おとり型核酸医薬による慢性関節リウマチに 対する遺伝子治療

富田 哲也^{*1)}, 森下 竜一^{*2)}, 富田奈留也^{*3)},
金田 安史^{*2)}, 吉川 秀樹^{*1)}, 越智 隆弘^{*4)}

review article

INFLAMMATION AND REGENERATION

Application of NF κ B decoy oligonucleotides for arthritis as a gene therapy

Rheumatoid arthritis(RA) and collagen-induced arthritis(CIA) are characterized by hyperplasia of the synovium and progressive joint destruction. The transcription factor- κ B(NF κ B) plays a pivotal role in the coordinated transactivation of cytokine and adhesion molecule genes, whose activation has been postulated to be involved in destructive changes of articular cartilage and bone in arthritic joints. In particular, interleukin-1(IL-1) and tumor necrosis factor α (TNF α) are important cytokines which perpetuate arthritis and induce joint destruction in both rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. We hypothesized that synthetic double-stranded DNA high affinity for NF κ B could be introduced *in vivo* as "decoy" cis elements to bind the transcription factor and to block the activation of proinflammatory cytokine genes such as IL-1 and TNF α . We reported here that *in vivo* transfection of NF κ B decoy ODN by intraarticular injection into collagen-induced arthritis in rats improved paw swelling. Histologic and radiographic studies showed a marked suppression of joint destruction in ankles treated by NF κ B decoy ODN transfection. NF κ B decoy ODN also suppressed the production of IL-1 and TNF α by synovium in the arthritic joints. Results demonstrated that administration of NF κ B decoy ODN in arthritic joints of collagen-induced arthritis in rats led to amelioration of arthritis. These findings suggest that intraarticular transfection of NF κ B decoy ODN may provide a useful therapeutic strategy for inflammatory arthritis.

Rec. 2/8/2001, pp 101~108

Tetsuya Tomita^{*1)}, Ryuichi Morishita^{*2)}, Naruya Tomita^{*3)},
Yasufumi Kaneda^{*2)}, Hideki Yoshikawa^{*1)}, Takahiro Ochi^{*4)}

key words : rheumatoid arthritis, decoy, NF κ B, gene therapy, transcriptional factor

慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)は慢性炎症性疾患であり、関節破壊が臨床で大きな問題となっている。既存の薬剤では関節破壊抑制効果はほとんど認められず、最近ではさまざまな抗RA剤、免疫抑制剤、NSIADなどの組み合わせにより、血清学的には炎症反応もある程度コントロールされるようになってきているが、このような状態でも全身のいくつかの関節は関節腫脹が持続し、経時的に関節破壊が進行する患者は決して少なくない。腫脹関節局所での骨・軟骨破壊進

^{*1)} Department of Orthopaedic Surgery, ^{*2)} Division of Gene Therapy Science, ^{*3)} Department of Geriatric Medicine, ^{*4)} Division of Computer Integrated Orthopaedic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine ^{*1)} 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科, ^{*2)} 同 遺伝子治療学, ^{*3)} 同 加齢医学, ^{*4)} 同 医学治療学

Offprint requests to: Tetsuya Tomita, Department of Orthopaedic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

図 1 NFκB の活性化機序
未刺激状態では NFκB は IκB と結合している。刺激を受けると IκB がリン酸化され、NFκB は核内へ移行し、結合部位に結合することにより活性化され、さまざまな因子の遺伝子発現を活性化する。

図 2 おとり型核酸医薬(デコイ)の作用機序
デコイはその特定の結合部位に競合的に結合し、転写調節因子の結合阻害によるプロモーター活性の低下を生じさせる。

図 3 HVJ-リポソーム法

行の抑制が可能な治療法の開発は必須と考えられる。

RA の特徴の一つは、関節局所における細胞浸潤と血管新生を伴う滑膜増殖である。RA の関節破壊機序は未だ完全には解明されていないが、増殖滑膜も重要な役割を果たしていると考えられている。関節局所では IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインや ICAM-1 などの接着因子, matrix metalloproteinase (MMP) などが過剰に産生され RA の骨・軟骨破壊に関与している。RA の治療としてこれら炎症性サイトカインや接着因子の抗体を用い病態を改善しようとする治療が注目を集めている。特に TNF α をターゲットとした抗体療法はヒトでもその有効性が示されている¹⁻⁵⁾。

また実験的関節炎モデルや臨床試験では IL-1 をターゲットとした IL-1 Ra による治療も関節破壊抑制に効果的であることが報告されている⁶⁻¹⁰⁾。しかしながらこれら抗体療法にも投与方法、効果持続、コストなどさまざまな問題点が残存しているのが現状である。

筆者らはこれらの因子の発現を制御している転

図 4 CIA ラット足関節腫脹の経時的変化
NF κ B デコイ投与後 2 週より足関節腫脹は改善した。

写制御因子 nuclear factor κ B (NF κ B) に着目した。NF κ B は免疫グロブリン k 鎖遺伝子が成熟 B 細胞特異的に発現するために必要なエンハンサー領域に結合する転写因子として同定された¹¹⁾。p 50 と p 65 のヘテロ二量体であることが明らかになっている。不活化の状態ではその抑制因子 I κ B と複合体を形成し、細胞質に存在するが、細

図 5 NF κ B デコイ足関節内投与後 7 週の X 線像
NF κ B デコイ投与(B)ではスクランブルデコイ投与(C)に比べ明らかに関節破壊が抑制されている。A は健康ラットの足関節 X 線像。

図 6 NF κ B デコイ足関節内投与後7週の組織像

NF κ B デコイ投与(C, D)では関節軟骨の菲薄化は認められるがほぼ全周にわたり関節軟骨は温存されている。スクランブルデコイ投与(E, F)では著しい関節破壊が認められる。A, B は健康ラットの足関節組織像。(A, C, E $\times$ 40 倍, B, D, F $\times$ 100 倍)

胞外からの活性化刺激(IL-1 β , TNF α , 紫外線照射など)により I κ B のリン酸化が起こり I κ B はプロテアソームにより分解される。I κ B が分解されることにより, NF κ B は核内へ移行しその標的遺伝子の発現を活性化する(図 1)^{12,13)}。

RA 増殖滑膜細胞での NF κ B の活性化が報告され, さまざまな炎症性サイトカインや接着因子の発現が亢進し病態形成や関節破壊における

NF κ B の重要性が示唆された^{14~16)}。そこで筆者らは転写因子レベルでの制御を目的としておとり(デコイ)型核酸医薬による治療法を考案した¹⁷⁾。これは特定の転写調節因子の結合部位の結合を阻害し, 活性化される遺伝子群の発現抑制あるいは発現増強を行うものである。そのため転写調節因子の結合部位を含む短いオリゴヌクレオチドを合成し, 二重鎖核酸にしたあと細胞内に導入する。

図 7 関節滑膜中の IL-1, TNF α 濃度

Day 21(デコイ投与後1週), Day 63(デコイ投与後7週)とも関節滑膜中の TNF α , IL-1 β 濃度は NF κ B デコイ投与群で有意に抑制されていた. *, **, #, ## $p < 0.01$ vs scrambled decoy

そのメカニズムは明らかであり、転写調節因子の結合部位への競合的結合阻害によるプロモーター活性の低下である(図2)^{18,19)}。

核酸医薬の関節内導入法の開発

核酸医薬とは、核酸合成機で作成される短い核酸を用いた人工化合物の総称であり、アンチセンスオリゴや上述のデコイなどが特定の遺伝子発現抑制方法として注目されている。しかしこれら核酸医薬は生体内では非常に不安定であり、罹患関節において核酸医薬を用いて特定遺伝子発現抑制を行う場合、その効果を期待するにはまず安全で効率のよい導入法の確立が必須である。

大阪大学では生体組織における遺伝子導入にすぐれた方法として細胞融合に基づく遺伝子導入法の研究から HVJ(hemmagglutinating virus of Japan: Sendai virus)リポゾーム法の開発が行われてきた^{20,21)}。HVJ-リポゾーム法は遺伝子を核蛋白と結合後、脂質の膜に包み込み、DNA-脂質複合体を形成したあと、不活化した HVJ を加え HVJ の膜融合能を利用し、遺伝子を直接細胞質へ導入

する方法である(図3)。HVJ の細胞表面レセプターはシアル酸のついた糖脂質、糖蛋白質であり、リンパ球以外のほとんどの細胞に融合し遺伝子の導入が可能である。筆者らは HVJ-リポゾーム法を用い、関節内への直接投与によりこれまでに、関節軟骨、滑膜、靱帯への遺伝子導入に成功している²²⁾。

また HVJ-リポゾームによる関節内での明らかな炎症反応、組織傷害や免疫反応は認められず、他の臓器での検討でも現在までのところ細胞毒性や中和抗体に関しては他の導入法に比べきわめて少ないと考えられている²³⁾。本法は核酸医薬の *in vivo* への導入でもきわめてすぐれている^{24~27)}。実際に FITC ラベルしたオリゴヌクレオチドを関節炎モデルラットの関節内へ導入してみると、増殖滑膜細胞の核内にオリゴヌクレオチドが移行し、経時的にその発現は減少するものの導入後28日までは関節滑膜内に存在が認められた²⁸⁾。オリゴヌクレオチドを HVJ-リポゾーム法を用いずに単独で関節内投与しても発現レベルは有意に低く、また核内移行も少数しか認められず、ほぼ24

図 8 ヒト RA 滑膜組織に対する NFκB デコイの影響

(A)IL-1β, (B)TNFα, (C)IL-6, (D)MMP-1, (E)ICAM-1. *, **, ***p<0.01 vs scrambled decoy, #, ##p<0.05 vs scrambled decoy

時間以内に大半が分解された。また効果に関しても HVJ-リポゾーム法を応用することにより、より少量の核酸医薬で同等の遺伝子発現抑制効果が得られしかもより長期にわたり効果を期待することができた^{29,30)}。

転写因子制御による関節破壊抑制効果

ラットコラーゲン関節炎(CIA)モデルを用いて NFκB デコイによる治療効果を検討してみた²⁸⁾。CIA 関節滑膜における転写因子 NFκB の活性化について検討したところ、ヒト RA 滑膜細胞と同様に CIA 関節滑膜でも NFκB の活性化は亢進していた。初回感作後 2 週で、肉眼的に明らかに関節炎を発症した足関節を対象として

NFκB デコイを HVJ-リポゾーム法を用い直接関節内投与した。コントロールとしてスクランブルデコイを同様の方法で関節内投与した。関節腫脹は投与後 2 週より NFκB デコイ投与群でスクランブルデコイ投与群や未治療群に比べ有意に改善した(図 4)。投与後 7 週での検討では X 線学的には NFκB デコイ投与群では健常ラット足関節に比べ関節裂隙の多少の狭小化は認められるが、明らかな骨破壊は認められなかった。これに対しスクランブルデコイ投与群では足関節の破壊は明らかであった(図 5)。

同時に行った組織学的検討では NFκB デコイ投与群では健常ラットに比べ関節裂隙の狭小化、関節軟骨の菲薄化を認めたが関節軟骨はほぼ全周

にわたり温存されており、滑膜増殖はほとんど認められなかった。スクランブルデコイ投与群では未治療群と同様であり、関節軟骨は完全に破壊され軟骨下骨の破壊、パンスの形成は著明であった(図6)。

これらの結果はNF κ Bデコイ投与により明らかに関節破壊が抑制されたことを示している。その機序を検討する目的で、デコイ投与後1週および7週での関節滑膜中のIL-1, TNF α 濃度を測定した。どちらの時期においても関節滑膜中のIL-1, TNF α 濃度はNF κ Bデコイ投与群でスクランブルデコイ投与群、未治療群に比べ明らかに抑制されていた(図7)。すなわちNF κ Bデコイ投与によりNF κ Bの活性化が阻害され、その下流にあるIL-1, TNF α の遺伝子発現が抑制されたと考えられる。

ついでヒトRA滑膜組織や滑膜細胞を用いてNF κ Bデコイの効果について検討した³¹⁾。滑膜組織器官培養系で、NF κ Bデコイを滑膜組織に導入し、滑膜組織からのIL-1, TNF α , IL-6, MMP-1の産生を測定した(図8)。これらの産生はNF κ Bデコイ導入群でスクランブルデコイ導入群、未治療群に比べ有意に抑制された。

血管新生などに重要な役割を果たすと考えられている接着分子であるICAM-1の滑膜組織中での発現についても検討したが、その発現もNF κ Bデコイ導入により明らかに抑制された。これらの抑制効果は特にIL-1, TNF α で顕著であった。IL-1, TNF α がNF κ Bデコイによりその発現がほとんど抑制されるのに対し、IL-6, MMP-1では発現抑制は約60%程度であった。これはIL-6, MMP-1発現にAP-1やNF-IL-6など他の転写調節因子の関与が存在するためと考えられた。培養滑膜細胞に対してはNF κ Bデコイ導入による細胞増殖抑制効果も示されている。これは炎症性サイトカインの発現低下に伴う二次的な効果と考えられた。

おわりに

これまでの結果はNF κ BデコイによるRA関節破壊抑制の可能性を大いに示唆するものと考え

られた。今回は単回投与によりかなりの効果が得られたが、RAは慢性疾患であり実際の臨床応用では繰り返し投与が必要になる可能性があり、投与方法、投与間隔などについての詳細な検討が必要と考えられる。筆者らはすでに臨床応用に向けて大型動物による検討を開始している。筆者らは滑膜増殖の観点からは細胞周期調節因子であるE2Fに対するデコイによりヒトRA滑膜増殖を抑制できることも報告しており³²⁾、RAの病態形成において重要な役割を果たしていると考えられている転写因子AP-1に対するデコイの有用性も実験動物モデルで報告されている³³⁾。

現段階ではヒトに臨床応用するためにはまだまだ基礎的研究は必至であるが、転写調節因子レベルでの制御によりRAの関節破壊を抑制できる可能性が示唆されており、今後他の転写調節因子を含めたRAの関節破壊機序の解明とその制御を目的とした核酸医薬療法の治療への応用が期待される。

文 献

- 1) Bathon J, Martin RW, Fleishman RM et al.: A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343(22): 1586-1593, 2000.
- 2) Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M et al.: Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum* 36: 1681-1690, 1993.
- 3) Piguat PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gentz R, Lesslauer W: Evolution of collagen-induced arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumor necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* 77: 510-514, 1992.
- 4) Williams RO, Feldmann M, Maini RN: Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9784-9788, 1992.
- 5) Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, Gillis S: Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 151: 6602-6607, 1993.
- 6) Hung GL, Galea-Lauri J, Mueller GM et al.: Suppression of intra-articular response to interleukin-1 by transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene to synovium. *Gene Ther* 1: 64-69, 1994.
- 7) Otani K, Nita I, Macaulay W et al.: Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by *ex vivo* gene

- therapy. *J Immunol* 156 : 3558-3562, 1996.
- 8) Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN et al. : Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 402-406, 1996.
 - 9) Drevlow B, Capezio J, Lovis R et al. : Phase I study of recombinant human interleukin-1 receptor (RHU IL-1 R) administered intra-articularly in active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 36(suppl.) : S 39, 1993.
 - 10) Bresnihan B, Lookabaugh J, Wilt K et al. : Treatment with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1 ra) in rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Rheum* 36(suppl.) : S 73, 1993.
 - 11) Sen R, Baltimore D : Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 26 : 47(6) : 921-928, 1986.
 - 12) Collart MA, Baeuerle PA, Vassalli P : Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages : involvement of four kB-like motifs and constitutive and inducible form of NF κ B. *Mol Cell Biol* 10 : 1498-1506, 1990.
 - 13) Ghosh S, May MJ, Koppe EB : NF-kappa B and Rel proteins : evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16 : 225-260, 1998.
 - 14) Fujisawa K, Aono H, Hasunuma T et al. : Activation of transcriptional factor NF κ B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum* 39 : 197-203, 1996.
 - 15) Handel ML, McMorro LB, Gravallese EM : Nuclear factor- κ B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum* 38 : 1762-1770, 1995.
 - 16) Marok R, Winyard PG, Coumbe A et al. : Activation of the transcription factor nuclear factor- κ B in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum* 39 : 583-591, 1996.
 - 17) Morishita R, Sugimoto T, Aoki M et al. : In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor κ B binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 3 : 894-899, 1997.
 - 18) Tomita N, Morishita R, Higaki J et al. : A novel strategy for gene therapy and gene regulation analysis using transcriptional factor decoy oligonucleotides. *Exp Nephrol* 15 : 429-434, 1997.
 - 19) Tomita N, Morishita R, Kaneda Y et al. : Gene therapy as a potential treatment for restenosis and myocardial infarction. *Drug News Perspect* 13 : 206-212, 2000.
 - 20) Kaneda Y, Iwai K, Uchida T : Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* 20 : 243(4889) : 375-378, 1989.
 - 21) Kaneda Y, Iwai K, Uchida T : Introduction and expression of human insulin gene in adult rat liver. *J Biol Chem* 264 : 12126-12129, 1989.
 - 22) Tomita T, Hashimoto H, Tomita N et al. : In vivo direct gene transfer into articular cartilage by intraarticular injection mediated by HVJ(Sendai virus) and liposomes. *Arthritis Rheum* 40 : 901-906, 1997.
 - 23) Dzau VJ, Mann MJ, Morishita R et al. : Fusogenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 11421-11425, 1996.
 - 24) Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M et al. : A novel molecular strategy using cis element "decoy" of E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 5855-5859, 1995.
 - 25) Morishita R, Higaki J, Tomita N et al. : Role of transcriptional cis-elements, angiotensinogen gene-activating elements, of angiotensinogen gene in blood pressure regulation. *Hypertension* 27 : 502-507, 1996.
 - 26) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE et al. : Single intraluminal delivery of antisense cdc 2 kinase and PCNA oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 8474-8479, 1993.
 - 27) Tomita N, Morishita R, Higaki J et al. : Transient decrease in high blood pressure by in vivo transfer of antisense oligodeoxynucleotides against rat angiotensinogen. *Hypertension* 26 : 131-136, 1995.
 - 28) Tomita T, Takeuchi E, Tomita N et al. : In vivo transfection of NF κ B decoy oligodeoxynucleotides suppressed the severity of collagen-induced arthritis as a gene therapy. *Arthritis Rheum* 42 : 2532-2542, 1999.
 - 29) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE et al. : Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides. *J Clin Invest* 93 : 1458-1464, 1994.
 - 30) Morishita R, Gibbons GH, Kaneda Y et al. : Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides (cyclin B1 and cdk 2 kinase) in the vessel wall : Enhanced therapeutic utility for restenosis by HVJ-liposome method. *Gene* 149 : 13-19, 1994.
 - 31) Tomita T, Takano H, Tomita N et al. : Transcription factor decoy for NF κ B inhibits cytokine and adhesion molecule expression in synovial cells derived from rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39 : 749-757, 2000.
 - 32) Tomita T, Takano H, Tomita N et al. : Oligonucleotide decoy for transcriptional factor E2F inhibits RA synovial cell proliferation in vitro. *Arthritis Rheum* 42(suppl.) : S 107, 1999.
 - 33) Shiozawa S, Shimizu K, Tanaka K et al. : Studies on the contribution of c-fos/AP-1 to arthritic joint destruction. *J Clin Invest* 99 : 1210-1216, 1997.