

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08023

研究課題名(和文)嫌気性菌ベクターを用いた虚血性心疾患に対する血管新生療法薬剤の開発

研究課題名(英文)Development of angiogenic therapy for ischemic heart disease using anaerobic vector

研究代表者

和田 有子(WADA, YUKO)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：30419410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：嫌気性細菌であるB.Longum (BL)が、静脈内投与によっても心筋梗塞部位に特異的に蓄積し、非虚血部位からは速やかに除去されることをモルモット心筋梗塞モデルを用いて示し、BLが虚血性心疾患に対する治療薬のベクターとして有用である可能性を示した。次いでbFGF遺伝子をこのベクターに組み込んだFGF-BLを開発し、これを用いたモルモット心筋梗塞モデルの治療実験を行った。FGF-BLが心筋梗塞部位に特異的にデリバリーされることを確認したが、左室機能の改善効果を示すには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study we showed that B.Longum (BL), an anaerobic bacterium, accumulates specifically in the myocardial infarction site by intravenous administration, and are promptly removed from the non-ischemic site. This finding indicates that BL may be useful vector for ischemic heart disease.

We developed the new therapeutic angiogenesis drug for ischemic heart disease, FGF-BL incorporating bFGF gene into this vector, and performed a therapeutic experiment on guinea pig myocardial infarction model using FGF-BL. We confirmed that FGF-BL was specifically delivered to myocardial infarction site, but this agent did not show improvement effect for LV function.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管新生療法

## 1. 研究開始当初の背景

従来の薬物治療や内科的・外科的血行再建では対処できない重症虚血心筋や重症虚血肢に対し、虚血部位に血管新生遺伝子や蛋白、骨髄細胞などを投与することにより血管新生を促進しようとする血管新生療法が試みられている。殊に近年、糖尿病患者の増加や透析患者の生命予後の改善、高齢者の増加などにより、重症心筋虚血や重症虚血肢患者は増加の一途を辿っており、外科的治療が困難である患者背景と相俟って血管新生療法のニーズが高まっている。

血管新生遺伝子を用いた血管新生療法薬剤は、現状ではウィルスベクターや naked plasmid 投与にて行われており、いずれも全身投与した場合標的部位への特異的集積性はなく、局所での十分な濃度を得るために局所投与（筋注）あるいは経動脈的投与がとられる。そのため特に虚血性心疾患に対する心筋投与では、開胸操作あるいはカテーテルによる投与が必要となり、その高侵襲性から、単独治療ではなく何らかの観血的手技（冠動脈バイパス手術やカテーテルインターベーション）との併用で利用されることが多い。このことは、外科的治療が困難である患者をターゲットとする本治療法の適応を限界づけている。

ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）は強力な血管新生作用を持つ血管新生因子であり、これまでに bFGF 遺伝子やタンパクを用いた血管新生療法薬剤がいくつか開発され、虚血性心疾患に対し臨床応用も試みられている。しかしそれらは上述のように標的部位特異性のない薬剤であるため、投与には開胸操作やカテーテル操作が必要である。

本研究代表者はこれまでの研究において、*Bifidobacterium Longum* (B. Longum) 菌が、全身投与（静注）でも虚血部位特異的に集積・増殖し、かつ虚血の改善に伴い消失するという、虚血性疾患治療薬の担体（ベクター）として極めて優れた特性を有すること、さらにこの B.L ベクターにヒト bFGF 遺伝子およびその発現遺伝子を組み込んだ bFGF 組換え *B. Longum* (FGF-B.L) が、マウス下肢虚血に対し血管新生作用をもつことを示してきた。

なお組換え *B. Longum* 菌は固形癌に対する DDS (Drug Delivery System) として治療実験や安全性試験が行われてきており虚血性心疾患を持つ個体に対する安全性が示されれば、虚血性心疾患に対しても臨床応用化が期待できる位置にある。

本研究では、ヒト腸内常在菌で非病原性の偏性嫌気性菌である *B. longum* 菌をベクターとして用いた、虚血性疾患に対する血管新生療法の新しい薬剤の開発を目標とした。

## 2. 研究の目的

FGF-B.L が薬剤として下肢虚血だけでなく虚血性心疾患にも応用可能であることを示すため、動物心筋梗塞モデルを用い虚血性心

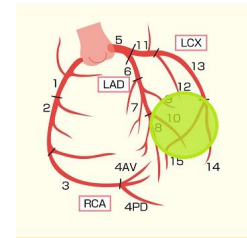
疾患に対する有効性の確認および安全性の確認を行う。また本薬剤は生物であり、体内での動態は宿主（患者）の全身状態において非常に重要であるため、全身投与された本薬剤の体内分布についても動物モデルにて確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) モデルの作製

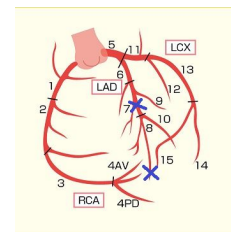
本研究の実施には、オス 10-12 週齢のモルモット (Hartley) を使用した。三種混合麻酔（塩酸メドミジン・ミダゾラム・酒石酸ブトルファノール）の腹腔内投与後、気管内挿管をおこない人工呼吸器管理としたのち、開胸し、下記方法により心筋梗塞モデルを作製した。術中はセボフルラン 2.5% 吸入麻酔を併用し、術後は拮抗薬（塩酸アチパメゾール）の筋肉内投与により回復を促し、鎮痛薬（メロキシカム）の皮下投与をおこなった。

クライオアブレーション (Cryo-injury) 法アルミ棒を液体窒素で冷却し、左室心筋面にあてることにより実施。(図 1)



【図 1】

冠動脈結紮法  
左冠動脈前下行枝を 5-0 シルク糸により 2 ヶ所結紮した。(図 2)



【図 2】

### (2) *B. longum* 菌投与

*Bifidobacterium Longum* (B. Longum) 簡易凍結製剤を 37 水浴 10 分間保温により融解したものを使用した。三種混合麻酔（モデル作製時と同様のものを使用）の腹腔内投与による麻酔下のもと、29G 針付きシリンジを使用し *B. longum* 菌の静脈内投与を実施。

投与部位は、前肢副橈側皮静脈、耳介周縁静脈、サフェナ静脈、皮切後の大腿静脈、陰頸静脈による投与法を検討したのち、陰頸静脈からの投与に決定した。

最終的な投与菌数は  $16.4 \times 10^9$  cfu/body/day と定め、投与日については菌数測定実施日 day0 (モデル作製当日) および day1 に実施し、心機能評価用では day5 および day9 に追加投与を実施した。

### (3) 心機能評価

モデル作製前・術後 5 日目・9 日目・2 週間目・3 週間目・4 週間目（心摘出前）に、マスクによるイソフルラン吸入麻酔下のもと

心エコーをおこない、左室拡張末期径(LVID-d)・左室収縮末期径(LVID-s)・左室駆出率(EF%)・内径短縮率(FS%)を測定した。

(4)組織からの菌検出・測定

動物は過剰麻酔による犠牲死後、心臓および脾臓を摘出。心臓は健常部位・梗塞部位・境界領域を採取、重量測定後、液体窒素にて急速凍結し、-80 で保存した。

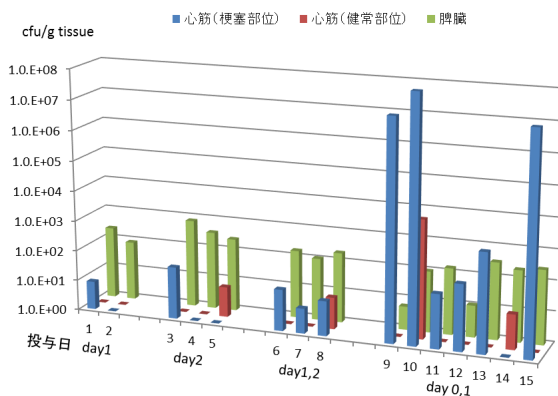
菌数測定時に凍結組織を 37 水浴 10 分間の保温により融解し、ハサミにてミンチ状にした後、嫌気性希釈液を組織重量の 9 倍量入れホモジナイズした。このホモジナイズ液を BFL 寒天培地 (5-フルオロウラシルを添加した BL 寒天培地) に添付し、脱酸素・炭酸ガス発生剤とともに密閉容器に入れ、37 にて 3 日間培養し、生菌数測定を実施。

4. 研究成果

(1) B.L ベクターの投与日の検討

全身投与された B.L ベクターが、梗塞部位に特異的に集積し、健常部位からは速やかに消失することを示すため、ラット心筋梗塞モデルへの B.L ベクターの投与実験を行った。心筋梗塞モデルはクライオアブレーション法にて作成した。

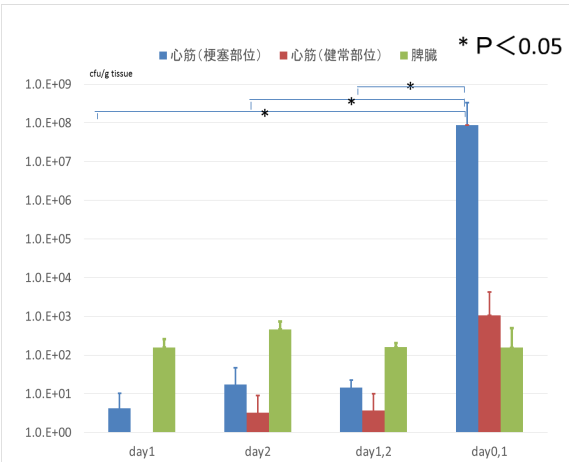
これまでのマウス下肢虚血モデルの経験では、ベクターは単回投与よりも複数回投与の方が定着率がよいことが示されているが、心筋梗塞モデルにおいても同様の動態を示すか確認するため、心筋梗塞作成後 1 日目、2 日目の単回投与、および 1, 2 日目、0, 1 日目の連続投与を行い、2 日後に心臓を摘出、組織あたりの菌数を測定した。なお一日の投与量は、マウス下肢虚血モデルにおける最適投与量を参考に  $16.4 \times 10^9$  cfu/day とした。



【図3 投与日とベクター定着数】

下肢虚血の場合と同様に、単回投与に比べ複数回投与、特に心筋梗塞作成直後からの投与において心筋梗塞部位へのベクターの集積が有意に多いことが示された。一方健常心筋や脾臓への集積は単回投与と複数回投与で有意な差はなかった。(図3、4)心筋梗塞作成翌日からの投与に比べ、心筋梗塞作成直後の集積が多かったのは、クライオアブレーション

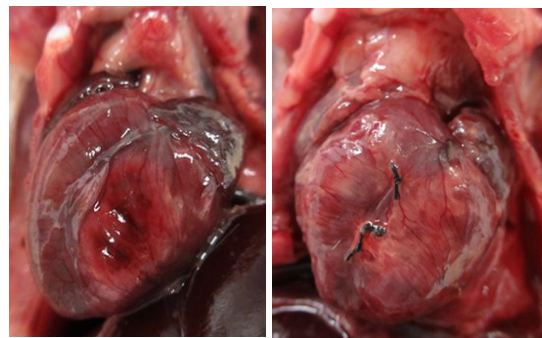
によるモデルに起因すると推測される。つまりこのモデルにおいては側副血行の発達が比較的早く梗塞部位の虚血が維持できない可能性があり、ヒトの心筋梗塞へのベクター投与のモデルとしては不適切である可能性が示唆された。



【図4 投与日とベクター定着数(平均)】

(2) 虚血性心疾患モデル(組織低酸素状態)としてより最適なモデルの作製

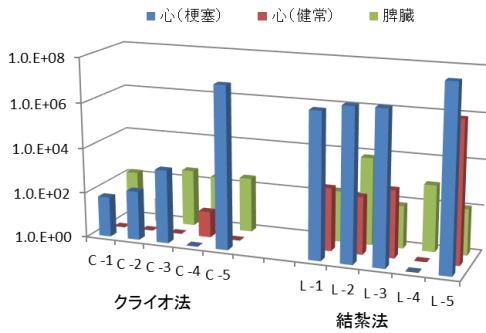
そこで次に我々はLAD結紮による心筋梗塞モデルを作成しB.Lベクターの集積を確認した。(図5)投与日は心筋梗塞作成後 day0,1 とし、投与量は先の投与量に準じた。結果、LAD結紮法による心筋梗塞モデルにおいてベクターの定着率が有意に上昇した。(図6,7)本ベクターの定着が、心筋梗塞という組織形態に準じるのではなく、組織の虚血状態に依存することが示された。



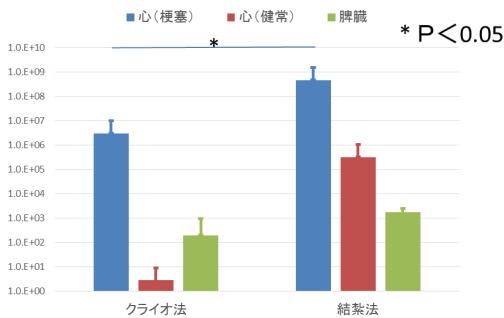
【図5 クライオ法(左)と結紮法(右)】

なお結紮法において、健常心筋とした検体からも  $10^5$  cfu/g tissue 程度の菌が検出されたが、これは結紮法においては虚血範囲がクライオ法に比べて同定しづらく、梗塞には至っていないものの虚血になっている心筋が含まれてしまった可能性が考えられる。実際、結紮法においては梗塞部位周辺の心筋組織においても菌が定着していることを確認しており、本ベクターが梗塞の有無ではなく虚血の有無によって分布を決定づけられてい

ることを示唆している。



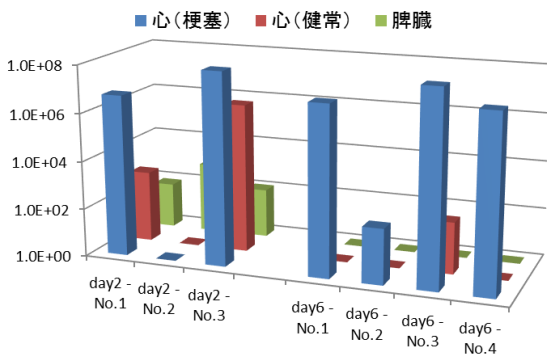
【図6 心筋梗塞作成法による定着菌数の違い】



【図7 心筋梗塞作成法による定着菌数の違い(平均)】

### (3) ベクターの体内動態～経時的变化

次いで、本ベクターの経時的体内動態を確認するため、心筋梗塞モデルに投与した後の菌数の変化を経時的に確認した。モデル作成は結紮法によって行い、最終投与日より2日後、6日後に心臓を摘出、菌数の確認を行った。その結果6日目においても  $10^6$  cfu/g tissue の菌が梗塞部位に確認できた。一方健常心筋や脾臓からは6日目には菌は除去されていた。(図8)

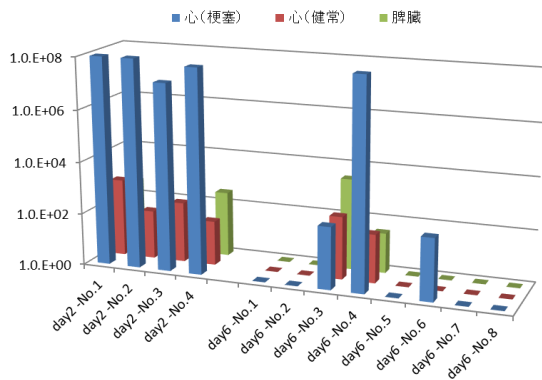


【図8 定着菌数の経時的变化】

### (4) bFGF 組み込み BL ベクター (FGF-B.L) の体内動態の確認

これまでの実験で B.L ベクターが、心筋梗塞発症直後からの連続投与によって速やかに

虚血部位(心筋梗塞部位)に定着し、その数は6日目まで持続する一方、健常心筋や脾臓など健常部位からは速やかに排除されることが示された。そこで次に我々は、このベクターに血管新生因子である bFGF 遺伝子を組み込んだ FGF-B.L を用いて同様の検討を行うこととした。FGF-B.L によって血管新生が行われれば、局所の虚血は改善し好氣的になった部位からは菌は排除されるはずである。このことを確認するために、結紮法によって作成した心筋梗塞モデルに FGF-B.L を投与し、2日目、6日目の定着菌数を測定した。その結果、FGF-B.L 投与群における2日後の定着率は B.L ベクターと同様であったが、6日目には有意にその数が減少していた。脾臓や健常心筋における動態は B.L ベクターの時と同様であった。(図9)

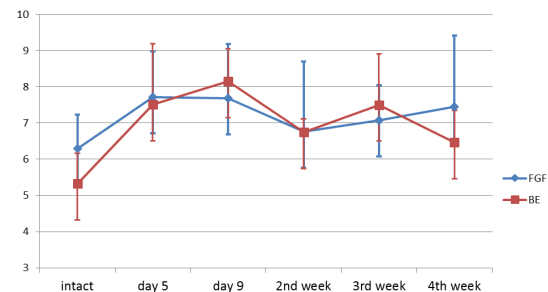


【図9 定着菌数の経時的变化 (FGF-BL)】

この結果によって、間接的ではあるが、FGF-B.L が心筋梗塞部位において虚血を改善している可能性が示唆された。

### (5) FGF-B.L による心筋梗塞モデル治療試験

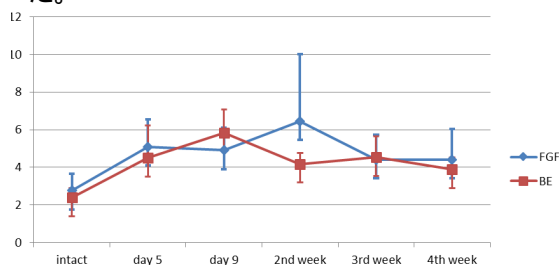
B.L ベクターおよび FGF-B.L が静注によって心筋梗塞部位に特異的に集積することが確認できたため、次いで治療実験にうつった。モデル作成は結紮法によって行い、薬剤投与は心筋梗塞作成後 day0,1,5,9 に行った。心筋梗塞作成前、day5,9,14,21,28 に全身麻酔下に心臓超音波検査を行い、左室拡張末期径 (LVDd) (図10)、左室収縮末期径 (LVDs) (図11)、左室駆出率 (EF) (図12)、左室内径短縮率 (FS) (図13) を測定した。



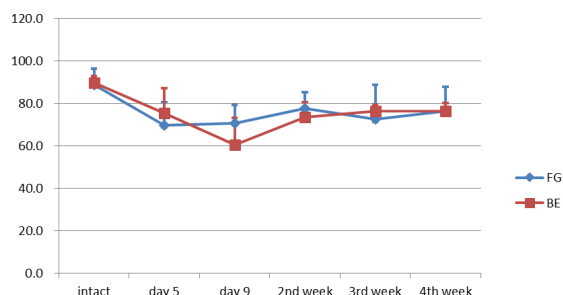
【図10 LVDdの経時的变化】



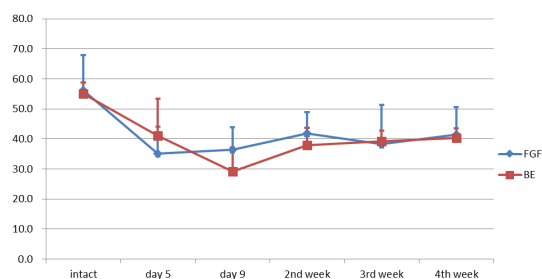
心筋梗塞作成後 5 日後には LVDd, LVDs の拡大および EF, FS の低下を認めた。しかし BL ベクター投与群と FGF-B.L 投与群との間に有意な差は認めず、FGF-B.L による血管新生効果は左室機能を改善させるには至らなかった。



【図 11 LVDs の経時的変化】



【図 12 EF (%) の経時的変化】



【図 13 FS (%) の経時的変化】

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Valve-sparing aortic root replacement after double-switch operation for corrected transposition of the great arteries in a patient with ulcerative colitis. Gomibuchi T, Okada K, Seto T, Okita Y. J Thorac Cardiovasc Surg. 2018 Jun; 155(6): e175-e176, 査読有

Nontraumatic Proximal Ulnar Artery Pseudoaneurysm Mimicking a Soft Tissue

Tumor in Image Modality. Kehara H, Wada Y, Fukui D, Shingu K, Seto T, Okada K. Ann Vasc Surg. 2018 Feb; 47:279. e1-279, 査読有

Increased Expression of Y-Box-Binding Protein-1 in Hind-Limb Muscles During Regeneration from Ischemic Injury in Mice. Fuke M, Narita M, Wada Y, Seto T, Okada K, Nakayama J, Izumi H, Ito KI. Tohoku J Exp Med. 2018 Jan;244(1):53-62, 査読有

Surgical Repair of Cervical Aortic Arch With Brain Circulation Anomaly Through Clamshell Incision. Gomibuchi T, Seto T, Yamamoto T, Nakahara K, Ohashi N, Ohtsu Y, Wada Y, Fukui D, Okada K. Ann Thorac Surg. 2017 Sep;104(3), 査読有

Impact of extracellular matrix on engraftment and maturation of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a rat myocardial infarct model. Ogasawara T, Okano S, Ichimura H, Kadota S, Tanaka Y, Minami I, Uesugi M, Wada Y, Saito N, Okada K, Kuwahara K, Shiba Y. Sci Rep. 2017 Aug 17;7(1):8630. 査読有

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 有子 (WADA, Yuko)  
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・講師  
研究者番号 : 30419410

### (2) 研究分担者

瀬戸 達一郎 (SETO, Tatsuichiro)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授  
研究者番号 : 70362118

### (4) 研究協力者

田中 夕祈 (TANAKA, Yuki)  
信州大学・医学部・技能補佐員  
研究者番号 : なし