

Chimera decoy を使った腹部大動脈瘤の遺伝子治療

三宅 隆¹ 青木 元邦² 森下 竜一¹

要 旨：小径動脈瘤は外科的治療の適応にならず早期発見されたメリットを生かした有効な治療方針が確立していない。NFκBとetsの2つの転写因子は人間の動脈瘤の進展に関与していることが明らかになり、これらをブロックするデコイ療法はウサギ動脈瘤モデルで有効性が確認され、小径動脈瘤の新規治療法になる可能性が示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 297-303)

Key words: gene therapy, aneurysm, decoy, NFκB, ets

序 言

大動脈瘤は無症候性に発症・増大し最終的に破裂に至る疾患である。破裂を予防するために外科的な人工血管置換術が確立され良好な成績を収めている。また、低侵襲治療としてステントグラフト内挿術も行われるようになってきた。しかし、検診などで行われる超音波・CT検査で小径の動脈瘤が偶然発見される機会が多くなっているが、その治療法は現在確立されていない。近年分子生物学の進歩によって大動脈瘤の進行機序の解明も進んでおり、早期発見されたメリットを生かした小径動脈瘤の新しい治療法の開発が期待されるようになっている。

小径動脈瘤の新しい治療方針

4cm未満の小径腹部大動脈瘤の治療方針は、破裂のリスクが少ないことから多くの施設で経過観察となっている。しかし、小径瘤が自然に消退した報告はなく、増大速度に違いはあるが徐々に拡大し最終的には外科的な治療が必要になる。完成された大きな動脈瘤の組織では平滑筋細胞などの血管を構成する細胞減少が起こり、代わりに線維化が進んでいる。しかし、小径の瘤ではこれらの細胞が残っており、浸潤した炎症細胞とともにプロテアーゼ群を分泌し弾性線維などの細胞外マトリックスの破壊を来し動脈瘤の発症・進展

をひき起こすと考えられている^{1,2)}。しかし、基礎的実験からこれらの細胞は血管壁の構成成分であるエラスチンやコラーゲンといった細胞外マトリックスを合成する能力も有することがわかってきており、この瘤壁内の細胞をターゲットにした治療法が考えられるようになった。小径瘤のうちに進行する血管壁の破壊を停止させ、反対に再生させる分子治療・薬物療法の確立は外科的治療で発生する手術侵襲や人工物の留置を避けられ、早期発見のメリットを生かした新規治療法となると考えられる。

動脈瘤の形成過程におけるNFκBとetsの関与

動脈瘤では血管外膜側の炎症がトリガーとなり、多くのプロテアーゼが分泌される³⁾。特にプロテアーゼ群の中でもmatrix metalloproteinases (MMPs) 2とMMP-9が瘤の形成過程で中心的な役割を果たしている^{2,4)}。これらの病態に関連した多くの遺伝子発現の初期過程では特定の転写調節因子が関与している。われわれは動脈瘤進展の首座である炎症とMMPの活性亢進に関与する転写因子としてnuclear factor kappa B (NFκB)とetsに注目した。NFκBは免疫と炎症に関与する遺伝子群をコントロールする転写因子として知られている。NFκBの活性化は各種のサイトカイン、ケモカインそして接着因子の発現を亢進し、これらの因子が炎症細胞の浸潤を誘導する⁵⁾。また、NFκBは直接MMP遺伝子のプロモーターに結合部分があり、MMP-1, MMP-2, MMP-3そし

¹大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学

²大阪大学大学院医学系研究科加齢医学

2007年3月26日受理

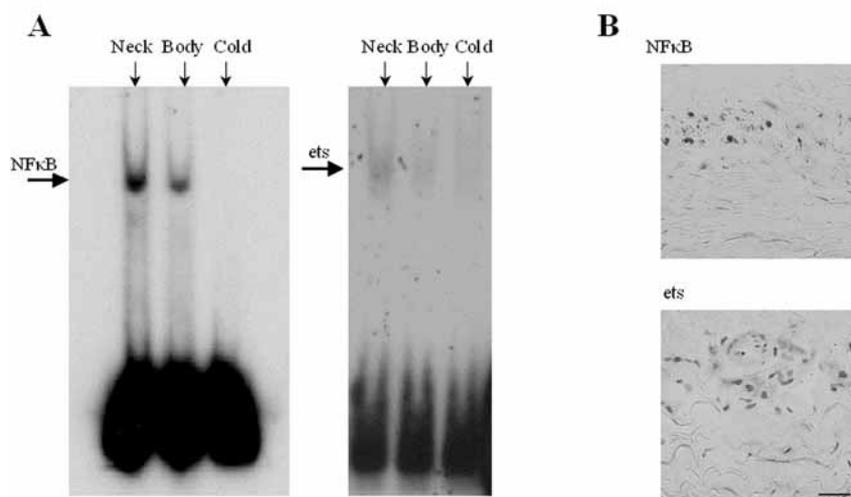


Figure 1 Activation of NFκB and ets in human AAA samples.
 A: Representative results of EMSA for NFκB and ets binding sites.
 B: Immunohistochemical staining of NFκB and ets in outer aneurysm wall.
 Neck: nuclear extracts (10 μg) from the neck of human harvested AAA, Body: nuclear extracts from the most dilated part of human harvested AAA, Cold: non-labeled probe (× 100 excess). Scale bar in B, 50 μm.

てMMP-9の合成を亢進する⁶⁻⁸⁾。もう一つの転写因子 etsは造血, 血管発生に関与する遺伝子群をコントロールする転写因子であるが, これも直接MMPのプロモーターに結合部位を持ち, MMP-1, MMP-2そしてMMP-9の発現を亢進することが明らかにされている⁹⁻¹²⁾。われわれは実際に人間の動脈瘤壁でNFκBとetsが活性亢進しているかを人工血管置換術中に得られた瘤壁サンプルで検討した。gel shift assayで行った転写因子活性の評価では, 2つの転写因子の発現は動脈瘤で著明に亢進しており, 特に拡張が進行している瘤頸部のサンプルに強い活性を認めた。また, 免疫染色でもNFκBとets陽性細胞を外膜側に認め, その一部がマクロファージであることも確認された(Fig. 1)。このことから人間の動脈瘤進展において, これら2つの転写因子が強く関与していると考えられた。

核酸医薬による動脈瘤治療

1) デコイ療法

デコイ療法は遺伝子治療の範疇に含まれており, 人工的に作製された核酸医薬を使って転写因子の作用をブロックする方法である。本来活性化する多くの遺伝子発現を同時に調節できる特徴を持っている。具体的

には転写因子の結合部位を含むオリゴヌクレオチドを合成・二重鎖核酸(デコイ)とし, ターゲット細胞の核内に導入する。このデコイが転写因子と結合することでDNA上への転写因子の結合を阻害しプロモーター活性が低下, 本来発現する遺伝子群がコントロールされる(Fig. 2)。

2) 術中サンプルでのキメラデコイのMMP抑制効果

NFκBとetsの結合活性を同時に抑制することが可能なデコイ療法は動脈瘤の進展に関与する炎症とMMP発現に関与する複数の遺伝子を同時に制御することが可能であると考え, これら2つの転写因子の結合モチーフを持つキメラデコイを作製した。術中に得られた瘤壁サンプルを使った組織培養ではキメラデコイは用量依存性にMMP-1とMMP-9の発現を抑制した。この抑制効果はNFκBデコイを単独で導入したときより強い効果を示し, etsを同時にブロックする相乗効果と考えられる(Fig. 3)。

3) キメラデコイの動脈瘤治療効果

人間の瘤組織の検討からキメラデコイの治療効果が期待されたので, ウサギの動脈瘤モデルでその有効性

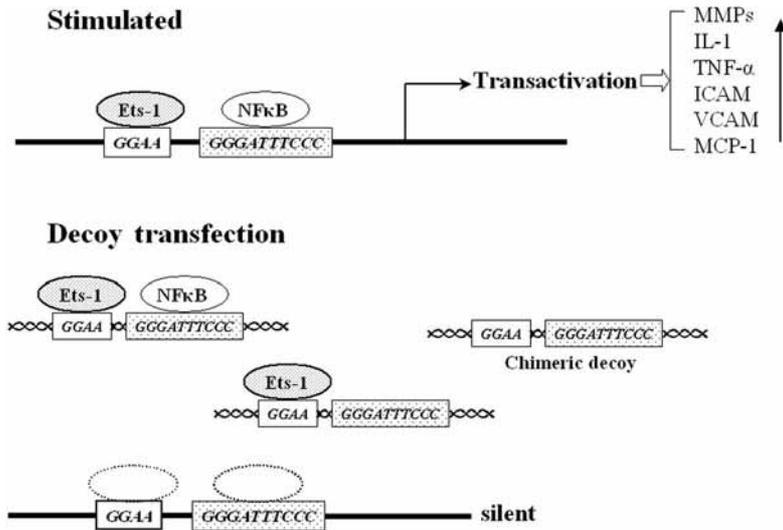


Figure 2 Chimeric decoy strategy. GGGATTCCC and GGAA are the consensus sequences for the NFκB and ets binding sites, respectively. The chimeric decoy *cis* element double-stranded ODN binds to free NFκB and ets, preventing transactivation of various genes described in the schema.

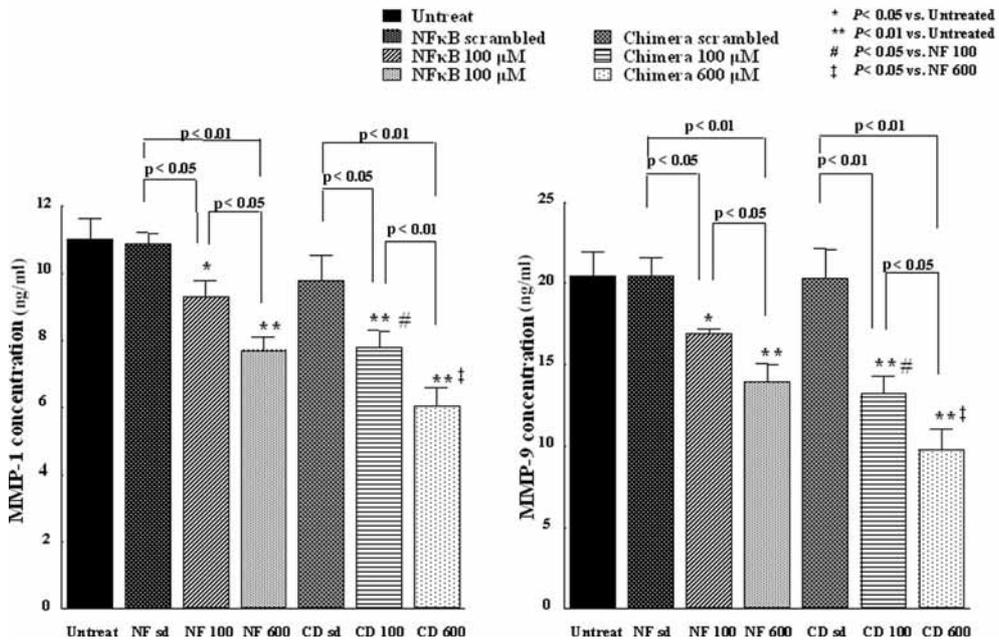


Figure 3 Inhibitory effects of chimeric decoy ODN in human AAA samples. Inhibitory effects of chimeric decoy ODN on secretion of MMP-1 and MMP-9 in organ culture systems, as assessed by ELISA.

を検討した。われわれはセルローズを器材にした導入シートを作製し、これを血管周囲に巻くことで動脈瘤の主病変である外膜側から中膜の一部まで導入可能な

方法を考案した(Fig. 4)。超音波検査で経過を観察すると瘤作製と同時にデコイを投与した実験では動脈瘤拡大に対する予防効果を認めた。さらに瘤作製 1 週間後

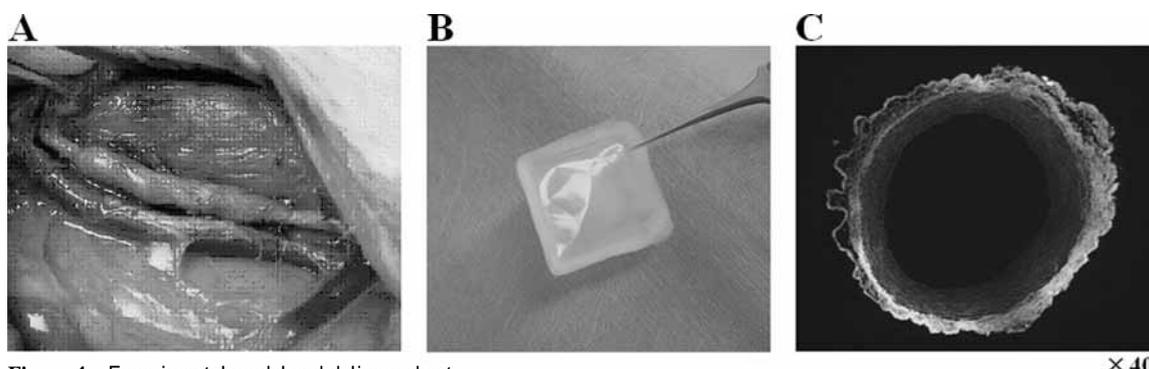


Figure 4 Experimental model and delivery sheet.
 A: Elastase-induced rabbit AAA model.
 B: Delivery sheet containing decoy ODN.
 C: Typical photograph of fluorescence in aorta of rabbit transfected with FITC-labeled ODN using delivery sheet.

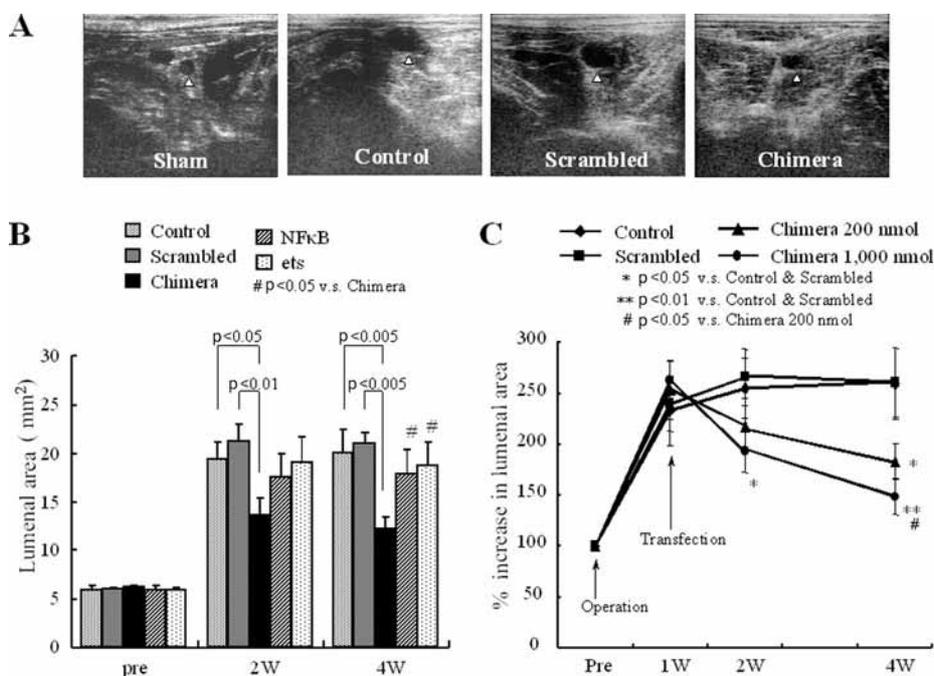


Figure 5 Prevention and regression of AAA by chimeric decoy ODN.
 A: Representative ultrasound of aortic dilatation at 4 weeks after transfection.
 B: Prevention of AAA by chimeric decoy ODN as assessed by ultrasound.
 C: Regression of AAA by chimeric decoy ODN.

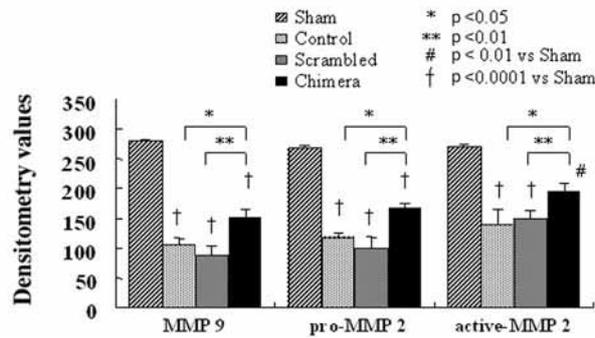
にデコイを投与した実験では動脈瘤縮小効果を示した (Fig. 5)。

メカニズムの検討ではアポトーシスに伴う炎症細胞浸潤の減少に加え、デコイの直接効果として瘤の進展に重要なMMP-2とMMP-9の発現抑制をザイモグラ

フィーで確認した (Fig. 6)。このことで血管壁破壊の進行が停止されたと考えられる。さらにreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) では動脈壁の主要構成成分であるコラーゲンI, IIIそしてエラスチンの合成亢進を認めた (Fig. 7)。血管壁のエラスチン合成は

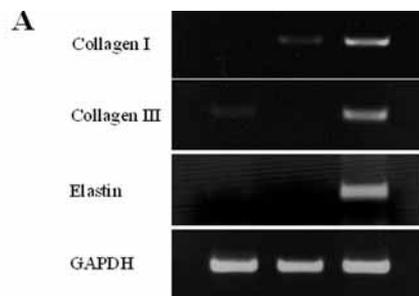


A



B

Figure 6 Inhibition of MMP expression of aneurysm wall by chimeric decoy ODN.
 A: Representative gelatin zymography at 1 week after transfection.
 B: Densitometric evaluation of gelatin zymography (high dose of MMP melts gel, resulting in low density of gel).



B

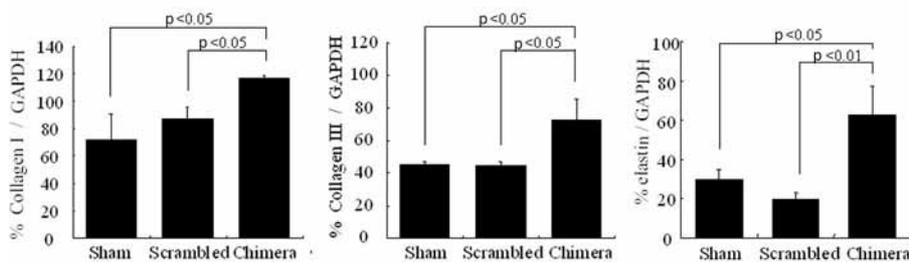


Figure 7 Increase of collagen type I, III and elastin gene expression.
 Semiquantitative RT-PCR analysis (A) and densitometric evaluation (B) at 1 week after transfection.

成人ではほとんど行われないと考えられている。しかし、近年エラスチンの合成亢進がいくつかの病態で確認された。NF κ Bの活性上昇はエラスチンの合成抑制に働くことが報告されており、デコイ投与によってこの抑制が解除されることが合成促進に働いたと考えられる¹³⁾。また、人間の動脈瘤ではコラーゲンIIIの合成亢進は確認されているが、コラーゲンIは正常血管で含有量が多いにもかかわらず合成の亢進はみられない。コラーゲン代謝においてもNF κ Bとetsはともに抑制的に作用することが報告されており、デコイによる抑制解除が合成亢進につながったと思われ、特にコラーゲンIの合成促進が重要であると考えられる^{14,15)}。

おわりに

血管壁の構成成分の合成は成長期には活発だが、成人になるとほとんど行われなくなる。このため血管壁の破壊が始まると再生能力を大きく超え、動脈瘤が形成されてくる²⁾。そこでこのバランスを再生に向かって傾けることが治療目標となる。NF κ Bとetsに対するキメラデコイ療法は有効な治療効果を示したがまだ解決すべき多くの問題が残っている。その一つに導入方法が挙げられる。デコイシートによる導入は病変の首座である外膜側に作用させる局所療法であるが、瘤周囲の剥離が必要であり大きな侵襲を与えることになる。臨床応用するには、より効果的で安全な遺伝子導入法・デリバリーシステムの確立が必要である。

文 献

- 1) Thompson RW: Basic science of abdominal aortic aneurysms: emerging therapeutic strategies for an unresolved clinical problem. *Curr Opin Cardiol*, 1996, **11**: 504–518.
- 2) Elmore JR, Keister BF, Franklin DP et al: Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*, 1998, **12**: 221–228.
- 3) Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA et al: Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 318–326.
- 4) Freestone T, Turner RJ, Coady A et al: Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1145–1151.
- 5) Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 1999, **18**: 6853–6866.
- 6) Bond M, Baker AH, Newby AC: Nuclear factor κ B activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **264**: 561–567.
- 7) Takeshita H, Yoshizaki T, Miller WE et al: Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol*, 1999, **73**: 5548–5555.
- 8) Kim H, Koh G: Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF- κ B-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **269**: 401–405.
- 9) Vandembunder B, Wernert N, Queva C et al: Does the transcription factor c-ets1 take part in the regulation of angiogenesis and tumor invasion? *Folia Biol (Praha)*, 1994, **40**: 301–313.
- 10) Nerlov C, Rorth P, Blasi F et al: Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene*, 1991, **6**: 1583–1592.
- 11) Gum R, Lengyel E, Juarez J et al: Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 10672–10680.
- 12) Watabe T, Yoshida K, Shindoh M et al: The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer*, 1998, **77**: 128–137.
- 13) Kuang PP, Berk JL, Rishikof DC et al: NF- κ B induced by IL-1 β inhibits elastin transcription and myofibroblast phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **283**: C58–C65.
- 14) Kouba DJ, Chung KY, Nishiyama T et al: Nuclear factor- κ B mediates TNF- α inhibitory effect on α 2(I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts. *J Immunol*, 1999, **162**: 4226–4234.
- 15) Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK et al: Ets1 is an effector of the transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF- β . *J Biol Chem*, 2002, **277**: 20399–20408.

Gene Therapy for Treating Abdominal Aortic Aneurysm Using Chimeric Decoy Oligodeoxynucleotides against NF κ B and ets

Takashi Miyake,¹ Motokuni Aoki,² and Ryuichi Morishita¹

¹Department of Clinical Gene Therapy, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

²Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

Key words: gene therapy, aneurysm, decoy, NF κ B, ets

Small abdominal aortic aneurysms (AAAs) have a low risk of rupture, and remain without well-defined treatment strategies. Therefore, the development of a novel therapeutic approach to treat AAA in the clinical setting is anticipated. Activation of NF κ B and ets might be one of the major factors in the process of aortic dilatation in humans. Suppression of these transcription factors using chimeric decoy oligodeoxynucleotides inhibited the progression of AAA through the re-balance of matrix synthesis and degradation in a rabbit model. Further modification of a chimeric decoy strategy would be useful to treat AAA as decoy-based therapy.

(J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 297–303)