

血管リモデリングにおける転写因子の役割とその制御

鈴木 淳一

要 旨：血管病変に対する新しい治療法を開発する際に、炎症は無視できない。NF- κ Bデコイは炎症において重要な転写因子NF- κ Bを特異的に抑制する。マウス移植心にNF- κ Bデコイを導入したところ、冠動脈病変の進展が抑制された。動脈傷害モデルにおいてもNF- κ Bデコイにより内膜肥厚が抑制された。NF- κ Bデコイを冠動脈形成術ステント部に導入する臨床試験が進行中である。近い将来、NF- κ Bデコイの広範な臨床応用が期待されている。(J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 333–336)

Key words: inflammation, NF- κ B, decoy, neointimal, stenting

はじめに

血管病変に対する新しい治療法を開発する際に、炎症の側面を無視することはできない。nuclear factor-kappa B(NF- κ B)は種々の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¹⁾。

われわれは、心臓移植後血管病変や動脈傷害後新生内膜形成などにおける炎症反応の進行においてNF- κ Bが活性化される点に注目した。NF- κ Bはサイトカインや細胞接着分子など広く炎症因子を活性化するため、炎症が関与する血管病の病勢進展に重要な役割を演じていることが知られている。この炎症反応の抑制のため、われわれは遺伝子導入等の手法を用いてNF- κ Bを制御する新しい治療法の開発を試みてきた。

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。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、このデコイの細胞内への導入による治療は、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^{2,3)}。

本稿では、血管リモデリングにおける転写因子の役割とその制御について、特にNF- κ Bデコイの有用性を概観し、合わせて最近のわれわれの知見を述べて今後の展望としたい。

心移植後血管病変における効果

心臓移植は、末期心臓病患者に対する治療として確立しており、現在までに約7万例の移植がなされている。移植後早期の予後は急性拒絶に対する優れた免疫抑制剤の登場で改善しているため、1年生存率が80%を越えている。しかし、慢性拒絶である冠動脈病変(graft arterial disease: GAD)に対してはその治療や予防法がないため、長期予後に関して最も大きな障壁となっている⁴⁾。

GADは、数年の経過でびまん性に冠動脈狭窄が進展することにより移植心の虚血を来す病態である⁵⁾。この冠動脈硬化は、移植後数年の間にほとんどの症例に観察され、狭窄が進行すると移植心は虚血に陥り心不全に至る⁶⁾。臨床的にはこの冠動脈狭窄病変は、定期的な冠動脈造影と血管内超音波検査により診断される⁷⁾が、進行した移植心冠動脈病変は狭窄部位が広範にわたるため経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス術による治療は一般に無効で、現在のところ救命には再移植

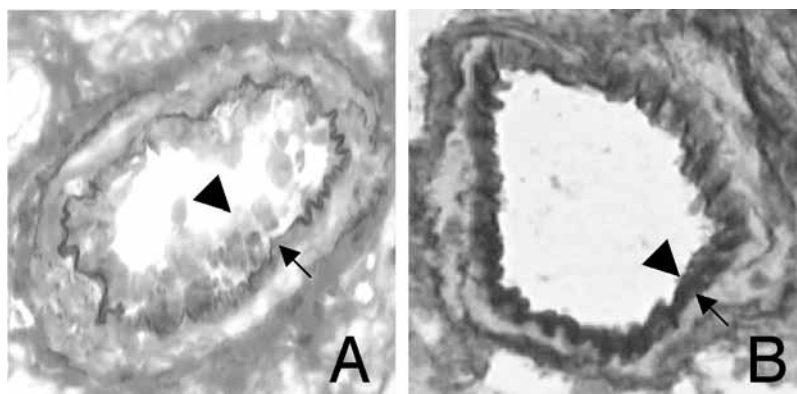


Figure 1 Representative graft coronary arteries of murine cardiac allografts (EvG staining).

Although the panel A (no treatment) shows significantly thickened intima, the panel B (NF-κB decoy) shows less neointimal formation.

arrows: internal elastic lamina, arrow-heads: endothelium

© 2000 Nature Publishing Group All rights reserved. Suzuki J, Morishita R, Amano J et al: Decoy against nuclear factor-kappa B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Gene Ther*, 2000, 7: 1847–1852.

しか有効な治療手技がない⁸⁾。

われわれは、移植心に遺伝子を導入することにより、GADの進展を抑制できることを動物実験で明らかにしてきた。最初に、GADにおける細胞周期調節遺伝子の役割を明らかにするために、マウス心臓移植モデルを用いて解析した。cdk2 kinaseに対するアンチセンスをhemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome法により、移植時に*ex vivo*で導入したところ、血管の内膜肥厚が有意に抑制され、細胞周期調節因子の制御が治療上有用であることが明らかとなった⁹⁾。同じく細胞周期調節遺伝子であるproliferating cell nuclear antigen (PCNA)に対するアンチセンスを導入したところ、血管の内膜肥厚がcdk2 kinaseと同様に有意に抑制された¹⁰⁾。さらに、複数の細胞周期調節遺伝子を同時に制御するE2FデコイによってもGADは抑制された¹¹⁾。一方、GADにおける細胞死(apoptosis)の役割を明らかにするために、細胞死を調節する調節遺伝子であるBcl-xに対するアンチセンスを導入したところ、細胞死の誘導と血管内膜肥厚が有意に抑制され、細胞死のコントロールも治療上有用であることが明らかとなった¹²⁾。

以上の解析の結果、GADの抑制には種々の因子を単独に抑制しても不十分であることが解明された。そこで、われわれが最も注目したのは、NF-κBデコイの導入により、多くの炎症因子を同時に抑制する方法である。NF-κBデコイの効果を確かめるために、class IIミスマッチの組み合わせによりマウス異所性心臓移植モデルを作製した。移植心においては、抗原提示によりサイトカインなどの炎症性物質が活性化して、GADが進行していた。この移植心に*ex vivo*でNF-κBデコイを導

入したところ、サイトカインや接着分子の発現低下がみられ、その結果新生内膜形成の程度が減弱した¹³⁾ (**Fig. 1**)。

血管病変における効果

血管病変においても、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¹⁴⁾、静脈グラフト¹⁵⁾の内膜肥厚の進展が抑制されたなどの成果が報告されている。これらにおいてはintercellular adhesion molecule (ICAM)-1やvascular cell adhesion molecule (VCAM)-1などの接着分子の発現がNF-κB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。われわれは、NF-κBデコイをウイルスベクターを用いずに対象となる血管に導入するために、超音波遺伝子導入法を採用しており、良好な内膜肥厚予防効果を得ている¹⁶⁾。本研究においては、ラット大腿動脈をワイヤーにて傷害するモデルを採用した。このモデルでは、無治療にて傷害後に著明な内膜肥厚を形成する。われわれはまず、超音波導入法による導入効率をfluorescein isothiocyanate (FITC)ラベルしたデコイを用いて確認した。FITCラベルしたデコイをマイクロバブルと混和して血管外より浸透させ、超音波を該当部位にのみ照射した。その結果、著しいFITCの導入が確認され、その導入細胞数はコントロールと比し著しく増加していた。また、超音波照射部位以外には、FITCデコイの導入は確認されなかった。この結果を基礎に、NF-κBデコイを傷害血管に超音波-マイクロバブル法を用いて導入したところ、ICAM-1などの接着分子などの発現が抑制されて、

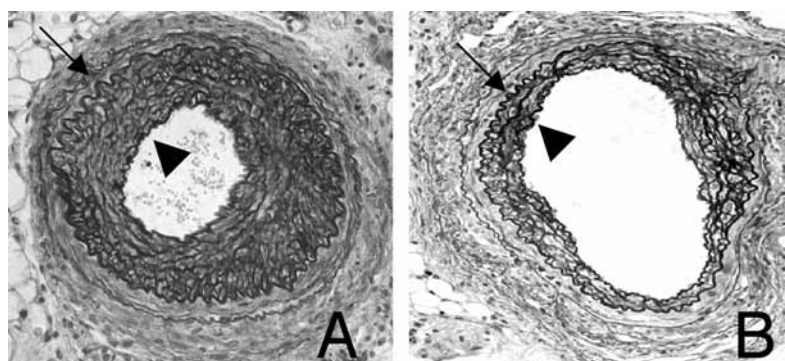


Figure 2 Representative femoral arteries after wire injury (EvG staining). Although the panel A (no treatment) shows significant thickened intima, the panel B (NF- κ B decoy) shows less neointimal formation. arrows: internal elastic lamina, arrowheads: endothelium
© 2006 S. Karger AG, Basel All rights reserved. Inagaki H, Suzuki J, Ogawa M et al: Ultrasound-microbubble-mediated NF- κ B decoy transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice. *J Vasc Res*, 2006, **43**: 12–18.

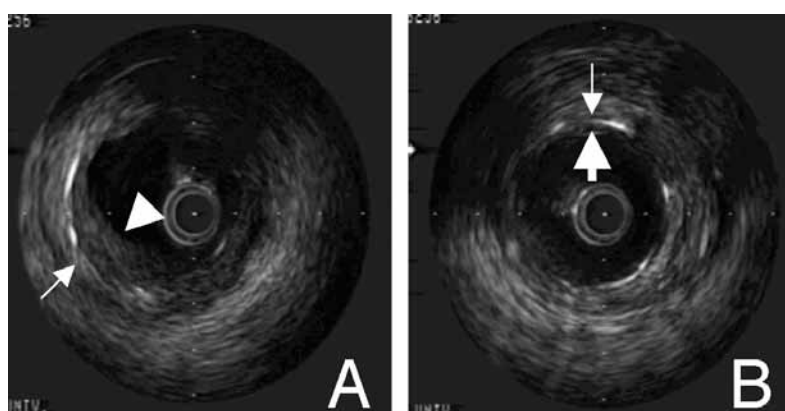


Figure 3 Representative intravascular ultrasound findings 6 months after clinical PCI. Although the panel A (no treatment) shows significantly thickened intima, the panel B (NF- κ B decoy) shows less neointimal formation. arrows: internal elastic lamina, arrowheads: stents
© 2004 The Japanese Circulation Society All rights reserved. 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.

内膜肥厚の進展が著しく抑制された(**Fig. 2**)。この結果から、ウイルスベクターを用いることなく対象血管にデコイを導入できることが確認され、近い将来、臨床に応用されることが期待されている。

冠動脈再狭窄予防に対する臨床応用

臨床における冠動脈形成術後の再狭窄は、その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十分に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。われわれは、大阪大学での基礎実験の結果を基に、冠動脈ステント植え込み部にNF- κ Bデコイを導入する臨床応用の検討を実施した。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、

合計18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。最初の数例については良い結果が報告されており¹⁷⁾(**Fig. 3**)、全体の長期効果についても今後検討され、逐次報告される予定である。

結 語

多くの患者のquality of life(QOL)を低下させている炎症性心疾患に特異的な治療法の開発が期待される。デコイ遺伝子導入は対象遺伝子と対象臓器を局限して実施しうるため、非特異的な反応や全身投与による身体への副作用がなく、患者の負担を最小限にしながら治療効果が期待される点も特長である。すでに本結果の一部は国内において心血管病に対して臨床応用されており、本研究の結果が近い将来臨床に応用されることが期待されている。

文 献

- 1) Jones WK, Brown M, Rex X et al: NF- κ B as an integrator

- of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling? *Cardiovasc Toxicol*, 2003, **3**: 229–254.
- 2) 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.
 - 3) Morishita R, Aoki M, Kaneda Y: Decoy oligodeoxynucleotides as novel cardiovascular drugs for cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **947**: 294–301.
 - 4) Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM et al: Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report—2006. *J Heart Lung Transplant*, 2006, **25**: 869–879.
 - 5) Billingham ME: Cardiac transplantation. In: Sale GE ed. *The Pathology of Organ Transplantation*. Butterworths, Boston, 1990, 133–152.
 - 6) Johnson DE, Alderman EL, Schroeder JS et al: Transplant coronary artery disease: histopathologic correlations with angiographic morphology. *J Am Coll Cardiol*, 1991, **17**: 449–457.
 - 7) Botas J, Pinto FJ, Chenzbraun A et al: Influence of preexistent donor coronary artery disease on the progression of transplant vasculopathy. An intravascular ultrasound study. *Circulation*, 1995, **92**: 1126–1132.
 - 8) Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR: Cardiac allograft vasculopathy: current concepts, recent developments, and future directions. *J Heart Lung Transplant*, 1992, **11**: 9–23.
 - 9) Suzuki J, Isobe M, Morishita R et al: Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense cdk2 kinase oligonucleotide. *Nat Med*, 1997, **3**: 900–903.
 - 10) Suzuki J, Isobe M, Morishita R et al: Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis using antisense proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotide. *Transplantation*, 2000, **70**: 398–400.
 - 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) Suzuki J, Isobe M, Morishita R et al: Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res*, 2000, **45**: 783–787.
 - 13) Suzuki J, Morishita R, Amano J et al: Decoy against nuclear factor-kappa B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Gene Ther*, 2000, **7**: 1847–1852.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Inagaki H, Suzuki J, Ogawa M et al: Ultrasound-microbubble-mediated NF- κ B decoy transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice. *J Vasc Res*, 2006, **43**: 12–18.
 - 17) 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.

Roles of Transcriptional Factors and Their Regulation in Vascular Remodeling

Jun-ichi Suzuki

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

Key words: inflammation, NF- κ B, decoy, neointimal, stenting

Inflammation plays a pivotal role in vascular diseases. Nuclear factor-kappa B (NF- κ B), a transcriptional factor, is linked to the development of inflammation. Therefore, decoy against NF- κ B suppresses various inflammatory reactions. In our study, the decoy suppressed arterial neointimal formation in transplanted murine hearts and rat with injured femoral arteries. Based on the results, we performed clinical decoy transfection with the coronary stenting.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 333–336)

Online publication July 23, 2007

脈管学 Vol. 47, 2007