

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	清水 紀之
学位論文題目			
Nuclear factor- $\kappa$ B decoy transfection for prevention of vein graft intimal hyperplasia (Nuclear factor- $\kappa$ B デコイ導入による静脈グラフト内膜肥厚の抑止に関する研究)			
共 著 者 名			
東 信良, 西川 智之, 平田 哲, 森下 竜一, 金田 安史, 笹嶋 唯博			
未 公 表			
研 究 目 的			
<p>糖尿病の増加と相俟って、粥状硬化性動脈閉塞により下肢壊疽や心筋梗塞が増加している。これらの虚血性疾患に対し大伏在静脈や上肢皮静脈など内径 2.5~4 mm の静脈は、下肢動脈や冠動脈閉塞病変に対する血行再建(バイパス術)に頻用される極めて優れた代用血管である。しかしこれも 5 年以内に約 20%が閉塞し、その主因は進行性内膜肥厚である。グラフトが閉塞すると虚血症状が再燃することから内膜肥厚の進行を抑制する治療の開発が急務となっており、これまで術後抗血小板薬、抗凝固薬などが使用されてきたがいまだに開存性を向上させる有効な治療法はみあたらない。移植後内膜肥厚の発生についてはさまざまな機序の関与が議論されているが、その中でも炎症、免疫反応に関与する転写因子 Nuclear factor-<math>\kappa</math>B (NF-<math>\kappa</math>B) が、静脈グラフト内膜肥厚に関与する可能性が推察されている。そこで、静脈グラフト移植後に NF-<math>\kappa</math>B の活性化が認められるか、NF-<math>\kappa</math>B の活性化を遺伝子治療にて抑制することにより移植後静脈グラフトの内膜肥厚が抑制されるかを検討した。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p><b>動物モデル</b> 17頭の雑種成犬(体重 9 - 15 kg, 平均 11.5<math>\pm</math>1.5 kg)を使用した。全身麻酔下に静脈グラフトとして下肢外側伏在静脈を採取し、同側の大腿動脈を置換した。</p>			
<p><b>研究グループ</b></p>			
<p><b>Group I: 移植後 NF-<math>\kappa</math>B 活性化</b> 6 頭, 12 グラフトを無作為に振り分け, 移植後 30 分, 2 時間, 2 日, 7 日で摘出し核タンパクを抽出した。ゲルシフトアッセイにて NF-<math>\kappa</math>B の活性化を評価した。</p>			
<p><b>Group II: デコイの ICAM-1 mRNA 発現への効果</b> NF-<math>\kappa</math>B の下流タンパクである ICAM-1 の発現が NF-<math>\kappa</math>B デコイ導入により抑制されるかを評価した。移植前静脈グラフトに hemagglutinating virus of Japan-envelope (HVJ-E)法を用いてデコイを導入した。4 頭, 8 グラフトを用い各犬の片側を Group II-a (Scrambled デコイを導入したグラフト), 反対側を Group II-b (NF-<math>\kappa</math>B デコイを導入したグラフト)に振り分け, 移植 7 日後に摘出し, mRNA を抽出, RT-PCR 法にて ICAM-1 mRNA 発現を比較した。</p>			

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を内部標準とし ICAM-1 mRNA / GAPDH mRNA 比を計算し比較した。

**Group III: デコイの内膜肥厚への効果** 7頭, 14 グラフトを以下の3グループに無作為に振り分けた。Group III-a(デコイ導入操作をせず移植したグラフト), Group III-b (Scrambled デコイを導入したグラフト), Group III-c (NF- $\kappa$ B デコイを導入したグラフト)。グラフトを移植4週後に摘出しホルマリン固定標本とした。Elastica van Gieson 染色した標本の内膜肥厚面積, 内腔面積を計測し, 内膜肥厚面積/内腔面積 (I/L 比)を計算し比較した。

**デコイの種類** デコイ法とは合成核酸を用い遺伝子のプロモーター領域への転写因子の結合を阻害し, 各種下流タンパクの mRNA 転写を抑制する方法である。使用したデコイは以下の配列である: NF- $\kappa$ B デコイ: 5'-CCTTGAAGGGATTTCCCTCC-3', 3'-GGAAGTTCCTAAAGGGAGG-5';

Scrambled デコイ: 5'-TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3', 3'-AACGGCATGGACTGAATCGG-5'.

Scrambled デコイは無秩序で機能を持たない配列で, コントロールとして使用した。ビオチン標識 Scrambled デコイは導入効率を確認するために用いた。

**デコイの導入** デコイは HVJ-E 法を用いて静脈グラフトに導入した。HVJ-E は第二世代の HVJ ベクターで, 安全で高効率のベクターといわれている。デコイを HVJ-E に封入し, 採取した静脈グラフト内に注入, 30 分 incubation することにより導入した。導入の確認にはビオチン標識したデコイを導入し免疫組織学的染色で確認した。

**統計学的解析** ICAM-1 mRNA 発現の比較は unpaired Student's t-test にて検定した。内膜肥厚面積 / 内腔面積の比較は Kruskal-Wallis test, 多重比較検定は Scheffé 法にて検定した。P < 0.05 を有意差ありとした。

## 成 績

**移植後 NF- $\kappa$ B の活性化** 採取直後の静脈グラフトにおいてもある程度の活性化が認められた。

NF- $\kappa$ B の活性化は移植2日後をピークとし7日後には採取直後と同等のレベルに戻った。

**静脈グラフトへのデコイ導入** HVJ-E を用いた静脈グラフトへのデコイ導入はビオチン標識デコイにより確認し, 平滑筋層浅層まで導入されているのを確認できた。

**デコイの ICAM-1 mRNA 発現抑制効果** ICAM-1 mRNA 発現は Group II-b が Group II-a に比較して統計学的に有意に抑制されていた (ICAM-1 mRNA / GAPDH mRNA: Group II-a;  $0.612 \pm 0.08$ , versus Group II-b;  $0.347 \pm 0.07$ ; P = 0.047)。

**デコイの内膜肥厚抑制効果** 内膜肥厚の形成は Group III-c が Group III-b より抑制されていた。内膜肥厚面積 / 内腔面積の比較でも Group III-a ( $0.043 \pm 0.01$ ), Group III-b ( $0.461 \pm 0.11$ ), Group III-c ( $0.096 \pm 0.03$ )であり, Group III-c が Group III-b に比較して統計学的に有意に抑制されていた(P = 0.0091)。Group III-a と Group III-c に統計学的有意差は認められなかった(P = 0.8639)。

## 考 案

静脈グラフトの内膜肥厚は手術侵襲, シェアストレス, 虚血再灌流傷害, 内皮細胞の剥脱などの侵襲に

より惹起される中膜平滑筋細胞の遊走, 増殖と膠原繊維の沈着が主体であると考えられている. これらのさまざまな侵襲はサイトカイン, 接着分子, 成長因子などの発現を亢進させる. NF- $\kappa$ B はこれらの発現を制御する主な転写因子であることから, 静脈グラフト内膜肥厚の発達に重要な役割を担っていると考えられる. 動脈傷害モデルでは, NF- $\kappa$ B の活性化は傷害後 6 時間でピークに達し, 3 日後にコントロールレベルに戻った. 我々の静脈グラフトモデルでは, 移植 2 日後でピークに達し, 7 日後にはコントロールレベルに戻った. この結果より, 移植後早期に NF- $\kappa$ B の活性化が生じるので, 移植前のグラフトに遺伝子治療を行うことは, NF- $\kappa$ B の活性化を抑制し, 炎症反応や後に生じる内膜肥厚を抑制のために理にかなっていると考えられる.

今回, NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する方法としてデコイ法を利用した. デコイはデオキシヌクレオチドの短い配列で構成されており, タンパクやプラスミドに比べ精製が容易である. また, 宿主のゲノムには挿入されず, 細胞内には 3 から 7 日ほどしか存在しないので安全である. デコイの作用時間は短い, 静脈グラフト移植後数日間の NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するためには十分であり, この抑制で 4 週後の内膜肥厚も抑制された.

ICAM-1 などの接着分子は内膜肥厚発達には重要な役割を果たしている. ICAM-1 は NF- $\kappa$ B により制御されるタンパクの一つであり, 静脈グラフト移植後に発現が亢進する. ICAM-1 欠損マウスでは移植後内膜肥厚が抑制されたと報告されている.

E2F デコイはヒトのバイパスグラフトにおいて開存率が改善したと報告されている. 我々の研究でも NF- $\kappa$ B デコイと E2F デコイは同等の内膜肥厚抑制効果を認めた. E2F は細胞周期関連タンパクを制御する転写因子であり, NF- $\kappa$ B はさまざまなタンパクを制御する転写因子ということから, 内膜肥厚抑制の機構になんらかの違いがあると思われる.

NF- $\kappa$ B デコイの臨床応用に向けてはいくつかの問題が考えられる. 一つ目は, 臨床においては弁部, 吻合部など限局性の内膜肥厚発生が問題である. 二つ目は, HVJ-E による侵襲も内膜肥厚発生に関与している可能性もあり, より侵襲の少ない他の導入法の検討も必要である.

## 結 論

静脈グラフトにおいて, NF- $\kappa$ B の活性化は移植後に増加し, NF- $\kappa$ B デコイの導入により ICAM-1 発現の抑制を通して内膜肥厚の発達が抑制された.

## 引 用 文 献

- [1] Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Yamamoto K, Nakagami H, Kaneda Y et al. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor- $\kappa$ B binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther* 2001;8:1635-42.
- [2] Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, Yamamoto S, Ikegami H, Suzuki N et al. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol Ther* 2002;6:219-26.
- [3] Zou Y, Hu Y, Mayr M, Dietrich H, Wick G, Xu Q. Reduced neointima hyperplasia of vein bypass grafts in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Circ Res* 2000;86:434-40.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	清水 紀之
審査委員長 <u>鈴木 裕</u> ㊞ 審査委員 <u>笹嶋 唯博</u> ㊞ 審査委員 <u>藤枝 憲二</u> ㊞ 審査委員 <u>若宮 伸隆</u> ㊞			
学 位 論 文 題 目  <b>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B decoy transfection for prevention of vein graft intimal hyperplasia</b> (Nuclear factor- $\kappa$ B デコイ導入による静脈グラフト内膜肥厚の抑止に関する研究)			
<p>糖尿病の増加と相俟って、粥状硬化性動脈閉塞により下肢壊疽や心筋梗塞が増加している。大伏在静脈や上肢皮静脈などは、下肢動脈や冠動脈の閉塞などの病変に対する血行再建(バイパス術)に頻用される代用血管であるが、これも5年以内に進行性内膜肥厚を主因として約20%が閉塞してしまい、虚血症状が再燃する。従って内膜肥厚の進行を抑制する治療の開発が急務となっている。本論文は、自家静脈グラフト移植後の内膜肥厚に対する転写因子 Nuclear factor-<math>\kappa</math>B (NF-<math>\kappa</math>B)活性化の関与、および移植直前静脈グラフトへの NF-<math>\kappa</math>B デコイ導入を利用した遺伝子治療による NF-<math>\kappa</math>B 活性化の抑制と内膜肥厚の抑制について、下記のような基礎的研究を行なった。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 雑種成犬を用いて全身麻酔下に、静脈グラフトとして下肢外側伏在静脈を採取し、大腿動脈を置換した。</li> <li>2. 静脈グラフトでは、NF-<math>\kappa</math>B の活性化が移植2日後をピークとして起こり、7日後にグラフト採取直後と同等のレベルに戻った。</li> <li>3. Hemagglutinating virus of Japan-envelope (HVJ-E)を利用した NF-<math>\kappa</math>B デコイ導入操作により、静脈グラフト平滑筋層浅層までデコイが導入されていること</li> </ol>			

を確認した。

4. NF- $\kappa$ B により発現が制御されるタンパク ICAM-1 は、静脈グラフト移植後に発現亢進し、細胞接着分子として内膜肥厚発達に重要な役割を演じると考えられている。本研究では、NF- $\kappa$ B デコイ導入により 1 週後、ICAM-1 の発現が抑制されていることを明らかとした。
5. 移植 4 週後の静脈グラフトの内膜肥厚は、NF- $\kappa$ B デコイ導入により、スクランブルデコイ導入のコントロール群に比較し、有意に抑制されていることを明らかとした。一方、デコイ導入操作を施さないコントロール群とは内膜肥厚に有意な差は存在しなかった。

本論文は、このように静脈グラフトにおいて、NF- $\kappa$ B の活性が移植後に増大すること、NF- $\kappa$ B デコイ導入によりおそらく ICAM-1 発現の抑制を介して内膜肥厚が抑制されることを明らかにした。論文提出者が考察しているように、今後 HVJ-E 法以外の、より低侵襲性の他の導入法の検討や、臨床上問題となる弁部や吻合部など限局性の内膜肥厚発生に対する NF- $\kappa$ B デコイによる抑制についての検討も必要であるが、本研究はこれまでの薬物療法や手術手技改善などでは限界があった自家静脈グラフト開存率改善のために NF- $\kappa$ B デコイ応用が大きく貢献する可能性を示したものであり、高く評価できる。

また、論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対して適切な回答が得られ、論文提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものと判定した。