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 15 年度総括・分担研究報告書

主任研究者　江頭　健輔

平成 16（2004）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
―マウス、ラット、ウサギならびにサルのモデルでの検討―
・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6-9ページ

研究報告2　変異型MCP-1遺伝子導入の毒性試験
・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10-11ページ

研究報告3・NF-κB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・・・・・・・・・・・・・・・・12-17ページ

・研究要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13ページ

・臨床研究の進行状況・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14ページ

・NF-κBデコイ溶出型ステントの前臨床試験の概要・・15-17ページ

4　研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・18ページ

5　研究成果の刊行物・別刷

【研　究　組　織】

※主任研究者名・所属・役職

江頭　健輔　（九州大学大学病院　循環器内科・講師）

※分担研究者名・所属・役職

竹下　　彰　（九州大学・名誉教授）

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　（九州大学大学病院　病理部・講師）

※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
（九州大学大学病院　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、申請者らが考案した抗 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）。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（NF-κB、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バルーンによる内膜傷害モデル、２）ステント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、探索的臨床研究の実施を目指す。

A　研究の必要性と目的

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-κB 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） 。これらの結果から、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

３項目のサブテーマについて研究を進めた。先ず、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、変異型 MCP-1（7ND）遺伝子導入の毒性試験もほぼ終了した。さらに、NF-κB 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・ステント後新生内膜形成モデル（ウサギ、サル）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）傷害後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、ことを明かにした（Hypertension 2003, Gene Therapy 2004）。

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」を平成１５年５月、厚生労働省へ再申請した。しかし、申請直後に薬剤溶出型ステントの画期的臨床成績が発表され、審査委員会から「薬剤溶出型ステントと同様に局所遺伝子送達による治療法に研究計画を変更するのが妥当」というコメントを頂いた。このコメントに沿って、現在、遺伝子溶出型ステントの研究開発を行っている。

2　変異型 MCP-1（7ND）遺伝子導入の毒性試験・

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 センターて実施した（委託）。そこで霊長類（カニクイザル）を用いて毒性試験ならびに抗体産生試験を実施した。その結果、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

- 基礎研究．NF-κB デコイ溶出型ステントの作製と基礎研究を行った。
- 探索的臨床研究．平成１４年１１月、大阪大学ならびに東京医科歯科大学と共同で臨床研究「ステント後再狭窄に対する NF-κB デコイを用いた探索的臨床研究」を開始した（２４症例を予定）。現在まで、１５例の症例に NF-kB デコイを導入した（九州大学で１５症例中１２症例を実施した）。

C. 考察ならびに結論

1　血管傷害後内膜形成の原因に MCP-1 を介する炎症が必須の役割を果たすことが明かとなった。MCP-1 をターゲットにした新規治療の妥当性が示された。この成果は申請者が開発した 7ND 遺伝子導入という独創的技術を駆使して得られたものである。

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（例・ACE 阻害薬、トラニラスト、抗血小板薬など）、ヒトに近い霊長類での検討が必要と考え、本研究では霊長類（サルモデル）での実験を行った。霊長類におけるモデル作製に成功し、同モデルで抗 MCP-1 療法の有効性を初めて明確にすることができた。霊長類を用いた研究によって、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さらに支持された。

2　変異型 MCP-1（7ND）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、その毒性に加えて抗原性誘導などが懸念される。本研究では、ラット、サルでの毒性と抗体産生試験を実施し、毒性と抗体産生は検出できなかった。

3　NF-kB デコイ導入による再狭窄抑制を目指した臨床研究を世界で初めて実施したことの臨床的意義は大きい。

4　抗 MCP-1 療法ならびに NF-kB デコイによる抗転写因子療法が再狭窄に対する次世代治療として有用であることが示された。今後は、遺伝子溶出型ステント（金属あるいは生分解性材料をプラットホームとする）として遺伝子を局所に送達する方向に開発研究が進むと考えられる。本研究成果を基盤にして、国産遺伝子溶出型ステントが誕生することを期待する。

D　健康危険情報

なし

E　研究発表

1）国内　口頭発表３０件、原著論文による発表１０件、
それ以外（レビュー等）の発表４０件

2）国外　口頭発表２０件、原著論文による発表３３件、
それ以外（レビュー等）の発表５件

F　知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

国内出願２件（１件．平成１６年３月１８日出願特願 2004-077581、１件．出願予定）

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

—マウス、ラット、ウサギならびにサルのモデルでの検討—

再狭窄に対する抗MCP-1遺伝子治療法の開発と臨床応用
—マウス、ラット、ウサギならびにサルのモデルでの検討—

【研究要旨】

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留置モデルを用いて抗MCP-1療法の有効性を明らかにした。これらの研究成果から、MCP-1を介する炎症が血管傷害後内膜肥厚の形成に必須の役割を果たすことが明かとなった。この研究成果を基盤にして、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」を平成１５年５月、厚生労働省へ再申請したが、申請直後に薬剤溶出型ステントの画期的臨床成績が発表され、審査委員会から「薬剤溶出型ステントと同様に局所遺伝子送達による治療法に研究計画を変更するのが妥当」というコメントを頂いた。このコメントに沿って、現在、病変局所への遺伝子導入を可能にする遺伝子溶出型ステントの研究開発を行っている。

本研究では、以下の動物モデルを用いて研究を実施した。臨床応用を考慮し、ヒトに近い霊長類での試験も実施した。

<u>試験１　ウサギならびにサルのステント留置後の新生内膜形成モデルでの研究</u>

【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(500μg＋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(1500μg＋局所麻酔)あるいは、PBS(PBS＋局所麻酔)を筋注した。

【結果】ウサギモデルではステント留置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、7ND遺伝子導入によって新生内膜肥厚は抑制された。

【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。本研究成果によりMCP-1をターゲットとする治療がステント後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。

試験２　遺伝子溶出型ステントの作製と前臨床試験の開始

最近、シロリムス（ラパマイシン)、パクリタキセル（タキソール）などの薬剤溶出型ステントが登場し、それらは無作為、前向き臨床試験（SIRIUS trial, RAVEL trial, TAXUS II, ASPET）で新生内膜の増殖を抑制し、再狭窄率を減少させるという有望な結果となった。このことは、ステントをDDS (drug delivery system)として使用し局所へ治療因子を送達することが再狭窄抑制の治療戦略となることを支持する。

しかし、現行の薬剤溶出ステントの臨床的問題点として、亜急性期血栓性塞栓・過敏反応・死亡などが生じることがNIHから発表され慎重な臨床経過の観察が勧告されている。前臨床試験レベルでは、不十分な血管修復反応（炎症の持続、内皮再生障害など)、血栓形成、遠隔期での効果の消失などの問題が指摘されている。したがって、安全性と有効性においてより優れた薬剤溶出ステントの開発が開始されているのが現状である。

再狭窄の成因におけるMCP-1の役割を示唆する臨床研究成績が発表されている。すなわち、（１）ステント再狭窄部位では慢性炎症（単球浸潤）が持続する；（２）ステント拡張術直後からMCP-1濃度の増加と白血球活性化が生じる；（３）MCP-1血中濃度と再狭窄の発生は相関する、などである。これらの基礎ならびに臨床研究成績を基盤にして、我々は7ND遺伝子溶出型ステントを作製し、前臨床試験を実施している。遺伝子溶出型ステントの優位性として、（１）早期溶出によって遺伝子導入・発現ができるのでポリマー等によるコート技術の開発に重点を置かなくてもよい、（２）一旦導入されれば７－１０日間にわたって標的因子が安定して局所分泌されるので、薬剤溶出型ステントと比較して、標的因子の局所保持性が高い、

（3）全身副作用が生じない、などが期待される。また、7NDを用いることにより、先行の抗癌剤、免疫抑制剤のコーティングステントの前臨床試験の遠隔期に見られた組織修復反応の障害（内皮再生障害、炎症の持続）は克服できることが期待される。今後は、遺伝子溶出型ステントとして臨床応用を予定している。

研究報告２：

変異型 MCP-1 遺伝子導入の毒性試験

変異型 MCP-1 遺伝子導入の毒性試験

【要旨】

今年度は毒性試験を行った。

慢性毒性試験.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）を筋注し、１１か月間ならびに１７か月間観察し全身臓器の病理組織学的検索を行った。その結果、毒性を示唆する所見は認めなかった。動脈硬化を作製したサルに変異型 MCP-1 プラスミド（0 5 mg/kg、２週間毎）を慢性投与し、毒性を検索した。血清学的検索、病理組織学的検索において毒性を示唆する所見は認めなかった。

以下の慢性毒性試験を実施した。

【概要】7ND プラスミド遺伝子の骨格筋内投与の長期毒性（0 5 mg/kg）の有無を高コレステロール食負荷カニクイザルを用いて検討した。この研究は動脈硬化性病変進行に対する 7ND プラスミド投与の効果を検討する研究のなかで実施したものである。

平成１３年５月から１４年６月までに行った。高コレステロール食負荷を６ヶ月間行った後、大腿部筋肉に対照（空）プラスミド（９頭）あるいは 7ND 遺伝子プラスミド ０５mg/kg（９頭）を２週間毎に投与し、以後６ヶ月間観察を行った。プラスミド投与３日前にブピバカイン（0 25%マーカイン 4ml）を投与した。体重・食事量測定を２週間毎に、血中サイトカイン・ケモカイン（MCP-1、IL-8、ICAM-1、bFGF、レニン活性、angiotensin II など)、CRP 測定を毎月、血清 GOT、GPT、LDH、血球検査を解剖時に実施した。６ヶ月後に解剖し主要臓器（心臓、大動脈、腎臓、肝臓）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体重・食事量の変化は見られなかった。血中サイトカイン・ケモカイン、CRP、血球検査、GOT、GPT、LDH、はいずれの群ても対照群と同等であった。病理組織解析において、7ND 遺伝子導入による効果として動脈硬化性病変の退縮が認められた。しかし、主要臓器に毒性を示す所見は認めなかった。

【評価】高コレステロール食負荷カニクイザルにおいて 7ND プラスミドの長期間投与の影響は調べた結果、毒性の出現は認めなかった。動脈硬化の退縮は認めた。

研究報告３：

NF-κB 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

NF-κB 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

【研究要旨】

前臨床試験　NF-κB デコイ溶出型ステントによって NF-κB 活性が抑制され、ステント後新生内膜形成が減少することを明らかにしつつある。

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-κB デコイを用いた探索的臨床研究」を開始した（２４症例を予定)。現在まで、１５例の症例に NF-κB デコイを導入した（九州大学で１５症例中１２症例を実施した)。

以下に、

現在までの臨床研究の実施状況

NF-κB デコイ溶出型ステントの前臨床試験の概要

を示す。

臨床研究の進行状況

目標症例は24症例である。現在、14症例にNF-kBデコイが投与されている（そのうち11症例が九州大学で実施された）。14症例中１０症例で６ヶ月間の観察が終了している。

現在のところ、NF-κBデコイ投与に起因すると考えられる重篤な副作用、有害事象は認められない。

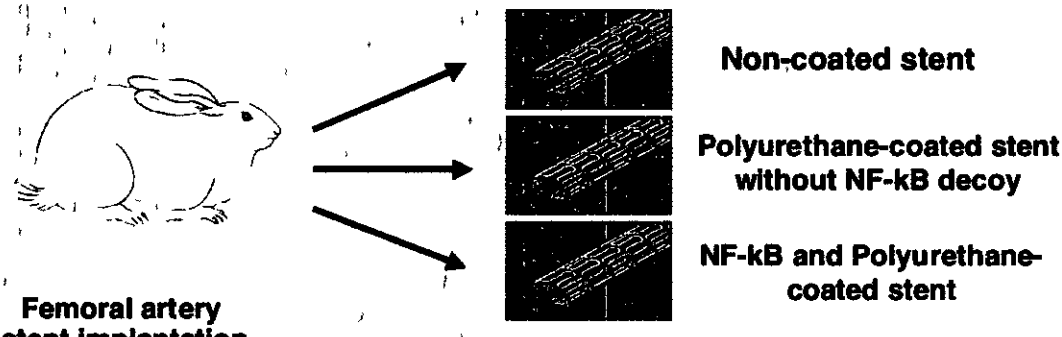
NF-κBデコイ溶出型ステントの前臨床試験の概要

Hypothesis

Blockade of NF-κB by stent-based delivery of cis-element "decoy" of NF-κB reduces neointimal formation after stent implantation in rabbits.

Methods

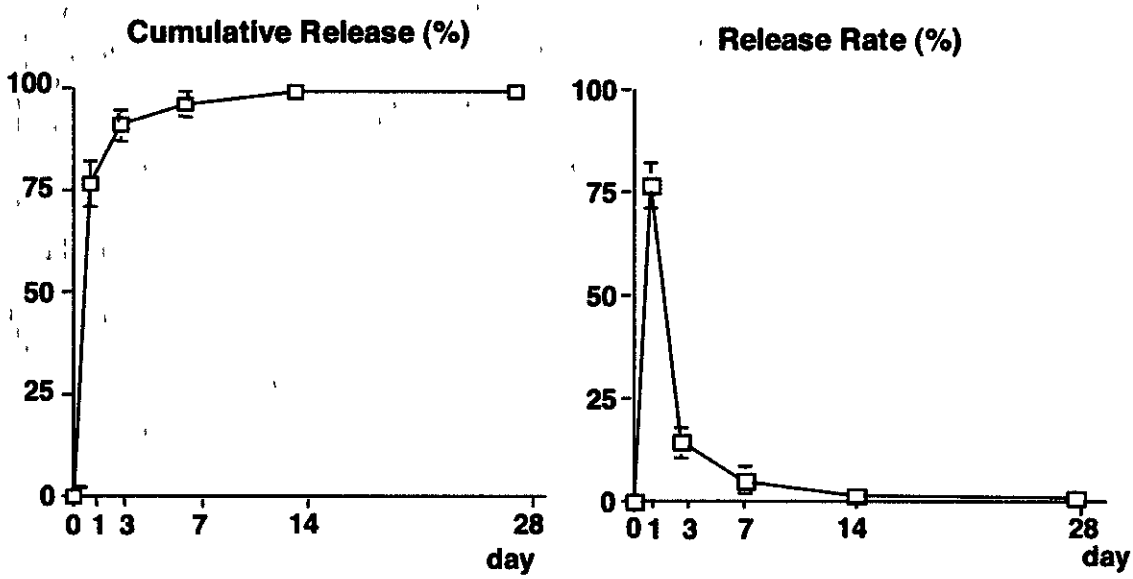
Animals: Hypercholesterolemic Rabbits



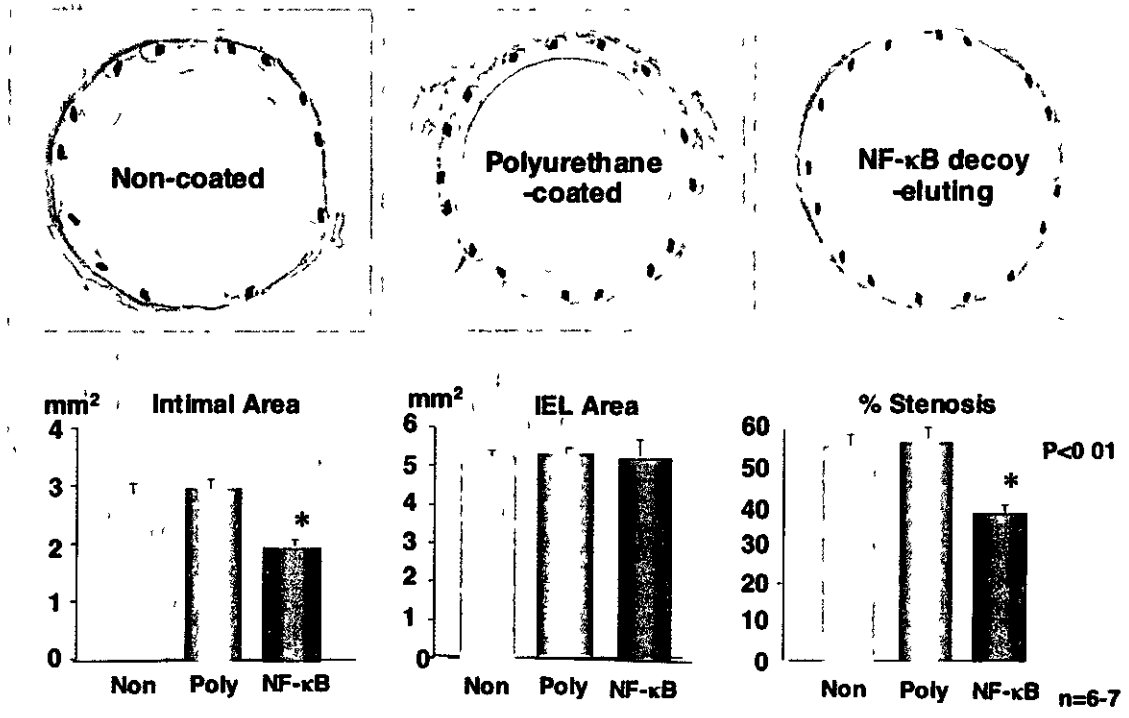
NF-κB Decoy in Vitro Release Kinetics Experiment

Initial Burst Release was Observed

About 200μg NF-κB decoy was loaded



NF-κB Decoy Eluting Stent Suppresses Neointimal Hyperplasia 28 Day After Stenting



Conclusion

- **Local stent-based delivery of NF-κB decoy reduced neointimal formation after stent implantation.**

- **These results suggest that this strategy might be a practical and promising means for prevention of neointimal formation after stent implantation.**

4　研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Inoue S, Egashira K, Ni Wihua, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K Taakeshita A	Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Limits Progression and Destabilization of Established Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice	Circulation	106	2700-2706	2002
Ni Weihua, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K, Zhao Q, Nishida K, Takeshita A, Egashira K,	Monocyte Cemoattractant Protein-1 Is an Essential Inflammatory Mediator in Angiotensin II-Induced Progression of Established Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice	Arterioscler Thromb Vasc Biol	24	534-539	2004
Ohtani K, Egashira K, Ishibashi M, Hiasa K, Zhao Q, Aoki M, Kaneda Y, Morishita R, Takeshita A	Inhibition of neointimal hyperplasia after balloon injury by cis-element decoy's of early growth response gene-1 in hypercholesterolemic rabbits	Gene Therapy	11(2)	126-132	2004
Ohtani K, Usui M, Nakano K, Kohjimoto Y, Kitajima S, Hirouchi Y, Li X, Kitamoto S, Takeshita A, Egashira K	Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Reduces Experimental In-Stent Restenosis in Hypercholesterolemic Rabbits and Monkeys	Gene Therapy		in press	2004
江頭健輔	血管病における炎症のニューパラダイム	血管医学	4 (5)	7-9	2003
北本史朗 江頭健輔	動脈硬化・再狭窄と炎症	血管医学	4 (5)	27-35	2003
北本史朗 江頭健輔	将来可能な遺伝子治療法	分子心血管病	4 (6)	62-68	2003

5　研究成果の刊行物・別刷

次のページ以降に論文別刷りを添付します。