

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861223

研究課題名(和文) CREデコイODNによる血管内膜肥厚抑制効果の検討

研究課題名(英文) Development of the gene therapy with CRE decoy ODN to prevent vascular intimal hyperplasia

研究代表者

内田 大貴 (UCHIDA, DAIKI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80422038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管内膜肥厚(IH)に対する有効な予防、治療法は確立されていない。転写因子CREBの結合サイトのCRE活性を核酸医薬を用い制御することでIHを抑制する。CRE decoy ODNを設計し、血管平滑筋細胞に遺伝子導入すると、CRE活性、増殖能および遊走能を有意に抑制した。またCRE活性により誘導される遺伝子群の発現も有意に抑制した。マウスワイヤ障害モデル(C57BL/6J)を作成し、マイクロバブル超音波導入法を用いてCRE decoy ODNを血管壁に導入した。術後3週でのIH抑制効果につき現在評価中である。IH抑制療法として、CRE decoy ODNを使った分子治療法に期待が寄せられる。

研究成果の概要(英文)：Intimal hyperplasia (IH) is the main cause of vein graft stenosis or failure after bypass surgery. However, no therapeutic targets for the treatment of IH have been identified. Our recent research using human vein graft samples have been reported that inhibiting the CREB function is a key role to prevent vein graft IH. Therefore, We focused on decoy oligodeoxynucleotide(ODN) transfection as gene therapy strategy of IH. The goals of the present study are to investigate inhibiting effect on CREB function by CRE-decoy ODN and to prevent vascular IH. Transfer of the decoy ODN repressed CRE activity and decreased VSMCs proliferation, and migration significantly, the same as the treatment of DN of CREB. From now on, we will check the therapeutic efficacy of the decoy therapy in mouse model. Transfer of CRE decoy ODN may lead to new clinical approach to IH.

研究分野：血管外科

キーワード：内膜肥厚 遺伝子治療 decoy ODN

1. 研究開始当初の背景

(1) 下肢閉塞性動脈硬化症 (ASO) 治療の現状

ASOは心筋梗塞、脳卒中と同様に動脈硬化の一病態として現れ、その治療成績が他の血管病変の予後を左右する重要疾患である。重症病変に対しては動脈や静脈をグラフトとした血行再建が第一選択の治療であるが、バイパス術後2年程度で進行性内膜肥厚によるグラフト狭窄が約3割の患者に発生し再手術が必要となる。この自家血管グラフトの内膜肥厚の抑制は血管外科学の永年の研究テーマであるが、未だ有効な予防、治療方法は確立されていない。

(2) 内膜肥厚抑制へのこれまでの成果

内膜肥厚メカニズムは種々の要因から内皮傷害が発生し血管平滑筋細胞の活性化によって引き起こされる多段階メカニズムである (Dardik A. Circ J. 2010)。この中で治療ターゲットとして報告された分子は40以上にのぼるが治療に結びついたものはない。特に米国で行われた E2F デコイ ODN を用いた検討は、動物実験から第2相臨床試験までは有望であったが、第3相臨床試験では全く効果を認めず、多くの血管外科医を落胆させた (Conte M. J Vasc Surg. 2006)。

(3) 動物モデルではヒトの病態を的確に再現できないのではないかと考えた。そこで実際に当科で手術を受けた ASO 患者の狭窄静脈グラフトを解析することとした。回収した狭窄血管、正常血管、移植前血管をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、病的状況で特異的に発現する遺伝子を20分子抽出し、さらに増殖能、遊走能で機能的スクリーニングを行った結果、MAPKAPK3 と FHL5 という2つの遺伝子を同定した(図1)。これらの遺伝子をさらに解析した結果、以下の知見を得た (Nakanishi K, et al. J Vasc Surg. 2012, in press)。CREB のリン酸化サイトでのドミナントネガティブ(DN)では FHL5 の効果を抑制することができなかったが DNA 結合部位の DN

である KCREB は両遺伝子の効果を抑制し、CREB-CRE 複合体の形成を阻止した(図2)。また、マウス大腿動脈でワイヤ障害による内膜肥厚モデルを作成し、MAPKAPK3 と FHL5 の両者を抑制した DN、KCREB 発現遺伝子を導入すると、著明に内膜肥厚を抑制した(図3)。これらは独立した経路で CREB を活性化し、CRE 配列誘導遺伝子を発現することが重要な役割を果たしている(図1)。

図1 FHL5 と MPKAPK3 の機能とメカニズム

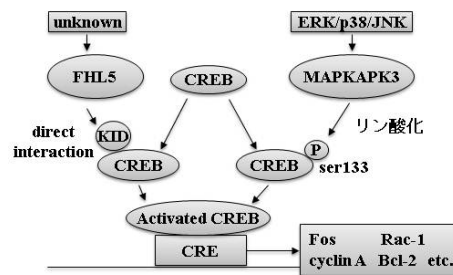


図2 ドミナントネガティブによる CRE 活性の抑制

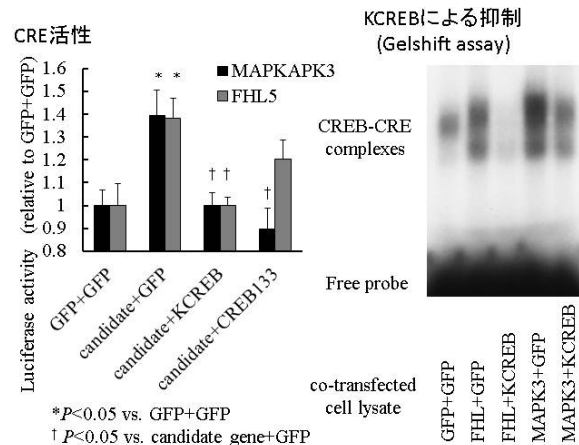
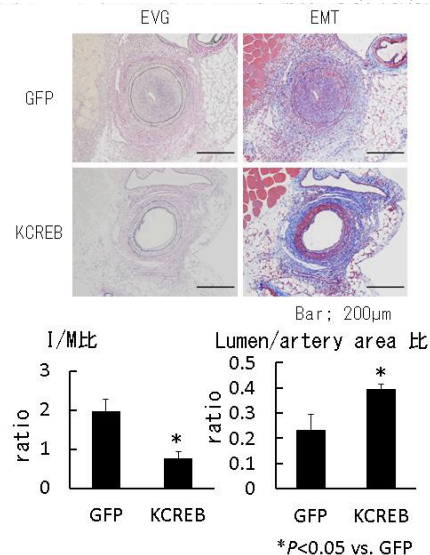


図3 マウスモデルでの内膜肥厚抑制効果



## 2. 研究の目的

(1) CRE 抑制による内膜肥厚抑制療法を臨床応用へ結びつけるため検討を行なっているが、現在の DN による治療法には問題点がある：タンパクを利用する場合、細胞核内へタンパクを届ける方法が困難である、効果持続が短い、DN 発現遺伝子を導入する場合、発現までのステップが多く非効率である、作用濃度を予測できない、また共通して DN そのものの安全性が不明である。以上の点を考慮し、DN とは作用点の違う方法を採用することとし、これまでに NF $\kappa$ B や E2F で実績のあるデコイ療法を検討することとした。

本研究では以下の点を明らかにする。

1. CRE デコイ ODN の細胞、生体内で安定的な分子構造を決定する。

2. 細胞レベルで CRE デコイの VSMC 抑制効果を明らかにする。

3. 動物モデルで CRE デコイの内膜肥厚抑制効果を明らかにする。本研究は臨床研究へ向けた前臨床橋渡し研究の一つと考えており、動物モデルでの効果に関する proof of concept の獲得を最終目標とする。

## 3. 研究の方法

(1) CRE デコイ ODN を設計合成

CRE デコイを設計、合成しさらに CREB との結合能力を検討し、最も治療用分子として優れているものを ELISA で決定する。

(2) 血管平滑筋細胞 (VSMC) への遺伝子導入増殖能 (MTS assay)、遊走能 (Boyden chamber 法)、CRE 活性 (レポーター遺伝子アッセイ) など基本的解析を行い、ドミナントネガティブと遜色のない効果があることを確認する。

(3) ワイヤ障害による内膜肥厚誘導マウスモデルを用い、デコイ導入による内膜肥厚抑制効果 (組織染色、遺伝子発現) を明らかにし、内膜肥厚抑制の治療用分子としての有効性を確認する。

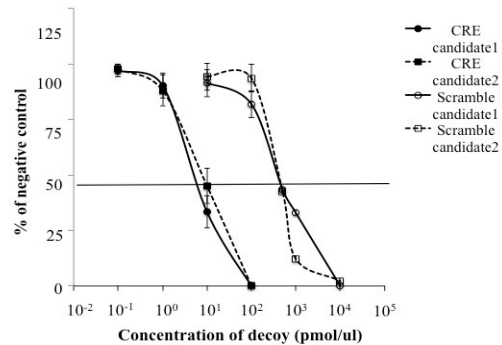
## 4. 研究成果

(1) デコイの CREB への結合能

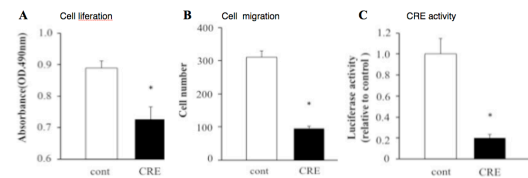
治療用候補デコイ 2 種、コントロール用デコ

イ 2 種を設計、合成し、最も結合能の高いデコイ (CRE candidate1) を ELISA で選定した (図 4)。

図 4 デコイの結合能



(2) 血管平滑筋細胞における CRE デコイの基本的解析

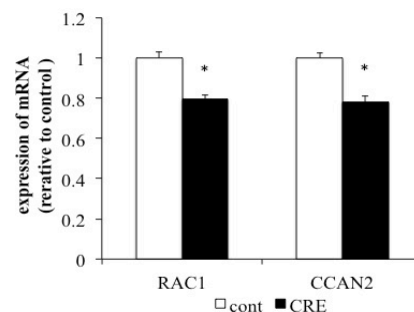


血管平滑筋細胞 (VSMC) に対し、デコイを遺伝子導入し、A；増殖能、B；遊走能、C；CRE 活性など基本的解析を行い、著明な抑制効果が確認できた (図 5)。

(3) CRE デコイによる下流遺伝子群の発現抑制効果

CRE 下流遺伝子群の mRNA 発現をリアルタイム PCR でみると RAC1 と CCAN2 で有意差を持って発現低下を認めた (図 6)。

図 6 CRE デコイによる下流遺伝子群の発現抑制効果



(4) マウスワイヤ障害モデルでの CRE デコイによる内膜肥厚抑制効果

現在、モデル作成、解析中である。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計4件）

① 内田大貴、Transfer of CRE-decoy ODN resulted in significantly downregulated CRE activity and inhibited VSMC proliferation and migration in vitro

、日本遺伝子治療学会、2015年7月、大阪

② 内田大貴、CRE decoy ODNによる血管内膜肥厚抑制効果の検討、56回日本脈管学会、2015年10月、東京

③ 内田大貴、CRE decoy oligonucleotide (ODN)による血管内膜肥厚抑制療法の開発、日本心臓血管外科学会、2016年2月、名古屋

④ 内田大貴、当科における血管内膜肥厚抑制分子の探索と応用、日本外科学会、2016年4月、大阪

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 大貴 (Uchida Daiki)

旭川医科大学・第一外科・助教

研究者番号：80422038

### (2) 研究分担者

齊藤 幸裕 (Saito Yukihiro)

旭川医科大学・第一外科・講師

研究者番号：80540583