

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791332  
 研究課題名（和文）RNA 干渉法による心筋虚血再灌流後心筋障害のメカニズム解明と遺伝子治療への応用  
 研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of ischemic reperfusion cardiac injury by RNA interference, and clinical application for gene therapy  
 研究代表者  
 加藤 祐子（KATOH YUKO）  
 京都府立医科大学・附属病院・専攻医  
 研究者番号：50398400

研究成果の概要：ラット心筋細胞にsiRNAを導入する実験は、In Vitro系はNucleofection法にて、In Vivo系はHVJ Envelope Vectorを用いて行い、Real Time PCR及びWestern Blotで成功したことを確認した。p38MAP kinaseをノックダウンすることにより、サイトカイン放出及び心筋収縮力が低下することは、In Vitroの実験では確認した。In Vivo系において、心筋梗塞の減少効果については、今後実験結果を確認する予定である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	210,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

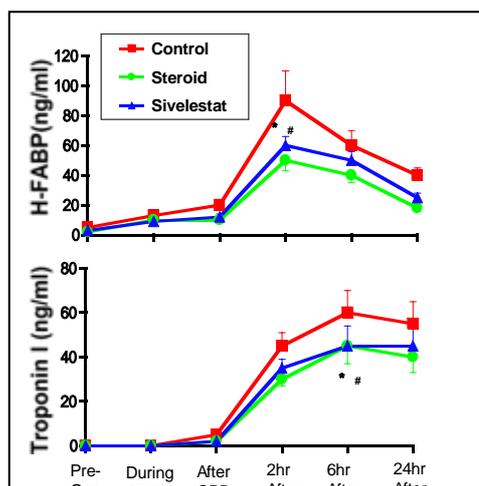
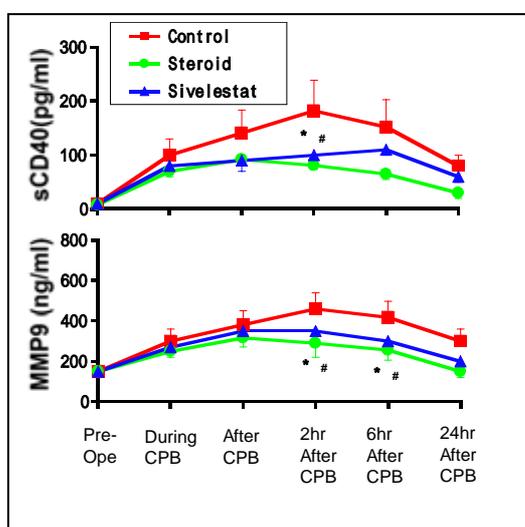
キーワード：心筋虚血再灌流、RNA干渉法、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

心臓血管手術においては虚血再灌流障害等が原因で、高サイトカイン血症によりSIRSに陥る危険性が知られている。従って適度な炎症性サイトカイン産生抑制は患者に利益をもたらす可能性がある。1970年代より人工心肺手術においてステロイドのパルス療法が支持されてきた。

確かにステロイド投与は炎症性サイトカイン産生を抑制し、周術期の炎症反応を抑制するが、免疫力低下による術後感染症の増加、高血糖などの弊害が問題となる(文献1)。しかし最近の論文によるとステロイドの副作用を押しさえた少量(ストレス用量)投与により、重症心臓手術からの回復が促進されたことが報告された(文献2)。

これらの文献を基に、申請者らは心臓血管外科予定手術患者を対象とした臨床研究を行い、ストレス用量のHydrocortisone(ステロイド, 4-5mg/kg)を投与することにより(n=50)、周術期の血漿中及び肺胞上皮被覆液中のIL6, IL8, CD40, MMP 9 産生の抑制, IL10濃度の上昇と共に、血漿中Heart Fatty Acid Binding Protein (H-FABP), NT-proBNP, Troponin I 濃度の低下を認めた(図参照)。更に術前よりのSivelestat(好中球エラスターゼインヒビター)投与に於いても血漿H-FABP, Troponin I濃度の上昇抑制が見られることから(n=20)、白血球の活性化が抑制される事も心筋保護に作用している事が示唆された。(図参照)。



また当教室の中嶋らは、ラットを用いた動物実験においては、冠動脈加前下行糸状筋モデルに於いてIL10発現アデノウイルスベクター (Ad-IL10)を尾静脈より注入することにより、冠動脈加前下行糸状筋による心筋梗塞モデ

ルにおいて梗塞量の減少を見た。従って血漿中IL10上昇が心筋保護に作用していることが示唆された。ステロイドやIL10がどのような経路でサイトカイン産生を修飾するのか、異論もあるが一般的には核内因子群が関与している事が知られている(文献3)。また、心筋細胞においてNF- $\kappa$ Bの核内移行により種々の遺伝子の転写活性が促進されることにより心筋細胞障害が起きるとの報告(文献4)がある一方、心筋保護に働いているとの報告もある(文献5)。

1. Corticosteroids and cardiopulmonary bypass: a review of clinical investigations. Chaney MA. Chest;121:921-31,2002.
2. Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery. Kilger E, et al. Crit Care Med;31:1068-74, 2003
3. Glucocorticoids: effects on gene transcription. Adcock IM, et al. Proc Am Thorac Soc;1:247-54, 2004.
4. Inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. Onai Y, et al. Cardiovasc Res;63:51-9, 2004
5. Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction Misra A, et al. Circulation 23;108:3075-8, 2003
6. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying LPS-Associated Myocyte Impairment Tavener SA, Kubens P. Am J Physiol; 290:H800-6,2006

## 2. 研究の目的

(1) .ラット心筋細胞の単細胞培養及びラット白血球との共培養実験にて、核内因子をターゲットとしたsiRNAをNucleofection法により遺伝子ノックダウンし、核内因子

の移動を修飾する事で虚血再還流によるラット心筋細胞障害の変化を観察する。

(2). ラット心筋細胞増殖前下行性結紮再還流モデルにおいて、核内因子をターゲットとしたsiRNAをHVJ Envelope Vector等を用いて、Vivoに導入することで予め遺伝子ノックダウンする事により、心筋梗塞の広がり、心筋障害等の変化を観察する。

### 3. 研究の方法

#### (1). ラット心筋細胞及び多核白血球にsiRNAを導入する実験 (In Vitro系)

(ラット心筋細胞及び多核白血球の単離)

心筋細胞の単離は、過去の文献(Sadoshima J, et al. JBC;267:10551-60,1992)の通りに行う。ラット多核白血球の単離は、比重遠心法(Histopaque-1119, -1083, Sigma)にて行う。いずれの細胞も単離後、DMEM培養液で培養する。

(siRNAの作成)

NF- B p50, p65, I B Kinase, p38 MAP Kinase, Akt KinaseをターゲットにしたsiRNA塩基配列作成は、siRNA合成を外注するか、独自にWhitehead siRNA prediction programを用いて塩基配列を決める。例えば、anti-p50 siRNAの場合は、5'-AGU CCA GGA UUA UAG CCC CdTdTとなる。

(Nucleofection法によるsiRNA導入、及び遺伝子発現抑制効果の確認)

ラット心筋細胞又は、多核白血球を、Nucleofector Solution内に $2-5 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ lに播種しsiRNA 1.5  $\mu$ gを添付後、Amaxa siRNA Nucleofection Program (Amaxa、現有設備)に従いsiRNAの導入を行う。24-72時間CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養後に細胞回収しノックダウンの効果を、リアルタイムPCR(7300 Applied Biosystems、現有設備)によりmRNAレベルにおいて定量評価、蛍光顕微鏡にて蛋白レベルの細胞内局在半定量評価、さらにDNA-binding ELISA(Active Motif社等)により

蛋白レベルにおいて細胞質及び核内のNF- B等を定量評価することで、最終的にNF- B、又はMAP Kinase等の核内因子がNegative Controlと比べ変化していることを確認する。

#### (2). ラット心筋細胞単培養、及び多核白血球共培養による虚血再還流後心筋細胞障害の評価 (In Vitro系)

Anaeropack(三菱ガス化学)を用いて大きな装置を使わずに <1%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>/95%N<sub>2</sub>環境下に24時間、以下の4グループの細胞を培養後、95%Air/5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで6時間培養することで心筋虚血再還流モデルをIn Vitroで実現する。

siRNA導入済みラット心筋細胞単独培養、  
ラット心筋細胞単独培養

ラット心筋細胞 + siRNA導入済みラット多核白血球による共培養

ラット心筋細胞 + ラット多核白血球による共培養においてMyocyte Contractility System(Ion Optix Corp.)にて、1ml/minのTyrode Bufferで還流した1Hz刺激下の培養心筋細胞の収縮力をSoft Edge Software(Ion Optix Corp.)にて定量し、心筋細胞障害を検討する (Circ Res;95(7):700-7, 2004)。

同時にFura-2 AM(0.5  $\mu$ M)で心筋細胞をラベルし、心筋細胞のカルシウムの動きを蛍光強度(Ratio 340nm/380nm)で同時測定する。また、培養液中のMCP-1, IL1-beta, TNF- $\alpha$ , Troponin I, Fatty Acid Binding Protein濃度を、ELISA法にて定量し心筋障害を評価する。

#### (3). siRNA発現Vectorのラットへの遺伝子導入による心筋虚血障害治療への応用 (In Vivo系)

ラットは週齢8-10week (250-300g)のSprague-Dawley Ratを用いる。

(siRNA発現Vectorの作製)

Vitroの実験系において心筋細胞障害に抑制効果のあった遺伝子をターゲットにしたsiRNA発現ベクターを作成する。

(siRNA発現プラスミドDNAのマウスへの投与) HVJ Envelope Vectorを用いる場合は懸濁液を1-2AU、ラット尾静脈より全身投与する。全身投与にて、心筋細胞に遺伝子発現抑制効果が見られない場合は、虚血予想領域の局所注入を試みる。また、多核白血球をノックダウンする場合は、Ex Vivoにて、Nucleofection法で予め遺伝子抑制した多核白血球を、白血球抗体投与により多核白血球成分が殆ど無くなる様に前処理したラットの尾静脈より全身注入する。

(RNAi効果の評価) Vector投与48-72時間後にラット心筋及び血液を採取し、目的の遺伝子の発現が抑制されている事をリアルタイムPCRによりmRNAレベルにて、蛍光顕微鏡又はDNA-binding ELISA(Active Motif社)等により蛋白レベルにて発現が抑制されている事を確認する。

(心筋梗塞の作成) Vector投与48-72時間後に気管内挿管下人工呼吸下ラットの第4肋間より開胸し、心外膜を剥離し冠状動脈前下行枝に30分間の間、結紮を行う。

(心筋梗塞巣の定量化) 24時間後に前下行枝を再度結紮し、尾静脈より2%Evans Blue注入により、Non-ischemic ZoneとIschemic Zoneを鑑別する。その後心臓を垂直方向に4分割し、2%Triphenyl Tetrazolium Chloride(TTC)染色する事で、Ischemic ZoneをViable AreaとNecrotic Areaに鑑別する。それぞれのスライスを写真に取りコンピューターソフトで心筋梗塞巣を定量解析する。

(心筋組織血管周囲の多核白血球の浸潤の評価、及び免疫組織染色による評価)

心筋組織切片をGill No.3 H & E染色にて5視野における多核白血球数を定量評価、心筋組織内血管周囲のP-selectin, ICAM-1免疫組織化学染色による半定量評価を行う。

(血中サイトカイン濃度等の評価)

血漿を採取し、血漿中IL6, IL8, IL10, CD40,

MMP9, Fatty Acid Binding Protein, Troponin I, NT-proBNP濃度をELISA法にて測定し、心筋障害の程度と炎症性サイトカインの濃度を定量化する。

#### 4. 研究成果

ラット心筋細胞及び多核白血球にsiRNAを導入する実験 (In Vitro系)

(ラット心筋細胞及び多核白血球の単離)

心筋細胞の単離は、過去の文献(Sadoshima J, et al. JBC,1992)の通り、ラット多核白血球の単離は比重遠心(Histopaque-1119, -1083)にて行った。

(siRNAの作成)NF- $\kappa$ B p50, p65, I $\kappa$ B Kinase, p38 MAP Kinase, Akt KinaseをターゲットにしたsiRNA塩基配列作成した。

(Nucleofection法によるsiRNA導入、及び遺伝子発現抑制効果の確認)ラット心筋細胞又は、多核白血球を、Nucleofector Solution内に2-5x10<sup>6</sup>cells/100 $\mu$ lに播種しsiRNA 1.5 $\mu$ gを添付後、Amaxa siRNA Nucleofection Program に従いsiRNAの導入を行った。24-72時間CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養後に細胞回収しノックダウンの効果を確認した。

ラット心筋細胞単培養、及び多核白血球共培養による虚血再還流後心筋細胞障害の評価

(In Vitro系) Anaeropack(三菱ガス化学)を用いて、1%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>/95%N<sub>2</sub>環境下に24時間、細胞を培養後、95%Air/5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで6時間培養することで心筋虚血再還流モデルをIn Vitroで行い、NF- $\kappa$ B p50, p38 MAP Kinaseノックダウン群において、IL6, IL8, TNF $\alpha$ 放出の抑制をみた。

siRNA発現Vectorのラットへの遺伝子導入による心筋虚血障害治療への応用 (In Vivo系) ラットは週齢8-10week (250-300g)のSprague-Dawley Ratを用いた。

(siRNA発現Vectorの作製)

In Vitroの実験系において心筋細胞障害に抑制

効果のあったp38 MAP Kinase遺伝子をターゲットにしたsiRNA発現ベクターを作成した。(siRNA発現プラスミドDNAのマウスへの投与) HVJ Envelope Vectorを用いる場合は懸濁液を1-2AU、ラット尾静脈より全身投与および、虚血予想領域の局所注入を試みた。また、多核白血球をノックダウンする場合は、Ex Vivoにて、Nucleofection法で予め遺伝子抑制した多核白血球を、白血球抗体投与により多核白血球成分が殆ど無くなる様に前処理したラットの尾静脈より全身注入した。(RNAi効果の評価) Vector投与48-72時間後にラット心筋及び血液を採取し、目的の遺伝子の発現が抑制されている事をリアルタイムPCRによりmRNAレベルにて、蛍光顕微鏡又はDNA-binding ELISA(Active Motif社)等により蛋白レベルにて発現が抑制されている事を確認した。

## 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)

Hosokawa K, Shime N, Kato Y, Hashimoto S. A randomized trial of ultrasound image-based skin surface marking versus real-time ultrasound-guided internal jugular vein catheterization in infants. *Anesthesiology*. 2007;107(5):720-4.

Shime N, Kato Y, Kosaka T, Kokufu T, Yamagishi M, Fujita N. Glycopeptide pharmacokinetics in current paediatric cardiac surgery practice. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;32(4):577-8

Kato Y, Shime N, Hashimoto S, Nomura M, Okayama Y, Yamagishi M, Fujita N. Effects of controlled perioperative antimicrobial prophylaxis on infectious outcomes in pediatric cardiac surgery. *Cri-*

*t Care Med*. 2007;35(7):1763-8.

谷口彩乃, 梅内貴子, 志馬伸朗, 加藤祐子, 橋本悟. 食道閉鎖症、大動脈縮窄症に高度の先天性気管狭窄症を合併し、呼吸管理に難渋した1症例. *日本集中治療医学会雑誌* 15(4):539-542, 2008.

〔学会発表〕(計3件)

梅内貴子, 志馬伸朗, 加藤祐子, 橋本悟. 肺高血圧を有する乳児先天性心疾患根治術後での早期抜管は術後炎症反応を軽減する. 第30回日本呼吸療法医学会総会, 松本, 2008.7.4

貴志千春, 加藤祐子, 志馬伸朗. 小児静脈穿刺におけるトランスイルミネーション法の有用性を評価するパイロットスタディ. 第55回日本麻酔科学会学術集会, 横浜, 2008.6.12.

梅内貴子, 志馬伸朗, 青木智史, 小坂喜太郎, 橋本壮志, 加藤祐子, 黄瀬ひろみ, 木村彰夫, 天谷文昌, 橋本悟. 診断治療に難渋した小児膿胸の一例. 第12回京滋救命救急セミナー, 京都, 2008.3.21.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 祐子 (KATO H YUKO)

京都府立医科大学・附属病院・専攻医

研究者番号: 50398400