

遺伝子治療による血管傷害後内膜肥厚の制御 —基礎実験から長期経過観察された臨床試験の結果まで—

鈴木 淳一

要 旨：血管内膜肥厚に対する新しい治療法を開発するために、遺伝子導入により NF- κ B を抑制するおとり遺伝子(デコイ)の有用性を検討した。基礎実験として、ラット血管傷害部位に NF- κ B デコイを導入したところ、内膜肥厚の進展が抑制された。臨床試験では NF- κ B デコイを冠動脈形成術ステント植え込み部に導入した。その結果、血清 MCP-1 レベルが低下したが、全身性副作用やステント部血栓症は認められなかった。(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 423-425)

Key words: decoy, NF- κ B, gene therapy, neointimal formation, thrombus

はじめに

血管傷害後の内膜肥厚に対する新しい治療法を開発する際に、炎症および血栓形成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群の発現を誘導する。したがって、炎症に関連する様々な疾患の進展に 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^{1,2)}。われわれは、虚血再灌流傷害、心筋炎、移植後拒絶心などにおいて NF- κ B が活性化することに注目した。NF- κ B は循環器疾患においても広く炎症因子を活性化するため、炎症が関与する心血管疾患の病勢進展に重要な役割を演じている。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を開発を試みてきた。

デコイ-オリゴヌクレオチド(以下デコイ)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³⁻⁵⁾。

本稿では、血管傷害後内膜肥厚における転写因子の役割とその制御について、とくに NF- κ B デコイの有用性を概観し、合わせてわれわれの基礎および臨床における最近の知見を述べて今後の展望としたい。

動物実験モデル

動物実験モデルを用いた心血管病における検討では、バルーン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⁸⁻¹⁰⁾。

われわれは、臨床応用を念頭に NF- κ B 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¹¹⁾。本研究においては、ラット大腿動脈をワイヤーにて障害するモデルを採用した。このモデルでは、無治療にて障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 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- κ B デコイを障害血管に超音波-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を抑制して、内膜肥厚の進展が著しく抑制された。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することが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。さらに、この超音波遺伝子導入技術は、生体内の血管に siRNA を導入するためにも応用されている¹²⁾。

臨床試験

上記の成果を基礎に NF- κ B デコイを用いた臨床応用が実施された。冠動脈形成術後の再狭窄は、患者の長期予後を左右する重大な要素であるが、未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、秋田大学において分担研究している。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。また、導入に際

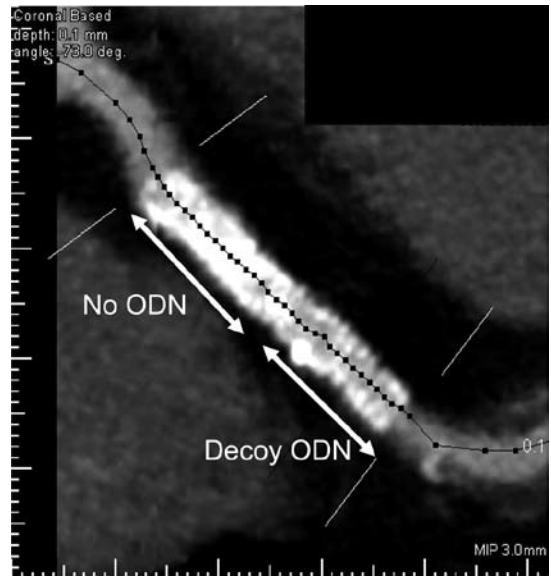


Figure 1 A longitudinal finding of coronary CT scan at the no decoy ODN and NF- κ B decoy ODN site four years after the PCI and NF- κ B decoy ODN transfection. The CT finding revealed that the NF- κ B decoy ODN treatment suppressed the development of neointimal formation compared to the site of no decoy ODN transfection. Arrows indicate portions of stents and decoy ODN transfection. (The panel was modified from the reference 15)

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を開始した。2002 年 12 月に第 1 例目が実施されて以来、現在までに合計 18 症例(うち 1 例経過観察中に脱落)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^{13, 14)}。さらに最初の 1 例については、導入後 4 年目の冠動脈 CT の結果が報告されている¹⁵⁾(Fig. 1)。

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不十分であったり、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導入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、大阪大学の森下竜一博士、金田安史博士、東京医科歯科大学の磯部光章博士、九州大学の江頭健輔博士、秋田大学の伊藤宏博士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-kappaB 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-kappaB 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-kappa B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Gene Ther* 2000; **7**: 1847–1852
- 9) Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al: Nucleic acid drugs for prevention of cardiac rejection. *J Biomed Biotech* 2009; Article ID 916514, 5 pages
- 10) Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al: Characteristics of chronic rejection in heart transplantation: important elements of pathogenesis and future treatments. *Circ J* 2010; **74**: 233–239
- 11) Inagaki H, Suzuki J, Ogawa M, et al: Ultrasound-microbubble-mediated NF-kappaB decoy transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice. *J Vasc Res* 2006; **43**: 12–18
- 12) Suzuki J, Ogawa M, Takayama K, et al: Ultrasound-microbubble-mediated intercellular adhesion molecule-1 small interfering ribonucleic acid transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**: 904–913
- 13) Suzuki J, Ito H, Gotoh R, et al: Initial clinical cases using an NF-kB decoy at the site of the coronary stenting for prevention of restenosis. *Circ J* 2004; **68**: 270–271
- 14) Egashira K, Suzuki J, Ito H, et al: Long-term follow up of initial clinical cases with NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide transfection at the site of coronary stenting. *J Gene Med* 2008; **10**: 805–809
- 15) Suzuki J, Tezuka D, Morishita R, et al: An initial case of suppressed restenosis with nuclear factor-kappa B decoy transfection after percutaneous coronary intervention. *J Gene Med* 2009; **11**: 89–91

Gene Therapy for Prevention of Neointimal Formation after Arterial Injury: From Bench to Bedside after Long-term Observation

Jun-ichi Suzuki

Department of Advanced Clinical Science and Therapeutics, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Key words: decoy, NF-κB, gene therapy, neointimal formation, thrombus

Transfection of cis-element double-stranded DNA (decoy) has been reported to be a useful method for gene therapy. This decoy strategy has been a novel clinical strategy for gene therapy. In this article, we reviewed the experimental results of NF-kappaB decoy in the arterial injury model and the clinical trial data of NF-kappaB decoy transfection at the site of coronary stenting. (*J Jpn Coll Angiol*, 2011, **51**: 423–425)

Online publication December 27, 2011