

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進 研究事業

冠動脈形成術後再狭窄に対する新規遺伝子治療法〔抗 MCP-1 療法、
抗転写因子療法〕の基礎研究ならびに臨床研究

平成 14 年度総括・分担研究報告書

主任研究者 江頭 健輔

平成 15 (2003) 年 4 月

目次

1. 研究組織	1 ページ
2. 総括研究報告書	2-5 ページ
3. 分担研究報告書	
研究報告 1 : 再狭窄に対する抗MCP-1遺伝子治療法の開発と臨床応用	6-9 ページ
研究報告 2 : 抗MCP-1遺伝子治療の毒性試験	10-19 ページ
研究報告 3 : NF- κ B デコイ導入による再狭窄の抑制に関する基礎研究と 探索的臨床研究	20-55 ページ
4. 研究成果の刊行に関する一覧表	56 ページ
5. 研究成果の刊行物・別刷	57 ページ

研究組織

主任研究者名・所属・役職

江頭 健輔 九州大学医学部附属病院 循環器内科 講師

分担研究者名・所属・役職

竹下 彰 九州大学大学院医学研究院 循環器内科学 教授

居石 克夫 九州大学大学院医学研究院 病理病態学 教授

米満 吉和 九州大学大学院医学研究院 病理病態学 助手

事務担当

小柳 美香 九州大学大学院医学研究院 循環器内科学

厚生労働科学研究費補助金
(基礎研究成果の臨床応用推進 研究事業)
総括研究報告書

冠動脈形成術後再狭窄に対する新規遺伝子治療法 [抗 MCP-1 療法、
抗転写因子療法] の基礎研究ならびに臨床研究

主任研究者 江頭 健輔
九州大学医学部附属病院 循環器内科 講師

研究要旨 (概要) :

- 研究の必要性ならびに目的 : 拡張した血管内腔が再び狭くなる血管形成術後「再狭窄」が高率に発生することが医療上だけでなく社会的にも問題となっている。しかし、現在のところ再狭窄に対する有効な治療法はなく、新規の治療法の開発の必要性が強く指摘されている。本研究の目的は、再狭窄の新しい遺伝子治療法 (抗 MCP-1 療法、抗転写因子療法) を開発し、臨床応用を目指すことにある。
- 期待される効果など : 1) 再狭窄に対する新たな遺伝子治療法が確立される可能性がある。2) 再狭窄/動脈硬化の発生機序の理解に大きく貢献するだけでなく、「発生機序に即した根本的治療」が実施可能となる。3) 「血管病の遺伝子医療」の実現が促進される。4) 国民の健康科学に貢献する次世代医療の実現が可能となる。
- 本研究の独創的な点と特色 : 1) 本研究の最も独創的な点は、申請者が考案した抗 MCP-1 遺伝子治療法を用いて再狭窄に対する新規遺伝子治療法の開発を試みることである (特許出願中)。2) 血管傷害モデルで新生内膜形成や収縮性リモデリングに、最近その病態的意義が注目さ

れている転写因子（*egr-1* など）がどの程度重要な役割を果たすかを明確に実証した研究は少ない。

- 研究計画：研究成果に基づいて臨床応用を目指すために以下の動物モデルを用いる：1) 高コレステロール食負荷ウサギならびにサルの頸動脈内膜傷害モデル、2) スtent 植え込み後再狭窄ウサギおよびサルモデル。さらに、厚生労働省・文部科学省合同審査委員会の承認を得て、臨床研究を行う。

A. 研究の必要性和目的

動脈硬化を基盤として発生する虚血性心疾患や脳卒中などの虚血性臓器障害の頻度は増加しており（我が国の死因の約4割を占める）、その治療法の確立は高齢化社会を迎えている我が国の医学の最も重要な課題の一つである。動脈硬化による血管内腔狭窄を拡張する経皮的冠動脈形成術の有用性は確立し、世界的に普及している。しかし、拡張した血管内腔が再び狭くなる「再狭窄」が高率（冠動脈では40%、下肢動脈では60%）に発生することが医療上だけでなく社会的にも問題となっている。再狭窄率ならびに合併症の発生が高齢者に多いことも深刻な問題である。しかし、現在のところ再狭窄に対する有効な治療法はない。したがって、新規治療法の開発が強く望まれている。

最近、我々は1) 変異型 monocyte chemoattractant protein-1

(MCP-1) が MCP-1 受容体の dominant-negative inhibitor として作用すること、2) その遺伝子導入によって動脈硬化性病変が抑制されること、を明らかにした (FASEB J 2000、Circulation 2001)。また、転写因子 NF- κ B を阻害するデコイ導入により NO 産生抑制モデルの動脈硬化が抑制されることも明らかにした (Circulation 2000)。これらの結果が

ら、抗 MCP-1 遺伝子治療あるいは抗転写因子療法が再狭窄の画期的新規治療法となる可能性が示唆された。

本研究の目的は、上記の我々の成果をふまえて再狭窄の新しい遺伝子治療法（抗 MCP-1 療法、抗転写因子療法）を開発し、臨床研究を目指すことにある。

B. 研究方法・計画ならびに研究結果

今年度は3項目のサブテーマについて研究を進めた。平成14年度の目標であったステント拡張術後の実験的再狭窄に対する抗 MCP-1 療法の研究計画は達成できた。また、抗 MCP-1 治療の毒性試験にも着手し成果が上がっている。さらに、NF-kB デコイ導入による再狭窄抑制を目指した探索的臨床研究を開始した。

1. 再狭窄に対する抗 MCP-1 遺伝子治療法の開発と臨床応用：

- 1) 前臨床試験：高コレステロール食負荷ウサギならびにサルを用いてステント拡張後再狭窄モデルを作製した。変異型 MCP-1 (7ND) 遺伝子導入による抗 MCP-1 療法によって、(1) ステント拡張後早期の炎症が抑制される、(2) 1ヶ月後の新生内膜形成が抑制される (60-70%抑制)、ことが明かとなった (Hypertension 2003)。
- 2) 探索的臨床研究の申請：上記研究成果に基づいて「再狭窄に対する抗 MCP-1 遺伝子治療探索的臨床研究」を厚生労働省へ申請した (修正・見直し請求に対する再申請を平成15年4月に提出予定)。

2. 抗 MCP-1 遺伝子治療の毒性試験：毒性試験は厚生労働省霊長類研究施設あるいは田辺 R&D センターで実施した (委託)。そこで霊長類 (カニクイザル) を用いて急性毒性試験ならびに抗体産生試験を実施した。その結果、急性毒性や抗体産生は認めなかった。

3. NF-kB デコイ導入による再狭窄の抑制に関する基礎研究と探索的臨床研究：

- 1) 基礎研究：NF-kB デコイ導入による NF-kB 活性抑制によって高コレステロール血症ウサギにおけるステント内新生内膜形成が減少することを明らかにしつつある (予備成績)。

- 2) 探索的臨床研究：学内倫理委員会の承諾を得て、平成14年11月、臨床研究「ステント後再狭窄に対する NF- κ B デコイを用いた探索的

C. 考察ならびに結論

1. 今年度の成績から、ウサギならびにサルにおいて再狭窄反応（血管傷害後内膜肥厚）の原因に MCP-1 を介する炎症が必須の役割を果たすことが明らかとなった。申請者は、従来、ラットやウサギモデルにおいて有効性が示された治療法であっても、ヒトでは再狭窄に対する作用が全く認められないということが殆どであったことから、ヒトに近い霊長類での検討が必要と考え霊長類（サルモデル）での実験を行った。霊長類で MCP-1 をターゲットとする治療が再狭窄に対する有用な新規治療になる可能性が初めて示された。
2. 変異型 MCP-1 は生体内には殆ど存在しないので臨床研究を実施する場合には、その急性毒性に加えて抗原性や免疫異常の誘導などが懸念される。この毒性試験の結果、毒性は認められなかったので臨床研究に向けての準備を進めることが出来る。
3. 実験的ステント内再狭窄に対する NF- κ B デコイ導入の効果を引き続き検討する。探索的臨床研究引き続き継続して実施する。

D 健康危険情報

なし

E 研究発表

なし

F 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

研究報告1：

再狭窄に対する抗MCP-1遺伝子治療法の開発と臨床応用

再狭窄に対する抗MCP-1遺伝子治療法の開発と臨床応用

ラット、ウサギならびにサルのモデルでの検討

【研究要旨】

我々が開発した変異型MCP-1遺伝子を用いた遺伝子導入が抗MCP-1遺伝子治療として有用であることを報告してきた。今年度は高コレステロール血症ウサギならびにサルの腸骨動脈ステント内再狭窄モデルを用いて有効性を明らかにした。これらの研究成果から、MCP-1をターゲットとする治療が再狭窄に対する有用な新規治療になる可能性が明かとなった。現在、遺伝子治療臨床研究計画「再狭窄に対する遺伝子治療臨床研究」を厚生労働省へ申請している（平成15年4月再申請予定）。

【背景と目的】

冠インターベンション後再狭窄に対する確立された治療法はない。最近再狭窄の分子機構として血管傷害後早期に生じる炎症の重要性が注目されてきた。しかし、血管壁に生じる炎症を効率的かつ安全に阻止できる治療法は限られていた。我々は単球／マクロファージの遊走に必須の役割を持つケモカインである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の機能を生体レベルで阻止できる新しい抗MCP-1遺伝子治療法を開発した。すなわち、MCP-1のN末端の2番目から8番目までのアミノ酸が欠損した欠損体(7ND)がMCP-1受容体の強力な dominant negative inhibitor として作用すること、7ND遺伝子を動物実験の骨格筋に導入すると同タンパクが循環血中に分泌されること、分泌された7NDは単球のMCP-1受容体(CCR2)に結合し受容体シグナルを阻止すること、遠隔臓器のMCP-1による単球浸潤を著明に抑制できること、を明らか

にした (FASEB J 2000、Circulation 2001)。平成13年度は、高コレステロール食負荷ウサギモデルにおいてバルーン傷害後の炎症反応 (MCP-1発現亢進、単球・マクロファージ浸潤) が著しく抑制され再狭窄反応 (内膜肥厚、陰性リモデリング) が減少することを報告した (Circulation 2002)。

また、ラットならびに高コレステロール血症サルのバルーン傷害モデルを用いて7ND遺伝子導入が血管傷害後の炎症反応ならびに新生内膜肥厚を抑制するかどうかを明らかにした (FASEB J 2002)。

平成14年度年度の研究の目的は、高コレステロール血症ウサギならびにサルのステント内再狭窄モデルを用いて7ND遺伝子導入が血管傷害後の炎症反応ならびに新生内膜肥厚を抑制するかどうかを明らかにすることである。

【方法】

ウサギならびにカニクイザルに高コレステロール食負荷を行い、高コレステロール血症状態にした。麻酔下に腸骨動脈にマルチリンクステントを挿入し拡張した。手術3日前からアスピリン81mgとチクロピジン100mgを実験終了まで投与した。28日後に動物を安楽死させ、両側腸骨動脈の病理組織学的検索ならびに遺伝子発現解析を行った。ウサギでは手術直前、右大腿筋内に7ND遺伝子(500 μ g+electroporation法)あるいは、PBS(PBS+electroporation法)を筋注した。サルでは右大腿筋内に7ND遺伝子(1500 μ g+局所麻酔)あるいは、PBS(PBS+局所麻酔)を筋注した。

【結果】

ラット頸動脈バルーン傷害後3-7日後にMCP-1の遺伝子ならびにタンパク発現、単球を主体とする炎症細胞浸潤と増殖 (PCNA陽性細胞出現) が認められ、28日後には内膜肥厚を認めた。7ND遺伝子導入によって、このような炎症・増

殖ならびに新生内膜肥厚は約70%抑制された。

サルモデルでも同様に傷害28日後に新生内膜肥厚が観察された。7ND遺伝子導入によって新生内膜肥厚は約70%抑制された。

【考察】

これらの成績から、ウサギならびにサルにおいてステント内再狭窄の原因におけるMCP-1の重要性が明かとなった。申請者はウサギ（昨年度）、ラットならびにサル（今年度）においてバルーン傷害後再狭窄反応（血管傷害後内膜肥厚）成立にもMCP-1が必須の役割を果たすことを報告した。申請者は、従来、ラットやウサギモデルにおいて有効性が示された治療法であっても、ヒトでは再狭窄に対する作用が全く認められないということが殆どであったことから、ヒトに近い霊長類での検討が必要と考えサルモデルでの実験を行った。本研究成果によりMCP-1をターゲットとする治療が再狭窄に対する有用な新規治療になる可能性が初めて霊長類で示された。

このような基礎研究成果から、現在、「再狭窄に対する遺伝子治療臨床研究」を厚生労働省へ申請している。

研究報告 2 :

抗 MCP-1 遺伝子治療の毒性試験

抗 MCP-1 遺伝子治療の毒性試験

【要旨】

急性毒性試験と抗体産生試験を行った。

急性毒性:高コレステロール血症カニクイザルに変異型 MCP-1 プラスミド(0.5 mg/kg、1.2 mg/kg) を筋注し、血液学・血液生化学、検尿、検便、を経時的に実施するとともに、投与28日後に解剖を行った。その結果、筋肉注射によると考えられる血清 CPK・GOT 上昇は認めしたが、それ以外の炎症、肝障害、アレルギーなどは認めなかった。また、全身臓器の病理組織学的異常も認めなかった。

抗体産生試験:変異型 MCP-1 コーティングディッシュでの ELISA 測定を変異型 MCP-1 投与サルのパア血清(投与前、28日後)を用いて行った。その結果、特異的 IgG 抗体価の上昇は認めなかった。したがって、ヒトにおいても変異型 MCP-1 に対する抗変異型 MCP-1 抗体が生じる可能性は低いと考えられた。

急性毒性試験は以下の3試験を実施した。

毒性試験1

概要:7ND プラスミド遺伝子の骨格筋内投与の毒性の有無を明らかにするためにカニクイザルを用いて検討した。試験施設は厚生省霊長類共同利用施設(〒305-0843 茨城県つくば市八幡台一番地)を用い、試験は社団法人予防衛生協会(〒305-0843 茨城県つくば市八幡台一番地)に委託して平成12年10月24日から11月28日までの間に行った。カニクイザルの塩酸プピバカイン投与部位に生理食塩水あるいは7NDを含むプラスミドDNAを単回筋肉内投与した際の急性毒性を検討した。試験は、カニクイザルの大腿部筋肉にプピバカイン(0.25%マーカイン4ml)を3日前に前投与し、生理食塩水(2頭)あるいは7ND遺伝子1.2 mg/kg(3頭)を大腿部筋肉の前処置部位に投与し、以後28日間あるいは29日間観察を行った。経時的に体重、血圧、心電図、尿、血液、検査を行い、最後に剖検と各臓器の病理組織学的検査を実施した。結果:7ND遺伝子投与によって、対照群と比較して以下の異常所見が見られた;投与後1日目の尿ケトン体陽性、投与1日目の分葉核好中球増加と相対的リンパ球減少。遺伝子投与群・対照群両方に見られた所見として以下の所見が見られた;7日目の尿量増加、投与1日目のGOT、CPK増加(筋肉注射による筋肉破壊の結果と考えられる)、筋肉注射部位筋肉の軽度の炎症・変性・再生(筋肉注射による非特異的変化であって7ND遺伝子導入による特異的変化ではな

いと考えられる) など。

評価：カニクイザルにおいて 7ND プラスミド骨格筋投与による重篤な毒性は認めなかった。本試験の結果から、7ND プラスミド DNA の単回筋肉内投与の安全性は高いと結論された。臨床研究では、ヒトに対する 7ND 投与量は 0.5 mg/kg と設定している。したがって、この毒性試験によってヒトに投与する約 2 倍量強の 7ND プラスミドによる重篤な毒性は認めないことが示された。

毒性試験 2

概要：我々が設定した臨床用量 (0.5 mg/kg) の 7ND プラスミド遺伝子の骨格筋内投与の毒性の有無をカニクイザルを用いて検討した。この研究は申請者らが田辺 R & D 社動物実験施設 (〒335-8505、埼玉県戸田市川岸 2-2-50) で平成 12 年 10 月から 12 月までに行った。カニクイザルの大腿部筋肉にプピバカイン (0.25%マーカイン 4ml) を 3 日前に前投与し、生理食塩水 (4 頭) あるいは 7ND 遺伝子 0.5 mg/kg (6 頭) を大腿部筋肉の前処置部位に投与し、以後 28 日間あるいは 31 日間観察を行った。最後に剖検と各臓器の病理組織学的検査を実施した。

結果：7ND 遺伝子投与によって上記剖検所見ならびに病理組織学的所見に異常は認めなかった。また、尿所見の異常も生じなかった。

評価：カニクイザルにおいて 7ND プラスミド 0.5 mg/kg 骨格筋投与による毒性は認めなかった。

毒性試験 3

概要：変異型 MCP-1 遺伝子投与による急性毒性をラットで検討した。

ヒトに投与する場合と同様の前処置法で高用量の変異型 MCP-1 を WKY ラット (メス、週令：12-16 週、体重 190-230g) に投与した場合の急性毒性を検討した。ラットの下肢骨格筋 (大腿筋) に局所麻酔薬 (0.25%マーカイン: 400 μ l) を筋注し、3 日後、同部位に変異型 MCP-1 を以下の 3 つの用量で筋注した。投与 3, 7, 14 日後に下記項目を検討した。

投与量は以下の 3 dose であった；臨床使用量：0.5 mg/kg、3 倍量：1.5 mg/kg、10 倍量：5.0 mg/kg。

以下の項目を測定した。

1) 血液検査 (血計、生化学)

2) 血中・筋注部位筋肉における炎症性サイトカイン発現

：ELISA 法による IL-6, TNF α , IL-1 β , MCP-1 濃度測定

(Biosource 社 ELISA kit : rat IL-6(#KRC0061), rat TNF α (#KRC3014), rat IL-1

β (#KRC0011), rat MCP-1 (#KRC1012))

<結果>

- 高用量投与でもラットの食餌、飲水量に変化なく体重減少を認めなかった。
- 血液検査：高用量(10 倍)投与でのみ一過性かつ軽度の白血球増加を認めた
が、いずれの用量・期間でも CRP は陰性だった。生化学では、筋注後 3 日
目の CPK, GOT 増加傾向を認めた。この CPK, GOT 上昇はプラスミド筋注
による影響と考えられる。その他は特に有意な臓器障害を認めなかった。
- 炎症性サイトカイン発現：血中、筋注部位筋肉において有意な炎症性サイ
トカインの発現増加を認めなかった。

抗体産生試験として以下の 2 試験を実施した。

試験 1

7ND 遺伝子導入によって蛋白が産生されれば抗体が産生される可能性がある。
この点を以下に示すような二つの実験を行い、7ND を投与したカニクイサル血
清において 7ND に対する抗体は検出できないことを示した。

実験 1

<方法>

野生型ヒト MCP-1 もしくは変異型ヒト MCP-1 自体を抗原としてプレートに
固定化し、変異型 MCP-1 を投与した実験動物の血清を反応させ、HRP 標識抗
ヒト IgG (IgM) を二次抗体として ELISA 測定した。マウス (C57B6J) ならば
びにカニクイサル (体重 4.5-5.0kg、4-5 歳) に変異型 MCP-1 遺伝子プラスミ
ド 0.5 mg/kg を骨格筋に導入した。

<結果>

実験 1：実験動物における野生型 MCP-1 に対する抗体産生の検討

ELISA 法により、変異型 MCP-1 投与 28 日後*のマウス血清(N=4)にお
いて抗 MCP-1 抗体価の上昇(約 4.4 倍**)を認めた (図 1)。ヒトとマウス
の MCP-1 相同性は 75% (アミノ酸) であるため、この抗体価の上昇はマ
ウスに投与した変異型 MCP-1 がヒト由来であることが主因と考えられる。

次に、同一サルのペア血清(N=8)を用いて MCP-1 特異的な IgG/IgM の
産生を ELISA 法で検討した。一般に IgG は抗原を繰り返し免疫した方が抗
体価の上昇が期待されるので、変異型 MCP-1 を 14 日後に再投与 (追加免
疫) した 28 日後*の血清を検討した。しかし特異的抗体の抗体価上昇は認
めなかった (図 2)。さらに IgM の検討も行ったが、IgG と同様に変異型
MCP-1 投与 7 日後***の血清で抗体価は有意な上昇を認めなかった (図 2)。

以上の成績から、変異型 MCP-1 を投与したサルの血清中に抗ヒト MCP-1 抗体の産生が認められないことが明らかになった。サルとヒトの MCP-1 相同性は 99% (アミノ酸) と非常に高いので、サルがヒト MCP-1 を抗原として認識しない可能性が考えられた。従ってヒトにおける変異型 MCP-1 抗体産生の検討をサルで実施できると考え、以下のように 2. の検討を行った。

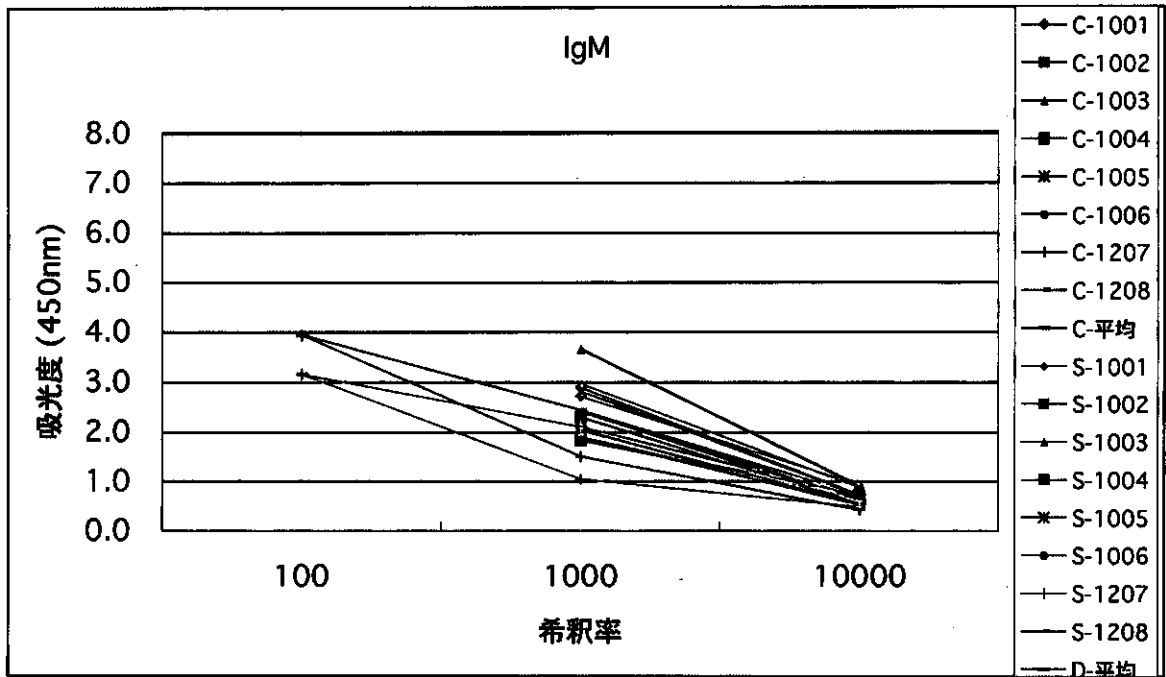
- * IgG の抗体価は抗原提示後数週間(3-5 週)で上昇するので、変異型 MCP-1 投与 28 日後の血清を用いた。
- ** 臨床において一般にウイルス感染などの場合、ペア血清で 4 倍以上の抗体価の上昇を感染の基準としている。
- *** IgM の抗体価は抗原提示後 4 - 5 日でピークに達して漸減することが知られているので、変異型 MCP-1 投与 7 日後の血清を用いた。

実験 2：実験動物における変異型ヒト MCP-1 に対する抗体産生の検討

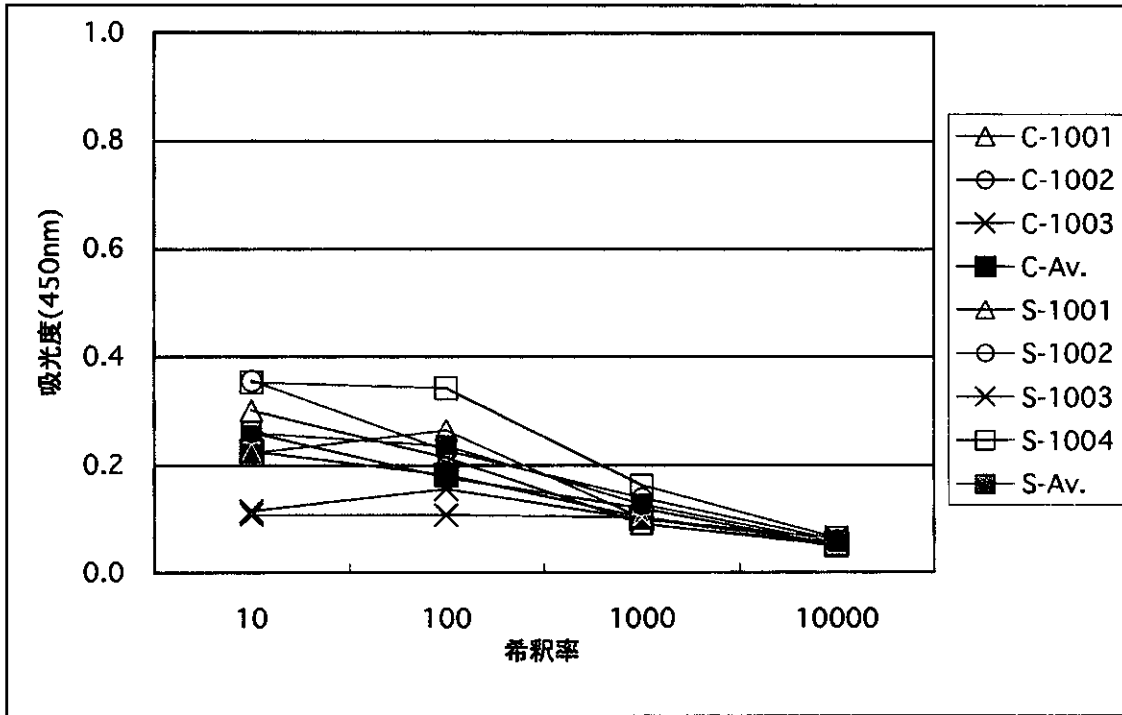
サルにおいて変異型 MCP-1 投与で抗体が産生されるとすると、変異型 MCP-1 特異的な構造 (7 アミノ酸が欠失した前後構造) による抗原性に起因すると考えられる。変異型 MCP-1 コーティングディッシュでの ELISA 測定を変異型 MCP-1 投与サルのペア血清 (28 日後) を用いて行ったが、特異的 IgG 抗体価の上昇は認めなかった (図 3)。陽性対照として行ったマウス血清 (28 日後) では特異的 IgG 抗体価の上昇を認めた (図 4：約 3 倍) ので、サルにおいて変異部位の抗原性に対する抗体産生は起こらない可能性が高いと考えられた。即ちヒトにおいても変異型 MCP-1 に対する抗変異型 MCP-1 抗体が生じる可能性は低いと考えられた。

<総括>

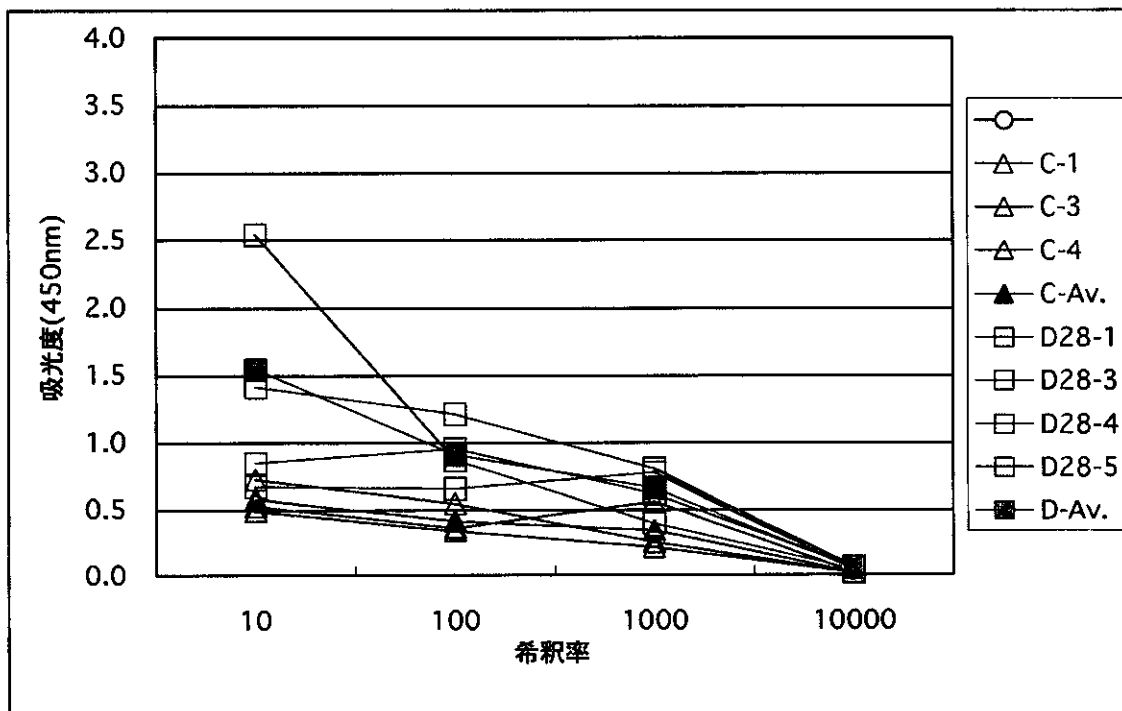
変異型 MCP-1 (ヒト由来) の抗原性について検討した。サルにおいて変異型 MCP-1 に対する抗体価の上昇は認められなかったため、ヒトにおいても変異型 MCP-1 抗体が産生される可能性は低いと考えられる。その理由はヒトとサルの MCP-1 の相同性の高さであり、サルではヒト MCP-1 による有意な抗体産生が認められなかったからである。従って、本実験成績から変異型 MCP-1 の抗原性は低いと考えられる。



(図 3) 変異型 MCP-1 投与サルの抗変異型 MCP-1 抗体価



(図 4) 変異型 MCP-1 投与マウスの抗変異型 MCP-1 抗体価



試験 2

<方法>

7ND 遺伝子プラスミドを 0.5mg/kg 筋肉内投与した 6 匹のサル（カニクイザル）を用いた。投与後 11 ヶ月もしくは 17 ヶ月後に血清を採取した。

対照コントロールとして、正常カニクイサル 3 例の血清を用意した。上清は 500 倍に希釈し、サンプル処理液に混合し、5 分間煮沸還元を行い、5 % から 20 % の濃度勾配をつけた SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。尚、染色は SYPRO Ruby 染色（蛍光染色）を行った。

<結果と考察>

本試験において、正常サル上清の泳動パターンと 7ND 投与サルの泳動パターンはほぼ一致した（次のページ参照）。また、特に H 鎖および L 鎖と思われるバンドが正常サル血清と比べ、異常な個体は認められなかった。

以上のことから、本試験において、7ND 投与サルで抗体が産生されている結果は見出されなかった。