイルスベクターを用いて VWF-CP の遺伝子導入を行った。VWF-CP 遺伝子を導入した平滑筋細胞においては、培養液中の VWF 分解活性は高値を示したが、コントロール群 (LacZ 遺伝子導入) の平滑筋細胞ではこの酵素活性は認められなかった。
- 2) 以上の結果を踏まえ、レーザー照射による血栓形成モデルを用いて、VWF-CP の抗血栓作用を検討した。ラットの総頸動脈の内皮細胞を剥離し、アデノウイルスベクターにより VWF-CP 遺伝子を導入、その5日後に導入部位にレーザーを照射し血栓を作成した。LacZ 遺伝子導入血管では、レーザー照射開始後2分以内に全例 (n=3) で閉塞性の血小板血栓が形成された。一方、VWF-CP 遺伝子導入血管では、5 分間の照射においても閉塞性血栓の形成は認められなかった (n=3)。

以上が当初の研究予定の結果として得られたが、この血栓形成抑制効果は以前同様の手技にて検討を行った E-NTPDase の血栓抑制効果に比べかなり弱く、結論として不十分であった。EctoATPDase (CD39)は血小板より放出される ADP を瞬時に分解する酵素で、VWF-CP と同様に血小板凝集を抑えることにより強力な抗血栓因子として作用していると考えられる。EctoATPDase と VWF-CP の作用機序の差異として血管収縮能へ

の関与が考えられるため、血栓形成抑制のためには血中の血小板凝集抑制のみでは不十分であり、局所血管壁における ADP をはじめとした血管収縮能への影響が重要であると考えられた。したがって追加実験として以下のごとく血管収縮能の検討を行うこととした。

ラットの頸動脈壁に組換えアデノウイルスを用いて E-NTPDase 遺伝子ならびにコントロール群として LacZ 遺伝子を導入した。導入 5 日後に血管を摘出しリング標本を作製、KCl, ノルエピネフリンおよび ATP, ADP による収縮反応を検討した。

結果: E-NTPDase 遺伝子導入後の血管は、全層において E-NTPDase 蛋白の発現がみられ、特に中膜に強い発現を認めた。KCl とノルエピネフリンに対する収縮反応は内皮細胞剥離後の遺伝子非導入血管、LacZ 導入血管、E-NTPDase 導入血管で有意な差は認められなかった。一方、ATP, ADP に対する収縮反応は、LacZ 導入血管では遺伝子非導入血管と有意差がみられないのに対して、E-NTPDase 遺伝子導入血管では ATP, ADP に対する血管収縮能が、LacZ 導入血管に比してそれぞれ最大収縮濃度で $50.0\% \pm 22.0$, $70.0\% \pm 20.0$ (n=5) と有意に低下した。

結論: 当初目的とした結果は得られなかったが、E-NTPDase が傷害動脈壁において ATP, ADP に対する血管収縮を抑制することが示された。以上のことから、PTA 後などの傷害血管において、血小板凝集とともに血管

収縮を抑制することが閉塞性血栓形成の抑制に重要であることが示唆された。