

氏 名	なかの かく 中 野 覚
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 乙 第 1 5 7 号
学位授与の日付	平成 19 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 4 項該当
学 位 論 文 題 目	ステント内再狭窄における単球走化性因子(MCP-1)の役割 (主査)
審 査 委 員	教授 遠藤泰久 教授 竹谷 茂 教授 中島敏博

論文内容の要旨

本論文は、心臓血管などの拡張治療に広く用いられるステントにより引き起こされる血管再狭窄を防止する治療法として開発中の抗炎症因子遺伝子治療に関する細胞生物学的研究をまとめたものである。

経皮的冠動脈血行再建術は世界的にみると年間 200 万例以上の実績があり、その大部分はステント留置術である。通常のステント（ベアメタルステント）ではいったん拡張した血管内腔が再び狭くなり狭心症、急性心筋梗塞の再発を来す再狭窄が高率に生じることが知られている。ステントを用いて血管を拡張するという機械的傷害に加えて金属製のステントによる異物反応が血管壁に炎症細胞の浸潤を誘導し、その結果、炎症細胞から発現するサイトカインおよび増殖因子が血管平滑筋細胞の増殖および遊走を引き起こし再狭窄につながる。また、多くの臨床研究および動物実験の結果から炎症細胞の浸潤が再狭窄の中心的役割を果たすことがわかってきた。この再狭窄の問題は薬剤溶出型ステントの開発成功によりほぼ解決されたかに思われた。しかし、ステントにコーティングした薬剤はいずれも細胞周期に関わる因子をターゲットとしているため、血管平滑筋細胞だけでなく内皮細胞にも非特異的な抗増殖作用を有し、再内皮化の遅延、炎症、増殖およびフィブリン沈着の継続といった副作用、とくに晩期ステント内血栓症を生じることが報告されている。さらに、心筋梗塞あるいは死亡といった重要な評価項目（ハードエンドポイント）の発生率は薬剤溶出型ステントを留置された方が高いということが近年、明らかになった。さらに、薬物溶出ステントは小血管や分枝の場合には使用できない。それゆえ、第一世代の薬剤溶出型ステントに代わる新しい治療方法の開発が強く望まれている。

したがって、ステント内再狭窄に対する新しい治療方法を研究開発し、また同時にステント内再狭窄の発生機序を解明することは極めて重要である。単球走化性因子(MCP-1)の N 末側の欠損した遺伝子 (7ND) を骨格筋に遺伝子導入する抗 MCP-1 遺伝子療法が開発され、この治療方法により傷害後の動脈硬化が抑制されることがすでに報告されている。

本論文は緒言の他、次の 3 章及び総合考察で構成されている。

第 1 章ではこの遺伝子療法を用いて高脂血症ウサギおよびサルに実験的ステント内再狭窄を生じさせ、ステント内再狭窄における MCP-1 の役割を細胞生物学的に検討した結果について述べている。高コレステロール食を負荷したウサギおよびカニクイザルにプラスミドを筋肉内投与し 28 日後に生じる新生内膜を解析した。その結果、変異型 MCP-1 の遺伝子導入により、ステント

を留置した血管壁への単球の浸潤および活性化が抑制され新生内膜の形成が減少した。この遺伝子治療戦略は局所における MCP-1 の発現および炎症性サイトカインの発現を抑制した。すなわち、MCP-1 の介する炎症の阻害は実験的ステント内再狭窄を抑制する。この遺伝子治療戦略はヒトにおけるステント内再狭窄に対する新しい治療法となる可能性を示唆している。

第2章では全身的な遺伝子治療ではなく、カテーテルを用いた局所遺伝子治療について、細胞生物学的に検討した結果を述べている。臨床ですでに用いられている REMEDY 局所インフュージョンカテーテルを使ってステント留置部位に 7ND 遺伝子を導入し、ステント内再狭窄を抑制するかどうか検討を加えた。高コレステロールを負荷した雄性のカニクイザルの腸骨動脈にベアメタルステントを留置した。ステント留置直後に、生理食塩水あるいは 7ND アデノウイルスベクターをレメディー局所投与カテーテルを用いてステント留置部位に投与した。その結果、コントロールである *LacZ* 遺伝子導入群に比べて 7ND 遺伝子導入群で早期の炎症および晩期（28 日後）の新生内膜が有意に抑制された。さらに、早期において炎症性、増殖性サイトカインの産生が抑制された。これらのことからカテーテルによるアデノウイルスベクターを用いた抗 MCP-1 遺伝子療法はステント内再狭窄に有効である可能性を示唆している。

第3章ではカルシウム拮抗血圧降下剤がステント再狭窄に及ぼす影響について、細胞生物学的に検討した結果を述べている。カルシウム拮抗薬には抗動脈硬化作用があり、その機序の一部に MCP-1 産生抑制があることが知られている。しかし、カルシウム拮抗薬がステント内再狭窄を抑制するという研究例はこれまで知られていない。そこで第3章では第三世代カルシウム拮抗薬であるアゼルニジピンが霊長類においてステント内再狭窄を抑制するか否か明らかにした。雄性カニクイザルに4週間高コレステロール食を給餌し溶媒対照群、アゼルニジピン低用量および高用量群に分けた。ステントを腸骨動脈に留置し24週間薬物投与を続けたのち病理解析を行った。その結果、高用量アゼルニジピンは新生内膜形成および、新生内膜中の酸化ストレスおよび MCP-1 の産生を抑制することが明らかになった。さらに MCP-1 刺激に対する培養血管平滑筋細胞の増殖遊走を臨床での血中濃度と等しいアゼルニジピンが抑制することを明らかにした。これらの霊長類におけるデータからアゼルニジピンの血管保護的カルシウム拮抗薬としての臨床における血管再建術患者への使用が有効である可能性を示唆している。

以上の研究からステント内再狭窄の発生机序には MCP-1 発現増加によるステント留置部位への単球の遊走だけでなく、MCP-1 を介した炎症および血管平滑筋細胞の増殖・遊走が重要であることを細胞生物学的に明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、血管再狭窄を防止する治療法として開発中の抗炎症因子遺伝子治療に関し、高脂血症モデルの実験動物（ウサギ、サル）においてその効果を細胞生物学的に検討したものである。現在、心臓冠状動脈の拡張手術は世界的にみると年間 200 万例以上行なわれ、その大部分でステントが使用されているが、機械的傷害に加えて金属製のステントによる異物反応が血管壁に炎症細胞の浸潤を誘導し、その結果、炎症細胞から産生されるサイトカインおよび増殖因子が血管平滑筋細胞の増殖および遊走を引き起こし再狭窄につながるということが知られている。このステント内

再狭窄に対する新しい治療法として単球走化性因子(MCP-1)の N 末側の欠損した変異型 MCP-1 遺伝子 (7ND) を骨格筋に遺伝子導入する抗 MCP-1 遺伝子療法が開発され、すでに傷害後の動脈硬化が抑制されることが報告されているが、詳細な検討はなされていなかった。

高脂血症ウサギおよびサルに実験的ステント内再狭窄を生じさせ、MCP-1 の役割を細胞生物学的に検討した結果、変異型 MCP-1 (7ND) の全身的遺伝子導入により、ステントを留置した血管壁への単球の浸潤および活性化が抑制され新生内膜の形成が減少することが明らかになった。この遺伝子治療はステント留置部位における MCP-1 の発現および炎症性サイトカインの発現を抑制したことから、MCP-1 が関与する炎症を阻害すれば実験的ステント内再狭窄を抑制できることが示された。

次に全身的な遺伝子治療ではなく、より臨床応用の可能性の高いカテーテルを用いた局所的遺伝子治療法について検討を加えている。臨床ですでに用いられている REMEDY 局所インフュージョンカテーテルを使ってステント留置部位に 7ND 遺伝子を導入し、ステント内再狭窄を抑制するかどうか検討を加えた結果、コントロールである *LacZ* 遺伝子導入群に比べて 7ND 遺伝子導入群で早期の炎症および晚期 (28 日後) の新生内膜が有意に抑制されることが明らかになった。さらに、早期において炎症性、増殖性サイトカインの産生が抑制されることも示された。

次にカルシウム拮抗血圧降下剤がステント再狭窄に及ぼす影響について、細胞生物学的に検討を行なっている。これまでカルシウム拮抗薬の抗動脈硬化作用は知られているが、ステント内再狭窄に対する効果は検討されていなかった。カルシウム拮抗薬であるアゼルニジピンの霊長類におけるステント内再狭窄に対する効果を、24 週間高コレステロール食を給餌したカニクイザルを用い検討した結果、高用量アゼルニジピンはステント内新生内膜形成および、新生内膜中の酸化ストレスおよび MCP-1 の産生を抑制することが明らかになった。さらに MCP-1 刺激によっておこる培養血管平滑筋細胞の増殖遊走を、高血圧患者の血中濃度と等しい濃度のアゼルニジピンが抑制することを明らかにした。これらの霊長類及び培養細胞における研究結果から、カルシウム拮抗血圧降下剤は、臨床における血管再建術患者への使用が有効である可能性が示唆された。

以上のように、本論文はサルなどの高脂血症実験モデルを用い、ステント内再狭窄の防止に抗 MCP-1 遺伝子療法が有効であることを示すだけでなく、その発生機序には MCP-1 発現増加によるステント留置部位への単球の遊走だけでなく、発症部位での MCP-1 を介した炎症および血管平滑筋細胞の増殖・遊走が重要であることを細胞生物学的に明らかにしている。

本研究は下記の 3 報の論文を基礎としており、そのうち 2 報は申請者を筆頭著者とし、いずれも査読制のある学術雑誌に掲載されている。その他、申請者は関連する分野で多数の学術論文を発表している。

- 1) Ohtani K, Usui M, Nakano K, Kohjimoto Y, Kitajima S, Hirouchi Y, Li XH, Kitamoto S, Takeshita A, Egashira K. Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy reduces experimental in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits and monkeys. *Gene Therapy*. 11(16):1273-82. (2004)
- 2) Nakano K, Egashira K, Ohtani K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, Sunagawa K. Catheter-based adenovirus-mediated anti-monocyte chemoattractant gene therapy attenuates in-stent neointima formation in cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis*. Nov 24; Epub ahead of print (2006)
- 3) Nakano K, Egashira K, Tada H, Kohjimoto Y, Hirouchi Y, Kitajima S, Endo Y, Li XH, Sunagawa K.

A third-generation, long-acting, dihydropyridine calcium antagonist, azelnidipine, attenuates stent-associated neointimal formation in non-human primates. *Journal of Hypertension*. 24(9):1881-9. (2006)

(参考報文)

1. Kitamoto S, Nakano K, Hirouchi Y, Kohjimoto Y, Kitajima S, Usui M, Inoue S, Egashira K. Cholesterol-lowering independent regression and stabilization of atherosclerotic lesions by pravastatin and by antimonocyte chemoattractant protein-1 therapy in nonhuman primates. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004;24(8):1522-1528.
2. Ohtani K, Egashira K, Ihara Y, Nakano K, Funakoshi K, Zhao G, Sata M, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates in-stent restenosis by inhibiting inflammation and progenitor cells. *Hypertension*. 2006;48(4):664-670.
3. Ohtani K, Egashira K, Nakano K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, Kimura S, Tominaga R, Morishita R, Sunagawa K. Stent-based local delivery of nuclear factor- κ B decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*. 2006; 114: 2773-2779.
4. Nakano K, Egashira K, Ohtani K, Iwata E, Miyagawa M, Sunagawa K. Azelnidipine has anti-atherosclerotic effects independent of its blood pressure- lowering actions in monkeys and mice. *Atherosclerosis*. 2007 (in press)
5. Nakano K, Egashira K, Masuda S, Funakoshi K, Kimura S, Tsujimoto H, Hara K, Kawashima Y, Tominaga R, Sunagawa K. Development of a novel bioabsorbable polymeric nanoparticle drug or gene eluting stent by electro-deposit nanoparticle-coating technology. *Japanese Journal of Interventional Cardiology*. 2007; 22: 201-209 (in Japanese)
6. Ihara Y, Egashira K, Nakano K, Ohtani K, Kubo M, Koga J, Iwai M, Horiuchi M, Zhao G, Yamagishi S, Sunagawa K. Upregulation of the ligand-RAGE pathway via the angiotensin II type I receptor is essential in the pathogenesis of diabetic atherosclerosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007 (in press)

【総説】

1. 中野 覚、船越 公太、木村 聡、江頭 健輔. 心血管リモデリングとMCP-1. *分子心血管病* 2006 .7(3)259-264
2. 中野 覚、月江 教昭、増田 征剛、江頭 健輔. DES遅発性血栓症の衝撃と分子機序. *血管医学* 2007. 8: 83-88