

遺伝子導入を駆使した自家静脈グラフト内膜肥厚の
制御

課題番号：15591320

平成15年度～平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））

研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 東 信 良

(旭川医科大学医学部)

遺伝子導入を駆使した自家静脈グラフト内膜肥厚の 制御

課題番号：15591320

研究組織

研究代表者 東 信良 (旭川医科大学医学部講師)

研究分担者 笹嶋 唯博 (旭川医科大学医学部教授)

稲葉 雅史 (旭川医科大学医学部助教授)

羽賀 将衛 (旭川医科大学医学部助手)

研究経費

平成 14 年度 1,100 千円

平成 15 年度 600 千円

平成 16 年度 600 千円

平成 17 年度 500 千円

計 2,800 千円

研究発表

論文発表

- 1) Shimizu N., Azuma N., Hirata S., Sasajima T., et al.: Effect on vein graft intimal hyperplasia of nuclear factor- κ B decoy transfection using the second generation of HVJ vector. J Cardiovascular Surgery. in press.
(巻末に発表論文として引用)

口頭発表

- 1) Shimizu N., Azuma N., Hirata S., Sasajima T.: Inhibition of intimal hyperplasia after vein bypass grafting using nuclear factor- κ B decoy oligodeoxynucleotide. 6th International Congress of Asian Vascular Society. 2004
- 2) 清水紀之、東 信良、平田 哲、西川智之、笹嶋唯博ほか.: HVJ-Envelope法を用いた NF κ B decoy 導入による移植静脈グラフト内膜肥厚抑制の検討. 第 104 回日本外科学会定期学術集会. 2004
- 3) 東 信良、稲葉雅史、清水紀之、羽賀将衛、笹嶋唯博ほか.: 末梢バイパスにおける静脈グラフト内膜肥厚の対策: 現状と展望. 第 33 回日本血管外科学会学術総会. 2005
- 4) 清水紀之、東 信良、平田 哲、笹嶋唯博.: 核酸医薬による実験的静脈グラフト内膜肥厚抑制とその作用機序の検討. 第 33 回日本血管外科学会学術総会. 2005
- 5) Shimizu N., Azuma N., Hirata S., Sasajima T.: Effect and mechanism of NF- κ B decoy on intimal hyperplasia after vein bypass grafting. 47th Annual World Congress of International College of Angiology. 2005

緒 言

【本研究の背景】自家静脈グラフトは末梢血管外科領域において使用可能な唯一の小口径代用血管であり、人工血管では開存不可能な下腿や足部へのバイパスに際してグラフト材料として使用されている。また、自家静脈グラフトは、冠動脈バイパスにおいても、いまだに有用なグラフト材料であり、動脈グラフトが使用できない症例や緊急例には好んで使用されている。グラフトとして採取可能な自家静脈は限られており、再手術等で使用してしまうと代替材料が無いことから、非常に貴重な自家資源であるといえる。

特に近年においては、糖尿病患者の増加に伴い、下腿や足部あるいは冠動脈といった小口径領域の動脈へバイパス手術を行う機会が劇的に増加し、また、長寿化にともなって再手術も増加していることから、こうした小口径領域に使用できる自家静脈の重要性が再認識されてきている。

自家静脈は、動脈系に移植される際に、その内面の内皮細胞の大部分がいったん脱落し、3～4週間かけて再び再生内皮細胞で被覆される「再内皮細胞化」**re-endothelialization** が起こることを我々は報告してきた。内皮細胞が脱落している期間が長いと、さまざまな血漿成分や流血中の単核球細胞が血管壁に侵入して静脈壁の血管平滑筋細胞を刺激し、内膜肥厚を引き起こすが、やがて内皮細胞によって被覆されると、内皮細胞からの NO やプロスタサイクリンなどの分泌によって内膜肥厚がおさまることが、これまでの血管分子生物学で得られた知見から立証されつつある。しかし、この内皮細胞再生過程が何らかの原因で遅延したり、あるいは、再生した内皮細胞の機能が障害されていると、内膜肥厚が治まらず、やがて静脈グラフトの狭窄や閉塞につながると考えられている。

臨床例では、グラフト開存を脅かす内膜肥厚が静脈グラフトを移植した患者の約 20%に発生し、術後 1～2 年の間にこのグラフト狭窄に対して修復手術を必要としたり、あるいは、グラフト閉塞にいたることから、この内膜肥厚が静脈グラフトの開存率低下の最も大きな原因となっていることが 20 年ほど前から指摘されている。内膜肥厚は、繰り返し起こることで、貴重な自家血管資源の枯渇につながるばかりでなく、末梢バイパス手術の成績がこの内膜肥厚によっていまだに向上しないことがバイパス手術普及の停滞の一因となっており、内膜肥厚の解決は血管外科において急務といえる。

この静脈グラフトの内膜肥厚に対して、各種の抗血小板薬、プロスタグラン

ディン製剤、抗凝固薬などが使用されてきたが、実験的な内膜肥厚に効果があっても、臨床例に対してこれらの薬剤は内膜肥厚によるグラフト狭窄を予防する効果は全く証明されておらず、多くの研究者が長年研究してきたにも関わらず、いまだに、未解決のまま残されている。このことは、従来の血管内面の抗血栓性に主眼をおいた内膜肥厚制御のあり方から発想を転換する必要があることを示唆している可能性がある。

このような観点に立って、米国ではいち早く、E2F という細胞分裂を促す転写因子をブロックするデコイ核酸医薬を血管壁に導入して、血管壁における平滑筋細胞の過剰な増殖を抑え、内膜肥厚を抑制する治療法の確立を目指した。この治療法は非常に高い注目を集めたものの、多施設臨床治験の結果、有効性を証明できなかった。

【本研究の目的】我々は、内膜肥厚を移植直後の一種の虚血再還流障害に対する過剰な反応と捉え、その過剰な反応を制御することで内膜肥厚を抑制できるのではないかという仮説を立て、本研究を立案した。すなわち、静脈グラフトを採取し、そこに動脈血流を流すことで、静脈グラフトは虚血再還流障害を受け、NFkB(Nuclear Factor kappa B)などの転写因子が活性化される。NFkBはアポトーシスを介して内皮細胞脱落などに関与するとともに、各種接着因子やPDGFなどの増殖因子の転写を促して、炎症細胞の侵入や平滑筋細胞の脱分化・遊走のトリガーとなりうる転写因子であり、この転写因子の過剰発現を抑えることで、静脈グラフトの過剰な内膜肥厚を防止できると考えた。

この仮説を実証するために、本研究では、1) 静脈グラフトの移植時に実際にNFkBの転写やそれに続くdown streamの反応が静脈壁で起こっているかどうかの証明、2) この転写因子を制御するツールとして、転写因子のbinding siteの配列をもったおとり核酸(デコイODN)を静脈壁内の細胞に効率的良く導入する方法の開発、3) 実験的静脈グラフト内膜肥厚に対するNFkBデコイのin vivoにおける内膜肥厚抑制効果の3点について明らかにする必要があり、これらを実現する目的で以下の実験を行った。

(1) 静脈グラフト移植におけるNFkB活性化の証明

【目的】

静脈グラフト移植時に炎症性サイトカインに深く関係する転写因子であるNFkBの活性化が起きていることを明らかにする。

【材料と方法】

イヌ伏在静脈を採取し、その静脈グラフトにて同じイヌの大腿動脈を置換し、一定期間後の静脈グラフトを摘出し、グラフトに存在する細胞の核蛋白を抽出し、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を用いて NF κ B の活性化の有無およびその時間的推移について解析した。詳細な実験手順や試薬については、巻末の論文に記載した。

なお、イヌの伏在静脈は、大腿静脈に比べて、口径が小さく、大腿動脈の置換において適切なサイズであり、かつ、壁厚があり、構造的にヒトの大伏在静脈に類似していることから、この静脈を今回の一連の実験で使用することとした。

【結果】

イヌの伏在静脈グラフト移植モデルにおいて、NF κ B 活性は、静脈グラフト採取直後から増加し、移植後 2 日目にピークとなり、移植後 7 日目までにコントロールレベルまで低下する時間経過を呈した (巻末論文 Fig.1)。

NF κ B 活性化は、静脈グラフト採取操作そのもの、さらには、採取して再還流されるまでのグラフトの虚血と再還流障害に起因するものである可能性が考えられた。

この NF κ B の活性化が内膜肥厚発生に関与しているのか、その活性化を阻止することで、静脈グラフト内膜肥厚発生を阻止できるのかどうかを以下の実験で検討した。

(2) 静脈グラフトへの核酸導入方法の検討

【目的】

血管壁における NF κ B の活性化を阻止する方法として、NF κ B の DNA binding site の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(ODN)を細胞内に導入することで、活性化した NF κ B を導入した ODN でトラップし、その結果、転写活性を阻止するという手法を選択した。

動脈壁よりも薄く、脆弱な静脈壁への遺伝子導入方法は確立されていない。静脈壁構成細胞への遺伝子導入方法として①加圧法、②HVJ-Envelope 法、③超音波法の比較検討を行い、導入効率や血管壁への障害の程度などを比較検討

した。

各導入法の実際の方法は下記のとおり、

- ① 加圧法：加圧という物理的な方法によって遺伝子導入を試みる方法。血管内に生食で希釈した ODN 溶液を満たし、150mmHg ないし 300mmHg の圧をかけて 30 分静置。
- ② HVJ-Envelope 法：HVJ(センダイウイルス)の優れた接着能・細胞融合能を利用した方法で、ウイルスの病原性を回避する目的で、紫外線を用いてウイルスを不活性化し、その envelope のみをベクターとして用いる方法。あらかじめ、envelope 内に目的の遺伝子を封入し、そのベクター溶液で血管内腔を満たし、30 分間 37 度でインキュベーションする。
- ③ 超音波法：超音波用造影剤溶液で血管内腔をみたし、血管外から治療用超音波をあてることで、超音波用造影剤粒子を血管壁と衝突させ、その際にできる小孔を通して遺伝子を取り込む方法。レボピスト溶液で血管内腔を満たし、超音波装置の出力や超音波照射時間を調節し、条件を設定する。

【結果】

- ① 加圧法：ODN はわずかに導入されるものの、導入のために圧をあげると静脈壁の膨化、内皮細胞脱落や内膜亀裂など血管壁の障害が生じるため、加圧法は組織の脆弱な血管への遺伝子導入法としては適切な方法ではないと判断された。
- ② HVJ-Envelope 法：
 - ・導入効率・導入様式：内膜および中膜の内層まで良好に遺伝子導入された。ODN 導入の場合、40～50%の細胞が導入遺伝子マーカーであるビオチンで染色され (巻末論文 Fig.2)、導入された遺伝子は、細胞内に存在して、少なくとも導入操作後 3 日間は細胞内にとどまっていることが示された。
 - ・血管壁障害：HVJ-Envelope によって導入を行った血管の開存性は良好で、遺伝子導入による血管壁障害は明らかではなかった。ただし、細胞浸潤を認めることや、ICAM-1 発現レベルの上昇を認めることから、ウイルスの envelope に対する免疫反応あるいは非特異的炎症反応を惹起している可能性が示唆された。
- ③ 超音波法：
 - ・導入効率・導入様式：内膜および中膜の内層まで良好に遺伝子導入されるが、細胞内とともに細胞外 (間質) も強く染色され、物理的に血管壁内には入ったものの有効に細胞内に到達できない遺伝子が多いことが示唆された。
 - ・血管壁障害：超音波法によって遺伝子導入した静脈を静脈グラフトとして移植したが、開存率は 33%であり、超音波による物理的ダメージが影響してい

るものと考えられた。

- ・ 導入効率と超音波出力の調整等によって、改良の余地があるものと考えられた。

以上の検討から、血管壁という脆弱で、かつ、内面性状をきびしく追求しなければならぬ場における遺伝子導入法としては、HVJ-Envelope 法が最も優れており、加圧法や超音波法といった物理的な方法よりも勝っていると考えられた。従って、以下の遺伝子導入については、HVJ-Envelope 法を用いて実験を進めることとした。

ただし、HVJ が有する膜蛋白に対する宿主の反応（非特異的炎症反応や免疫応答）が血管壁の炎症ひいては癒痕化を招く可能性もあり、さらに臨床応用を想定した場合には、そうしたベクターを使用することに対する倫理的配慮も必要であると考えられることから、さらに異なった手法を探求してゆく必要がある。

(3) NFκB decoy による静脈グラフト内膜肥厚抑制効果の

検討

【目的】

静脈グラフトの内膜肥厚に炎症性の転写因子である NFκB が重要な役割を果たしているのかどうか、さらに、内膜肥厚の治療戦略として、デコイ導入が有用な手段となるのかどうかを明らかにするため、下記の要領で、in vivo 実験を行った。

【方法】

雑種成犬の大腿動脈を下腿から採取した伏在静脈グラフトで置換し、一定期間後に静脈グラフトを採取した。静脈グラフト移植に際して、実験群に NFκB decoy を対照群には Scramble decoy を HVJ-Envelope vector を用いて導入した。各々の decoy の塩基配列を下に示す。

NF-κB decoy ODN;

5'-CCTTGAAGGGATTTCCCTCC-3', 3'-GGAACTTCCCTAAAGGGAGG-5';

scrambled decoy ODN,

5'-TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3', 3'-AACGGCATGGACTGAATCGG-5'.

以下の4つの実験を行った。

1) NFkB Decoy の NFkB 活性化阻止の確認実験 ; NF k B decoy が目的の静脈グラフトの NFkB 活性化阻止を果たしているかどうかを検討した。

NF k B decoy ODN または対照の scramble ODN を静脈グラフトに導入し、静脈グラフトをイヌ大腿動脈に移植し、移植後、最も NFkB 活性が高かった移植後 2 日目にグラフトを摘出して、摘出グラフトから細胞内蛋白を抽出し、NFkB の活性化を EMSA 法により測定した。

2) NFkB decoy による静脈グラフト内膜肥厚抑制実験

移植グラフトを移植後 4 週間後に摘出して、ホルマリン固定し、グラフト中央部にて短軸切片を作成し、各標本につき 3 スライスの組織標本画像をコンピューターに取り込み、NIH image という解析用ソフトを用いて、内膜の厚みを測定し、同時に測定した内腔面積で標準化して示した。

2) NF k B Decoy の ICAM-1 活性化抑制効果の検討 :

NF k B decoy がどのように内膜肥厚抑制に関わっているのかを明らかにするため、NFkB の down stream protein の一つである ICAM-1 の活性化を測定した。

なお、実験方法の詳細については、巻末の論文を参照のこと。

【結果】

1) NFkB Decoy の NFkB 活性化阻止 ;

NF k B decoy を導入して移植後 2 日目の静脈グラフトにて、scramble ODN 導入群と比べ NF k B 活性が有意に抑制されていることが確認された。

2) NFkB decoy による静脈グラフト内膜肥厚抑制実験

移植後 1 ヶ月時の組織切片の計測にて、内膜肥厚部の面積は、scramble ODN 導入群と NFkB decoy 導入群で比較したところ、NFkB decoy 群で有意に内膜肥厚が抑制されることが明らかとなった (巻末論文 Fig.5, Fig.6)。なお、その内膜肥厚の抑制効果の大きさは、同時に同じモデルを用いて行った E2F decoy の成績とほぼ同程度であった。

3) NF k B Decoy の ICAM-1 活性化抑制効果の検討 :

ICAM-1 mRNA 発現を測定した結果、scramble ODN に比較して、NFkB decoy 導入群では、明らかに ICAM-1 mRNA 発現が減少していた (巻末論文 Fig.3, Fig.4)。

以上の結果より、下記の結論を得た。

- ① 静脈グラフトにおいて、おとり核酸 decoy 導入により NF κ B 活性を抑制することが可能となった。
- ② NF κ B 活性をおとり核酸 decoy 導入により抑制することで、内膜肥厚が抑制されたことから、NF κ B は静脈グラフトの内膜肥厚発生に重要な転写因子であるといえる。
- ③ NF κ B による内膜肥厚発生の一部は、ICAM-1 を介する可能性が示唆された。

考 察

これまで、各種の薬剤が静脈グラフト内膜肥厚の抑制目的に使用されてきたが、臨床で信頼できる効果のある薬剤はいまだ皆無であり、そのような領域で今回、イヌでの静脈グラフト内膜肥厚を抑制できたことで、以下の 2 点において非常に意義がある。

- 1) 今回のような遺伝子工学的手法を用いた内膜肥厚抑制の試みは極めてユニークであること
- 2) 炎症を抑えるという、従前とは全く異なる観点から内膜肥厚抑制を試み、その有効性が少なくともイヌで示されたこと

以上の知見に基づいて、内膜肥厚を制御する戦略が大きく変化、前進してゆくことが期待される。

1) 遺伝子工学的手法による内膜肥厚抑制

今回、デコイ核酸は、HVJ-Envelope ベクターを用いて血管壁に導入されたが、ウイルスの増殖能を破壊して使用しているとはいえ、何らかの免疫反応（表面蛋白に対する免疫反応）が生じる可能性は高く、そのベクターへの反応として、炎症が過度に生じて、そのベクターに対する炎症が NF κ B decoy によって抑えられているという見方もできないわけではない。

また、臨床応用に取り組む際にも、できるだけ倫理的障壁が低い導入方法を選択すべきであり、その観点からも、倫理的に問題がなく、炎症を引き起こさず、かつ、導入効率が非常に良いという導入方法を模索する必要がある。

今回の本研究を実施中に、米国で行われた細胞周期に関連する転写因子である E2F decoy を加圧法によって自家静脈グラフトに導入してその効果のみ

る大規模臨床試験が行われ、世界中から注目を集めていた。その結果が最近発表されたが、結果は、対照群とほぼ同等の内膜肥厚発生率であり、残念ながら、ヒトの静脈グラフトにおける E2F decoy 導入の有効性を示すことはできなかった。

この E2F decoy の多施設臨床試験でなぜ効果が証明できなかったかを明らかにすることも重要である。導入方法の問題や、導入効率の問題、さらに、導入する核酸の標的遺伝子の選択、効果持続時間などの問題であった可能性もあり、解明が待たれるとともに、今後、それに基づいた改良や発展が望まれる。

特に、効果の持続時間は最も大きなハードルであり、通常、細胞内に導入された核酸は 3~4 日程度で分解されることから、いかにこの期間を延長させるかが重要になってくると考えられる。

2) 炎症と内膜肥厚

これまで、内膜肥厚は、内皮細胞の再生障害、血小板活性化およびそれに引き続く血小板由来増殖因子やサイトカインなどの因子が深く関わっているものと考えられていた。しかし、近年になって、動脈硬化やバージャー病、各種膠原病、動脈瘤などの血管疾患の発症や進行において、炎症の関与がクローズアップされてきている。すなわち、炎症の存在により、内皮細胞障害発生時の修復過程の変化や、中膜平滑筋細胞の形質転換、炎症性サイトカインによる各種接着因子の発現とそれによって起こる細胞成分の血管内への侵入など、多くの研究結果が蓄積されつつある。

最近では、静脈グラフト内膜肥厚は、CRP 高値を示した患者群で起こりやすいという臨床研究も報告され、注目されている。

我々は、本研究で、炎症関連の蛋白の発現を促進する転写因子である NF κ B に着目し、実験を進めた結果、確かに静脈グラフトの内膜肥厚が有意に抑制された。このことから、内膜肥厚の発生過程において、「炎症」が重要な要素であることが示唆され、炎症と内膜肥厚の関連についてさらなる研究成果が期待される。