

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390344
 研究課題名（和文） siRNAを用いた新しい遺伝子治療戦略
 -炎症制御による血管内膜肥厚抑制効果-
 研究課題名（英文） New Gene Therapy - Controlled Release of siRNA as to Midkine Inhibits the Intimal Hyperplasia in Vein Grafts.
 研究代表者
 古森 公浩 (KOMORI KIMHIRO)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号:40225587

研究成果の概要：

Midkine (MK) はヘパリン結合性増殖因子であり、炎症に関与することが MK 欠損マウスでの研究で証明されている。本研究では、高脂血症ウサギモデルを用いて、ステント留置血管における MK 発現と新生内膜の関係について検討し、MK はステント留置後の新生内膜増殖において浸潤マクロファージを介して重要な役割を担っていることを明らかにした。今後は、MK を標的分子とした薬剤溶出ステントによるステント再狭窄予防への臨床応用が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：ステント、血管内膜肥厚、Midkine、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

高齢化や食生活の欧米化により動脈硬化に起因する閉塞性動脈硬化症 (ASO) 症例が増加している。手術手技、治療用カテーテル、人工血管材質そして薬剤の進歩により、PTCA や閉塞血管に対するバイパス術の早期治療成績は著しく向上したが、血管壁内膜肥厚に起因する術後の再狭窄は、遠隔成績向上の障害となっている。

下肢 ASO における侵襲治療としてはステントを用いた血管内治療とバイパス術が行われる。しかしながら、ステントの再狭窄、特に鼠径部以下の末梢動脈病変のステント治療後 20-30% の再狭窄がみられること、またバイパスグラフトとして自家静脈グラフトは第一選択であるが、約 20-30% が晩期閉塞がみられることは、解決すべき問題点である。即ち、この血管内膜肥厚の原因を明らかにし

その治療法を確立することは、臨床的に大変重要である。

我々はこれまで、ASO 臨床例に極めて良く関連するイヌ (J Vasc Surg, 1986) およびウサギ (Atherosclerosis, 1994) 異常血流モデルを開発し、以下の知見を得た。即ち、(1) 異常血流条件下では自家静脈グラフト内膜肥厚が著明に増強され、これに関連する血行力学的因子は壁面剪断応力 (wall shear stress) であること (J Vasc Surg, 1986)、(2) low shear stress 下では、prostacyclin (PGI₂)、NO の産生低下が認められ (Circ Res 1991, 1993, Surgery 1994, J Surg Res 1994, 1995)、内皮細胞機能低下と内膜肥厚との関連を報告してきた。

(3) さらに ecNOS 遺伝子導入により内膜肥厚抑制効果を報告した (J Vasc Surg, 1998, Surgery 2002)。また、傷害血管や自家静脈グラフトの内膜肥厚には平滑筋細胞の他、外膜の線維芽細胞増殖が関与する可能性を報告し (Atherosclerosis, 2001, Circulation 1997, J Thorac Cardiovasc Surg 1997)、内膜肥厚の病理学的発生機序として血管壁全層の過剰な傷害修復反応であり、それに low shear stress や高脂血症が増悪因子として働いている可能性を明らかにした。最近さらに我々は、血管内膜肥厚に対する MCP-1 をターゲットとした抗炎症療法 (Circulation, 2002) や AP-1 decoy による内膜肥厚抑制を報告した (Circulation, 2002)。

以上のように、血管内膜肥厚は多因子性の病態であり、血管壁構成細胞 (内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、血球) が様々な分子を介してクロストークしていると考えられているが、最近血管壁における炎症性変化が再狭窄や動脈硬化性病巣の進行に中心的な役割を果たしていることが明らかにされてきた。最近、我々は炎症細胞遊走能と平滑筋細胞遊走作用のあるミッドカイン (MK) に初めて注目し興味ある知見を得た。ウサギバルーン擦過モデル内膜肥厚ならびに自家静脈グラフト内膜肥厚に MK が発現し、それをアンチセンスならびに siRNA 投与による遺伝子治療において内膜肥厚抑制効果を明らかにした (Am J Physiol, 2005)。

しかしながら、これまでステントの再狭窄

に対する炎症制御による新しい遺伝子治療の探索研究はなされていないのが現状である。今回我々は、ステントの再狭窄とミッドカイン (MK) との関連に初めて注目した。MK は炎症細胞遊走能と平滑筋細胞遊走作用があることが知られているが遺伝子治療のターゲットとしての報告はほとんどない。また、その遺伝子治療戦略として血管病変にほとんど応用の報告がない。siRNA を用いる点も注目すべき特徴である。さらには自家静脈グラフト内膜肥厚抑制の新しい治療戦略として monocyte を誘導する走化因子として知られているケモカインである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) をターゲットとした siRNA の内膜肥厚抑制効果も併せて検討する。

2. 研究の目的

冠動脈疾患に対する血管内治療後の再狭窄は単純病変で 15~20%、複雑な病変で 30~60% と言われ、末梢動脈への stenting も同様の問題を抱えている。Drug eluting stent は劇的に再狭窄率を減少させたが、末梢動脈病変では依然問題として残り、さらに不十分な内皮化による血栓閉塞も新たな問題となっている。バルーン血管拡張術後の再狭窄とステント留置後の再狭窄では、血管平滑筋の遊走・増殖という点では同様であるが血管壁における炎症反応は大きく異なり、ステント留置後の血管障害は炎症反応が長期に持続しマクロファージの集積が著明に多いことが分かっている。また高脂血症では血中 LDL は増加し、酸化された LDL (oxLDL) は血管壁に浸潤したマクロファージの scavenger receptor に認識されて貪食され、泡沫細胞化し動脈硬化病変が進行する。

Midkine (MK) はヘパリン結合性増殖因子であり、炎症に関与することが MK 欠損マウスでの研究で証明されている。我々はこれまでに MK 欠損マウスの頸動脈擦過モデルにおいて、新生内膜形成が抑制され MK の全身投与によりその効果が減弱することを報告した。また、MK siRNA を局所投与することで静脈グラフトにおける新生内膜の抑制効果についても報告した。これらの報告では、MK は新生内膜において主に平滑筋細胞において発現

が見られ、そのピークはおおよそ術7日後であった。したがって MK は新しい血管再狭窄予防の標的分子として考えられるが、動脈硬化病変に対するステント留置後の再狭窄での関与については明らかにされていない。本研究では、高脂血症ウサギモデルを用いて、ステント留置血管における MK 発現と新生内膜の関係について検証した。

3. 研究の方法

(1) 動脈実験

日本白色種ウサギに 1% コレステロールを 4 週間投与し、高脂血症モデルを作成する。ステント留置後の早期血栓閉塞予防のため術前日からアスピリンを 20mg/day を Sacrifice まで投与した。全身麻酔下に右頸動脈を露出し全身ヘパリン化の後に直径 3mm 全長 30mm のバルーンステントを挿入し腸骨動脈にステントを留置した (Fig. 1A)。術後 1, 3, 7, 14, 28 日後に sacrifice しステント留置血管を採取して以下の実験を行った。

①ステント留置血管から蛋白を抽出しウエスタンブロッティング法にて各タイムポイントでの MK の発現量を比較検討した。

②同様に TotalRNA を抽出して、RT-PCR 法で各タイムポイントにおける MK mRNA の発現量を比較検討した。

③ステント留置血管をホルマリン固定し、elastic Van Gieson 染色を行い正常食と高脂血症モデルとで新生内膜を比較した。続いて、ステントを除去した血管を固定し、マクロファージ (RAM-11)、血管内皮細胞 (CD31)、平滑筋細胞 (α SMA) で免疫染色を行った。また MK の免疫染色には、ウサギ MK を認識する chicken 抗 human MK 抗体を使用した。さらに MK とマクロファージの蛍光二重染色で新生内膜での MK の分布を検討した。

(2) 細胞実験

① Human monocyte like cell である THP-1 を 100nM phorbol myristate acetate (PMA) で刺激しマクロファージへの分化モデルを作成する。Western blotting 法にて THP-1 からマクロファージへの分化前後における MK 蛋白発現を定量し比較検討した。

② 3% Thioglycollate をマウスの腹腔内に注入して刺激し 5 日後に腹腔洗浄して回収し

た細胞からマクロファージを分離培養し、low density lipoprotein (LDL)、酸化 LDL で泡沫細胞化させる。マクロファージが脂質を取り込んで泡沫化することによる MK 発現の変化を Western blotting 法で検討した。泡沫化の確認のため腹腔マクロファージは 0.5% Oil red O で脂肪染色を行った。

4. 研究成果

結果(1)

高コレステロール食によりステント留置後の新生内膜は有意に増加した (Fig1B)。MK の発現量は Western blotting 法、RT-PCR 法のいずれにおいても術 3 日後から増加し 7 日後にピークに達した。免疫組織学的検討では、新生内膜における MK の発現が確認された (Fig3A)。7、14、28 日後の標本での免疫染色 (血管内皮、平滑筋細胞、マクロファージ、MK) では新生内膜の上層に平滑筋細胞が、下層にマクロファージが分布し、MK の分布は血管内皮とマクロファージと一致していた (Fig3B)。また、MK とマクロファージに対する抗体での蛍光二重染色においてもマクロファージでの MK 発現が確認された (Fig3C)。

結果(2)

THP-1 によるマクロファージ分化モデル (Fig4A) では、THP-1 からマクロファージへの分化前後での MK 発現量に変化はなかった (Fig4B)。腹腔マクロファージは酸化 LDL を取り込み泡沫化したが (Fig5A)、この泡沫化によるマクロファージの MK 蛋白の発現量にも変化はなかった (Fig5B)。

考察

擦過モデルや静脈グラフトモデルでは、新生内膜での MK 発現は主に遊走した平滑筋細胞で認められた。今回、ステント留置後の新生内膜においても MK の関与は明らかにされたが、主に浸潤し泡沫化したマクロファージに発現していることが証明された。高脂血症下ではマクロファージが血管壁の炎症に強く関与し、そこでは MK の発現により平滑筋細胞遊走が誘導され新生内膜形成に関与していることが明らかとなった。THP-1 や腹腔マクロファージを使った実験でも MK の発現は確認されたがマクロファージ分化との関

連は確認できなかった。これらの細胞がすでに単球からある程度分化していることを考えると、血中を循環する単球細胞での検証により MK と分化との関連がより明らかになると思われる。血管再狭窄予防には種々の分子が標的とされ、これまでに PDGF、IL-10、TGF- β 、MCP-1、などの報告がある。MK SiRNA で内膜肥厚抑制効果が得られた静脈グラフトモデルのように、SiRNA でコーティングした薬剤溶出ステントへの応用によりステント再狭窄が可能となると予想される。今後は SiRNA を徐放可能とする薬剤溶出ステントの開発が期待される。

結論

MK はステント留置後の新生内膜増殖において浸潤マクロファージを介して重要な役割を担っていた。今後は MK による平滑筋細胞遊走増殖への分子機構を解明するとともに、MK を標的分子とした薬剤溶出ステントによるステント再狭窄予防への臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Narita H, Sen C, Komori K, Kadomatsu K. Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits: J Vasc Surg;47:1322-9, 2008 査読有
2. Inoguch H, Komori K, Maehara Y: Surgical Management of Abdominal Aortic Aneurysm Associated with Polycystic Kidney Disease: Report of Two Cases. Surgery Today;38:253-257, 2008 査読有
3. Fujita H, Banno H, Yamanouchi D, Kobayashi M, Yamamoto K, Komori K: Pitavastatin Inhibits Intimal Hyperplasia in Rabbit Vein Graft. J Surg Res , 148, 238-243, 2008 査読有
4. Nagata J, Kobayashi M, Nishikimi N, Komori K: Serum procalcitonin(PCT) is a reliable marker for ischemic complication of the intestine after open abdominal aortic surgery,

Eur J Vasc Endovasc Surg, 35, 694-697, 2008 査読有

5. Hattori K, Yamanouchi D, Banno H, Kobayashi M, Yamamoto K, Kajikuri J, Itoh T, Komori K : Celiprolol reduces the intimal thickening of autogenous vein grafts via an enhancement of nitric oxide function through an inhibition of superoxide production. J Vasc Surg ;46:116-23, 2007 査読有
6. Sugimoto M, Nakayama M, Goto M, Amano M, Komori K, Kaibuchi K: Rho-Kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. BIOCHEM BIOPH RES CO, 361:462-467, 2007 査読有
7. Kuma S, Oki E, Onohara T, Komori K, Maehara Y: Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells is associated with modulation of cell surface area and PDGF receptor expression. Clin Exp Pharmacol, 34, 153-160, 2007 査読有
8. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Murohara T: Safety and Efficacy of Autologous Progenitor Cell Transplantation for Therapeutic Angiogenesis in Patients with Critical Limb Ischemia. Circulation J , 71:196-201, 2007 査読有
9. Takeuchi K, Itoh H, Yonemitsu Y, Matsumoto T, Kume M, Komori K, Maehara Y: In Vivo Reduction of the Nuclear Factor- κ B Activity Using Synthetic cis-Element Decoy Oligonucleotides Suppresses Intimal Hyperplasia in the Injured Carotid Arteries in Rabbits. Surg Today, 37:575-583, 2007 査読有
10. Nukumizu Y, Matsushita M, Sakurai T, Kobayashi M, Nishikimi N, Komori K: Comparison of Doppler and Oscillometric Ankle Blood Pressure Measurement in Patients With Angiographically Documented Lower Extremity Arterial Occlusive Disease, Angiology 58:303-308, 2007 査読有

11. Izawa H, Kondo T, Usui A, Yamamoto K, Shintani S, Inden Y, Isobe S, Unno K, Kajiguchi M, Kato T, Noda A, Okumura K, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Ueda Y, Murohara T:
Clinical Protocol for Angiogenesis by Intramyocardial Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients With Severe Coronary Artery Disease --TACT-NAGOYA-HEART-.
Circulation J 70(9):1180-1183, 2006 査読有
12. Fujishiro K, Nishikimi N, Watanabe N, Sakurai T, Komori K, Ohta M:
The Retroperitoneum Protects Prosthetic Graft Material from Intraperitoneal contamination: An Experimental Study.
Eur J Vasc Endovasc Surg 31:280-283, 2006 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 古森公浩
末梢動脈閉鎖症の診断:治療の決めかた
第 25 回小倉ライブ 2008 年 6 月 1 日
リーガロイヤルホテル小倉
2. 古森公浩
閉塞性動脈硬化症の手術における pit fall と対策
第 7 回日本血管外科学会 2008 年 4 月 16 日
アルカディア市ヶ谷(東京)
3. 古森公浩
AAA に対する外科的手術-手技と成績-
第 1 回 Japan Endovascular Treatment Conference 2008 年 4 月 12 日
ヒルトン東京
4. 古森公浩
末梢動脈疾患 (PAD) に対する治療戦略
第 7 回日本再生医療学会 2008 年 3 月 13 日
名古屋国際会議場
5. 古森公浩
末梢動脈疾患 (Peripheral Arterial disease:PAD) に対する血行再建術-血管内治療と外科的バイパス術
第 13 回バスキュラーアクセスインターベンション治療研究会 2008 年 3 月 1 日
津田ホール(東京)
6. 古森公浩
末梢動脈疾患 (Peripheral Arterial Disease:PAD) に対する血行再建術-血管内治療と外科的バイパス術- 第 48 回日本脈

管学会 2007 年 10 月 27 日 松本

[図書] (計 11 件)

1. 児玉章朗、古森公浩
南江堂 臨床雑誌「外科」 2009 年 96-101
2. 杉本昌之、古森公浩
南江堂 閉塞性動脈硬化症 (PAD) 診療の実践-間欠性跛行に対するアプローチ-
2009 年 22-24,
3. 児玉章朗、古森公浩
日本臨牀社 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 循環器症候群 (第 2 版) III-その他の循環疾患を含めて 2008 年 324-327
4. 児玉章朗、古森公浩
金原出版 手術-手術局所解剖アトラス-
2008 年 879-888
5. 杉本昌之、古森公浩
メディカルレビュー社 Angiology Frontier 2008 年 101-105
6. 古森公浩
メディカ出版 心臓血管外科テクニク II 大血管疾患編 2008 年 74-95
7. 古森公浩
南山堂 血管外科基本手技アトラス
2007 年 11-14, 99-108,
8. 上遠野由紀、藤田広峰、古森公浩
中外医学社 心臓血管外科テキスト 2007 年 439-444, 445-446
9. 古森公浩
中山書店
大動脈瘤・大動脈解離診断のコツと落とし穴 2006 年 94-95, 96-97
10. 古森公浩
メディカルレビュー社
NAVIGATOR 血栓症ナビゲーター 2006 年 196-197
11. 古森公浩
メディカルトリビューン
標準血管外科 2006 年 17-23, 41-46, 121-128

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古森 公浩 (KOMORI KIMIHIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40225587

(2) 研究分担者

門松 健治 (KADOMATSU KENJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80204519

室原 豊明 (MUROHARA TOYOAKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90299503

山本 清人 (YAMAMOTO KIYOHITO)

名古屋大学医学部附属病院・講師

研究者番号: 10298359

小林 昌義 (KOBAYASHI MASAYOSHI)

名古屋大学医学部附属病院・助教

研究者番号: 60329381