

氏名	なかしま ひでき 中嶋英喜
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第467号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Inhibition of Experimental Abdominal Aortic Aneurysm in the Rat by Use of Decoy Oligodeoxynucleotides Suppressing Activity of Nuclear Factor $\kappa$ B and ets Transcription Factors (転写調節因子NF $\kappa$ Bとetsのおとり型核酸医薬によるラット腹部大動脈瘤の抑制)
学位論文審査委員	(主査) 河合康明 (副査) 汐田剛史 應儀成二

## 学位論文の内容の要旨

真性大動脈瘤の発生や進展には、大動脈壁のリモデリングにおける弾性線維の主要成分であるエラスチンの破壊が関与する。この大動脈壁におけるエラスチン代謝は、マトリックス分解酵素(MMPs)、マトリックス分解酵素阻害因子(TIMPs)、各種サイトカインなどが関与する複雑な組織内反応であるが、MMP-2、MMP-9などのMMPsが中心的役割をなすと理解されている。一方、転写調節因子であるNF $\kappa$ Bやetsは、大動脈壁に発現するMMPsや接着因子などを、産生細胞を介して調節している。従って、これらの転写調節因子を遺伝子的に制御することにより、MMPsの発現が抑制されるものと考えられる。

本研究では、ラット大動脈瘤モデルにおいて、MMPsの転写調節因子であるNF $\kappa$ Bとetsを同時に抑制するため、おとり型核酸医薬(デコイ)を用いて大動脈瘤の抑制効果を検討した。

### 方法

ヒト腹部大動脈瘤壁の摘出標本では、抗NF $\kappa$ B p65抗体で免疫染色して、NF $\kappa$ Bの発現を病理組織学的に評価した。

ラット大動脈瘤モデルでは、下肢動脈よりカテーテルを腹部大動脈内に留置して、ブタ脛エラストマーを還流して大動脈瘤を作成した。デコイは、導入用シートを腹部大動脈に巻き付けて導入し、FITCラベルデコイにより導入部位を確認した。デコイは、NF $\kappa$ Bとets-1同時抑制のキメラデコイ、スクランブル・キメラデコイ(対照)、NF $\kappa$ B単独抑制のNF $\kappa$ Bデコイ、スクランブル・NF $\kappa$ Bデコイ(対照)の4群で比較検討した。大動脈瘤は、形態的評価として超音波検査で瘤径変化を4週間観察後、摘出した。ラット腹部大動脈瘤の摘出標本では、分子生物学的評価として、NF $\kappa$ Bとets-1の転写活性はElectrophoretic mobility shift assay(EMSA)、MMPs蛋白の発現と活性はWestern blotting, gel zymography, in situ zymographyを行った。病理組織学的評価として、Hematoxylin and eosin

染色、Miller's elastin and van Gieson 染色を行い、抗 CD31 抗体による免疫染色によりマクロファージを評価した。

## 結果

ヒト腹部大動脈瘤壁では、NF $\kappa$ B は主に外膜、内膜を中心に発現していた。

ラット大動脈瘤モデルでは、全てブタ腱エラストーゼ処理により、2週間目には全て有意な瘤径の拡大が発生した。デコイの導入は、FITC ラベルデコイにより腹部大動脈の外膜や中膜に存在し、シート固定後7日まで確認した。

分子生物学的評価において、キメラデコイでは、スクランブルと比較して、大動脈瘤壁での NF $\kappa$ B と *ets-1* が同時に抑制され、そして、同様に、大動脈瘤壁での MMP-9 の発現や活性も抑制された。

病理組織学的評価において、キメラデコイでは、スクランブルと比較して、大動脈壁の弾性線維の蛋白融解が減少し、また、大動脈瘤壁でのマクロファージ数も減少した。

形態的評価において、術後4週までの大動脈瘤径の抑制効果を4群で比較した。キメラデコイ群と NF $\kappa$ B デコイ群の2群は、非デコイ群やスクランブルの2群より有意に瘤径拡大が抑制された。そして、キメラデコイ群は、NF $\kappa$ B デコイ群より有意に瘤径拡大が抑制された。

## 考察

現在、大動脈瘤の発生や進展を完全に阻止できる薬物治療は存在しない。しかし、大動脈瘤の病態が大動脈壁におけるエラスチンの破壊であり、その主な原因として MMPs 活性の亢進が証明されていることから、MMPs 活性を抑制することにより新しい薬物治療が実現できると考えられる。今回、新しい遺伝子治療として、おとり型核酸医薬（デコイ）を用いて、MMPs の転写調節因子である NF $\kappa$ B と *ets* を同時に抑制するキメラデコイを考案した。

ヒト真性大動脈瘤と実験的大動脈瘤の相違を検討するため、ヒト腹部大動脈瘤壁における NF $\kappa$ B 活性の亢進を確認し、そして作成したラット大動脈瘤モデルにおいても NF $\kappa$ B と *ets-1* 活性の亢進、並びに MMP-9 発現や活性の亢進を証明した。これらの結果から、ラット大動脈瘤モデルにおいても、ヒト腹部大動脈瘤と同様に NF $\kappa$ B や *ets-1* の活性亢進による MMPs の過剰発現が大動脈瘤の形成に関与すると考えられる。

このラット大動脈瘤モデルにおいて、キメラデコイの効果を NF $\kappa$ B デコイやスクランブルデコイと比較した。キメラデコイでは、瘤径拡大の抑制、瘤壁 NF $\kappa$ B と *ets-1* の転写活性の抑制、並びに瘤壁 MMPs の発現と活性の抑制が証明され、薬物治療としての可能性が示唆された。また瘤壁内マクロファージ数の減少があり、マクロファージの遊走も抑制することが推察された。こうした結果から、キメラデコイの MMPs の抑制効果は、NF $\kappa$ B と *ets-1* の転写抑制、マクロファージや血管平滑筋細胞などの産生細胞からの分泌抑制、マクロファージの遊走抑制による総合的作用と考えられる。以上のような検討から、NF $\kappa$ B と *ets* を同時に抑制するキメラデコイは、大動脈瘤の発生や進展を抑制する新しい遺伝子治療となる可能性がある。

## 結論

転写調節因子である NF $\kappa$ B と *ets* を同時に抑制するキメラデコイは、実験的大動脈瘤の進展を抑制したことから、大動脈瘤の新しい遺伝子治療となる可能性がある。大動脈瘤の進展には、NF $\kappa$ B と *ets* が重要な役割を演ずると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ラット大動脈瘤モデルを用いて、瘤壁 MMPs の抑制による新しい遺伝子治療の可能性を検討したものである。

MMPs の転写調節因子である NF $\kappa$ B と ets-1 を同時に抑制するキメラデコイを確立した。このキメラデコイをラット大動脈瘤モデルに導入することにより、瘤径の拡大抑制、瘤壁 NF $\kappa$ B と ets-1 の転写抑制、並びに瘤壁 MMPs の発現抑制を証明した。

これらの内容は、真性大動脈瘤に対する新しい遺伝子治療の可能性を示したものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認める。