

単球走化性促進因子(MCP-1)を標的とした再狭窄予防

大谷 規彰 江頭 健輔

要旨: 薬剤溶出ステントは、冠動脈インターベンション後の再狭窄を減らすことに成功し、虚血性心疾患に対する治療戦略は新たな局面を迎えている。しかし、再狭窄におけるすべての問題が解決されたわけではなく、糖尿病患者や病変によっては依然再狭窄率は高く、また、現行の搭載薬剤が再内皮化を遅延させ、遅発性再狭窄を引き起こす可能性があり、長期成績への危惧もある。われわれは再狭窄における炎症の役割に注目し、血管傷害後の炎症に必須の役割を果たすMCP-1の機能抑制により実験的再狭窄が抑制できることを、霊長類を含む実験動物を用いて明らかにしてきた。MCP-1の抑制により炎症が抑制されるだけでなく、平滑筋遊走・増殖が抑制され、内皮再生は影響を受けないことが分かってきた。今後、MCP-1を標的にした再狭窄治療法の確立が期待される。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 155-159)

Key words: MCP-1, inflammation, macrophage, drug-eluting stent

はじめに

現在、わが国で年間15万例、世界で150万例の冠動脈インターベンション(percutaneous coronary intervention: PCI)が行われているが、そのうち60~70%をステント留置術が占め、中核をなす治療となっている。しかしながらステント留置後の新生内膜形成による再狭窄が20~40%の割合で生じ、問題となっている。

薬剤溶出ステント(drug-eluting stent: DES)の登場により、冠動脈ステント留置後の再狭窄が劇的に減少し、虚血性心疾患に対する治療法は新たな時代に入ったといえる。なかでも免疫抑制薬シロリムスと抗悪性腫瘍薬パクリタキセルを使用した溶出ステントは大規模臨床試験で有効性が確認された¹⁻⁴⁾。しかしながら未決の問題も残されている。

現行のDESの問題点

薬剤溶出ステントは大規模臨床試験で有望な結果を示したことから、局所への薬物運搬により、局所での薬物濃度を上げることが今後の再狭窄抑制への研究として一つの戦略となる。一方で再狭窄の機序やコー

ティングステントによる再狭窄抑制機序には不明の点が多く残され、新たな問題も生じている。問題点として、長期間の抗血小板治療が必要で、手術などのために中断せざるを得ないときは細心の注意が必要なこと⁵⁾、再狭窄率は減少させたが、心血管イベントや総死亡は従来のステント治療と変わらないこと⁶⁾、糖尿病患者や細い病変、長い病変では再狭窄を起こしやすいこと、ステントにコーティングするポリマーに対する過敏反応が起こること⁷⁾、再内皮化遅延による遅発性再狭窄や冠動脈瘤発生などが起こる可能性があり^{8,9)}長期予後が不明なことなどが挙げられる。

再狭窄の機序

PCI後再狭窄の機序は、狭窄部を拡張することで生じる血管損傷に伴う、修復機転としての、平滑筋様細胞の過剰増殖からなる新生内膜の形成である。バルーン拡張術の再狭窄の機序には、新生内膜形成のほか、一度拡張された血管が弾性リコイルにより徐々に縮小する陰性リモデリングが加わる。ステント留置術の再狭窄は新生内膜肥厚が主因だが、その分子機序にステント金属に対する異物反応としての炎症や組織傷

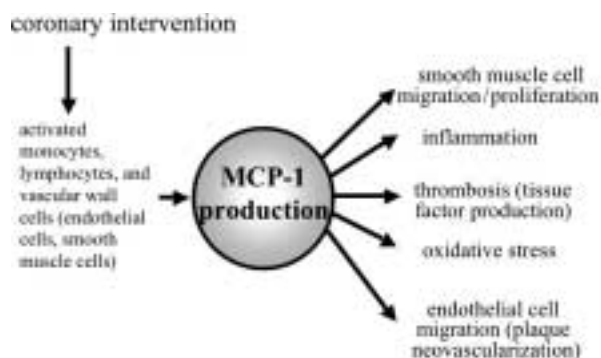


Figure 1 The role of the MCP-1 pathway in pathogenesis of restenosis.

害後の修復反応が重要な役割を果たしていることが示されている^{10,11)}。組織学的検討ではバルーン拡張術と比較し、ステント留置術では慢性的にステント部への単球・マクロファージの浸潤が認められる¹²⁾。ステント部周囲のマクロファージを中心とする炎症性細胞の浸潤程度と新生内膜形成は相関し、再狭窄病変では炎症性細胞の浸潤が多いことが報告されている¹³⁾。

再狭窄における単球，MCP-1の役割

PCIにより血管壁が損傷を受けると、単球・マクロファージの浸潤を伴う炎症性反応が惹起される。PCI施行後の患者の血管局所、もしくは全身の炎症の度合いが、再狭窄に大きくかわることが知られている¹⁴⁾。ステント留置後の末梢血での単球数や冠状静脈洞での炎症細胞の表面抗原Mac-1の活性化が新生内膜の大きさと相関するという報告もある。単球・マクロファージの浸潤や機能調節には、単球走化性促進因子(monocyte chemoattractant protein-1: MCP-1)が必須の役割を果たすため、MCP-1がPCI後、炎症を制御し得ることが予想される。後に再狭窄を起こす患者では、再狭窄を起こさない患者と比較し、PCI後の血漿MCP-1濃度が高く、また遷延するという報告がある¹⁵⁾。また、急性冠症候群の患者の血中MCP-1濃度が高い方が、予後は悪いという報告もある。組織科学的検討では再狭窄病変ではMCP-1の発現増強がみられ、マクロファージの浸潤が多いことが知られている。これらより、局所および全身的なマクロファージの活性化が新生内膜形成に大きくかわっていることが示唆され^{13,16)}、MCP-1は血管再狭窄の大きな治療標的と考えられる。

MCP-1はその受容体であるCCR2に結合することに

より、効力を発揮する。MCP-1とCCR2は正常血管壁ではほとんど発現していないが、血管が障害されると、その早期からほとんどすべての血管壁細胞で発現が増加し、炎症反応を増幅させ、新生内膜形成へと進む(Fig. 1)。

変異型MCP-1遺伝子導入による抗MCP-1遺伝子治療

われわれはMCP-1の受容体の拮抗作用を有する変異型MCP-1(MCP-1のN末端2~8番目のアミノ酸を欠損したもの、7ND)遺伝子を用いて、MCP-1活性を生体レベルで効率よく阻止できる遺伝子治療を開発した。すなわち、変異型MCP-1遺伝子の骨格筋注入により遺伝子発現が生じタンパクが循環血中に分泌されること、分泌されタンパクはMCP-1受容体に結合し、受容体シグナルを抑制すること、また遠隔臓器でのMCP-1による単球浸潤を抑制できることを明らかにした¹⁷⁾(Fig. 2)。霊長類を使用した毒性試験では、明らかな副作用(急性毒性、抗原性、免疫異常、アレルギー)は認めなかった。

変異型MCP-1遺伝子導入による実験的再狭窄の抑制

われわれはこれまで、7NDの遺伝子導入により、実験的再狭窄(バルーン傷害、外膜傷害、ステント留置)が抑制できることを、マウス、ラット、家兔、カニクイザルを用いて明らかにしてきた¹⁸⁻²⁰⁾。高コレステロール食負荷家兔とカニクイザルの腸骨動脈にステントを留置したモデルでは7ND遺伝子プラスミドの骨格筋導入による全身的效果によって、血管局所でのマクロファージの浸潤減少や増殖細胞の減少、炎症性・増

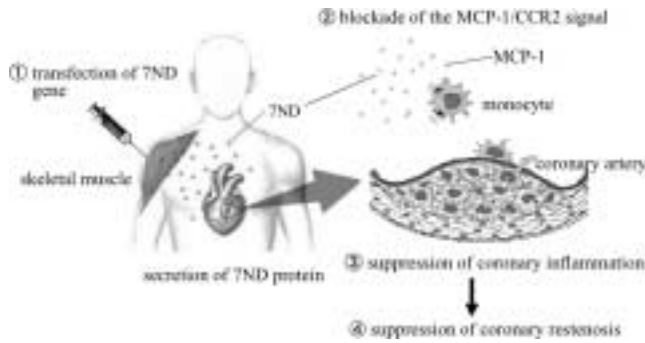


Figure 2 The schema for strategy of anti-MCP-1 gene therapy by 7ND gene transfer. To achieve effective blockade of the MCP-1/CCR2 signal pathway, we transfected the expression plasmid vector encoding 7ND gene into skeletal muscle. We reported that 7ND protein is secreted from the transfected skeletal muscle cells into the circulating blood, blocks the MCP-1/CCR2 signal pathway in coronary artery, and suppresses monocyte recruitment into the coronary artery.

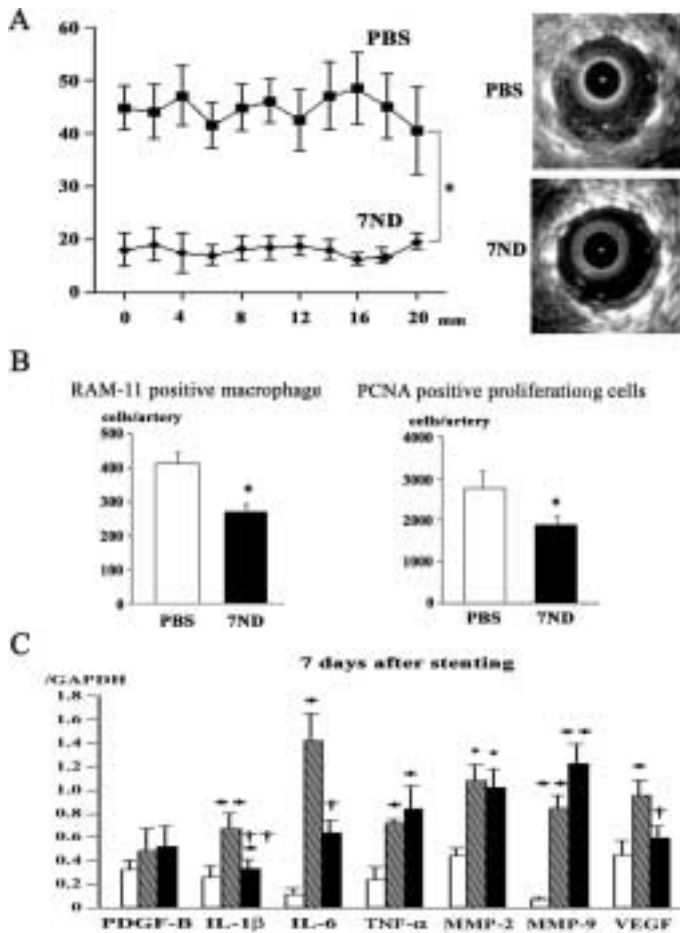


Figure 3 Effects of 7ND gene transfer on in-stent neointimal hyperplasia in rabbits.

A: Left; mean percent area stenosis within stent in the PBS-treated and 7ND-transfected rabbits as assessed by intravascular ultrasound. X axis: distance from the distal to the proximal stent end, Y axis: % cross sectional stenosis. Upper right panel shows an intravascular ultrasound cross-section image in PBS-treated animal with large neointimal hyperplasia. Lower right panel displays an intravascular ultrasound cross-section image in 7ND-transfected animal with small neointimal hyperplasia. * $p < 0.01$ between PBS and 7ND

B: Effects of 7ND gene transfer on inflammatory and proliferative changes. Artery sections 7 days after stenting immunohistochemically stained for monocytes/macrophages (RAM-11) or proliferating cells (PCNA) and summary of quantitative analyses are presented. * $p < 0.01$ versus PBS

C: Gene expression and immunohistochemistry in the stented artery of rabbits. Analysis of expression of various genes by real time RT-PCR in noninjured controls (open bars) and stented arteries from PBS-treated rabbits (hatched bars) and stented arteries from rabbits transfected with 7ND gene (closed bars). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control (no injury), † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ versus the PBS group.

殖性サイトカインの減少がもたらされ、新生内膜の形成抑制がみられた (Fig. 3)。

さらに、われわれは局所療法の有用性を明らかにするために、アデノウイルスベクターを用いて 7ND 遺伝

子をステント留置部位に局所導入したカニクイザルモデルの実験を実施した。その結果、遺伝子プラスミドの骨格筋導入よりさらに強力に新生内膜形成の抑制が達成された (Fig. 4)。

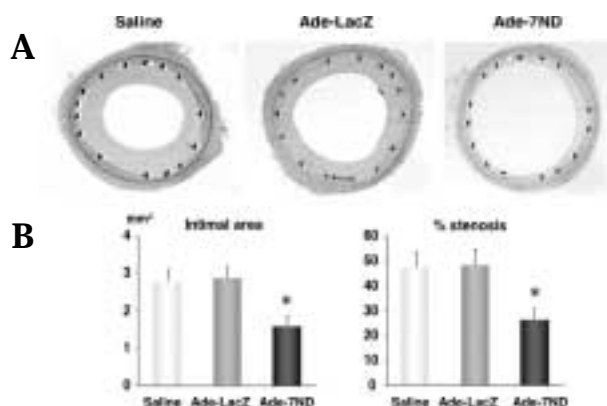


Figure 4 Effects of adeno-7ND gene transfer on in-stent neointimal hyperplasia in cynomolgus monkeys.

A: Arterial sections of stented artery from the normal saline group (left panel), adeno-LacZ group (middle panel), and 7ND-transfected group (right panel) 28 days after stenting stained with Elasticvan-Gieson.

B: Effect of 7ND gene transfer on intimal area and % stenosis 28 days after stenting. * $p < 0.01$ versus normal saline.

また、7NDタンパクを用いた培養細胞における実験では、7NDは単球の遊走抑制だけでなく、平滑筋の遊走・増殖を抑制した。内皮細胞の再生は抑制しないことが明らかになった。このことは、7NDは新生内膜形成の原因である単球や平滑筋細胞の機能を抑制する一方で、血管の修復過程に必要な再内皮化は抑制せず、7NDを局所に送達することができれば再狭窄がより安全かつ効果的に抑制される可能性が示唆された。これらの基礎研究成績を基盤にして、現在、7ND遺伝子溶出型ステントを作製し、前臨床試験を実施している。

おわりに

現行の薬剤溶出ステントは再狭窄率を劇的に減少させることに成功したが、そこで新たな課題も出てきた。再狭窄に対する取り組みはこれで終わりではなく、その課題を克服する第二、第三世代の薬剤溶出ステントの開発が進んでいる。MCP-1は炎症だけでなく、さまざまな機序を介して再狭窄の機序に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。抗MCP-1療法によって再狭窄がより安全かつ効果的に抑制される可能性が示唆され、さらなる検討を進めている。

文 献

- 1) Morice MC, Serruys PW, Sousa JE et al: A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*, 2002, **346**: 1773–1780.
- 2) Moses JW, Leon MB, Popma JJ et al: Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in

a native coronary artery. *N Engl J Med*, 2003, **349**: 1315–1323.

- 3) Stone GW, Ellis SG, Cox DA et al: A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2004, **350**: 221–231.
- 4) Park SJ, Shim WH, Ho DS et al: A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 1537–1545.
- 5) McFadden EP, Stabile E, Regar E et al: Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet*, 2004, **364**: 1519–1521.
- 6) Holmes DR Jr, Leon MB, Moses JW et al: Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. *Circulation*, 2004, **109**: 634–640.
- 7) Virmani R, Guagliumi G, Farb A et al: Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation*, 2004, **109**: 701–705.
- 8) Fukuda D, Sata M, Tanaka K et al: Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation*, 2005, **111**: 926–931.
- 9) Farb A, Heller PF, Shroff S et al: Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation*, 2001, **104**: 473–479.
- 10) Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ et al: Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation*, 1999, **99**: 44–52.
- 11) Kornowski R, Hong MK, Tio FO et al: In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **31**:

- 224–230.
- 12 Horvath C, Welt FG, Nedelman M et al: Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circ Res*, 2002, **90**: 488–494.
- 13 Farb A, Weber DK, Kolodgie FD et al: Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*, 2002, **105**: 2974–2980.
- 14 Almagor M, Keren A, Banai S: Increased C-reactive protein level after coronary stent implantation in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J*, 2003, **145**: 248–253.
- 15 Cipollone F, Marini M, Fazio M et al: Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 327–334.
- 16 Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J et al: Macrophage infiltration predicts restenosis after coronary intervention in patients with unstable angina. *Circulation*, 1996, **94**: 3098–3102.
- 17 Egashira K, Koyanagi M, Kitamoto S et al: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats: blockade of MCP-1 activity after intramuscular transfer of a mutant gene inhibits vascular remodeling induced by chronic blockade of NO synthesis. *Faseb J*, 2000, **14**: 1974–1978.
- 18 Mori E, Komori K, Yamaoka T et al: Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*, 2002, **105**: 2905–2910.
- 19 Usui M, Egashira K, Ohtani K et al: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. *Faseb J*, 2002, **16**: 1838–1840.
- 20 Ohtani K, Usui M, Nakano K et al: Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy reduces experimental in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits and monkeys. *Gene Ther*, 2004, **11**: 1273–1282.

Anti-monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy for Restenosis

Kisho Ohtani and Kensuke Egashira

Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka, Japan

Key words: MCP-1, inflammation, macrophage, drug-eluting stent

The development of drug-eluting stents (DES) has been a major breakthrough in modern interventional cardiology. The dramatically improved results of the recent clinical trials for not only sirolimus- but also paclitaxel-eluting stents will make physicians rethink how they manage patients with coronary artery disease. However, there remain some unsolved problems. Diabetes, smaller diameter vessels, and longer lesions inflict higher rates of restenosis. The current loading drugs have the potential for delayed endothelialization which promotes thrombus formation and late vessel occlusion. And long-term efficacy of current DES has yet to be proven. Vascular injury after balloon injury and stent implantation surges the incidence of inflammatory responses that accelerates the recruitment and activation of monocytes. We hypothesized that inflammatory changes mediated by MCP-1 were essential in restenosis, and demonstrated that blockade of MCP-1 by 7ND gene transfer suppressed experimental restenosis. 7ND not only suppressed monocyte infiltration/activation but also smooth muscle cells migration and proliferation. The fact that this strategy did not affect endothelial proliferation suggests anti-MCP-1 gene therapy may be useful in treating human restenosis after coronary intervention. (*J Jpn Coll Angiol*, 2005, **45**: 155–159)