

血行再建術後吻合部内膜肥厚抑制を目的とした遺伝子治療の基礎的検討

【05807102】

平成7年度科学研究費補助金【一般研究（c）】研究成果報告書

平成 9 年 3 月



研究代表者 稲葉雅史
(旭川医科大学医学部講師)

血行再建術後吻合部内肥厚抑制を目的とした
遺伝子治療の基礎的検討

【05807102】

平成7年度科学研究費補助金【一般研究（C）】研究報告書

平成9年3月

研究代表者 稲葉雅史

(旭川医科大学第一外科講師)

はじめに

種々の血行再建術後数ヵ月から1～2年の間にグラフトおよび吻合部に発生する内膜肥厚は、この時期の主要な閉塞原因でありその機序解明、対策が検討されてきた。組織学的には中膜平滑筋の内膜への遊走・過剰増殖が確認されており、主として抗血小板機能抑制を目的とした多くの薬物療法による予防が試みられてきたが、臨床的にはいまだ確実なものがないのが現状である。こうした状況から血管外科領域では内膜肥厚の早期発見とこれに対する外科的治療施行を余儀なくされるが、術後再狭窄が頻発しやすくこれらにもまた一定の限界があり、この領域で解決が急がれるべき重要な課題となっている。

近年特に動脈硬化の進展に対する機序解明が分子生物学的側面から積極的に行われ、これに伴い血管においても内皮細胞や平滑筋細胞に対する遺伝子導入の試みが報告され、新たな血管治療手段として期待される。血行再建術後の内膜肥厚および動脈硬化にはこれらの発生に血液細胞成分の関与や組織細胞増殖過程の面からさまざまな共通点が見い出されており、遺伝子治療の応用の可能性を検討することは、極めて有意義と考えられる。

本研究では、血管に対する遺伝子治療の可能性を主に目的とする遺伝子導入の至適条件および導入された細胞に発生する形態学的、機能的変化について基礎的に検討した。さらにこれら遺伝子治療応用の内膜肥厚モデルとして、人工血管と自家静脈の連結グラフトを用いた動・静脈間バイパスを施行し、外科的内膜肥厚予防策の一つとして連結部静脈側をグルタールアルデヒド処理した群との間でその長期成績を比較検討した。

研究組織

研究代表者 : 稲葉雅史 (旭川医科大学医学部講師)
研究分担者 : 笹嶋唯博 (旭川医科大学医学部助教授)

研究経費

平成5年度	500	千円
平成6年度	800	千円
平成7年度	800	千円
計	2,100	千円

研究発表

学会誌等

1) 稲葉雅史、笹嶋唯博、東 信良、郷 一知、山本浩史、久保良彦. 吻合部にGlutaraldehyde架橋処理を加えたePTFE血行再建—小口径血行再建における開存率向上をめざして—. 人工臓器 25, 2: 438—442, 1996

2) 東 信良、稲葉雅史、笹嶋唯博、郷 一知、山本浩史、赤坂伸之、久保良彦. 自家静脈グラフトによる下肢末梢動脈バイパス成績—内膜肥厚によるグラフト狭窄発生に関わる諸因子—. 日血外会誌 5, 3: 235—241, 1996

口頭発表

1) 稲葉雅史. 吻合部にGlutaraldehyde架橋処理を加えたePTFE 血行再建
日本人工臓器学会, 平成7年11月7～9日

I. 研究方法

1. 遺伝子導入の基礎検討

レトロウイルスベクターを用いた血管内皮細胞への遺伝子導入を目的として、大腸菌の β -galactosidase遺伝子（以下Lac Z遺伝子とする）を導入したMFGプラスミドベクターを含むLac Z細胞をviral producer cellとして選択した。血管内皮細胞はヒト臍帯静脈内皮細胞（以下HUVECとする）をCollagenase処理により採取し、ゲラチン処置を施した培養プレートにて継代培養を行いつつLac Z遺伝子導入を試みた。また、Lac Z細胞の対照としてpackaging cell lineである ϕ CRIP細胞および線維芽細胞の一つである3T3細胞を同時に培養した。培養液として、内皮細胞にはM-199(GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES)に20%Fetus Bovine Serum, 200mM glutamine, Penicillin/Streptomycin, Heparin加内皮細胞増殖因子(ECGF)を含む溶液を用い、隔日で交換した。また、Lac Z・ ϕ CRIP・3T3細胞には、Dulbecco's modified Eagle's medium(GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGY)に10% Calf Serum, glutamineおよびPenicillin/Streptomycinを加えた培養液を使用した。

1) 遺伝子導入法

confluentになったHUVECを導入前日にトリプシン処理した後これを濃度比1：6～1：8の割合で新たなグラチン塗布プレートに分割培養した。同時に50～70%程度confluentとなったLac Z細胞の培養液を前日に交換した。当日ほぼconfluentとなったLac Z細胞培養液を注射器にて採取し、16 μ g/ml濃度でDEAE-dextran溶液を加え、これをリン酸緩衝液で洗浄したHUVEC培養シャーレに暴露した。内皮細胞に対する遺伝子導入率を向上させる目的で2回/日の導入を施行し、DEAE-dextran添加培養液暴露時間は5時間/回とし2回目終了後は培養液を上記組成のM-199に交換した。HUVECがconfluentとなった後、同様な手技をこの後1または2回施行し、計4または6回の導入を基本的なプロトコールとした。Lac Z細胞のvirus particle産生能を定期的に検査するため、3T3細胞にLac Z細胞培養液を原液～ 10^{-8} 濃度までの連続的した希釈液を調整しtiter測定を施行したがこの際のDEAE-dextran濃度は8 μ g/mlとした。

2) 遺伝子導入の判定

5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside(X-gal)を基質とした細胞化学染色X-gal染色法を用いると、これが β -galactosidaseと反応し細胞質が青色に変化することから顕微鏡下にLac Z遺伝子導入達成および導入率を確認、算定した。X-gal染色は培養細胞をリン酸緩衝液で洗浄、0.5%glutaraldehydeにて10分間固定後これにX-gal溶液を加え37°Cで2～3時間反応させることにより行った。

3) 基礎検討項目

HUVECに対するLac Z遺伝子導入率が導入回数およびLac Z細胞のtiterの変化に伴いどの程度増減し得るか観察した。また、Lac Z遺伝子導入HUVECの細胞増殖を同一継代の非処理HUVECをコントロールとしてこれらとpackaging cellである ϕ CRIP培養液に16 μ g/mlのDEAE-dextranを加えて暴露したHUVECの増殖を比較検討した。

2. 移植グラフト吻合部内膜肥厚の基礎検討

1) 内膜肥厚モデル作成

体重12~15kgの雑種成犬5頭の一側外頸静脈約8cmを摘出し、これと内径5mm,長さ5cmの expanded polytetrafluoroethylene(以下ePTFE)人工血管を連結したcompositeグラフトを作成し、頸動脈と対側内頸静脈間に皮下経路で動静脈間バイパスを行った。吻合は、連結部は6-0polypropylene(以下PP)系による端・端吻合とし、動静脈側吻合はいずれも7-0 PP系による側・側吻合とした。また、ePTFEグラフトにはTECHNOGRAFT[®](住友電気工業社製)を選択した。

2) 内膜肥厚抑制モデルの検討

体重12~15kgの雑種成犬5頭を用い、上記モデルと同様に外頸静脈を摘出した後ePTFE人工血管とのcompositeグラフト作成の際に静脈吻合側をGlutaraldehyde(以下GA)で架橋処理した。方法は、まず摘出した外頸静脈の末梢側端よりその口径に適合した外径5~6mmのガラス棒を愛護的に約3cm挿入する。あらかじめフィルターで滅菌した1%GAを注射針より滴下しつつガラス棒の挿入された静脈グラフトの約2cmの範囲を外側およびガラス棒を抜去後内腔より約10分間固定した。この時点でGA処理した静脈は黄色調を呈し硬化する。その後残留したGAを除去する目的でヘパリン加生理食塩水で充分洗浄し、ePTFEグラフトと6-0 PP系を用い端々吻合した(Fig.1)。静脈側にGA処理を加えた modified compositeグラフト(以下MCGとする)で上記モデルと同様に頸動・静脈間にバイパスを作成し血流再開後5頭中2頭ではさらにePTFE片を用い連結部を被覆した。この際、

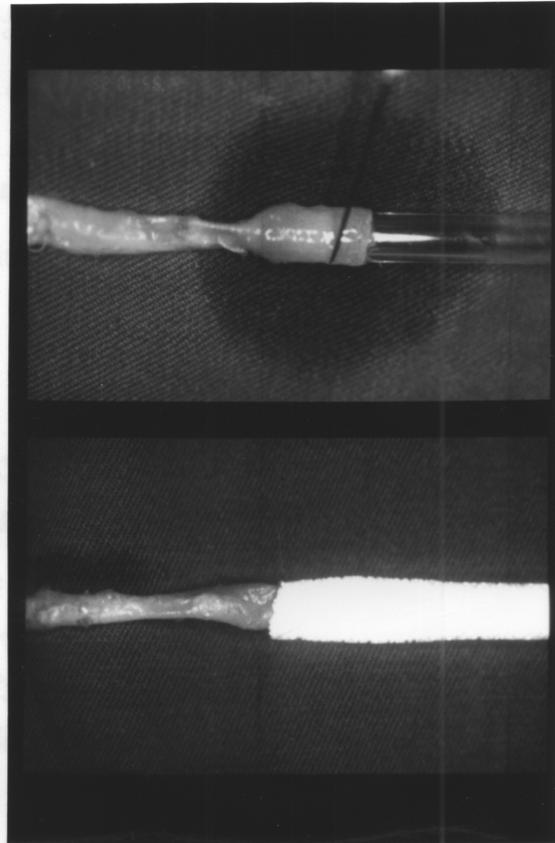


Fig.1 ePTFEと自家静脈 compositeグラフト

静脈側被覆範囲は、GA固定部をわずかに越える部位までとした。移植後血管造影にてグラフト開存、吻合形状を確認するとともに、2および3か月後に摘出し肉眼所見・組織所見に加え吻合部内面性状を走査電顕にて観察した。

Ⅱ. 結果

1. 遺伝子導入の基礎検討

1) レトロウイルスベクターのtiter測定

confluentとなった3T3細胞を前日に1:10濃度希釈でプレートに分配し、これに翌日Lac Z細胞培養液を原液 $\sim 10^{-8}$ まで10倍ごとに連続希釈してそれぞれ分配した3T3細胞プレートにDEAE-dextran法(8 μ g/ml)にて暴露しLac Z遺伝子導入を行った。

3T3細胞プレートが再度confluentになった後にX-gal染色を施行しtiterを測定した。原液 $\sim 10^{-1}$ 濃度では90%以上の3T3細胞が青色に染色され、 10^{-5} 濃度で10 \sim 20個、最低 10^{-7} 濃度で1 \sim 3個の染色細胞が確認され、titerは 10^7 /mlと診断された。しかし、細胞のpassage進行に伴いLac Z細胞の形態は円形・増大化し、導入率は原液でも70 \sim 80%と低下傾向を示し、titerも 10^4 または 10^5 /mlとなった。したがって至適ベクターのtiterは 10^6 /ml以上と考えられ、これを保持、確認するため1回/月のtiter測定を継続した。

2) 血管内皮細胞への遺伝子導入率

前日に1:6 \sim 1:8の濃度比で分配したHUVECにこれをリン酸緩衝液にて洗浄後、titer 10^7 /mlのconfluentになったproducer細胞Lac Zの培養液9 \sim 10mlにDEAE-dextran(16 μ g/ml)を加え2回/日暴露した。2回の暴露におけるLac Z遺伝子導入率(efficiency)は、平均18%(n=5)であった。さらに再度HUVECがconfluentとなった後に同様な手技を1 \sim 2日繰り返し施行し、全体で4または6回の暴露をおこなった例ではefficiencyは平均50%(n=5)と有意な増加を示した。しかし、4回および6回施行の間ではefficiencyの有意な差が得られなかった(Fig. 2)。

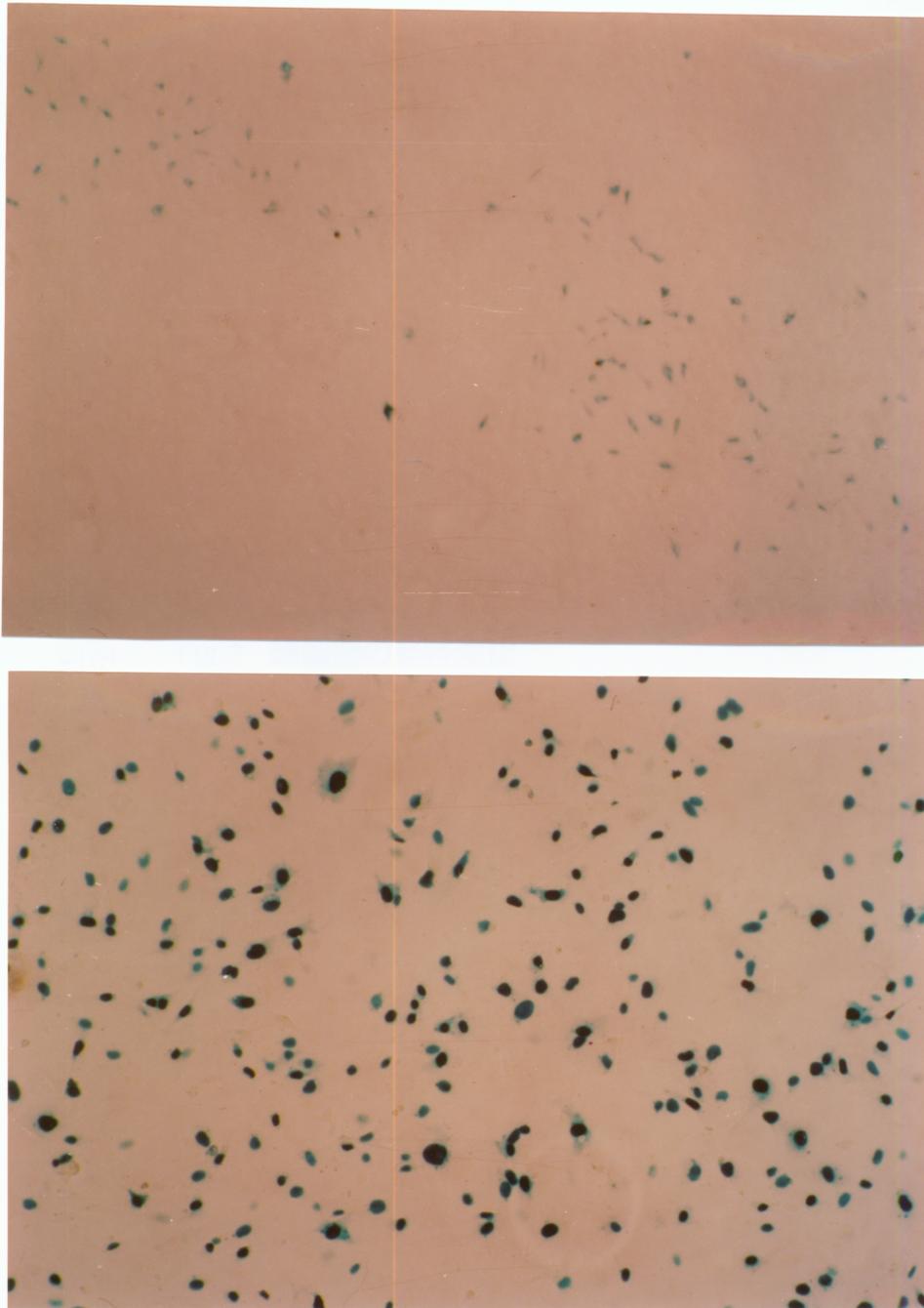


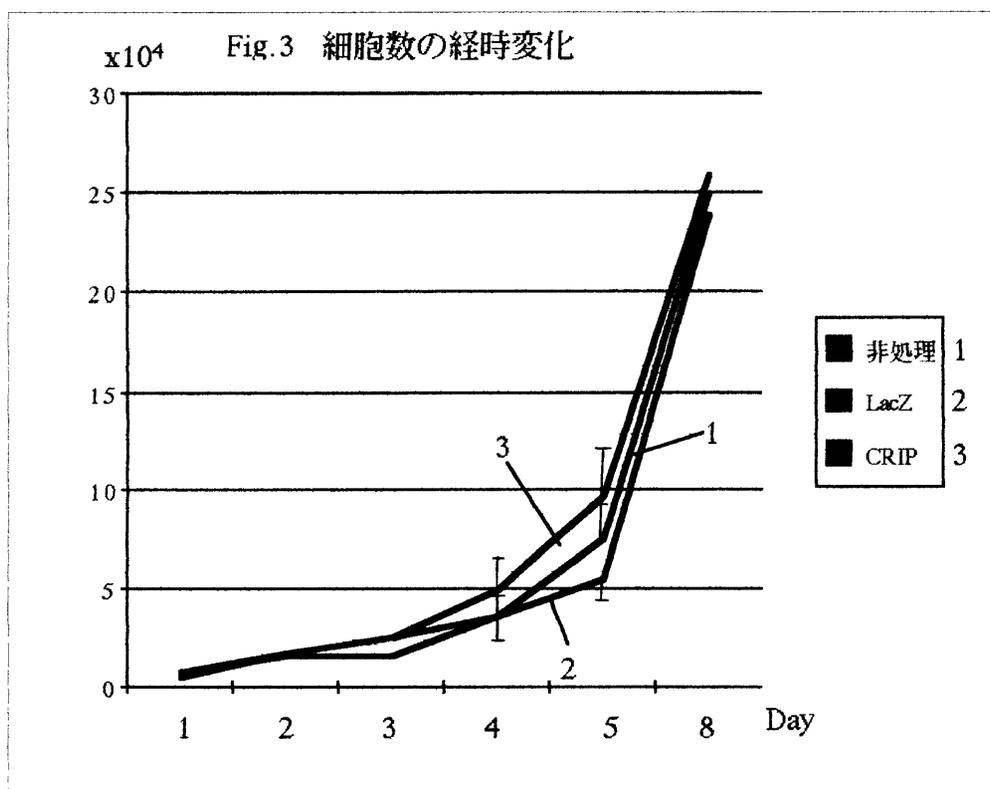
Fig.2 HUVECに対するLac Z遺伝子導入 (X-gal染色 x100)

上段：2回導入 下段：4回導入

3) 遺伝子導入細胞増殖能

非処理HUVECおよびLac Z, ϕ CRIP培養液にDEAE-dextranを添加し暴露したHUVECが confluentになった後(それぞれ非処理、Lac Z、 ϕ CRIPとする)、これらを24穴プレートに各々細胞数が $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるよう分割した。その後3種類のHUVEC細胞数を顕微鏡下に3穴/日ずつ経時的に測定した。1日後では、非処理(0.59 ± 0.16) $\times 10^4$ 、Lac Z ($0.75 \pm$

0.53) $\times 10^4$ 、 ϕ CRIP(0.78 ± 0.16) $\times 10^4$ といずれも減少した。しかし、2、5、8日後では、それぞれ非処理 1.71 ± 0.46 、 7.56 ± 2.38 、 25.25 ± 3.53 ($\times 10^4$)、LacZ 1.59 ± 0.37 、 5.56 ± 0.96 、 24 ± 2.82 ($\times 10^4$)、 ϕ CRIP 1.73 ± 0.34 、 9.68 ± 2.20 、 26.1 ± 1.06 ($\times 10^4$)(平均値 \pm SD)と経時的に増加した。この結果よりコントロールとした非処理HUVECとLacZ遺伝子導入HUVECとの細胞数の間にはいずれの経過日数においても統計学的有意差は認めなかった。また、LacZ導入HUVECのefficiencyはX-gal染色にて55%であった(Fig.3)。



2. 移植グラフト吻合部内膜肥厚の基本検討

1) 内膜肥厚モデルの移植成績

移植後3か月で3頭中1頭が閉塞したが、閉塞原因はcompositeグラフトに用いたePTFEと頸動脈との中枢吻合部狭窄であった。他の2頭は開存していたが、composite部のePTFE新生内膜形成は不良で縫合線に一致した血栓形成が認められた。

2) 内膜肥厚抑制モデルの移植成績

移植後2か月でグラフト感染にて1頭が閉塞した。残り4頭のグラフト肉眼所見では、ePTFE内面には赤色血栓が存在するが、GA固定静脈内面は平滑で血栓形成例はなかった。しかし、1頭ではcomposite部位に部分的な内膜肥厚が認められた。走査電顕では移植前10分間のGA処理後静脈グラフトの内皮細胞は収縮し丸みを帯びた形を呈しているが、移植後2か月の摘出標本では一部剥離を認めるがほぼ正常な形態、配列を示していた (Fig.4)。また、術後2か月の組織所見では、composite部に近接した内膜には厚さ約300 μm の新生内膜増殖が認められGA固定部から非固定領域へ滑らかに移行していた。また、強拡大では、最内面に一層の内皮細胞が確認されるがePTFE内面には伸展しておらず、さらに縫合糸周囲または縫合線からの組織侵入が観察された (Fig.5)。このため内膜肥厚発生の要因をさらに抑制する目的からこれら組織侵入を防御するために施行したMCGの移植後3か月の摘出標本では、GA固定静脈内面は平滑であるが被覆に一致したePTFE内面の治癒は不良であり、静脈グラフトGA固定、非固定境界領域とともにフィブリン血栓が認められた (Fig.5)。



GA処理静脈 ×1800



移植2か月 ×1800



Fig.5 移植後2か月の連結部組織像
上段：EVG x40 下段：HE x100

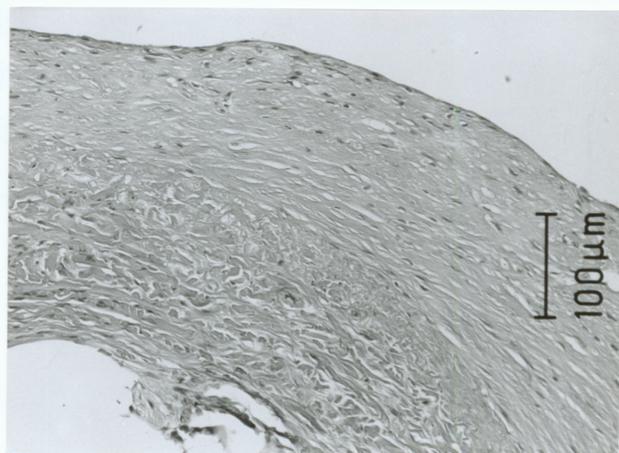


Fig.4 静脈グラフトGA固定部の
走査電顕像 (雑犬移植 x1800)

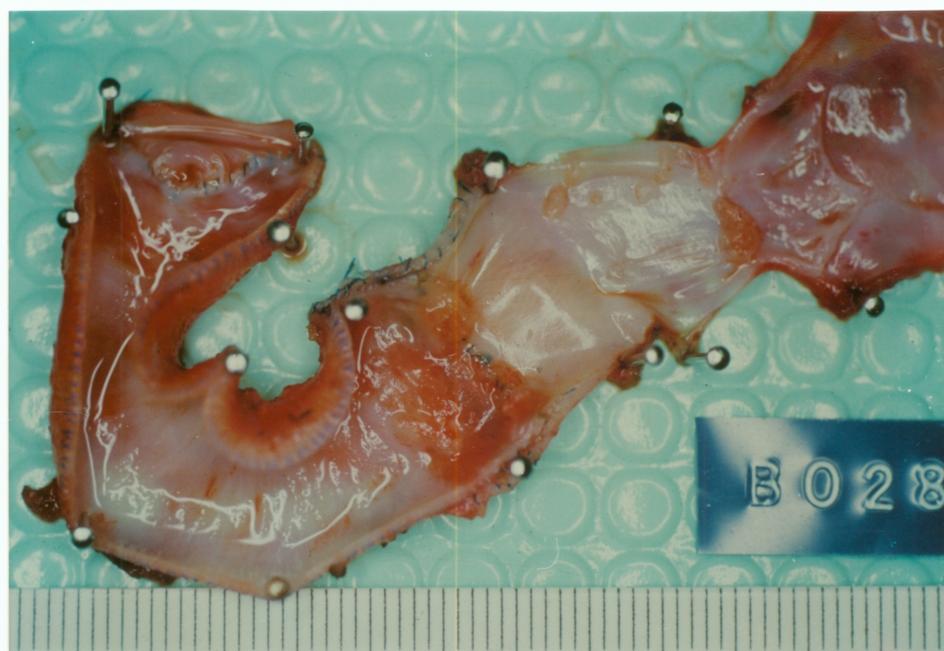


Fig. 5 Modified composite graft 移植後3か月の
グラフト内面像 (雑犬移植)

Ⅲ. まとめ

血管疾患に対する遺伝子治療をin vivoで施行する際には、目的とする導入遺伝子が可及的長期に安定して発現し、酵素やタンパク産生が確実に発揮されることが必要となる。この意味から現状ではレトロウイルスベクターが最も期待されるストラテジーと考えられているが、今回のin vitroの研究結果から培養ヒト血管内皮細胞への遺伝子導入の可能性と至適条件が部分的ではあるが明らかにされた。また、遺伝子導入後の細胞増殖能には有意な変化がないことも示された。これらは今後の遺伝子治療の基礎研究に向けて有用な情報となり得る。また、内膜肥厚抑制に対する種々の外科的対策法を試みたが、これまでのところcompositeグラフトは内膜肥厚モデルとはなり得るもののMCGによっても有意な吻合部内膜肥厚減少は得られず、これらの方法の付加に伴い新たな組織治癒障害と関連した問題点が観察された。今後さらに最良の導入遺伝子の選択(eNOS, t-PA, Prostanoidなど)とともにこれら遺伝子の培養血管組織への導入や人工血管cell seeding法への応用などin vivoでの研究展開が必須となるものと考ええる。