

デコイ導入による血管病変の予防

鈴木 淳一

要 旨：オトリ型核酸医薬(デコイ)が心血管病を治療する臨床現場で応用されつつある。NF- κ Bは炎症関連疾患において重要であり、デコイによるこの制御は、血管形成後再狭窄、静脈グラフト内膜肥厚などの炎症性疾患の進展を抑制する。E2Fは細胞周期調節遺伝子を同時に誘導するため、E2Fデコイは血管平滑筋細胞の増殖を抑制し、静脈バイパスグラフトの術後狭窄を予防する。現在、臨床応用としてデコイの治療効果を検討中である。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 151-154)

Key words: decoy, NF- κ B, E2F, gene therapy, restenosis

はじめに

遺伝子導入は、循環器疾患に対する有効な治療法として国内外の臨床現場に応用されつつある^{1,2)}。遺伝子治療で用いられているアンチセンスオリゴヌクレオチドやデコイ、リボザイムなどは、核酸合成機で作成される短い人工DNA(核酸化合物)であり、核酸医薬として分類される。デコイは、特定の転写調節因子の結合部位への結合を阻害し、プロモーター活性を低下させて、活性化される遺伝子群の抑制を行うものである。これらは、従来の医薬品のような化合物と異なり、比較的合成が容易で、そのターゲットやデザインを特異的に選択できるようになっている^{3,4)}。

本稿では、デコイの循環器疾患に対する応用を概観し、併せてわれわれの最近の知見を述べて今後の展望としたい。

Nuclear factor-kappa B(NF- κ B)デコイ

NF- κ Bは、炎症刺激により活性化されて核内に移行する転写因子で、種々のサイトカイン、ケモカイン、成長因子、接着分子などの炎症関連遺伝子群の発現を誘導する。したがって、炎症に関連するさまざまな疾患の進展にNF- κ Bは重要な役割を演じており、この制御が新しい治療となることが期待されている。NF- κ Bデコイは、NF- κ Bと特異的に結合する配列を含む短か

い二本鎖人工DNAであり、NF- κ Bによって活性化される種々の因子を特異的に阻害する。したがって、多面的な抗炎症効果を発揮しつつ、ステロイドに比して副作用が少ないことが期待されている⁵⁾。

動物実験モデルを用いた血管病における検討では、虚血性心疾患の治療に心臓血管内皮傷害による内膜肥厚の進展が抑制されたり⁶⁾、静脈グラフトの内膜肥厚の進展が抑制された⁷⁾などの成果が報告されている。これらにおいてはICAM-1やVCAM-1などの接着分子の発現がNF- κ Bデコイにより抑制されており、その結果として、細胞浸潤や増殖が抑制されたと考えられている。また、心臓移植後慢性拒絶で認められる冠動脈病変は、心臓移植患者の長期予後を左右する因子であるが、現在のところ予防および治療法がない。病理学的にはこの血管病変は冠動脈形成後再狭窄と類似した所見を呈し、未分化な平滑筋細胞が新生内膜を形成する。われわれはマウス心臓移植モデルを用いて、移植後冠動脈病変がNF- κ Bデコイによって予防されるかを検討した。minor mismatchの組み合わせで移植された心臓は慢性的に拒絶されて移植心血管病変が進行する。NF- κ Bデコイ導入を移植時に導入することによって、この血管病変とVCAM-1の発現が抑制された⁸⁾(Fig. 1)。

上記の成果を基礎にNF- κ Bデコイを用いた臨床応用がなされている。冠動脈形成術後の再狭窄は、患者の

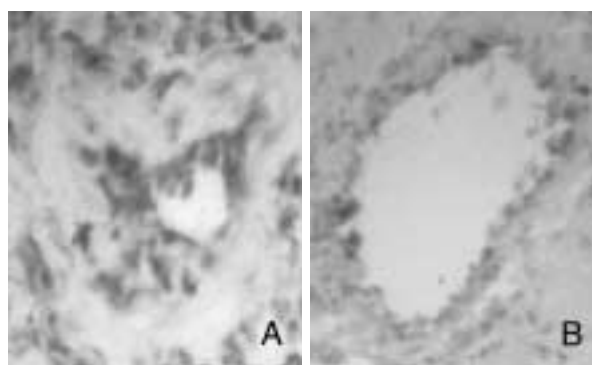


Figure 1 Representative immunohistochemistry detecting VCAM-1 expression in the murine cardiac allograft arteries. Non-treated allografts showed enhanced expression of VCAM-1 in the thickened intima. However, NF- κ B decoy transfected allograft arteries showed suppressed VCAM-1 expression with no intimal thickening.⁸⁾

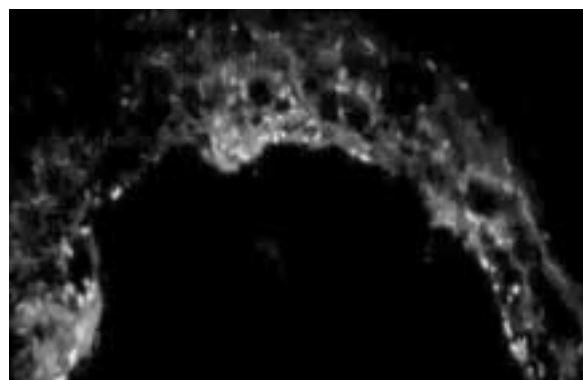


Figure 2 Representative pathology of swine coronary arteries with PCI and FITC-labeled decoy transfection. FITC-labeled decoy was transfected into not only the coronary endothelium but also the vascular wall.⁹⁾

長期予後を左右する重大な要素であるが、いまだにその予防法は解明されていない。ステントを用いた形成術では、バルーンによる形成術後より再狭窄の割合は少なくなっているが、完全には抑制できていない。この再狭窄は血管の物理的傷害に対して惹起された炎症であり、その進展にNF- κ Bが重要な役割を演じている。そこで、われわれは医薬品機構基礎研究推進事業の委託研究プロジェクトとして、課題「転写因子制御によるNF- κ B阻害薬開発と再狭窄治療への応用」を、東京医科歯科大学、大阪大学、九州大学において分担研究している。東京医科歯科大学循環器内科では、臨床応用する前段階の検討として、ブタを用いた導入効率と安全性の検討を実施した。FITCラベルされたデコイをブタ冠動脈に導入したところ、血管内皮と中膜血管平滑筋の一部に導入が確認された (Fig. 2)。また、導入に際して局所および全身の副作用を認めず、安全性も確認された。以上の実験結果を基礎として臨床応用の検討に入った。2002年12月に初めて東京医科歯科大

学循環器内科で実施されて以来、2005年1月現在までに合計17症例に実施され、導入時点での問題点はなかったことが報告されている。東京医科歯科大学循環器内科における最初の2例については導入後6カ月の結果が報告され⁹⁾ (Fig. 3)、全体の長期効果についても現在検討中である。

E2Fデコイ

E2Fは多くの細胞周期調節遺伝子を同時に活性化する転写因子であり、血管形成後再狭窄の原因の一つである血管平滑筋細胞増殖に重要な役割を演じている。デコイによりE2Fを制御すれば、多くの細胞周期調節遺伝子を同時に制御することができるため、これまでに細胞培養や実験動物を用いた多くの成果が報告されている。

実験的には1995年に森下らが報告したのが最初である。彼らはまず、E2FデコイがゲルシフトアッセイでE2F結合蛋白と完全に競合していることを証明した。

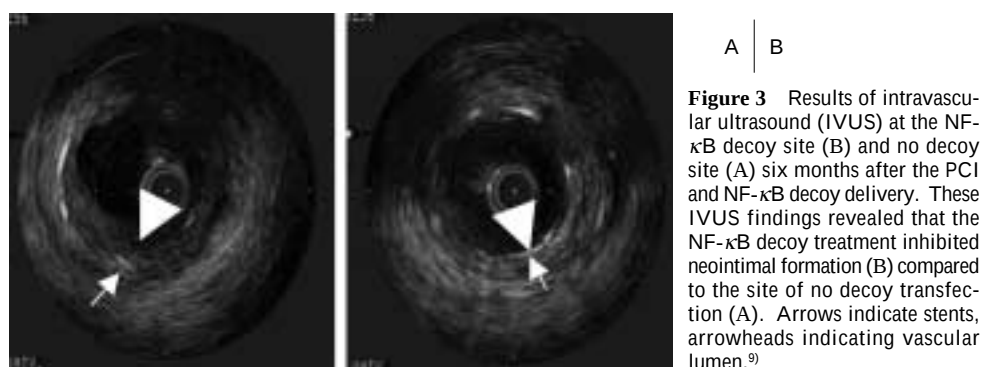


Figure 3 Results of intravascular ultrasound (IVUS) at the NF- κ B decoy site (B) and no decoy site (A) six months after the PCI and NF- κ B decoy delivery. These IVUS findings revealed that the NF- κ B decoy treatment inhibited neointimal formation (B) compared to the site of no decoy transfection (A). Arrows indicate stents, arrowheads indicating vascular lumen.⁹⁾

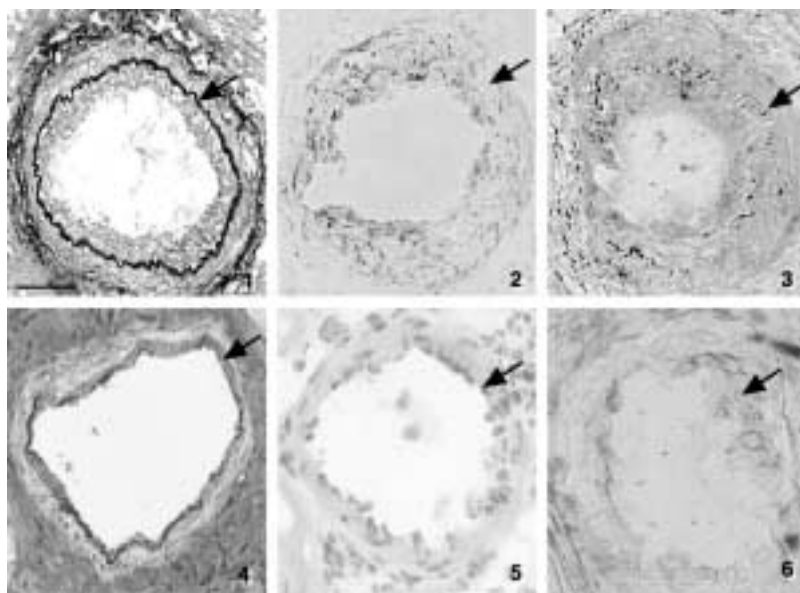


Figure 4 Representative pathological findings of primate allograft arteries at day 28 after transplantation. Allograft arteries without any gene transfection (the upper row). Allograft arteries transfected with E2F decoy (the lower row). 1 and 4 show coronary arteries stained with EvG to demonstrate intimal thickening. 2 and 5 show PCNA expression revealed by immunohistochemistry, and 3 and 6 show cdc2 kinase mRNA expression detected by *in situ* RT-PCR. PCNA and cdc2 kinase were strongly and diffusely expressed in the thickened intima of the allograft arteries from recipients without decoy transfection, whereas their expression was weak in the allografts transfected with the E2F decoy. Arrows indicate internal elastic lamina. Bar=50 μ m.¹¹⁾

さらに、培養実験系でE2Fデコイは種々の細胞周期調節遺伝子発現を制御して平滑筋細胞増殖を抑制し、ラット頸動脈傷害モデルにおいて新生内膜肥厚の進展を導入後8週間にわたり抑制した¹⁰⁾。われわれは、E2Fデコイがこの心臓移植後血管病変を予防しうるかをマウスおよびニホンザルで検討した。マウスでは、E2Fデコイはcdk2 kinaseを単独にアンチセンスにて抑制した群に比べて有意に冠動脈病変進展を抑制した。さら

に、ニホンザルを用いた実験でもその抑制効果が確認された¹¹⁾ (Fig. 4)。

上記の成果を基礎にE2Fデコイを用いた臨床応用がなされている。心臓バイパス術は米国では年間60万件実施されているが、長期的には約半数のグラフトが閉塞する。Dzauらは高リスク患者における心臓バイパス静脈グラフト閉塞をE2Fデコイを導入することにより予防できることを証明した。この報告では、E2Fデコ

イはベクターを用いないで圧力のみで血管壁に導入 (89%の導入効率)された。12カ月の観察期間中に、非導入群では約70%が閉塞したのに対し、E2Fデコイ導入により閉塞率は約30%に有意に低減された。期間中に全身および局所に副作用などは認めなかった^{12, 13)}。

おわりに

循環器疾患に関するこれまでのデコイを用いた遺伝子治療を概観した。従来の方法では治療効果が期待できなかったり、副作用が問題となっている疾患に対して、デコイによる遺伝子治療は有用な治療法になる可能性がある。今後のさらなる検討が期待されている。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学森下竜一先生、金田安史先生に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Morishita R: Perspective in progress of cardiovascular gene therapy. *J Pharmacol Sci*, 2004, **95**: 1–8.
- 2) Morishita R: Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J*, 2002, **66**: 1077–1086.
- 3) Tomita N, Ogihara T, Morishita R: Transcription factors as molecular targets: molecular mechanisms of decoy ODN and their design. *Curr Drug Targets*, 2003, **4**: 603–608.
- 4) Morishita R, Aoki M, Kaneda Y: Decoy oligodeoxynucleotides as novel cardiovascular drugs for cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **947**: 294–301.
- 5) Morishita R, Higaki J, Tomita N et al: Application of transcription factor “decoy” strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. *Circ Res*, 1998, **82**: 1023–1028.
- 6) Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K et al: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element ‘decoy’ of nuclear factor- κ B binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther*, 2001, **8**: 1635–1642.
- 7) Shintani T, Sawa Y, Takahashi T et al: Intraoperative transfection of vein grafts with the NF- κ B decoy in a canine aortocoronary bypass model: a strategy to attenuate intimal hyperplasia. *Ann Thorac Surg*, 2002, **74**: 1132–1137.
- 8) Suzuki J, Morishita R, Amano J et al: Decoy against nuclear factor- κ B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Gene Ther*, 2000, **7**: 1847–1852.
- 9) Suzuki J, Ito H, Gotoh R et al: Initial clinical cases using an NF- κ B decoy at the site of the coronary stenting for prevention of restenosis. *Circ J*, 2004, **68**: 270–271.
- 10) Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M et al: A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**: 5855–5859.
- 11) Kawauchi M, Suzuki J, Morishita R et al: Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE-liposome method in mice and nonhuman primates. *Circ Res*, 2000, **87**: 1063–1068.
- 12) Mann MJ, Whittmore AD, Donaldson MC et al: Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*, 1999, **354**: 1493–1498.
- 13) Mann MJ, Dzau VJ: Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *J Clin Invest*, 2000, **106**: 1071–1075.

Prevention of Vessel Diseases Using Decoy Transfection

Jun-ichi Suzuki

Cardiovascular Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Key words: decoy, NF- κ B, E2F, gene therapy, restenosis

Transfection of cis-element double-stranded DNA (decoy) has emerged as an additional clinical strategy to facilitate gene therapy. Furthermore, its usefulness has been reported in medical literature. In this article, we reviewed (1) experimental results of NF- κ B decoy and E2F decoy from the cardiovascular disease models, (2) the ongoing clinical trials of decoy transfection in treating vascular diseases. (*J Jpn Coll Angiol*, 2005, **45**: 151–154)