

報告書

平成15年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

アデノウイルスベクター導入により発現される新しい血管新生抑制因子の
同定とその臨床応用のための基礎研究

受賞者：森 圭介（埼玉医科大学眼科学教室）

共同研究者：奥田 晶彦*

現在本邦での成人中途失明の原因は、糖尿病網膜症が第一位であり、また、欧米では第一位で近年本邦でも急激に増加し、社会問題にもなっている疾患に加齢黄斑変性（AMD）がある。いずれも、網膜もしくは脈絡膜の新生血管を介して失明にいたる疾患である。現在までにある治療法は、レーザー光凝固で網膜や新生血管を直接凝固するもの、もしくは新生血管を手術的に除去するもので、いずれも網膜への侵襲が強く満足できる視機能を回復させることが難しい。研究代表者らは、この脈絡膜新生血管に対する新しい治療として、光化学療法¹の基礎実験を行ってきた。この光化学療法では、新生血管を高い精度で選択的に閉塞させることが可能で、従来の光凝固よりも網膜への侵襲が軽度であるのがその特徴である。しかし、この光化学療法では新生血管が発芽する環境・背景因子が改善されただけでないので、臨床応用した場合には、再発が大きな問題となった。従って、血管新生のプロセスを分子レベルで解明し、分子生物学的手法を用いて血管新生を制御する治療法の開発が必須であると言える。

この立場から、研究代表者らは既に血管新生に対する遺伝子治療のための基礎実験を行って来た。具体的には、抗腫瘍血管新生作用をもつendostatin遺伝子を組み込んだadenoviral vectorを脈絡膜新生血管モデルのマウスに静脈投与し、endostatinが腫瘍新生血管だけでなく、眼内血管新生にも有効であることを証明した。また、網膜色素上皮細胞から分泌されるserine protease inhibitorであるpigment epithelium-derived factor（PEDF）を発現させるadenoviral vectorを眼内注入し、抗血管新生作用のあることを網膜および脈絡膜新生血管モデルで証明した。この際、コントロールとして使用した遺伝子を組み込んでいない、いわゆる「空」のベクター自身にも、強力な網膜血管新生抑制作用のあることが判明した。この血管新生抑制作用は極めて強力²で、endostatinやPEDFよりも強く、ほぼ完

*埼玉医科大学ゲノム医学研究センター発生・医学・再生部門

全に網膜新生血管を抑制していた。しかもこのコントロールベクターによる血管新生抑制作用は、ウイルス遺伝子のearly region 4（E4）を削除しているか否かによりその効果が大きく異なっていたことから、E4から発現される蛋白の中に強力な血管新生抑制物質があることが推測される。しかし、E4の削除していないウイルスベクターは、細胞毒性が強く、そのままでは臨床応用は不可能である。そのため、このE4に含まれる血管新生抑制因子を同定し抽出し、それを新たな薬剤として治療に応用することが考えられる。

当該研究では、このコントロールベクターで発現される未知の血管新生抑制因子を特定し、臨床応用への基礎をつくることがその目的である。これにより、新しい血管新生抑制因子が同定されれば、強力な血管新生抑制治療薬となろう。もしくは毒性の低いほかのウイルスベクター（gutless adenoviral vectorやadeno-associated viral vector）に組み込めば、新しい血管新生に対する遺伝子治療の確立が期待できる。また、この抗血管新生効果は腫瘍新生血管でも観察され、実際にマウスにおける実験的悪性腫瘍で腫瘍の縮小効果が観察された。

以上の研究背景から行われた当該研究の研究成果は大きく分けて2つに分けられる。ひとつは当初より計画されていた、アデノウイルスベクターによる抗血管新生作用のある遺伝子のスクリーニングである。先に述べたように、糖尿病網膜症および加齢黄斑変性を対象とした、抗血管新生遺伝子治療の基礎実験を行っている際に、コントロールとして使用した遺伝子を組み込んでいない、いわゆる「空」のベクター自身にも、強力な網膜血管新生抑制作用のあることが判明した。この血管新生抑制作用は極めて強力²で、ほぼ完全に網膜新生血管を抑制していた。しかもこのコントロールベクターによる血管新生抑制作用は、ウイルス遺伝子のearly region 4（E4）を削除しているか否かによりその効果が大きく異なっていたことから、E4から発現さ

れる蛋白の中に強力な血管新生抑制物質があることが推測される。しかし、E4の削除していないウイルスベクターは、細胞毒性が強く、そのままでは臨床応用は不可能である。そのため、このE4に含まれる血管新生抑制因子を同定し抽出し、それを新たな薬剤として治療に応用することが考えられた。そのため、E4の削除してあるものとないものの2種類のコントロールベクターをマウスの眼内に直接注入し、その後眼内で何のmRNAの発現が亢進もしくは抑制されているかマイクロアレイ法で検索した。ウイルスベクターを注入したマウスは2種類で、ひとつは何もししていない正常のC57BL6マウスで、もうひとつは、未熟児網膜症モデルで眼内新生血管のあるC57BL6マウスである。未熟児網膜症モデルは生後7日から12日の間75%酸素下で飼育し、その後大気下に戻し生後13日に眼球摘出し、mRNAを抽出した。

正常C57BL6マウスにウイルスを注入した場合、全部で12,422のprobe setとESTsのうち、非注入眼とGV10ウイルス(E4の削除していないもの)の比較では、580種類のgeneとESTsの発現が変動していた。非注入眼とGV11ウイルス(E4の削除してあるもの)の比較では、660種類のgeneとESTsの発現が変動して

いた。また、注目すべきは、GV10とGV11との比較であるが、UGのMm81873, Mm51368, Mm24547の3種類のみが変動していた。しかしながら、これらのシグナルは小さくなく、変動が有意かどうかの判定が難しい。また、正常眼での検討と、実際に新生血管の発生が見られるモデルでは発現が異なってくる可能性が考えられたため、未熟児網膜症モデルにGV11ウイルスを注入した場合と、そうでなかった場合を比較した。その結果ウイルス注入で、有意に発現が増強した遺伝子は48種類、抑制されたものが12種類であった。そのうち、特に血管新生の抑制に関連している可能性のあるもののひとつに、MHC class I antigenが挙げられる。それ以外にもいくつか候補があった。

これに加え、もうひとつの付随的な知見として、アデノウイルスベクターには神経保護作用のあることも明らかとなった。これは、網膜変性モデルとして、網膜光障害を作成し、それにウイルスベクターを導入すると、網膜視細胞は保護されていた。いずれにしろ、アデノウイルスベクター投与で血管新生および神経保護に関与する遺伝子の発現が亢進していることが明らかとなった。