

循環器疾患のリスク評価と治療に関する新しいアプローチ

研究の概要

高齢化社会が急速に進行している我が国においては今後、循環器疾患の益々の増加が予測される。本研究においては循環器疾患のリスク因子の評価および内因性防御因子の修飾や遺伝子導入などによる治療の可能性を検討することを目的とする。

リスクとしての神経体液生因子に関して、腎生検施行例の ACE 遺伝子多型と腎の組織障害を検討すると、組織学的レベルにおいても ACE 遺伝子多型の DD 型が臓器障害進展のリスクとなることが示唆された。また、慢性血液透析患者を対象とした追跡調査では ACE 遺伝子多型の D アレルが心血管疾患発症の危険因子であることが示された。喫煙常習者における検討では喫煙が血圧上昇と交感神経刺激を伴い心血管疾患のリスクであることが明確にされた。

リスクとしてのインスリン抵抗性に関しては、インスリン抵抗性高血圧においてレプチンがインスリン抵抗性や高血圧の発症に関与することが示唆された。また、非糖尿病患者を対象とした検討ではインスリン抵抗性が冠動脈の内皮依存性血管拡張能を抑制し、冠血流量に影響を与える因子であった。また、糖尿病患者と同等の冠動脈病変の重症化が高インスリン血症を示す非糖尿病患者でみられたことより、インスリン抵抗性と高インスリン血症が直接冠動脈疾患に関わっていることが示唆された。

リスクとしての心肥大に関しては、高血圧患者および正常血圧者を対象として冠血流量を測定すると共に、心エコー法により求めた左室収縮機能と拡張機能との関係を検討した。高血圧患者では心肥大の進展と共に、単位心筋当たりの冠血流量と冠予備能が低下し、この単位心筋当たりの冠血流量の低下が左室収縮能および拡張能の障害を規定する最も重要な因子であった。

リスクとしての血管内皮機能障害に関しては、血管内皮細胞で産生されるエンドセリン (ET)、一酸化窒素 (NO)、アドレノメデュリン (AM) に注目し、動脈硬化と ET、虚血・再灌流障害と NO、アポトーシスと AM について検討した。高血圧や糖尿病や高脂血症では ET の血管収縮作用が増強され動脈硬化に関与していることが示唆された。また、内皮由来の NO の減少が虚血性腎不全の病態に関与していること、AM は血管内皮細胞のアポトーシスを抑制し、細胞の生存因子として作用していることが示唆された。

循環器疾患の遺伝子治療に関しては、閉塞性動脈硬化症などに対する血管新生による治療を目的として血管新生因子である肝細胞増殖因子 (HGF) の血管新生に及ぼす効果を下肢虚血モデル動物 (ウサギ、ラット) を用いて検討した。下肢虚血モデルに HGF を動脈内投与すると血管の新生と共に筋肉壊死像の軽減が認められ HGF による難治性血管疾患に対する遺伝子治療の可能性が明らかにされた。

島本 和明	札幌医科大学医学部 教授	リスクとしてのインスリン抵抗性
日和田邦男	愛媛大学医学部 教授	リスクとしての心肥大
平田 恭信	東京大学医学部 講師	リスクとしての血管内皮機能障害
荻原 俊男	大阪大学医学部 教授	循環器疾患の遺伝子治療

研究報告

本研究においては循環器疾患のリスク評価と治療に関する新しいアプローチというテーマで5名の班員がそれぞれのテーマを分担して研究を行った。従って、本研究報告もそれぞれのテーマに分けて記載することにする。

1. リスクとしての神経体液性因子（松岡）

I. 研究目的

ACE 遺伝子多型の DD 型が虚血性心疾患や腎障害のリスクであると指摘されているが、組織学的レベルにおいても DD 型が臓器障害の進展のリスクとなりうるかどうかを腎生検を施行した症例において検討した。また、維持血液透析患者の心血管疾患発症のリスクに ACE 遺伝子多型が関与するかどうかを前向きに検討した。更に、常習喫煙者の禁煙が血圧および交感神経活性にどのような影響を及ぼすのかを 24 時間にわたり血圧と心拍数を測定することにより評価した。

II. 研究計画および材料と方法

研究 1. 非糖尿病性腎疾患患者で腎生検を施行した 56 例を対象に ACE 遺伝子多型を調べると共に腎の血管系の組織像も検討した。

研究 2. 維持透析患者 534 例を対象として ACE 遺伝子多型を決定すると共に、2 年間にわたる追跡調査を行って心血管疾患の発症、死亡等との関係について検討した。

研究 3. 1 日 10 本以上（平均 29 本）の喫煙習慣を有する健常男性 39 名（平均年齢 33 歳、喫煙歴は平均 14 年）を対象に各 1 週間の喫煙期と禁煙期を無作為交叉法にて設定した。各期の最終日に携帯型自動血圧心拍計を用いて血圧を 30 分間隔で、心電図を連続で 24 時間記録した。また、安静空腹臥位の状態で血中カテコラミン等を測定した。

III. 研究成果

研究 1. 腎生検 56 例中 II 型は 21 例、ID 型は 22 例、DD 型は 13 例であった。各群間で血圧、腎機能（血清クレアチニン値）には差がなかった。DD 型で腎小葉間動脈の内膜の肥厚が認められた。

研究 2. 維持透析患者 534 例のうち II 型は 208 例、ID 型は 245 例、DD 型は 81 例であった。致死性および非致死性の心血管疾患の発症は II 型 35 例 (16.8%)、ID 型 67 例 (27.3%)、DD 型 30 例 (37.0%) と D アレルは有意な心血管疾患のリスク要因であった ($p=0.004$)。

研究 3. 正常血圧の喫煙常習者は 1 週間の禁煙により 24 時間血圧と心拍数は有意に低下した。血漿ノルエピネフリンとエピネフリンは禁煙により低下し、心拍変動解析による自律神経の評価では禁煙により交感神経活性は抑制され、副交感神経活性は亢進した。

IV. 考察

ACE 遺伝子多型の D アレルは組織学的にも臓器障害のリスクであることが示された。末期腎不全による慢性血液透析患者数はわが国では増加の一途をたどっているが、維持透析患者の 5 年生存率は 59% であり、死亡原因の 43% は脳血管障害を含む心血管系疾患が占める。維持透析患者における心血管疾患のリスクを明らかにすることは今後の治療方針を決定する上で極めて重要である。

喫煙は動脈硬化のリスクではあるが高血圧はおこさないとされている。しかしながら、24 時間血圧で評価すると喫煙により交感神経は刺激され、血圧は明らかに上昇している。24 時間血圧の方が随時血圧よりも臓器障害や合併症発症により密接に関係しているとされているのでこの様な点からも循環器疾患のリスクとしての喫煙は重要である。

2. リスクとしてのインスリン抵抗性 (島本)

I 研究目的

近年、動脈硬化性疾患の危険因子である高血圧・糖尿病・脂質代謝異常・肥満の共通の背景因子として、インスリン抵抗性の存在が注目されている。一方で、脂肪細胞由来のレプチンが肥満、高血圧、糖・脂質代謝異常に関連する可能性も指摘されているが詳細は明らかではない。またインスリン抵抗性は冠動脈硬化性疾患にも深く関わるとされ、糖尿病においては血管内皮依存性の冠動脈拡張能障害が存在することも報告されている。そこで、(1)一般住民検診においてレプチンと血圧との関連を解析し、高血圧発症にインスリン抵抗性、高レプチン血症がいかに関与するか。(2)インスリン抵抗性と冠動脈疾患の関連と、(3)その機序として、インスリン抵抗性と内皮依存性の冠血管拡張能の関わりについて検討する。

II 研究計画および材料と方法

研究 1. 北海道の 2 つの町の住民検診において糖尿病および高血圧の治療歴のあるものを除く 65 歳以下の男性 (57 ± 8 歳) 167 例、女性 (55 ± 8 歳) 263 例を対象に、収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP)、Body Mass Index (BMI)、空腹時血糖 (FBS)、空腹時インスリン値 (FIRI)、および空腹時血中レプチン (LEP) を測定した。またインスリン抵抗性の指標として FIRI に加えて Homa 指数 (HOMA) を算出し、 $HOMA < 1.73$ をインスリン感受性 (S)、 $HOMA \geq 1.73$ をインスリン抵抗性 (R) と定義し、 $SBP \geq 140\text{mmHg}$ あるいは $DBP \geq 90\text{mmHg}$ を高血圧 (HT)、それ以外を正常血圧 (NT) として、4 群 (SNT, RNT, SHT, RHT) 間で上記パラメーターを対比検討した。

研究 2. 対象は冠動脈疾患で当科入院症例 1,392 例のうち冠動脈造影上冠動脈全枝について複数方向で良好に観察され半定量評価を行った連続 216 例 (男性 175 例、女性 41 例)。全例に 75g 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) を施行し、負荷前、負荷後 30 分・60 分・90 分・120 分に血清ブドウ糖値および血漿インスリン濃度 (IRI) を測定した。その結果より対象

を糖尿病治療群 37 例、耐糖能障害（未治療糖尿病と耐糖能異常例）群 48 例および耐糖能正常例 131 例の各群に分け冠動脈造影上の狭窄病変の形態を検討した。さらに、OGTT 時、上記の採血を施行した耐糖能正常者のうち IRI を測定し得た 64 例を対象に、当教室の疫学研究による OGTT の 120 分 IRI の mean+1.5SD (43.4mU/l) を判別値として高インスリン血症例をインスリン抵抗性群、判別値以下を非インスリン抵抗性群に分類し比較検討した。

研究 3. 糖尿病のない当院入院患者 14 名において、冠動脈造影にて有意狭窄を有さない左冠動脈回旋枝にドップラーフローワイヤーを挿入し、パパベリン（10mg）及び段階的アセチルコリン（1, 3, 10mg/ml/min）の冠動脈内注入下での冠血流量変化率（%VFI）を測定した。インスリン感受性の評価としては、既報の euglycemic hyperinsulinemic glucose clamp (GC) 法を 2 時間施行しインスリン感受性の指標である M 値を測定した。当科既報の基準により、患者は M 値<167.3mg/m²/min をインスリン抵抗性群（IR；n=6）とし、対照のインスリン非抵抗性群（non-IR；n=8）と比較検討した。

III 研究成果

研究 1. 北海道の 2 つの町の住民検診では、男女とも正常血圧者の約 20%、高血圧の約 40%がインスリン抵抗性群に属した。全例での検討では、LEP は単相関分析で男女とも SBP、DBP、BMI、FIRI、HOMA と有意な正の相関を認めた。BMI と年齢を補正した偏相関分析では男性において LEP と DBP、LEP と FIRI、女性において LEP と SBP および DBP、LEP と FIRI および HOMA に有意な正の相関が保たれていた。4 群間の対比では、男女とも BMI は SNT に比し RNT で、SHT に比し RHT で有意に大であった。女性においては LEP はインスリン感受性群（SNT：8.2±0.4ng/ml、SHT：9.4±0.8）に比しインスリン抵抗性群（RNT：18.1±1.6、RHT：16.0±1.4）で高血圧の有無に関わらず同程度に高かったが、男性においては LEP は RHT（7.9±0.9ng/ml）で他群に比し有意に高く、SNT（3.8±0.2）、RNT（4.9±0.6）、SHT（4.5±0.6）群間に差を認めなかった。BMI、年齢、HOMA を補正した偏相関分析では男性でのみ LEP と DBP に有意な正の相関が保たれ、BMI、年齢、血圧を補正した偏相関分析では LEP と HOMA に女性でより強い正の相関が保たれていた。

研究 2. 糖尿病治療群（67.6%）は耐糖能障害群（43.8%）や耐糖能正常群（40.5%）に比して冠動脈多枝病変の頻度が高く、同様に冠動脈狭窄指数や石灰化指数も糖尿病治療群で有意に高値であった。耐糖能正常群においても OGTT 上、インスリン抵抗性の指標としての高インスリン血症（120 分インスリン値>43.4mU/l）が 50%で認められ、かかる群では冠動脈多枝病変の割合が多く（59.4%vs. 25.0%、p<0.05）、狭窄指数は有意に高値を示した。

研究 3. IR、non-IR において、パパベリンに対する %VFI は有意な差を認めなかった。一方、アセチルコリン 1、3mg/ml/min の低用量投与下での %VFI の増加率は IR では non-IR に比して有意に低値であり、その変化度も用量依存的であった。更に、アセチルコリン 1mg/ml/min 投与下での %VFI の増加率と M 値の間には有意な正の相関関係が認められた。

IV 考察

本研究ではインスリン抵抗性高血圧において、高レプチン血症が肥満とは独立して存在することが示唆された。男性においてインスリン感受性の指標で補正しても血圧とレプチ

ンの関係が保持されており、高レプチン血症の成因に肥満および高インスリン血症以外の因子が関与することを強く示唆した。また、男性のインスリン抵抗性高血圧患者でのみレプチンが高値を示した点は、高血圧自体も高レプチン血症を惹起しうる可能性を示すと考えられ、レプチンの調節には脂肪量、インスリン以外に他の血圧調節因子が関与する可能性を示唆した。これらのことから、レプチンは肥満に独立してインスリン抵抗性、高血圧発症に関連することが示唆された。

一方で糖尿病患者では冠動脈多枝病変の頻度が高かったが、耐糖能は正常でありかつ高インスリン血症を伴う群でも、糖尿病群と同等の冠動脈病変の重症化を認めた。また、非糖尿病患者においてもインスリン抵抗性の存在は冠動脈における内皮依存性の血管拡張能を低下させ、冠血流量に影響を与える因子である可能性が示唆された。すなわち、インスリン抵抗性の冠危険因子としての機転に内皮依存性冠血管拡張能の低下が関与することが考えられた。本研究では対象者として糖尿病を有している患者は入っておらず、糖毒性の影響を除外しても、インスリン抵抗性の程度そのものが内皮依存性の冠血管拡張能を規定し得ることの一つの証左と考えられた。これらのことから、インスリン抵抗性および高インスリン血症は、糖尿病とは独立して冠動脈硬化の発症・重症度にかかわり、この機転に内皮依存性冠血管拡張能の低下が関与することが示唆された。

3. リスクとしての心肥大（日和田）

I 研究目的

高血圧患者において、心肥大は脳、心、腎といった標的臓器の障害の独立したリスクであることは現在広く認められている。心臓に関してみれば、心肥大は心筋梗塞、心不全、突然死の重大なリスクである。一方、老年者高血圧においては心肥大は脳卒中の重要なリスクでもある。我々はこれまで高血圧と臓器障害の関係について研究を進めてきたが、心肥大が何故そのように標的臓器障害の大きなリスクとなるかは不明である。高血圧心の心機能に関する研究より、心肥大の存在下では左心機能が障害されることは判明している。高血圧心における心機能障害は、心拍出量の低下をもたらし、各標的臓器への臓器血流の低下を介して臓器障害に関与することが予想される。したがって、心肥大に伴う心機能障害の機序を明らかにすることは、心肥大と標的臓器障害の関係を明らかにする上でも重要である。また、臨床的に心肥大に伴う心機能障害の機序が解明されることにより、心肥大を予後悪化の主たる原因とする心疾患の有力な治療戦略を立てることが出来る。

II 研究計画および材料と方法

心肥大に伴う心機能障害の進展には心筋虚血の関与が考えられることより、非観血的に冠血流量を測定し、高血圧患者の心肥大の進展に伴う単位心筋当りの冠血流量の変化を明らかにすることを試みた。なお、冠血流量の測定はタリウム心筋シンチグラフィと心プール心筋シンチグラフィを用いて検討した。次に、心肥大を伴う高血圧患者に認められる左室収縮、拡張機能障害と冠血流量の関連を明らかにすることを試みた。高血圧患者を心肥大を有さない者、心肥大を有する者、心不全の既往を有する者に分類し、タリウム心筋シンチグラフィを用いた冠血流量の非観血的測定と心エコー法を用いた左室収縮、拡張機能の測定を同時に実施した。最後に、高血圧に伴う心不全発症時期を非観血的に予測可能

か否かを検討した。すなわち、高血圧性心肥大から心不全に移行する限界点をタリウム心筋シンチグラフィーを用いて非観血的に測定した単位心筋当たりの冠血流量で予測できるか否かを検討した。

III 研究成果

タリウム心筋シンチグラフィーより非観血的に求めた冠血流量は、心臓カテーテル検査時にドプラー・フローワイヤーを用いて観血的に測定した冠血流量と良好に相関することを明らかにした。また、心エコー法より求めた左室心筋重量とタリウム心筋シンチグラフィーより求めた冠血流量より単位心筋当たりの冠血流量を算出したが、心肥大の進展とともに単位心筋当たりの冠血流量が低下し、心筋虚血の状態にあることを明らかにした。

高血圧患者および正常血圧対照者を対象として、タリウム心筋シンチグラフィーを施行し、非観血的に冠血流量を測定し、心エコー法により求めた左室収縮機能、左室拡張機能との関係についての検討より、左室収縮機能および左室拡張機能は単位心筋当たりの冠血流量と強く相関することが明らかになった。すなわち、左室収縮機能障害および左室拡張機能障害を規定する最も重要な因子は単位心筋当たりの冠血流量であることが判明した。

心不全の既往を有する高血圧患者の左室心機能と冠血流量を測定した結果、心不全の既往の有する高血圧患者では、心不全の既往のない高血圧患者、正常血圧対照者と比較し、有意な単位心筋当たりの冠血流量の低下が認められた。すなわち、高血圧性心不全発症には単位心筋当たりの冠血流量低下が強く関与することが示唆された。

IV 考察

高血圧患者では、心肥大の進展とともに単位心筋当たりの冠血流量および冠予備能が低下し、日常生活で心筋虚血に陥る機会が増加することが予想される。この心肥大の進展に伴う単位心筋当たりの冠血流量低下が左室収縮機能障害および左室拡張機能障害を規定する最も重要な因子であることが明らかになった。したがって、心肥大を有する高血圧患者における心機能障害は、心拍出量の低下をもたらし、各標的臓器への臓器血流の低下を介して標的臓器障害と密接に関係しているものと思われる。高血圧患者の治療にあたっては、降圧のみにとらわれず、心肥大の退縮を考慮することがきわめて重要である。

4. リスクとしての血管内皮機能障害（平田）

I 研究目的

血管内皮細胞からはエンドセリン（ET）などの強力な血管収縮物質や一酸化窒素（NO）やアドレノメデュリン（AM）などの血管拡張物質が同時に分泌されている。これらは血管緊張度の調節ばかりでなく、動脈硬化あるいは血管リモデリングにも関わっている。本研究では 1) 動脈硬化モデルラットにおける ET の作用、2) 虚血・再灌流による細胞障害時の NO の役割、ならびに 3) 血管内皮細胞のアポトーシスにおける AM の役割を検討した。

II 研究計画および材料と方法

研究 1. Dahl 食塩感受性（S）ラット、糖尿病（DM）ラットおよび高脂血症ラットの腎を単離灌流し、ETB 受容体刺激薬である BQ-3020 およびアセチルコリン（ACh）の投与時の静

脈還流液中の NO 濃度（化学発光法）と腎動脈灌流圧を同時に測定した。また内皮型 NO 合成酵素（eNOS）、および ETB 受容体を組織化学的に検討した。

研究 2. ラットの虚血性急性腎不全を作成し、それらの単離灌流腎において、ACh による腎灌流圧の変化と NO 遊離量を測定した。この時、tetrahydrobiopterin (BH4)、BH4 の合成阻害薬である DAHP あるいは NO 合成阻害薬である L-NAME などを投与してその効果を調べた。また eNOS 蛋白、NOS 活性、腎機能の測定および腎臓の組織学的検討も行った

研究 3. ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を 2% の FBS を含む EGM-2 培地で培養した。アポトーシスは血清除去 EBM 培地で AM の存在下、非存在下で 24~36 時間培養して誘発した。また同様の無血清培地で 48 時間培養した際の細胞死の割合を MTS アッセイで調べ、AM 投与の影響を検討した。アポトーシス関連蛋白である Bcl-2、Bcl-x や Bax は Western blot 法にて測定した。HUVEC 培養上清中の NO 濃度は NO の蛍光標識物質である DAF を用いて測定した。

III 研究成果

研究 1. Dahl S ラットでは R ラットに比し収縮期血圧が高く、低濃度の BQ3020 の投与では R ラット腎では有意に灌流圧が低下したのに対し、S ラット腎では灌流圧が上昇した。高濃度では R ラットでも灌流圧を上昇させたが、その増加は S ラットに比し軽度であった。BQ3020 により NO 遊離は用量依存性に増加したが、その程度は S ラットで有意に減弱していた。同様の現象が糖尿病 WKY および SHR ならびに高脂血症ラットでも見られた。S および R ラットの腎小葉間動脈の血管内皮の eNOS の染色強度は S ラットで R ラットに比し、有意に減弱していた。糖尿病 WKY、糖尿病 SHR、および高脂血症ラットにおける eNOS の免疫反応性の明らかな変化は見られなかった。高血圧、糖尿病、および高脂血症ラットの腎における ETB 受容体の免疫反応性は、S ラット、糖尿病ラットや高脂血症ラットで対照ラットに比し有意に減弱していた。

研究 2. ラットの虚血・再灌流による急性腎不全モデルにおいて、ACh 刺激時の腎血管の内皮依存性拡張および NO 遊離量は減弱していた。BH4 の前投与は虚血性急性腎不全ラットの腎血管の内皮機能を著明に改善した。内因性 BH4 の産生阻害薬である DAHP の前投与は虚血性急性腎不全ラットの腎血管の内皮機能を減弱しなかったが、対照腎の内皮機能を著明に減弱した。虚血性急性腎不全腎では内皮型 NOS 蛋白ないし構成型 NOS 活性が減少していたが、BH4 により有意に改善した。BH4 投与ラットでは腎機能の低下および尿細管障害も軽減していたが、L-NAME 投与ラットでは無処置の虚血ラットより腎障害は顕著だった。

研究 3. 無血清培地中の HUVEC は細胞が萎縮し核が濃縮し、アポトーシスに特徴的な形態を示した。細胞死は AM の投与により $10^{-7}M$ 以上で有意に抑制された。この時 AM はアポトーシス蛋白である Bcl-x や Bcl-2 を変化させなかった。また db-cAMP、8-Br-cAMP あるいは forskolin はいずれも無血清による HUVEC のアポトーシスを抑制しなかった。一方、L-NAME の存在下では AM の抗アポトーシス作用は消失した。さらに $10 \mu M$ の SNP にも同様の抗アポトーシス作用を認めた。 $0.1 \mu M$ の AM 投与時の培養上清中の DAF 蛍光濃度は対照の 28.8 ± 1.4 から 33.1 ± 0.7 ($p < 0.05$) と増加し、 $10 \mu M$ の SNP では 40.5 ± 1.0 ($p < 0.01$) にまで増えた。

IV 考察

- 1) 動脈硬化症の原因疾患である高血圧、糖尿病、高脂血症では血管内皮上の ETB 受容体の減少を伴い、ET の血管収縮作用が増強され、本症における血管機能の異常に関与している可能性がある。
- 2) 内皮由来 NO の減少が虚血性急性腎不全の病態形成に重要な役割を果たしており、このことが内皮障害の進行した高血圧において虚血による組織障害が生じやすい一因と考えられる。また、BH4 の産生障害が虚血による内皮由来 NO の減少に関係する可能性がある。
- 3) AM は細胞の生存因子として作用し、様々な病的状態では AM の分泌増加により、障害因子に対して組織保護的に働く可能性がある。したがって AM はその循環調節作用以外の機序によっても血管壁のリモデリングに抑制的に作用している可能性がある。

5. 循環器疾患の遺伝子治療（荻原）

I 研究目的

ビュルガー（バージャー）病や閉塞性動脈硬化症に代表される末梢性血管疾患の患者は、間歇性跛行、安静時疼痛、下肢の組織障害（潰瘍・壊死）などの臨床症状を呈し、薬物治療の恩恵を受けられず肢趾切断となる患者が後を経たない。このような難治性循環器疾患の一つである Peripheral Vascular Disease（末梢性血管疾患）を始めとする動脈硬化症における遺伝子治療は、最近その成果が期待されている。現在、米国におき VEDF 遺伝子による閉塞性動脈硬化症に対する遺伝子治療の臨床試験は、最も成功している遺伝子治療と見なされている。動脈硬化症における遺伝子治療で臨床試験が開始されたものは、末梢性血管疾患（閉塞性動脈硬化症およびバージャー病）、経皮的血管拡張術後再狭窄、グラフト再不全（再狭窄）心筋梗塞、狭心症など多岐にわたっている。本研究では、難治性循環器疾患の治療への応用を目的として、血管新生因子である肝細胞増殖因子（HGF）を用いて下記の実験を行った。

II 研究計画

まず、組み換え型ヒト HGF の血管新生作用を検討するために、ウサギ下肢虚血モデルを作成し、動脈内へ HGF500 μ g を投与した。投与後、30 日後に血管造影を行い、血管数を計測すると共に、筋肉の壊死などを検討した。更に、組み換え型 HGF2mg/day の 5 日間の点滴静脈内投与をウサギ下肢虚血モデルへ行い、同様の検討を行った。

更に、ヒト HGF 遺伝子導入による効果を検討するために、ラット下肢虚血モデルを作成し、HVJ-リポソーム法（HGF プラスミド 20 μ g）及びプラスミド DNA（100 - 500 μ g）のみにて、下肢筋肉内へ遺伝子導入を行った。導入後、経時的に血流をレーザードップラー血流計にて測定、毛細血管数をアルカリフォスファターゼ染色にて測定した。

III 研究成果

大腿動脈外側枝摘出により作成したウサギ下肢虚血モデルへのヒト組み換え型 HGF の 2 回（10 日及び 12 日後）動脈内投与は、500 μ g の濃度にて投与後 10 日及び 30 日後有意な血管数の増加を血管造影上もたらした。血管造影にてこれらの血管は、新生血管に特異的な形状を示しており、HGF による直接の血管新生作用が明らかになった。また、ウサギ下

肢筋肉の組織学的検討では、対照群では正常ウサギに比較して著明な筋肉壊死像が観察されるのに対し、HGF 動注群では筋肉の壊死像の軽減が観察された。更に、ヒト閉塞性動脈硬化症患者に類似の所見として爪の脱落や下肢の進展阻害が対照群では見られたのに対し、HGF 群では見られず、HGF による血管新生が病態も改善していることが明らかになった。同様の効果は、組み換え型 HGF の単回投与においても確認された。更に、組み換え型 HGF の静脈内投与の血管新生効果も検討した。5 日間の連続静脈内投与において動脈内投与同様に有意な血管新生効果を示したが、投与量は動脈内投与に比べ約 20 倍必要であった。

ヒト HGF 遺伝子導入による血管新生作用も検討を行った。まず、筋肉内投与によるプラスミドによる遺伝子導入発現は、b-ガラクトシダーゼ遺伝子導入による染色及びルシフェラーゼ遺伝子導入によるルシフェラーゼ活性により確認された。ウイスターラットの下肢虚血モデルを作成し、10 日後に HVJ-リポソーム法により 20 μ g のヒト HGF 遺伝子を虚血下肢に筋肉内投与した。遺伝子導入によるヒト HGF 産生は、正常の下肢筋肉中の HGF とほぼ同量であった(ヒト HGF 導入群:1.8+0.7ng/g tissue、対照群:not detected、P<0.01)。投与後、3・5 及び 7 週間後にレーザードップラーにて下肢血流を測定した結果、ヒト HGF 遺伝子導入群で有意な血流増加を認めた。組織学的にも、毛細血管の有意な増加を HGF 遺伝子導入群で認めた。興味深いことに、同様の結果はヒト HGF プラスミド DNA のみの投与(250 及び 50 μ g)によっても確認された。ウサギ下肢閉塞性動脈硬化症モデルにおいても、ヒト HGF プラスミド DNA の投与により、著明な血管新生像が観察され、HGF による遺伝子治療の可能性が明らかになった。一方、遺伝子治療と組み換え型タンパクによる血管新生作用の比較も行った。その結果、ラット下肢虚血モデルへの組み換え型 HGF 投与も、1 週間以内の急性期では HGF 遺伝子導入よりむしろ強い血流増加作用を示した。しかし、3 週間をこえると遺伝子導入による血流増加作用が、組み換え型 HGF より強く、慢性期でも同様に推移する。同様の現象は VEGF においても組み替え型と遺伝子導入群で観察されている。これらの結果より、末梢血管疾患では急性効果より慢性効果が重要であるため、組み替え型より遺伝子導入が優れていると考えられる。更に、急性の血管拡張反応は、末梢への血流増加による組織血液量の減少などの副作用惹起の可能性があり、むしろ望ましくない。事実、組み換え型 VEGF の静脈投与は低血圧によるショック症状を惹起しうることも報告されており、急性期の副作用の軽減の観点からも遺伝子導入が望ましいと考えられた。

IV 考察

我々は、本研究で明らかにされた様に米国で血管新生治療に用いられている VEGF に代わり HGF を用いて、治療的血管新生療法の効果を示した。一方、虚血により内皮細胞及び平滑筋細胞において局所 HGF 産生は著明に減少した。虚血による HGF 産生低下は、初期には HGF の強力な産生因子である cAMP の低下により、長期的には HGF の強力な抑制因子である TGF- β の活性化によると考えられる。事実、内因性の血管壁 HGF は閉塞性動脈硬化症患者の血管では正常血管に比べ著明に減少していた。このことは、障害血管を救うのに HGF 量が十分でないことを示している。従って、HGF の補充は閉塞性動脈硬化症患者において側副血行を促進する事が期待される。これらの結果に基づき、1998 年末我々は大阪大学附属病院に、「HGF 遺伝子を用いた血管新生による閉塞性動脈硬化症の治療 (TREAT-HGF)」に関する試験計画書を提出した。本臨床研究でのヒト HGF 遺伝子導入は、前臨床動物試験

と同様にヒト HGF プラスミドの筋肉内への導入により行う。1999 年 11 月大阪大学遺伝子治療臨床研究審査委員会により承認され、現在文部・厚生両省において審議されている。

既に米国で行われている VEGF による遺伝子治療と比較して HGF による血管新生療法の利点は、以下の点が上げられる。1) 透過性を亢進する VEGF の副作用である浮腫が HGF では起こらない可能性がある。2) HGF の特異的受容体である c-met は虚血により増加することが報告されており、HGF による血管新生を増す可能性がある。3) HGF によりコラーゲン分解能を持ち、マトリックスを分解する MMP-1 やプラスミン活性化能を持つ uPA が増加する。uPA は不活化 HGF を活性化する事が知られており、プロ HGF の活性化は uPA を更に活性化する。HGF により局所で増加する uPA は HGF の利用率を増すことにより組織循環を増すことが期待される。4) HGF は直後の血管新生作用と平滑筋細胞における VEGF 遺伝子発現増加を介する間接的な血管新生作用を持ち、VEGF 以上に強力な血管新生作用を持つ。5) 内因性の血管壁 HGF 低下は HGF の安全域を高めると考えられる。6) HGF の血管新生作用は、VEGF 以上に強力である。今後、HGF 遺伝子による治療的血管新生療法の有効性は、ヒト臨床研究において確認していく予定である。HGF プラスミドによる血管新生療法は、末梢性血管疾患のみならず心筋梗塞などの虚血性疾患に対しても治療効果が最も期待される遺伝子治療である。しかし、未だ解決すべき多くの問題が残っている。今後安全で効率の良いベクターの開発と組織への選択的導入を可能にする遺伝子導入用カテーテルなどの器具の開発が不可避である。

V 研究成果の発表

1. Minami J, Ishimitsu T, Higashi T, Numabe A, Matsuoka H. Comparison between cilnidipine and nisoldipine with respect to effects on blood pressure and heart rate in hypertensive patients. *Hypertens Res* 21:215-219, 1998.
2. Minami J, Ishimitsu T, Kawano Y, Matsuoka H. Effects of amlodipine and nifedipine retard on autonomic nerve activity in hypertensive patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:572-576, 1998.
3. Minami J, Ishimitsu T, Kawano Y, Numabe A, Matsuoka H. Comparison of 24-hour blood pressure, heart rate, and autonomic nerve activity in hypertensive patients treated with cilnidipine or nifedipine retard. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:331-336, 1998.
4. Teranishi M, Ono H, Ishimitsu T, Matsuoka H. The insertion/deletion (I/D) ACE gene polymorphism affects microvascular structure of the kidney in patients with non-diabetic renal disease. *J Hypertns*, 17:351-356, 1999.
5. 石光俊彦、太尾泰雄、細谷和良、斉藤真由美、谷中肇子、鈴木武志、稲田英毅、太田智、吉井正義、明石真和、南順一、小野英彦、馬場友三郎、大場秀一、橋本玄之、八木繁、松岡博昭：慢性血液透析患者における心血管疾患の発生と ACE 遺伝子多型の関係について。透析会誌 34:41-47, 2001
6. 曳田信一、土橋和文、中田智明、浦 信行、島本和明：冠動脈硬化病変における糖代謝異常およびインスリン抵抗性の意義：半定量的冠動脈造影による検討。 *J Cardiology* 32:291-300, 1998

7. 老松 寛、齊藤重幸、浦 信行、島本和明：インスリン抵抗性の簡便な臨床評価法に関する検討—本態性高血圧症例での検討— 糖尿病 43; 205-213, 2000
8. Takizawa H, Shimamoto K, et al: Plasma Leptin Levels Are Associated with Blood Pressure Independent of Resistance. (submitting)
9. 高木 覚、齊藤重幸、島本和明：北海道農村部における耐糖能異常の生命予後に及ぼす影響—端野・壮瞥研究（18年間の前向循環器疫学調査）から—。糖尿病 41, 257-265, 1998
10. 高木 覚、齊藤重幸、島本和明ら：高齢者高血圧の脳・心血管合併症と長期予後—北海道循環器疫学調査の成績より— 血圧 5, 749-754, 1998
11. 高木陽一、齊藤重幸、島本和明ら：高血圧の進展に関わる耐糖能異常の役割—端野町・壮瞥町研究より— 日老医誌 35, 830-837, 1998
12. 坂本賢一、齊藤重幸、島本和明ら：高齢者における動脈硬化危険因子集積の意義：端野・壮瞥研究より 日老医誌 35, 382-388, 1998
13. 齊藤重幸、島本和明ら：糖尿病の頻度と生命予後—端野町・壮瞥町研究および循環器疾患基礎調査成績（NIPPON DATA 90）解析成績より。日循協誌 33, 140-145, 1998
14. Hamada M, Kuwahara T, Shigematsu Y, Kodama K, Hara Y, Hashida H, Ikeda S, Ohtsuka T, Nakata S, Hiwada K: Relation between coronary blood flow and left ventricular mass in hypertension: noninvasive quantification of coronary blood flow by thallium-201 myocardial scintigraphy. Hypertens Res 21:227-234, 1998.
15. Sasaki M, Hamada M, Hiwada K: Effects of coronary blood flow on left ventricular function in essential hypertension. Hypertens Res 23:239-245, 2000.
16. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T, Omata M: Effects of hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia on endothelin type B receptor-mediated nitric oxide release from rat kidney. Circulation 99:1242-1248, 1999
17. Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T, Omata M: Role of nitric oxide-cGMP pathway in adrenomedullin-induced vasodilation in rat. Hypertension 33: 689-693, 1999
18. Nagata D, Hirata Y, Suzuki E, Kakoki M, Hayakawa H, Goto A, Ishimitsu I, Minamino N, Ono Y, Kangawa K, Matsuo H, Omata M: Hypoxia-induced adrenomedullin production in the kidney. Kidney Int 55:1259-1267, 1999
19. Suzuki E, Nagata D, Kakoki M, Hayakawa H, Goto A, Omata M, Hirata Y: Molecular mechanisms of endothelin-1-induced cell cycle progression: Involvement of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase at distinct points. Circ Res 84:611-619, 1999
20. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Nagata D, Tojo A, Nishimatsu H, Kikuchi K, Nagano T, Omata M: Effects of tetrahydrobiopterin on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol

11:301-309, 2000

21. Suzuki E, Nagata D, Yoshizumi M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y: Reentry into the cell cycle of contact-inhibited vascular endothelial cells by a phosphatase inhibitor: possible involvement of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:3637-3644, 2000
22. Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, Sugiura S, Kojima H, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M, Nagai R, Hirata Y: Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cGMP-independent mechanism. *Hypertension* 36: 83-88, 2000
23. Hirata Y, Kakoki M, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T, Omata M: Hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and endothelin B receptor-mediated renal nitric oxide release-Response. *Circulation* 101: e228-e229, 2000
24. Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Yoshizumi M, Mano T, Walsh K, Sata M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y: Cyclin A downregulation and p21cip1 upregulation correlate with GATA-6-induced growth arrest in glomerular mesangial cells. *Circ Res* 87: 699-704, 2000
25. Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Satonaka H, Goto A, Omata M, Hirata Y: Transcriptional activation of the cyclin D1 gene is mediated by multiple cis elements including SP1 sites and a cyclic AMP responsive element in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276:662-669, 2001
26. Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M: Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nature Med* 7:382-383, 2001
27. Kojima H, Hirotsani M, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T: Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on Rhodamine Chromophore. *Anal Chem.*, in press.
28. Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Takeshita S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T: Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as "cytokine supplement therapy". *Hypertension* 33: 1379-1384, 1999
29. Hayashi S, Morishita R, Nakamura S, Yamamoto K, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T: Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral arterial disease: down-regulation of HGF in response to hypoxia in vascular cells. *Circulation* 100: II 301-II 308, 1999
30. Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, Kida I, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T: Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, etc. *Gene Therapy* 7: 412-

427, 2000

31. Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, Moriguchi A, Sakonjo H, Shokei-Kim, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T: Potential contribution of a novel anti-fibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamster. *Circulation* 102:246-252, 2000
32. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Kim S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T: Anti-apoptotic action of hepatocyte growth factor (HGF) through mitogen-activated protein kinase on human aortic endothelial cells. *J Hypertens* 18:1411-1420, 2000
33. Hayashi K, Nakamura S, Morishita R, Moriguchi A, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Sakai N, Ogihara T: In vivo transfer of human hepatocyte growth factor gene accelerates re-endothelialization and inhibits neointimal formation after balloon injury in rat model. *Gene Therapy* 7:1664-1671, 2000
34. Nakagami H et al: Phosphorylation of p38MAP kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells. *Diabetes* (in press)