

特集

心血管リモデリングにおける
転写因子の役割とその制御

鈴木 淳一*, 磯部 光章*

はじめに

心臓病変に対する新しい治療法を開発する際に、炎症の側面を無視することはできない。Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) は種々の炎症刺激により活性化されて核内に移行する転写因子で、種々のサイトカイン、ケモカイン、成長因子、接着分子などの炎症関連遺伝子群の発現を誘導する。したがって、炎症に関連する様々な疾患の進展に NF- κ B は重要な役割を演じており、この制御が新しい治療となることが期待されている¹⁾。我々は、虚血再灌流傷害、心筋炎、移植後拒絶心などにおける炎症反応を活性化する転写因子である NF- κ B に注目した。NF- κ B はサイトカインや細胞接着分子など広く炎症因子を活性化するため、炎症が関与する心疾患の病勢進展に重要な役割を演じている事が知られている。この炎症反応の抑制のため、我々は遺伝子導入等の手法を用いて NF- κ B を制御する新しい治療法の開発を試みてきた。

デコイは、特定の転写調節因子の結合部位への結合を阻害し、プロモーター活性を低下させて、活性化される遺伝子群の抑制を行うものである。NF- κ B デコイは、NF- κ B と特異的に結合する配列を含む短い二本鎖人工 DNA であり、NF- κ B によって活性化される種々の因子を特異的に阻害する。したがって、このデコイの細胞内への導入による治療は、多面的な抗炎症効果を発揮しつつ、ステロイドに比して副作用が少ないことが期待されている(図1)²⁾。

本稿では、心血管リモデリングにおける転写因子の役割とその制御について、特に NF- κ B デコイ

の循環器疾患に対する有用性を概観し、合わせて最近の我々の知見を述べて今後の展望としたい。

心筋虚血における効果

心筋虚血に関連した実験からは多くの成果が報告されている³⁾。大阪大学の森下らが心筋梗塞モデルを用いて NF- κ B デコイの有用性を報告した⁴⁾の に続き、澤らは心筋の虚血再灌流傷害が NF- κ B デコイにより抑制されることを明らかにした⁵⁾。これらの作用機序は、サイトカインや接着分子の発現抑制により、炎症細胞浸潤が減少したためである。これらの結果を基礎にブタを用いた前臨床実験がドイツで実施され、良好な成績が報告されている⁶⁾。また、心筋保護にも有用であることが解明された⁷⁾。ラット摘出心を Euro-Collins 液に 16 時間 4°C で保存した後に同種レシピエントに心臓移植した。スクランブルデコイを導入した心臓に比して NF- κ B

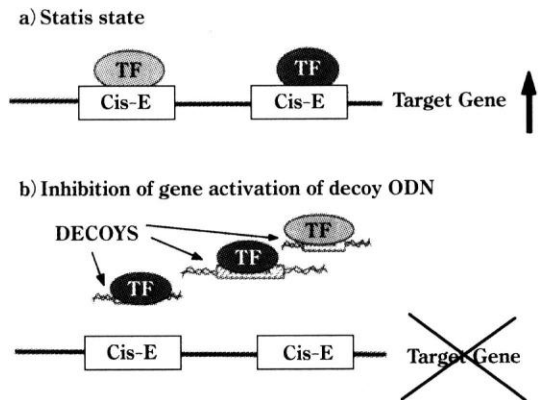


図1

NF- κ B デコイは、NF- κ B と特異的に結合する配列を含む短い二本鎖人工 DNA であり、結合部位への結合を阻害し、プロモーター活性を低下させて、活性化される遺伝子群の抑制を行う²⁾。

*東京医科歯科大学循環制御内科学

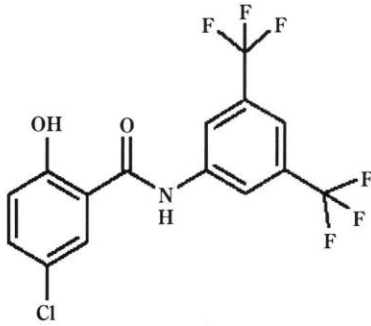


図2 I-κB 阻害剤 (IMD-0354) の構造式⁸⁾

デコイを導入したものは、心拍動の改善、心筋逸脱酵素や浸潤細胞数の減少が認められた。我々は、ラット虚血再灌流傷害モデルを作成して IκB 阻害剤 (IMD-0354 : 図2) の有効性を検討した。まず、心臓超音波にて心機能を確認したところ、無治療群では Fractional Shortening (FS) が 25% まで低下するのに対し、IκB 阻害剤投与群では 45% まで回復していた(図3)。また、病理学的には、接着分子である ICAM-1 の発現を抑制する事により、その傷害程度を有意に軽減した(図4)⁸⁾。

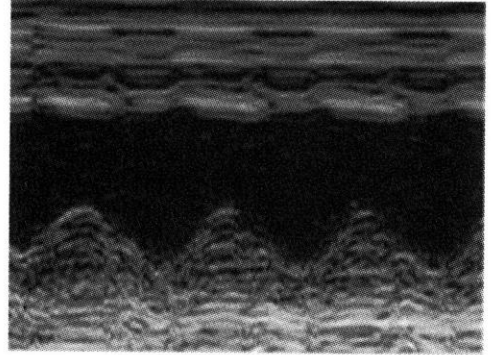
心筋炎における効果

心筋炎においては、その病勢と NF-κB の活性化は緊密に結びついている事が知られている⁹⁾。心筋炎における NF-κB の役割を明らかにするために、我々はラットにミオシンを感作させて自己免疫性心筋炎モデルを作成した。その病態は、NF-κB を介する激しい炎症反応の結果、心筋傷害を来たすものであった。この心筋炎ラットに NF-κB デコイを投与すると、心/体重比が無治療群に比して抑制され(図5)、病理学的な細胞浸潤範囲も縮小した(図6)。また、NF-κB デコイは、ICAM-1 などの接着分子や TNF や IL-2 などの炎症性サイトカインを広く制御して心筋傷害を抑制していることが免疫プロットや免疫染色にて証明された(図7, 8)¹⁰⁾。また、カテキン投与にて NF-κB 制御によりサイトカイン発現を変化させて心筋炎の進展が抑制された¹¹⁾。

心移植後拒絶における効果

心移植後拒絶においても、その病勢と NF-κB の活性化は緊密に結びついていることが知られている¹²⁾。移植後拒絶心における NF-κB の役割を明ら

A. vehicle



B. IMD10

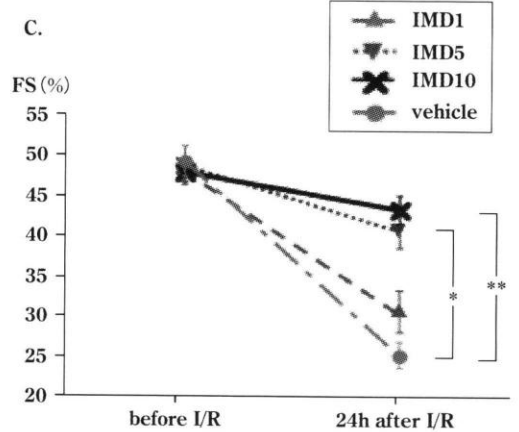
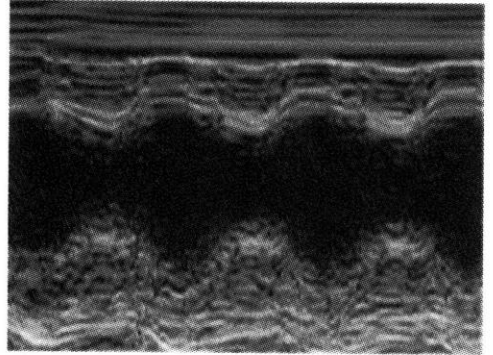


図3 ラット虚血再灌流傷害モデルにおける心臓超音波所見

無治療群(A)では Fractional Shortening (FS) が 25% まで低下するのに対し、IκB 阻害剤投与群(B)では 45% まで回復していた。この改善は、容量依存的に認められた(C)⁸⁾。

かにするために、マウス異所性心臓移植モデルを作製した。その病態は、抗原提示によりサイトカインなどの炎症性物質が活性化し、心筋破壊と線

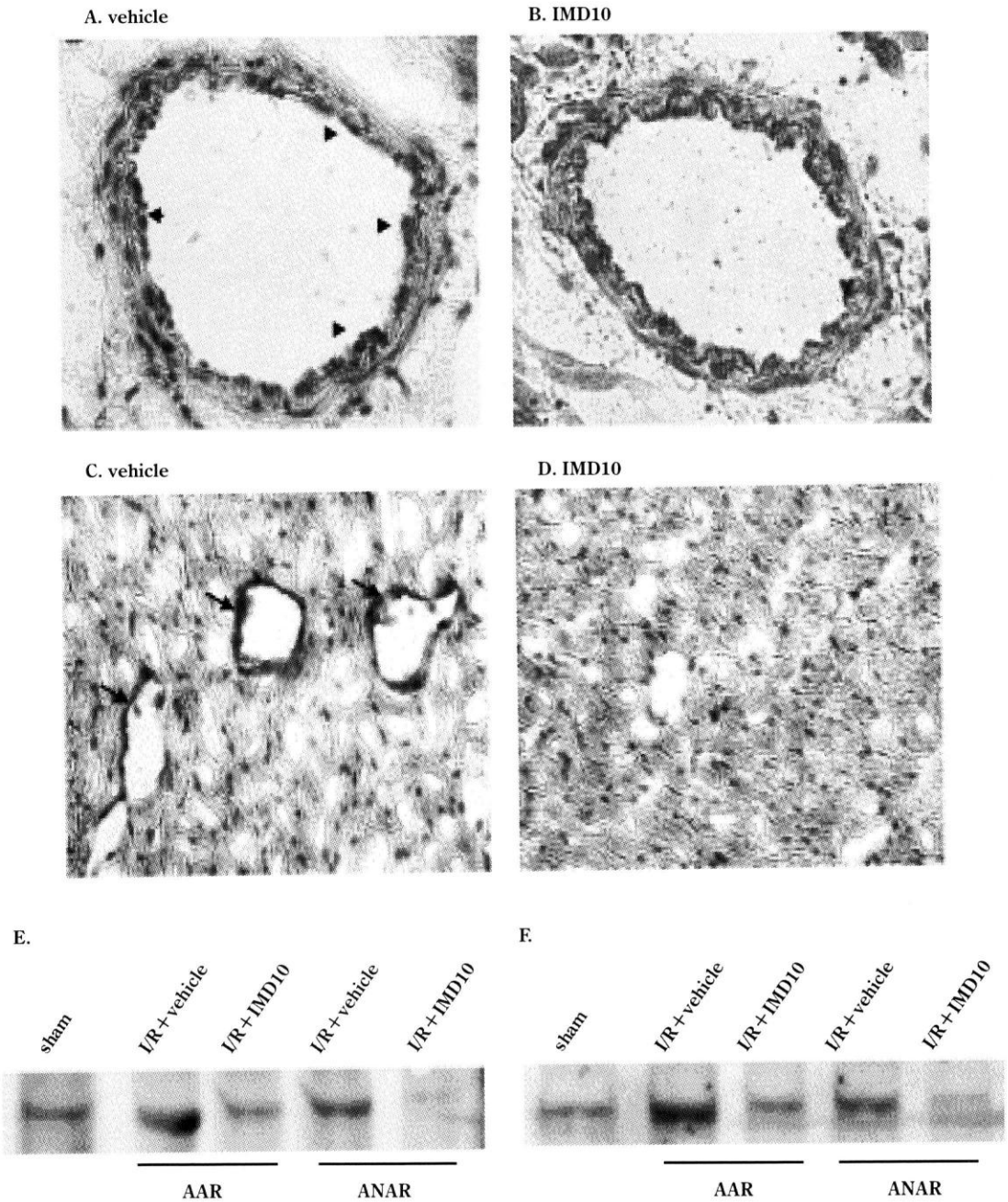


図4 ラット虚血再灌流傷害モデルにおける免疫染色所見
 接着分子である ICAM-1 の発現を抑制する事により，その傷害程度を有意に軽減した⁸⁾。

維化が進行しているものであった。移植心に *ex vivo* で NF- κ B デコイを導入したところ，細胞浸潤の減少とサイトカインや接着分子の発現低下がみられ(図9)，その結果生着が延長した¹³⁾。また，緑茶カテキン投与によっても NF- κ B が抑制され，移植心の心筋リモデリングが抑制された(図10)¹⁴⁾。

血管病変における効果

血管病変においても，虚血性心疾患の治療に心臓血管内皮傷害による内膜肥厚の進展が抑制されたり¹⁵⁾，静脈グラフト¹⁶⁾の内膜肥厚の進展が抑制されたなどの成果が報告されている。これらにお

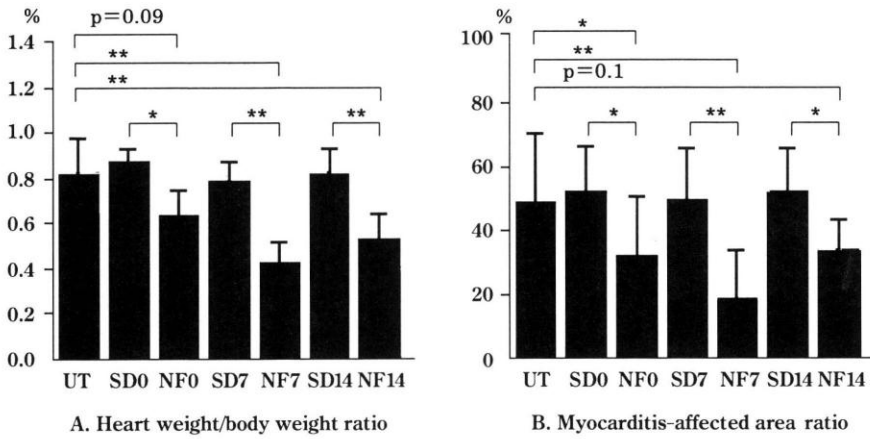


図5 ラット心筋炎における心/体重比(A)と病理学的心筋炎波及率(B)

NF-κB デコイを投与すると、心/体重比が無治療群に比して抑制され(A)、病理学的な細胞浸潤範囲も縮小した(B)。SD: スクランプルデコイ, NF: NF-κB デコイ¹⁰⁾

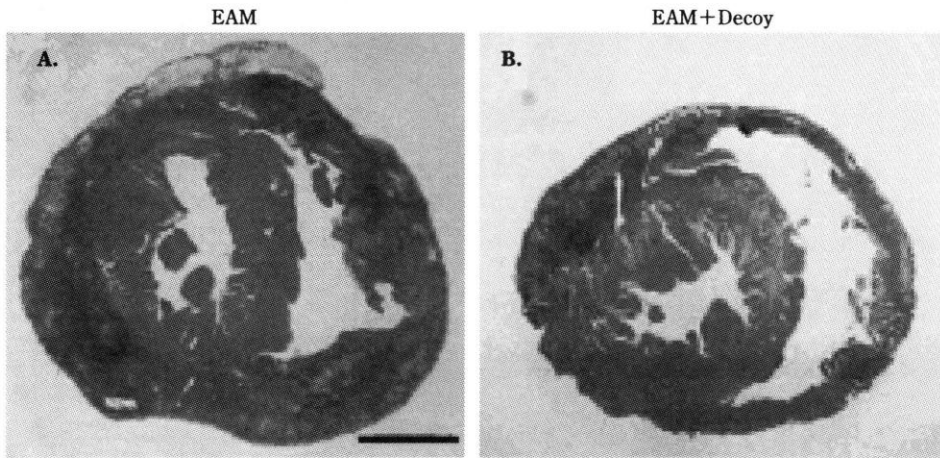


図6 ラット自己免疫性心筋炎における HE 染色

NF-κB デコイの投与により傷害されている範囲が抑制されている。A: 自己免疫性心筋炎ラット, B: 自己免疫性心筋炎ラット+NF-κB デコイ治療¹⁰⁾

いては ICAM-1 や VCAM-1 などの接着分子の発現が NF-κB デコイにより抑制されており、その結果として細胞浸潤や増殖が抑制されたと考えられている。我々は、NF-κB デコイをウイルスベクターを用いずに対象となる血管に導入するために、超音波遺伝子導入法を採用しており、良好な内膜肥厚予防効果を得ている¹⁷⁾。本研究においては、ラット大腿動脈をワイヤーにて障害するモデルを採用した。このモデルでは、無治療にて障害後に著明な内膜肥厚を形成する。我々はまず、超音波導入法による導入効率を FITC ラベルしたデコイを用いて確認した。FITC ラベルしたデコイをマイクロバブルと混和して血管外より浸透させ、超音波

を該当部位にのみ照射した。その結果、著しい FITC の導入が確認され、その導入細胞数はコントロールと比し著しく増加していた。また、超音波照射部位以外には、FITC デコイの導入は確認されなかった。この結果を基礎に、NF-κB デコイを障害血管に超音波-マイクロバブル法を用いて導入したところ、ICAM-1 などの接着分子などの発現を抑制して、内膜肥厚の進展が著しく抑制された。この結果から、ウイルスベクターを用いることなく対象血管にデコイを導入することができることが確認され、近い将来、臨床に応用されることが期待されている。

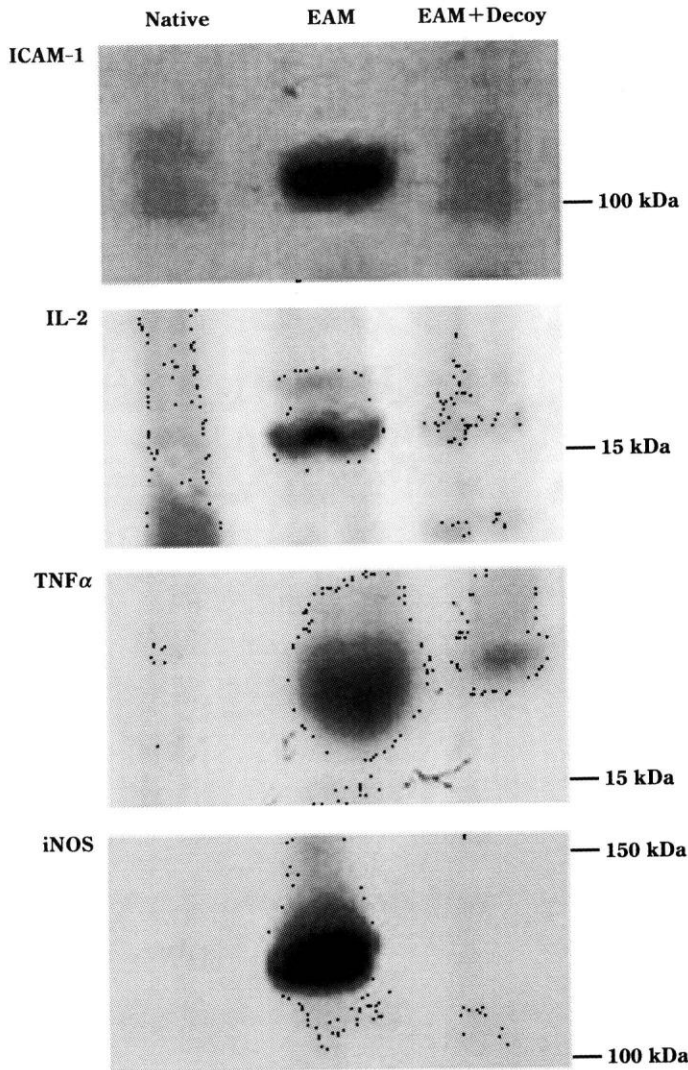


図7 ラット自己免疫性心筋炎におけるイムノブロット

IL-2, TNF α 等のサイトカイン, ICAM-1などの接着分子, iNOSなど様々な炎症性要因がNF- κ B デコイの投与により制御されている。

A: 正常ラット, B: 自己免疫性心筋炎ラット, C: 自己免疫性心筋炎ラット+NF- κ B デコイ治療¹⁰⁾

冠動脈再狭窄予防に対する臨床応用

臨床における冠動脈形成術後の再狭窄は、その長期予後を左右する重大な要素であるが、未だにその予防法は解明されていない。ステントを用いた形成術では、バルーンによる形成術後より再狭窄の割合は少なくなっているが、完全には抑制できていない。この再狭窄は血管の物理的傷害に対して惹起された炎症であり、その進展にNF- κ B が重要な役割を演じている。我々は、大阪大学

での基礎実験の結果を基に、冠動脈ステント植え込み部にNF- κ B デコイを導入する臨床応用の検討を実施した。2002年12月に初めて東京医科歯科大学循環器内科で実施されて以来、2006年4月までに合計18症例に実施され、導入時点での問題点は無かったことが報告されている。最初の数例については良い結果が報告されており¹⁸⁾、全体の長期効果についても今後検討され、逐次報告されていく予定である。

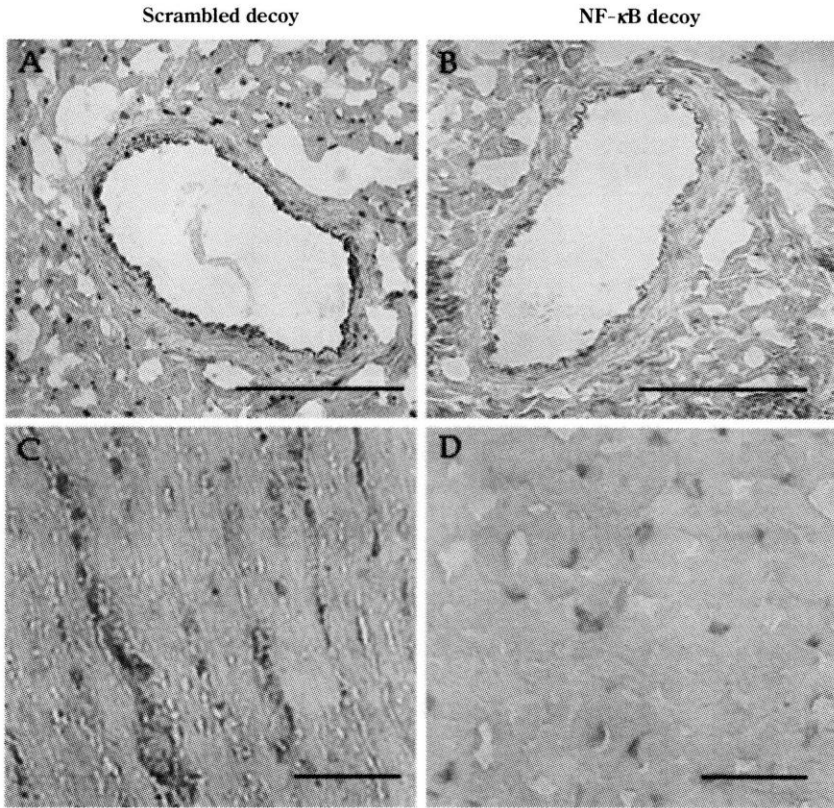


図8 ラット自己免疫性心筋炎における ICAM-1 の免疫染色

無治療群では、血管内皮(A)や浸潤細胞(C)に発現しているのに対し、NF-κB デコイ治療ではいずれも抑制されている(B, D)¹⁰⁾

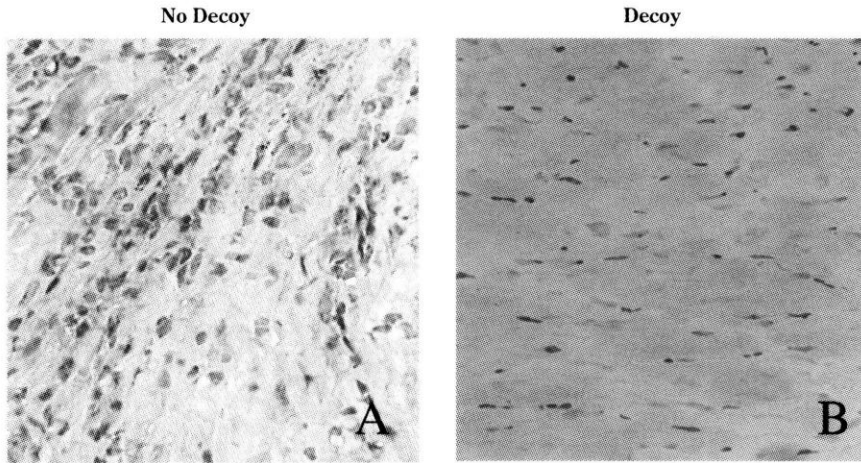


図9 移植抗原完全不適合の組み合わせで移植された心臓(移植後7日)における主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex: MHC) class I の免疫染色

無治療では抗原提示に重要な役割を演じている MHC class I の発現が増強している(A)のに対し、NF-κB デコイ(B)では発現が抑制されている¹³⁾。

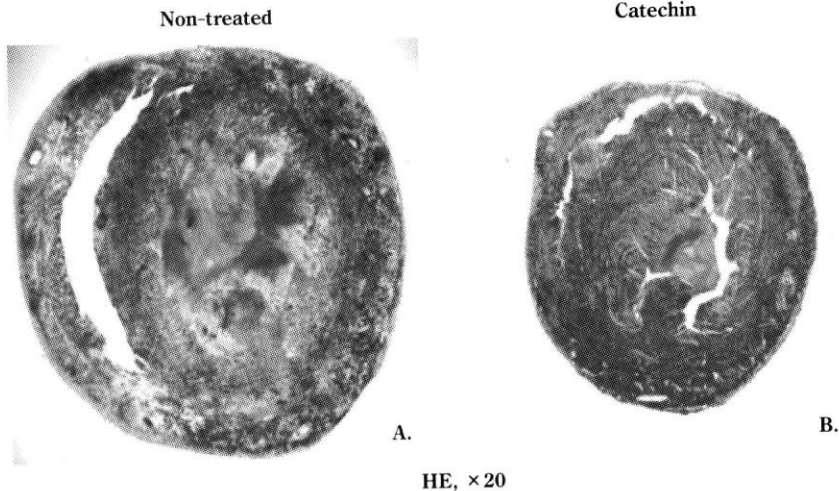


図10 移植抗原完全不適合の組み合わせで移植された心臓における HE 染色
無治療では著しい細胞浸潤(A)が認められるのに対し、NF- κ B デコイ(B)では抑制されている¹⁴⁾。

結 語

これらの結果より、多くの患者の QOL を低下させている炎症性心疾患の特異的な治療法の開発が期待される。また、デコイ遺伝子導入は対象遺伝子と対象臓器を局限して実施されうするため、非特異的な反応や全身投与による身体への副作用が無く、患者の負担を最小限にしながら治療効果が期待される点も特色である。さらに、すでに本結果の一部は国内において心血管病に対して臨床応用されており、本研究の結果が近い将来臨床に応用されることが期待されている。

文 献

- 1) Jones WK, Brown M, Ren X, et al: NF-kappaB as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling? *Cardiovasc Toxicol* 2003; 3: 229-54.
- 2) Morishita R, Higaki J, Tomita N, et al: Application of transcription factor "decoy" strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82: 1023-8.
- 3) Morishita R, Aoki M, Kaneda Y: Decoy oligodeoxynucleotides as novel cardiovascular drugs for cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947: 294-301.
- 4) Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al: In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997; 3: 894-9.
- 5) Sawa Y, Morishita R, Suzuki K, et al: A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element 'decoy' against NFkappaB binding site: evidence for a role of NFkappaB in ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1997; 96: II-280-4.
- 6) Kupatt C, Wichels R, Deiss M, et al: Retroinfusion of NFkappa-B decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther* 2002; 9: 518-26.
- 7) Sakaguchi T, Sawa Y, Fukushima N, et al: A novel strategy of decoy transfection against nuclear factor-kappa B in myocardial preservation. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 624-9.
- 8) Onai Y, Suzuki J, Kakuta T, et al: Inhibition of I κ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 51-9.
- 9) Alter P, Rupp H, Maisch B: Activated nuclear transcription factor kappaB in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy-relation to inflammation and cardiac function. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 180-7.
- 10) Yokoseki O, Suzuki J, Kitabayashi H, et al: cis Element decoy against nuclear factor- κ B attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circ Res* 2001; 89: 899-906.
- 11) Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, et al: Tea catechins improve left ventricular dysfunction, suppress myocardial inflammation, fibrosis, and alter cytokine expression in rat autoimmune myocarditis. *Eur J Heart Failure* 2006. In press
- 12) Cooper M, Lindholm P, Pieper G, et al: Myocardial nuclear factor-kappaB activity and nitric oxide production in rejecting cardiac allografts. *Transplantation*

- 1998; 66: 838-44.
- 13) Suzuki J, Morishita R, Amano J, et al: Decoy against nuclear factor-kappa B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Gene Ther* 2000; 7: 1847-52.
 - 14) Suzuki J, Ogawa M, Sagesaka YM, et al: Tea catechins attenuate ventricular remodeling and graft arterial diseases in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 272-9.
 - 15) Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, et al: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor-kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther* 2001; 8: 1635-42.
 - 16) Shintani T, Sawa Y, Takahashi T, et al: Intraoperative transfection of vein grafts with the NFkappaB decoy in a canine aortocoronary bypass model: a strategy to attenuate intimal hyperplasia. *Ann Thorac Surg* 2002; 74: 1132-7.
 - 17) Inagaki H, Suzuki J, Ogawa M, et al: Ultrasound-microbubble-mediated NF- κ B decoy transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice. *J Vasc Res* 2006; 43: 12-8.
 - 18) Suzuki J, Ito H, Gotoh R, et al: Initial clinical cases of the use of a NF-kappaB decoy at the site of coronary stenting for the prevention of restenosis.