核酸医薬を用いた 血管疾患に対する分子治療法

三宅 隆, 森下 竜一

要約：分子生物学の進歩に伴い血管疾患の病態解明が進み病変進行に関与する遺伝子・細胞内シグナルなどをターゲットにした分子治療も考案されてきた。そのなかで核酸医薬を使った治療法の開発も行われ、多くの遺伝子制御法が研究されている。核酸医薬は目的とする DNA・mRNA の相補的な塩基配列をもつ人工的に化学合成された核酸分子で高い特異性と容易な合成法が特徴である。動物実験で有用性が報告された主なものはアンチセンスとデコイで、臨床試験に進んでいる研究もあり次世代の治療薬として期待されている。対象疾患のひとつに血行再建後の内膜肥厚による再狭窄がある。アンチセンス法では細胞周期調節遺伝子をブロックして平滑筋細胞の増殖を抑制する方法がとられ、デコイ法では多くの細胞周期遺伝子群を制御している転写因子 E2F の活性を抑制する治療法が検討された。また病変進行に重要な因子である炎症を制御する転写因子 NF κ B に対するデコイも良好な内膜肥厚抑制効果を報告している。しかし E2F デコイの臨床試験では有意な治療効果が見られず、さらに複数の現象を制御するため NF κ B と E2F を同時に抑制するキメラデコイの開発が行われている。また小径の動脈瘤もデコイ療法のターゲットとなっている。動脈瘤の進展には血管壁の炎症と MMP の発現による細胞外マトリックスの破壊が重要な機序になっている。これに関与する転写因子が NF κ B と ets であり、これをデコイで同時に抑制することで動脈瘤の縮小効果が見られ、MMP 分泌・炎症の抑制による細胞外マトリックスの破壊停止に加え、エラスチン・コラーゲンの合成抑制を解除し細胞外マトリックスを再生する効果が確認された。このように核酸医薬は血管疾患においても新規治療法となる可能性が示されている。

1. 血管疾患に対する分子治療の現状

血管疾患の分子治療は、経皮的血管形成術や外科的なバイパス術後に発生する再狭窄の予防をターゲットとして研究が進んできた。その主な方法として 1) 遺伝子導入により特定のタンパク質を発現させる、または変異型タンパク質を発現させ正常タンパク質の機能を抑制する遺伝子治療、2) 中和抗体を投与して目的タンパク質の機能を抑制する抗体療法、3) 核酸医薬による目的遺伝子・タンパク質の発現を制御する方法などが考案されてきた。このなかには基礎的検討から臨床治験を行っている研究もあり、創薬に向けて今後ますます進んでいく分野であると期待されている。本稿では核酸医薬を使った血管疾患の治療法に関して紹介するが、特に核酸医薬のなかでデコイ療法を使った治療法について最近の著者らの知見を中心に概説する。

2. 核酸医薬の作用機序

核酸医薬は目的とする DNA・mRNA の相補的な塩基配列をもつ人工的に化学合成された核酸分子である。その構造はアンチセンスのように 1 本鎖のもの、デコイや siRNA のように 2 本鎖のものがあ、その機序・作用部位もそれぞれ異なっている。動物実験で治療薬として有効性を報告された方法はアンチセンス法、デコイ法そしてアプタマーがあり、その他にも遺伝子機能の解析などに応用されている方法もある (図 1)。

1) アンチセンス法

アンチセンスは目的遺伝子の mRNA と特異的に結合する核酸配列をもった合成核酸であり、これを細胞内に導入し目的の遺伝子と 2 重鎖を形成させタンパク質の発現を抑制する方法で目的以外の遺伝子には影響

図1 核酸医薬の作用部位・機序
(Morishita R. J Pharmacol Sci. 2004;95:1-8. より改変引用)

を及ぼすことはない。

2) siRNA (short-interfering RNA)

RNA干渉 (RNA interference) は目的とする遺伝子と相関する二本鎖RNAが標的遺伝子の転写産物 (mRNA) の相同部分の分解を促進し、タンパク質の発現を特異的に抑制する現象である。この現象を利用して人工的に合成された21～25塩基の二本鎖RNAを導入することでタンパク質発現を抑制する方法がsiRNA法である。現在は主に遺伝子の機能解析に利用されているが、治療方法としても期待されている。

3) アプタマー

核酸ライブラリーから人工的に得られる一本鎖核酸分子で、抗体と同じように目的とするタンパク・低分子化合物と結合して機能を阻害することができる。高い親和性と特異性をもっており、合成も容易で阻害薬の合成も可能である。

4) デコイ

さまざまな刺激により一連の遺伝子群が発現または抑制される初期の過程には特定の転写調節因子が関与している。デコイ療法はこの転写因子をブロックすることで活性化される遺伝子群の発現を調節する方法である。転写因子の結合部位を含むオリゴヌクレオチドを合成・二重鎖核酸 (デコイ) とし、ターゲット細胞の核内に導入する。このデコイが転写因子と結合することでDNA上への転写因子の結合を阻害してプロモーター活性が低下、本来発現する遺伝子群がコントロールされる。このデコイ療法は細胞周期や炎症などターゲットとなる現象に関与する複数の遺伝子を同時に

制御することが可能であり、一般にアンチセンス法より高い効果を得ることができる (図2)。

3. 血行再建後の再狭窄予防

心冠状動脈や末梢動脈の動脈硬化による狭窄病変にステント留置などの経皮的血管形成術が行われているが30～40%に再狭窄が起これ、静脈グラフトを使った外科的血行再建術でも15年で40～50%の狭窄・晩期閉塞が起これ。これらの再狭窄は動脈硬化の進行に加えて、手技に伴う内皮障害やマクロファージの浸潤など炎症反応の発生に続く中膜平滑筋細胞の内膜への遊走・増殖そして細胞外器質の沈着による新生内膜肥厚が原因と考えられている。ステント留置術では平滑筋細胞の増殖を薬剤で抑える薬剤溶出性ステントが開発され急性期の再狭窄は改善されたが、内膜再生の遅延による血栓形成や長期成績が問題点として残っている。核酸医薬の分野でも新生内膜肥厚の進展に関係する因子を制御する治療方法が考案された。

1) 細胞周期をコントロールするアンチセンス法

平滑筋細胞が増殖するためには細胞周期の進展が必要であり、これは細胞周期調節遺伝子群でコントロールされている。これらの遺伝子群にはc-myc, c-myb, cdc2, PCNAそしてチミジンキナーゼなどが含まれている。アンチセンス法を用いてこれらの遺伝子群の発現を抑制し、細胞周期を停止させ平滑筋細胞の増殖を抑制する治療法が考案された。1992年に前発癌遺伝子でもあるc-mybに対するアンチセンスが再狭窄予防に有効であった報告がされた(1)。その後c-mycア

図2 NFκB デコイのストラテジー (文献 17 より改変)

ンチセンスの内膜肥厚に対する有効性も動物モデルで証明され、最近 c-myc に対するアンチセンスを用いた再狭窄の予防を目的とする臨床試験が報告された。内膜肥厚、再狭窄率に有意な差は見られなかったが、ベクターを使わずにアンチセンスを冠動脈内投与する方法で低い導入効率の原因と考えられている(2)。われわれも細胞周期調節因子である PCNA と cdc2 キナーゼを同時に抑制するアンチセンスの導入が内膜肥厚を抑制することを報告した(3)。その他にも増殖因子である PDGF をターゲットにしたアンチセンスの有効性も報告されている。

2) 増殖因子を抑制するアプタマー法

VEGF に結合するアプタマーは、成人に失明をきたす加齢黄班変性症の治療薬としてすでに製品化されている。血管疾患では内膜肥厚の抑制に PDGF-B に対するアプタマーの動物実験が報告された。この報告では短期間の抑制効果は認めたが、6 週後の長期での抑制効果は消失しており投与期間・他剤併用の必要性を述べている(4)。血管疾患をターゲットにしたアプタマーの報告は少なく問題点もあるが、標的分子の多様性もあり今後研究が進んでいく分野と考えられている。

3) 細胞周期・炎症を制御するデコイ法

アンチセンス法でターゲットにした細胞周期調節遺伝子群のプロモーター部位に転写因子 E2F の結合部位があり、これらの発現をコントロールしている。E2F は細胞周期の静止期では不活性化されて Rb (Reti-

noblastoma) と結合しており、刺激時に Rb から遊離・活性化され S 期進展に必要な細胞周期調節遺伝子群の上流にある転写因子結合配列に結合し遺伝子群を発現させ細胞増殖をひき起こす。我々は E2F に対するデコイを平滑筋細胞に導入することで平滑筋細胞の増殖を抑え内膜肥厚が抑制できると考え、ラットの頸動脈バルーン障害モデルや豚の冠動脈バルーン障害モデルで内膜肥厚の抑制を報告した(5)。一方、米国では E2F デコイ療法による静脈グラフトの再狭窄予防を目的とした臨床試験が行われた。フェーズ I・II の試験では安全性・有効性が確認され、その良好な結果からフェーズ III の臨床試験が実施された。この試験では心臓、下肢の外科的な血行再建術で使用する静脈グラフトに E2F デコイを術中導入するデザインであったが、対象群に比べ再狭窄率の低下は見られなかった(6,7)。しかしこの報告からいくつかの問題点が明らかになった。その一つに内膜肥厚は多因子の関与で進展していくため細胞増殖のコントロールだけでは十分な効果が得られないことである。血管壁の炎症も内膜肥厚に関与する重要な因子と考えられており、インターロイキン-1,2,6,8 などのサイトカイン、MCP-1 などのケモカイン、ICAM,VCAM といった接着因子の発現亢進が動脈硬化巣でみられており炎症細胞の浸潤を誘導する(8)。これらの炎症関連因子の遺伝子発現を制御する転写因子に NFκB がある。人間の動脈硬化部位で NFκB の活性亢進が報告されており、我々

は NF κ B を抑制するデコイは E2F デコイと異なるアプローチとして内膜肥厚の抑制に有効と考えた. こうして新規合成した NF κ B デコイはラットやブタの動脈バルーン障害モデルで内膜肥厚の著明な抑制効果を認めた(8). さらにウサギ静脈グラフトモデルでは内膜肥厚の抑制に加え, 中膜の肥厚を誘導し動脈系における静脈グラフトの早期安定化を認めている. また NF κ B デコイには内皮細胞の保護効果が培養実験で報告されており, 静脈グラフトでも内皮依存性の血管拡張作用の改善を認めている(9).

以上のように E2F と NF κ B は内膜肥厚の進展に異なる機序で関与している. そこでこれら2つの転写因子の DNA 結合を阻害するために, それぞれの結合モチーフを合わせ持つキメラデコイを作製し, その効果をウサギ人工血管移植モデルで検討した. キメラデコイは平滑筋細胞増殖と炎症反応の両者を抑制し吻合部内膜肥厚の進展を抑えた. 米国で行われた E2F デコイの試験では十分な効果が得られなかったが, 新たなアプローチとしてキメラデコイの臨床での有効性に期待がもたれる.

4. 核酸医薬による動脈瘤治療

動脈瘤は無症候性に発症・増大して最終的に破裂をきたし死に至る疾患である. 破裂の予防目的で外科的な人工血管置換術が行われ良好な治療成績をあげており, 最近ではより低侵襲なステントグラフト留置術が開発された. これらの治療法は破裂の危険性が高い瘤径 4.5 cm 以上が一般的な適応となっている. しかし近年 CT や超音波検査が日常診療や検診で行われるようになり, 小径の動脈瘤が発見されることも多くなった. 小径瘤は破裂の危険が少ないため経過観察となるが, 自然に退縮する事はなく増大した時点で侵襲の大きい外科的治療が行われている. しかし小径瘤は薬物や分子治療に反応する多くの細胞を血管壁内に含有しているので, 早期に発見されたメリットを生かす低侵襲性の新しい治療法の確立が期待されている.

1) NF κ B・ets の動脈瘤への関与

動脈瘤の発症・進展には血管壁外膜側の炎症と matrix metalloproteinases (MMP) の発現亢進による細胞外マトリックス, 特に弾性繊維の破壊が重要な機序になっている. 我々はこれらの病態に関与する転写因子として NF κ B と ets に注目した. NF κ B は炎症に関与する転写因子であることは前述したが, 動脈瘤の病理所見では外膜側の炎症細胞の浸潤が認められており, この炎症細胞が平滑筋細胞と共に多種の MMP を分泌し血管壁の破壊を引き起こすと考えられている.

また NF κ B は MMP 遺伝子群のプロモーター部分に結合部分があり直接 MMP-1, MMP-2, MMP-3 そして MMP-9 の合成を亢進する(10-12). また ets は造血, 血管発生に関与する遺伝子群をコントロールする転写因子であるが, これも直接 MMP のプロモーターに結合部位を持ち MMP-1, MMP-2 そして MMP-9 の発現を亢進することが明らかにされている(13-16). 我々の検討でも動脈瘤症例の術中に得られた瘤壁サンプルの検討で NF κ B と ets の発現亢進を確認しており, 特に拡張が進行中である頸部で強い活性を認めている.

2) キメラデコイの動脈瘤治療効果

病理検討から NF κ B と ets を同時に抑制することは血管壁の炎症と複数のタイプの MMP 発現を抑えることが可能で動脈瘤の有効な治療方針になると考えられた. これまでにも抗炎症薬や MMP 阻害薬を使った動脈瘤モデルでの拡大予防効果が報告されている. 我々はこれら2つの転写因子に結合し活性を抑制するキメラデコイを作製した. 手術中に得られた瘤壁サンプルを使った組織培養ではキメラデコイは用量依存性に MMP-1 と MMP-9 の分泌を抑制した. この結果をもとにラットとウサギの動脈瘤モデルでキメラデコイの有効性を検討した(17). 我々はセルロースを基材にしたデコイ導入シートを作製し, これを血管周囲に巻くことで動脈瘤の主病変である外膜側から中膜の一部まで導入可能な方法を考案した. ウサギの実験では動脈瘤壁にキメラデコイを導入することで, 接着因子 VCAM-1 とケモカイン MCP-1 の発現を抑えてマクロファージの浸潤を抑制した. さらに瘤の進展に重要な MMP-2 と MMP-9 の活性抑制をデコイ治療群で確認した. この結果キメラデコイは弾性繊維の破壊を抑制することで動脈瘤拡大に対する予防効果を示した(図3). しかし臨床応用をするためには完成された動脈瘤に治療効果を示す必要がある. そこで動脈瘤作成の1週間後にデコイを導入する実験を行い動脈瘤の縮小効果をもとめた. そのメカニズムは予防効果の実験と同様に MMP 分泌・炎症の抑制による細胞外マトリックスの進行する破壊の停止であり, さらに NF κ B と ets の活性は血管壁の構成成分であるエラスチン, コラーゲンの合成抑制に働くが, キメラデコイはこの抑制を解除し弾性繊維・コラーゲン繊維の合成による瘤壁再生の効果も認めている. このように NF κ B と ets に対するデコイ療法は動脈瘤の早期治療となる可能性が示された.

5. 今後の核酸医薬を用いた治療法

核酸医薬は次世代の治療薬として期待されており,

a)

b)

c)

図3 ウサギ動脈瘤におけるキメラデコイの進展予防効果

a) 超音波画像, b) 血管造影, c) 超音波を使った瘤径の比較. キメラデコイは有意に動脈瘤の拡張を抑制した. Control: 対象群, Scrambled: ランダム配列のデコイ投与群, Chimera: キメラデコイ治療群. (文献 17 より改変)

新たな制御方法の開発も進んでいる. また病態解明が進み新規のターゲット遺伝子・タンパクの探索も行われている. しかし血管疾患に対する治療法は基本的に局所療法と考えられているので, その導入方法と効率が問題点となってくる. 外科治療に取り入れる場合は体外で導入することが可能で有効な手段であるが, 経皮的血管形成術ではバルーンを使った導入になるので導入効率の低下が懸念されている. また動脈瘤の治療で我々が行ったデコイシートによる導入は, 病変の首座である外膜側に作用させる局所療法であるが, 瘤周囲の剥離が必要であり侵襲的な治療法であることには変わりはない. より効果的で安全な遺伝子導入法・デリバリーシステムの確立が急務であり, さらに静脈投与で選択的に動脈硬化部位などの目的血管へ導入できるような組織特異的導入法が開発できれば, 核酸医薬は日常診療で使える治療薬として確立される.

文 献

- 1) Simons M, et al. Nature. 1992;359:67-70.
- 2) Kutryk MJ, et al. J Am Coll Cardiol. 2002;39:281-287.
- 3) Morishita R, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:8474-8478.
- 4) Leppanen O, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:E89-95.
- 5) Nakamura T, et al. Gene Ther. 2002;9:488-494.
- 6) Alexander JH, et al. JAMA. 2005;294:2446-2454.
- 7) Conte MS, et al. J Vasc Surg. 2006;43:742-751.
- 8) Yamasaki K, et al. Gene Ther. 2003;10:356-364.
- 9) Miyake T, et al. J Mol Cell Cardiol. 2006;41:431-440.
- 10) Bond M, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1999;264:561-567.
- 11) Takeshita H, et al. J Virol. 1999;73:5548-5555.
- 12) Kim H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000;269:401-405.
- 13) Vandenbunder B, et al. Folia Biol (Praha). 1994;40:301-313.
- 14) Nerlov C, et al. Oncogene. 1991;6:1583-1592.
- 15) Gum R, et al. J Biol Chem. 1996;271:10672-10680.
- 16) Watabe T, et al. Int J Cancer. 1998;77:128-137.
- 17) Miyake T, et al. Gene Ther. 2006;13:695-704.

著者プロフィール

三宅 隆 (みやけ たかし)

大阪大学 大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学, 特任研究員, 医学博士.

◇ 1987 年川崎医科大学卒業, '89 年川崎医科大学 胸部心臓血管外科教室 入局, '90 年川崎医科大学 大学院, '02 年大阪大学 遺伝子治療学, '03 年大阪大学 臨床遺伝子治療学.

◇ 研究テーマ: 心臓血管外科, 遺伝子治療. ◇ 趣味: カヌー.