

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	内田 大貴
<p>学位論文題目</p> <p>Development of the Gene Therapy with a CRE Decoy ODN to Prevent Vascular Intimal Hyperplasia</p> <p>(CRE decoy ODNを用いた血管内膜肥厚抑制遺伝子治療)</p> <p>共著者名</p> <p>(齊藤 幸裕、菊地 信介、吉田 有里、平田 哲、 笹嶋 唯博、東 信良と共著)</p> <p>The Journal of Vascular Surgery</p> <p>2019年 掲載予定</p>			
<p>研究目的</p>			
<p>血管内膜肥厚は、閉塞性動脈硬化症患者などの血管病変に対する血行再建術または血管内治療後の狭窄、閉塞をきたす主要な合併症である。しかし現在まで血管内膜肥厚を抑制する有効な予防、治療法は確立されていない。我々はこれまでにバイパスグラフトとして移植前のヒト静脈片をスクリーニングし、MAPKAPK3とFHL5という2つの血管内膜肥厚関連遺伝子を同定した。両分子はシグナル下流の共通転写因子であるcAMP response elements-binding protein (CREB)を活性化し内膜肥厚を誘導しており、CREBのドミナントネガティブを使用することで血管内膜肥厚を動物モデルにおいて抑制することができることを報告している。我々はこれらの知見を臨床に応用することを目的として、CREB抑制の方法としてすでに臨床において利用された実績のある核酸医薬の一つであるDecoyを使った新しい遺伝子治療に注目した。本研究では細胞および動物モデルにおいて、CRE decoy ODNによる血管内膜肥厚抑制効果を証明し、前臨床試験の第一歩として開発を始める。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

過去の文献からCRE decoy ODNを設計、合成し、CREBへの結合能をTranscription factor assay (Abnova Corporation, Taipei City, Taiwan)を用いて評価した。最も結合能の高いCRE decoy ODNを血管平滑筋細胞 (VSMCs) に遺伝子導入し、MTS assay (PROMEGA CORPORATION, WI, USA)およびmodified Boyden chamber法 (Neuro Probe Inc., MD, USA)を用いて増殖能と遊走能を評価した。CRE活性の評価にはLuciferase reporter gene assay (Pathway Profiling Luciferase System, Clontech Laboratories, Inc., CA, USA)を用いた。CRE下流遺伝子群の発現はqRT-PCR (Applied Biosystems, CA, USA)を用いて評価した。動物モデルは、マウスワイヤ障害モデル (C57BL6, n=6)を作成し、マイクロバブル超音波導入法を用いてCRE decoy ODNを血管壁に導入した。移植前静脈片におけるCREB活性化因子であるMAPKAPK3およびFHL5の発現を免疫組織染色にて評価した。

## 成 績

### 1 CRE Decoy ODNのスクリーニング

2種類のCRE Decoy ODNとコントロールとして2種類のScramble Decoy ODNを設計、合成した。Transcription factor assayにより活性化CREBを添加した際のDecoyがCREBに直接結合することによるCRE配列に対する結合阻害能を評価したところ、最も阻害能が高いCRE Decoy ODNの50%阻害濃度 (IC50) は7.814 pmol/ $\mu$ Lであったのに対し、最も低いScramble Decoy ODNのIC50は3726.416 pmol/ $\mu$ Lであった。両DecoyのIC50の比は476倍であり、設計したCRE Decoy ODNの強いCREBへの結合能とCRE配列に対する結合阻害能が確認された。

### 2 血管平滑筋細胞での機能評価

血管平滑筋細胞 (VSMCs) に各Decoyを遺伝子導入すると、CRE活性はScramble群に比べDecoy群で有意に抑制されていた ( $0.20 \pm 0.03$  vs  $1.00 \pm 0.16$ , n=6;  $p < 0.05$ )。同様に増殖能 ( $0.73 \pm 0.04$  vs  $0.89 \pm 0.02$ , n=6;  $P < 0.05$ )および遊走能 ( $96.4 \pm 6.1$  vs  $311.4 \pm 19.1$ , n=6;  $P < 0.05$ )も有意に抑制された。

### 3 CRE下流の遺伝子発現の変化

VSMCsに各Decoyを遺伝子導入しCRE下流の遺伝子発現をreal time PCRで評価したところ、Rac-1とCcna2といった遺伝子がCRE群で有意に抑制されていた。

### 4 マウスワイヤ障害モデルにおける内膜肥厚抑制効果

CRE Decoy ODNをマウスワイヤ障害モデルの血管壁に遺伝子導入し、組織染色で血管の病理学的所見を検討した。染色陽性率 (面積での評価) で遺伝子の導入効率は70%以上であった。さらにScramble群では著明な内膜肥厚を認めたのに対し、CRE群で有意に内膜肥厚形成を抑制した (内膜面積比、 $0.20 \pm 0.02$  vs  $0.56 \pm 0.08$ , n=6;  $p < 0.05$ )。またVSMCsの評価と同様にCRE下流の遺伝子発現をマウスワイヤ障害部血管壁 (全層) で評価したところ、Bcl-2、Ccna2がCRE群で有意に抑制されていた。

### 5 ヒト移植前静脈片における遺伝子発現

バイパスグラフトとして移植前のヒト静脈片について、免疫組織染色を施行しMAPKAPK3とFHL5

の発現を検討した。静脈の質についてMAPKAPK3はpoor graftで高発現していたがFHL5はgood graftで高発現しており、一定の傾向はなかった。しかし合併症別の評価ではMAPKAPK3、FHL5ともに糖尿病合併患者で有意に高発現していた。

### 考 案

今回我々が検討した転写因子に対するDecoy療法の実現可能性について、多くの種でそのシスエレメント配列が保存されていることが知られている。また異なった種のターゲット遺伝子のプロモーター領域において、異なった種の転写因子が結合可能であることが知られている。このようなことから動物実験の結果が実際のヒトでも十分に再現される可能性は極めて高い。またこれまでにヒトに応用されたE2FやNF $\kappa$ BといったDecoy療法について合併症の報告はなく、安全性の高い治療と考えられる。

遺伝子導入は遺伝子治療を成功させるために重要な要素である。今回我々はマイクロバブルを利用した超音波導入法を採用した。一般的にはウイルスベクターなどのツールを利用した遺伝子導入法が導入効率が高いとされているが、閉塞性動脈硬化症などの血管疾患が良性疾患であることを考慮すると少しでも遺伝子導入に関する危険性を回避することのほうが実現可能性としてメリットがあると考えた。実際我々の方法では70%以上の導入効率を達成しており十分な効果が期待される。今後臨床応用に際しては*ex vivo*で静脈内にDecoyを含む溶液を充填して超音波を照射するなどの方法を考えている。

臨床応用する際に本治療の適応となる患者を絞り込むため、ヒト静脈片を解析した。MAPKAPK3、FHL5ともに糖尿病合併患者に高発現していたが、糖尿病性腎症により慢性透析に移行した症例の静脈片ではどちらも発現が低下していた。このことから対象となる患者は透析に至らない糖尿病合併患者と推測されるが、糖尿病の進行度によって両分子の発現が変化するメカニズムは現在のところ不明であり、今後解明する必要があると考えている。

### 結 論

CRB-CREシグナルは血管内膜肥厚形成における重要なメカニズムであり、CRE decoy ODNによる血管内膜肥厚抑制遺伝子療法の可能性が示された。

### 引 用 文 献

1. Muto A, Model L, Ziegler K, Eghbalieh SD, Dardik A. Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies. *Circ J* 2010;74:1501-1512.

2. Conte MS, Bandyk DF, Clowes AW, Moneta GL, Seely L, Lorenz TJ, *et al.* Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery. *J Vasc Surg* 2006;43:742-751; discussion 751.

3. Nakanishi K, Saito Y, Azuma N, Sasajima T. Cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein activation by mitogen-activated protein kinase- activated protein kinase 3 and four-and-a-half LIM domains 5 plays a key role for vein graft intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 2013;57:182-93, 193 e1-10.

参 考 論 文