

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19591643
研究課題名 (和文) 重症不全心に対する RNAi と超音波を組み合わせた新しい遺伝子導入法の開発
研究課題名 (英文) Development of the novel gene transfer technique combining RNAi and ultrasonic intervention for the severe cardiac dysfunction
研究代表者 吉川 義朗 (YOSHIKAWA YOSHIRO) 奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：40343420

研究成果の概要 (和文)：

ラット心不全モデルに、sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) の抑制蛋白である Phospholamban (PLB) をアンチセンス法で抑制することでも、SERCA2a 機能を亢進できる。PLB と SERCA2a の比率 (PLB/SERCA2a ratio) に着目し不全心の治療が可能であると考え、PLB 抑制に有効な siRNA を複数作成し、in vitro で抑制効果を評価しているが有効なものは見つかっていない。マーカー遺伝子と超音波造影剤を用いて、生体内心臓での発現効率を比較した。また、antisense PLB (asPLB) を経管的に感染させることにより不全心の形成が抑制できることを示した。また水溶性カルパイン阻害剤 SNJ-1945 を用いることによって虚血再灌流不全心の形成が抑制されることを示した。

研究成果の概要 (英文)：

In failing hearts, a deficiency in sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 2a results in abnormal Ca^{2+} handling and diminished contraction. In addition, a decrease in the phosphorylation of phospholamban (PLB) has been reported. Gene transfer of antisense PLB (asPLB) can improve contractile function in the failing human myocardium. We conclude that SERCA2a function enhanced by adenoviral gene transfer of asPLB prevents Ca^{2+} overload-induced LV contractile dysfunction in terms of mechanical work and especially energetics. Our results indicate that soluble SNJ attenuates cardiac dysfunction due to CP arrest-reperfusion injury associated with the impairment of the total Ca^{2+} handling in excitation-contraction coupling by inhibiting the proteolysis of alpha-fodrin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科学

1. 研究開始当初の背景

我々は、ラット心不全心モデルに、sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) 遺伝子を導入することにより心機能と生存率が改善されると報告してきた。また SERCA2a の抑制蛋白である Phospholamban (PLB) をアンチセンス法で抑制することでも、SERCA2a 機能を亢進できる。このように我々は (PLB と SERCA2a の比率 (PLB/SERCA2a ratio) に着目し不全心の治療が可能であると考えている。しかし、従来のアデノウイルスによる遺伝子導入では小動物では心臓全体に対し治療が可能であるが、大動物やヒトの心臓全体に対しては十分な機能回復をもたらすことは困難であり、その方法は未だ確立されていない。最近のトピックスで、線虫で *RNAi* (*RNA interference: RNA 干渉*) により遺伝子発現が抑制されていることが発見され、哺乳類でも同様のメカニズムがあり、小さな RNA を用いて遺伝子サイレンシングを行う方法が報告され非常に注目を浴びている。

2. 研究の目的

RNAi と超音波を組み合わせて、より効率の良いしかも安全な不全心治療法を開発することが本研究の目的である。

(1) 重症不全心では SERCA2a の活性が低下し Ca^{2+} 取り込みが障害され細胞内 Ca^{2+} の上昇に伴い拡張不全が起こるとされている。その結果、筋小胞体 SR から放出される Ca^{2+} の減少による収縮不全も生じる。また、SERCA2a は抑制蛋白である PLB により機能を押しさえられている。そこで我々は PLB/SERCA2a ratio に着目し不全心の治療が可能であると考えている。我々は、これまで、ラット心不全心モデルに SERCA2a 遺伝子を導入することにより心機能と生存率が改善されると報告してきた。また、SERCA2a の抑制蛋白である PLB をアンチセンス法で抑制することでも、SERCA2a の機能を亢進させることができる。しかし、従来のアデノウイルスやアデノ随伴ウイルスなどによる遺伝子導入では小動物では心臓全体に対し治療が可能であるが、大動物やヒトの心臓全体に対しては十分な機能回復をもたらすことは困難であり、その方法は未だ確立されていない。また SERCA2a 遺伝子導入とアンチセンス法により PLB の抑制を同時に行うことにより、SERCA2a の活性をより高めることは理論上可能であるが、従来はウイルスベクターを用いており毒性や効

率の問題で同時に行うことは困難である。最近のトピックスで、線虫で *RNAi* により遺伝子発現が抑制されていることが発見され、哺乳類でも同様のメカニズムがあり、小さな RNA を用いて遺伝子サイレンシングを行う方法が報告され非常に注目を浴びている。In vitro では、心筋細胞にウイルスベクターを用いて siRNA の発現に成功した報告はあるが、生体内での成功例はない。一方、遺伝子導入に超音波を組み合わせてウイルスベクターを使用せずにプラスミドを用いて、機能する遺伝子を発現できるという報告がされている。そこで我々は科学研究費交付希望期間内に、従来我々が研究してきたラット不全心モデルを用いて *RNAi* と超音波を組み合わせて、より効率の良いしかも毒性の少ない不全心の遺伝子導入治療法を開発することが本研究の目的である。この研究が現在治療困難な重症不全心に対し移植に代わる全く新しい治療法を開発する第一歩となることが期待できる。

(2) 本研究計画の特色、および独創的な点は血液交叉灌流をすることにより不全心モデルのエネルギー効率を臓器全体で分析すると同時に、興奮収縮連関のカルシウムハンドリングに要する酸素消費を計測することにより心筋細胞レベルでの障害のメカニズムを評価し得る点である。さらに超音波照射下に SERCA2a のプラスミドを遺伝子導入することにより SERCA2a を過剰発現させ、同時に *RNAi* を用いて、PLB の遺伝子発現を抑制し SERCA2a の機能を高めてやることで不全心モデルのエネルギー効率や興奮収縮連関のカルシウムハンドリングに要する酸素消費がどのように変化するかを分析することができる点である。つまり病態モデルから得られた変化を分析した後、gene targeting と *RNAi* の手法で検証することによりその病態のメカニズムを解明できると同時に治療法の確立に結びつくという点が研究の効率という面でも極めて有効かつユニークな点である。また、本研究は、遺伝子の発現までの時間が短くコストも安いので研究の時間的経済的効率が非常に高いことも本研究の優れた点である。さらに、遺伝子導入にウイルスベクターを使用せず、超音波と *RNAi* を併用することでウイルスを用いた遺伝子導入で問題とされている毒性や発がん性などの危険を回避できる点が、将来の臨床応用を目指すうえで極めて重要な特徴である。

(3) 従来から不全心モデルや遺伝子導入後の治療効果の判定にコンダクタンスカテーテ

ルやランゲンドルフ灌流を用いた心機能の評価が行われてきたが、ラットで血液交叉灌流を行っている施設は世界でも他にはなく、我々のグループと共同研究先の米国ボストンの Massachusetts General Hospital (MGH) だけである。また、動物実験レベルでも心臓全体に対しては *in vivo* の遺伝子導入は技術的に困難だとされている。心筋壁に直接遺伝子を注入することにより左心室壁の局所的な遺伝子導入は臨床でも行われているが、心臓全体が治療対象となる心不全では直接注入法は効果が局所に限られるため十分でないと考えられる。発現効率の良い遺伝子導入法としては Massachusetts General Hospital (MGH) の Dr. Roger J. Hajjar らが開発した Cross Clamp 法が優れており、5年前より MGH と共同研究で遺伝子導入法の開発やベクターの制作を行っており本研究でも Cross Clamp 法を使用する。Cross Clamp 法によりほぼ 100%近い遺伝子の発現効率を得られ、心臓全体の機能の評価が不可欠である心不全モデルには極めて有効な方法であると考えられる。以上の点からも本研究が国内外で注目を集めることは間違いないと思われる。さらに本研究の成果は重症心不全に対する移植医療に取って代わる新たな治療となる可能性が高い。

3. 研究の方法

(1) プラスミドと siRNA の作製

プラスミドは筋小胞体 (SR) のカルシウムポンプ (SERCA2a) のプラスミド、SR のカルシウムを減少させるカルシウム結合蛋白である Sorcin のプラスミド、細胞膜の $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger のプラスミド、マーカー遺伝子である $\beta\text{-gal}$, GFP のプラスミドを作成する。RNAi に基づき PLB を抑制する siRNA をキットにより作成する。

(2) ラット心臓に対する生体内遺伝子導入 (Cross Clamp 法)

ペントバルビタール腹腔内投与、全身麻酔下に Wistar retire rat に気管内挿管し胸骨正中切開を行う。心尖部より 24G アンギオキャス先端が大動脈弁直上の大動脈内に位置するように留置する。カテーテル先端より末梢側で肺動脈と大動脈を同時に遮断できるようにタンニケットを準備する。アデノシンを注入後タンニケットで大動脈と肺動脈を遮断し超音波照射下にプラスミドと siRNA を注入しそのまま 30 秒間タンニケットを遮断する (Cross Clamp 法)。遮断解除後、止血を確認し閉胸し手術を終了する。使用するプラスミドは、 $\beta\text{-gal}$, GFP, SERCA2a, Sorcin, $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger と生理食塩水を注入する Sham 手術群と前記 6 群それぞれに siRNA を同時注入した群である。

(3) 心不全モデル作成と血液交叉灌流

血液交叉灌流ラット摘出心モデルでは、2匹のラットのうち、一方から心臓を摘出し、他方のラットを代謝サポーターとし、その頸動・静脈と摘出心臓をつなぎ血液交叉灌流を行い、摘出心臓の冠循環を行なう。摘出心臓の左室内にバルーンを挿入し左室圧の測定を行ない、マイクロシリンジでバルーンの注水量を増減することにより容量負荷を変化させて、等容性収縮のみを行う。また収縮性をあげるために Ca^{2+} を冠状動脈内に注入する。交叉灌流系はほとんどすべて冠循環であるので、一心拍の心筋酸素消費量は冠灌流量と動静脈酸素濃度較差の積を心拍数で除して求め、心臓の酸素消費量が連続的に正確に測定できる。

① 高濃度 Ca^{2+} 冠状動脈注入による Ca^{2+} 過負荷急性不全心 心筋細胞における虚血再灌流障害の発生には、その不可逆的終末像として心筋細胞内 Ca^{2+} 過負荷状態が知られている。しかし、虚血再灌流モデルでは、 Ca^{2+} 過負荷以外のさまざまな要因が関与しているため結果の解析が困難である。そのため、血液交叉灌流ラット摘出心を対象としてアシドーシス、虚血、さらに低酸素も起こらない Ca^{2+} 過負荷状態のみを一過性に起こした Ca^{2+} 過負荷急性不全心モデルを作成して心力学的・エネルギー学的検討を行う。生食注入 Sham 群、 $\beta\text{-gal}$, GFP 群、SERCA2a 群、anti-sense PLB (asPLB) 群、Sorcin 群、 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger 群、前記 6 群それぞれに siRNA を同時注入した群各 4 例に対し以下のプロトコルを行う。Cross Clamp 法による遺伝子導入 5 日後のドナー摘出心臓に対し血液交叉灌流を行い、まず、コントロールの ESPVR と $\text{VO}_2\text{-PVA}$ 関係を求める。その後、mLVV で左室圧と VO_2 を計測しながら 1% CaCl_2 を 5 分間毎に 1ml/hr, 2ml/hr, 3ml/hr, 3.5ml/hr 冠状動脈注入し、高濃度カルシウム冠動脈注入によるカルシウム過負荷不全心を作成する。カルシウムを注入中止し、20 分間カルシウムをクリアランスし、その後再び ESPVR と $\text{VO}_2\text{-PVA}$ 関係を求める。実験終了後、左心室を凍結保存し $\beta\text{-gal}$ assay 用の凍結切片作成標本 (-20°C) と Western Blot による蛋白分析用の標本 (-80°C) を作製する。

② 虚血再灌流急性不全心モデル

Ca^{2+} 過負荷を生じる現実的なモデルとして虚血再灌流 (IR) 障害による急性不全心モデルを 15 分の虚血後、60 分の再灌流を行い作製した。生食注入 Sham 群、 $\beta\text{-gal}$, GFP 群、SERCA2a 群、asPLB 群、Sorcin 群、 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger 前記 6 群それぞれに siRNA を同時注入した群各 4 例に対し以下のプロトコルを行う。Cross Clamp 法による遺伝子導入 5 日後のドナー摘出心臓に対し血液交叉灌流を行い、まず、コントロールの ESPVR と

VO₂-PVA 関係を求める。その後、15 分の虚血後、60 分の再灌流を行い ESPVR と VO₂-PVA 関係を求める。実験終了後、左心室を凍結保存し β-gal assay 用の凍結切片作成標本 (-20°C) と Western Blot による蛋白分析用の標本 (-80°C) を作製する。

(4) β-gal assay

-20°C に凍結保存した左心室をクライオスタットで凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で GFP の発光を確認後 X-gal 染色を行う。翌日に X-gal の発現を検討する。HE でコントラストステインを行う。

(5) 心筋の蛋白発現量の定量 -80°C で保存した左心室を、ホモジネートする。蛋白定量を行い、サンプルの蛋白量を一定の濃度に調整する。SDS-PAGE とウエスタンブロット法により、SERCA2a, Phospholamban, Ryanodine receptor, Na⁺-Ca²⁺ exchanger の発現を分析する。

4. 研究成果

ラット心不全心モデル sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) 遺伝子を導入することにより心機能と生存率が改善されると報告した。SERCA2a の抑制蛋白である Phospholamban (PLB) をアンチセンス法で抑制することでも、SERCA2a 機能を亢進できる。

(1) プラスミドと siRNA の作製

我々は (PLB と SERCA2a の比率 (PLB/SERCA2a ratio) に着目し不全心の治療が可能であると考え、PLB 抑制に有効な siRNA を複数作成し、*in vitro* で抑制効果を評価しているが有効なものは見つかっていない。

(2) 超音波造影剤を用いたラット心臓に対する生体内遺伝子導入 (Cross Clamp 法)

マーカー遺伝子と超音波造影剤を用いて、生体内心臓での発現効率を比較するに当たり、新しい造影剤を用いて導入効率を検討している。しかしながら効率的に発現する造影剤は今のところない。

(3) 経管的 anti-sense Phospholamban 法によるカルシウム過負荷不全心形成の抑制効果

PLB に対する anti-sense 法により SERCA2a を過剰発現させることによって、高カルシウム投与によるカルシウム過負荷不全心の形成抑制効果を検討した。低侵襲に遺伝子導入する方法として経動脈的にアデノウィルスに感染させたラット血液交叉灌流摘出心臓標本を作成し、高カルシウム冠状動脈注入による過負荷不全心形成予防における有効性を検討した。その結果 (1) カルシウム過負荷不全心では、ESPVR は下方に移動し、VO₂-PVA 関係直線の slope は変化せず VO₂-intercept が減少する。(2) asPLB により SERCA2a が過剰発現することにより、カルシウム過負荷不全心の形成が抑制されることが示された。

(4) 選択的 β₁ ブロッカーランジオロールの特性 血液交叉灌流摘出ラット心臓標本を作成し、左室容量を変化させて (Vol-run)、コントロールの左室収縮期末圧容積関係 (ESPVR)、1 心拍当たりの心筋酸素消費量 (VO₂)-収縮期圧容積面積 (PVA: 1 心拍当たりの総機械的エネルギー) 関係を求めた。ついで、ランジオロールを冠状動脈注入 (10 μmol/L) し同様の測定を行い、ESP_{mLVV}、PVA_{mLVV}、VO₂-PVA 関係における slope (PVA の酸素コスト) と VO₂ 切片 (PVA 非依存性 VO₂: 興奮収縮連関の酸素消費 + 基礎代謝) について解析した。また、Ca²⁺ 負荷を行いその収縮性の変化についても検討を加えた。ランジオロール投与で、ESPVR は下方に移動し ESP_{mLVV}、PVA_{mLVV} は減少し、1 心拍当たりの総機械的仕事量は減少した。VO₂-PVA 関係直線は、slope は変化しないで、VO₂ 切片が軽度減少した。基礎代謝は Normal 群と有意差はなかった。このことから興奮収縮連関の Ca²⁺ ハンドリングにかかわる酸素消費の低下が軽度であることが示唆された。心房ペーシングを行っている状況下であったが、ランジオロールは総機械的仕事量を軽度減少させるが、Ca²⁺ ハンドリングにかかわる酸素消費の低下はごく軽度であった。このことからカテコラミンを使用していることが多く、血行動態的にも不安定な心臓手術後に使用する薬剤としてのランジオロールの安全性が示唆された。

(5) 大動脈遮断解除後の再灌流障害予防における水溶性カルパイン阻害剤の効果

ラット血液交叉灌流摘出心臓標本を作成し、水溶性カルパイン阻害剤 SNJ-1945 による大動脈遮断解除後の虚血再灌流不全心形成予防における有効性を検討した。その結果 (1) 高 K⁺ 心筋保護による心停止による虚血再灌流不全心では、ESPVR は下方に移動し、VO₂-PVA 関係直線の slope は変化せず VO₂-intercept が減少する。(2) 水溶性カルパイン阻害剤 SNJ-1945 を用いることによって虚血再灌流不全心の形成が抑制されることが示され、心筋保護における有効性が示唆された。また SNJ-1945 には β₁ 受容体を介する positive inotropic effect (副作用) を有することが示された。これらの結果より、この水溶性カルパイン阻害剤 SNJ-1945 が、心臓手術における心筋保護薬としての臨床応用への可能性が強く示唆された。

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 4 件)

① Yoshikawa Y, Zhang GX, Obata K, Matsuyoshi H, Asada K, Taniguchi S, Takami M

A cardioprotective agent of a novel calpain inhibitor, SNJ-1945 exerts β_1 -actions on left ventricular mechanical work and energetics

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 査読有 in press

②Yoshikawa Y, Zhang GX, Obata K, Ohga Y, Matsuyoshi H, Taniguchi S, Takaki M. Cardioprotective effects of a novel calpain inhibitor SNJ-1945 for reperfusion injury after cardioplegic cardiac arrest. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 査読有 2010 Feb;298(2):H643-51. Epub 2009 Dec 4.

③Tsuji T, Del Monte F, Yoshikawa Y, Abe T, Shimizu J, Nakajima-Takenaka C, Taniguchi S, Hajjar RJ, Takaki M. Rescue of Ca^{2+} overload-induced left ventricular dysfunction by targeted ablation of phospholamban.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 査読有 2009; 296(2): H310-7. Epub 2008 Dec 12.

[学会発表] (計 26 件)

①吉川義朗、張国興、小畑孝二、大賀好美、松吉ひろ子、谷口繁樹、高木 都 新しいカルパイン阻害剤 SNJ-1945 添加心筋保護液の虚血再灌流障害防止効果：ラット血液交叉灌流摘出心臓標本を用いて 第 31 回日本循環制御医学会総会 2010 年 5 月 28-29 日 大阪府豊中市

②吉川義朗、多林伸起、張国興、阿部毅寿、清水寿一郎、谷口繁樹、高木都 大動脈遮断解除後の再灌流障害予防における水溶性カルパイン阻害剤の有用性 第 39 回日本心臓血管外科学会学術総会 2009 年 4 月 22-24 日 富山県富山市

③吉川義朗、藤根潔枝、清水壽一郎、大賀好美、谷口繁樹、高木 都 大動脈遮断解除後の再灌流障害予防における水溶性カルパイン阻害剤の効果：ラット血液交叉灌流摘出心臓標本を用いて 第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会学術集会 2008 年 8 月 22 日 大阪府豊中市

④吉川義朗、多林伸起、辻 毅嗣、藤根潔枝、清水寿一郎、阿部毅寿、谷口繁樹、高木 都 選択的 β_1 ブロッカーランジオロールの特性：血液交叉灌流ラット心臓を用いるメカノエナジェティクスからのアプローチ 第 60 回日本胸部外科学会定期学術集会 2007 年 10 月 17-20 日 宮城県仙台市

[その他]

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~2phy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 義朗 (YOSHIKAWA YOSHIRO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：40343420

(2) 研究分担者

高木 都 (TAKAKI MIYAKO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00033358

田村 大和 (TAMURA YAMATO)
奈良県立医科大学・医学部・研究生
研究者番号：20382301

(3) 連携研究者

辻 毅嗣 (TSUJI TSUYOSHI)
奈良県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：50295804