

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300178

研究課題名（和文）ナノバブルと超音波を用いた高効率型遺伝子導入法の末梢血流障害治療への早期応用

研究課題名（英文）Transfection of Kir6.2 channel genes into native vascular smooth muscle using sonoporation

研究代表者

寺本 憲功 (TERAMOTO NORIYOSHI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40294912

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ナノテクノロジーおよびチャネル蛋白質の機能を応用し、四肢の末梢血流障害の改善に向けた低侵襲性の新規遺伝子治療法を開発することを目的とした。気泡膜に内包した『ハイブリッド・ナノバブル』中に『カリウムチャネル遺伝子』を封入し、『ソノポレーション法』を用いて血管平滑筋に非侵襲的遺伝子導入を行なった。導入効率とその機能学的効果について解析し、末梢性血流障害への低侵襲性の新規治療システムを確立した。

研究成果の概要（英文）：

The combination of ultrasound and nano-bubbles coated with lipid bilayers (i.e. hybrid nano-bubbles) induces transient membrane permeability, leading to direct delivery of exogenous molecules (such as plasmid, siRNA, anticancer drugs etc.) into cells with minimal invasion. This method is generally termed as to be a sonoporation technique. When Kir6.2 (inwardly-rectifying K⁺ channel family 6 subtype 2) genes have transfected into native vascular smooth muscle layers of mouse aorta by use of sonoporation, RT-PCR analysis revealed the expression of Kir6.2 transcripts in vascular smooth muscle. When Kir6.2 genes, tagging with Myc-genes, were transfected into native smooth muscle layers using sonoporation, immunohistochemical studies have revealed that Kir6.2 and Myc proteins were co-expressed in vascular smooth muscle cells. The phenylephrine-induced contraction of mouse aorta was significantly reduced after the treatment of Kir6.2 gene-sonoporation, hyperpolarizing the membrane potentials of vascular smooth muscle.

These results suggest that Kir6.2 genes were functionally expressed in mouse vascular smooth muscles, causing a vascular relaxation due to the activity of Kir6.2. Thus, we have succeeded to establish the novel gene-transfected method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：分子薬理学・電気生理学・分子生物学・DDS・ナノ医工学

1. 研究開始当初の背景

(1) K⁺チャネルの生理学的な役割

細胞の恒常性はチャネル、ポンプおよびトランスポーター等の働きによって細胞膜を介して能動的にイオン勾配が形成され、細胞内外に電位差（静止膜電位）が生じることで保たれている。例えばカリウムイオン(K⁺)の細胞内濃度は約 130 mM、一方、細胞外濃度は約 4 mM に保たれ、K⁺チャネルは細胞外へのK⁺の流出を制御し、静止膜電位の維持に対して重要な生理学的な役割を果たしている。

これまで研究代表者(寺本 憲功)は血管平滑筋に存在するK⁺チャネルの特性に関する研究を行ってきた(Teramoto N., J Physiol, 572, 617-624, 2006)。K⁺チャネルが活性化し、開口すると細胞外へのK⁺透過性が亢進する。その結果、細胞膜が過分極し、電位依存性Ca²⁺流入成分が減少し、血管平滑筋は弛緩する。特に内向き整流性K⁺チャネル(Inwardly Rectified K⁺ channels; Kir)の第6ファミリーのサブタイプ2(Kir6.2)は他のK⁺チャネルと比較して開口時間が長く、安定した開口状態を呈する。

研究代表者は、このKir6.2の安定した過分極を示すチャネル特性に着目し、Kir6.2チャネル遺伝子を含むプラスミドDNAを血管平滑筋細胞内に非侵襲的に導入し、血管平滑筋を持続的に弛緩させ、最終的に末梢血流障害の改善に向けて臨床応用が可能であると考えた。また血管内皮と血管平滑筋の両者は互いにギャップ結合蛋白質、コネクシン等を介して強固に結合しており、血管内皮における過分極反応は血管平滑筋に対して受動的に電気現象として伝播し、血管平滑筋は弛緩することが一般的に知られている(Sandow S. L. et al., Cir Res, 90, 1108-1113, 2002)。すなわち、Kir6.2遺伝子を血管腔側から非侵襲的に血管内皮に遺伝子導入した場合でもKir6.2チャネル開口による血管内皮における過分極反応は、コネクシンを介して直ちに電氣的に血管平滑筋に対して伝播し、同様に血管平滑筋は持続的に弛緩する。

(2) ソノポレーションによるイオンチャネル遺伝子の非侵襲的導入法

ナノスケールのデバイスのナノバブルに超音波を照射すると外来遺伝子が、宿主細胞内に無侵襲的に導入される(一般的にソノポレーション法と呼ばれている)。ナノバブルに超音波振動が加わると破砕やキャビテーション気泡を誘起して衝撃波や液体ジェットなどの衝撃圧が発生する。この約1000大気圧と推定される重畳された衝撃圧が宿主の細胞膜に数マイクロ秒間のみ作用し、宿主細胞膜の立体構造を変化させ、一過性に細胞膜表面に小孔を形成し、外来遺伝子は宿主細胞内へ無侵襲的に導入されると考えられている(Kodama T. et al., Ultrasound in Med Biol, 32, 905-914, 2006)。

(3) 医工学原理を応用したナノメディシンの実用化

近年、ステントなどのデバイスの発達に伴い、低侵襲的な血管内療法が血管疾患の治療に対して広く行われている。しかしステントによる治療は、血管壁に対して侵襲的であり、再閉塞の原因となる動脈血栓症や新生内膜肥厚をもたらす。またステント留置には不適切な解剖学的部位もあり、今後、新たな血管内療法や再閉塞予防に向けた治療法が望まれている。これまで血液中で行われてきたソノポレーションは、単にプラスミドDNAとマイクロ気泡を混和させた状態であったため、血中に多量に存在するエンドヌクレアーゼにてプラスミドDNAは、直ちに分解され、遺伝子導入効率が極めて低く臨床応用に結び付いていない。またこれまで国内外において『ナノバブル』、『超音波衝撃』および『イオンチャネルの機能』を組み合わせた遺伝子治療に関する報告は無い。本研究は、臨床応用および他疾患への治療応用の試金石となる基礎医学的研究であり、今後、医工学を応用したナノメディシンの実用化に向けて重要な位置を占めると考えられる。

2. 研究の目的

本研究において、(1) 導入遺伝子(Kir6.2)が血液中のエンドヌクレアーゼで分解されぬように気泡膜に内包したハイブリッド・ナノバブルを作成し、ソノポレーション法にて無侵襲的に導入させ、(2) Kir6.2 チャンネル蛋白質を細胞膜上に新たに発現させ、K⁺チャンネル機能にて平滑筋弛緩反応を引き起こさせることを研究目的とした。また本法の応用しうる適応症としては、四肢末梢血管の狭窄や閉塞を伴う閉塞性動脈硬化症、未だ原因不明の血栓性閉塞性動脈炎(バージャー病)、心血管バイパス移植外科手術後の再建動脈閉塞の原因となる血管攣縮の予防や血管内膜肥厚による血管狭窄の予防などが考えられ、ナノテクノロジーの早期臨床応用に向けた重要な医学的意義を有すると考えられた。

3. 研究の方法

(1) ナノバブルの条件設定と新型ハイブリッド・ナノバブルの開発

キャビテーション気泡の動特性を解明するにはキャビテーション気泡の粒径分布と減衰特性スペクトルの情報が不可欠である。まず水槽実験から超音波照射後のナノバブルの粒径分布を粒度分布測定装置で測定し、次に気泡の音響減衰スペクトルをパルスレーザにて測定する。また破壊時の圧力情報を高周波帯域用マイクロフォンで測定し、離散フーリエ変換(FFT)解析を行った。さらに粒径分布、音響減衰スペクトルおよびFFT解析を基にKeller-Miksisの気泡モデル(Keller J.B. & Miksis M., J Acoust Soc Am, 68, 628-633, 1980)からキャビテーション気泡の動特性を求め、ハイブリッド・ナノバブルを開発・作成した。

(2) 遺伝子導入後の血管組織における分子生物学的解析

Kir6.2 Δ C26C166Sチャンネル遺伝子を含むナノバブルをソノポレーション法にて遺伝子導入後、Kir6.2チャンネル蛋白質が血管平滑筋層または血管内皮層に発現したか否かについてRT-PCR法とウエスタンブロット法を用いてmRNAおよび蛋白質レベルで評価した。また免疫組織化学法にてKir6.2チャンネル

蛋白質の組織学的局在を明らかにした。

(3) 遺伝子導入前後における大腿静脈血管の張力変化に関する機能的解析

微小な筋張力変化が測定可能な装置(ワイヤミオグラフシステム)を用いてマウスから摘出した同一血管平滑筋標本を用い、Kir6.2 Δ C26C166Sチャンネル遺伝子を導入した血管および導入していない血管の各々に対してアゴニスト(ノルエピネフリン、アセチルコリン、高カリウムイオン溶液)投与による収縮反応に対して相違があるか否かについて比較した。

(4) 遺伝子導入前後における血管に関する機能的解析

Kir6.2 Δ C26C166Sチャンネル遺伝子を導入した血管とチャンネル遺伝子を導入していない血管に対して微小電極法を用いて各々の状態での血管平滑筋および血管内皮における膜電位を計測し、遺伝子導入の有無による膜電位の値の相違について比較した。

4. 研究成果

(1) Kir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子の変異体本研究細胞膜移行型Kir6.2チャンネル遺伝子においてであるKir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子(図1: Kir6.2チャンネルのC端側26個のアミノ酸残基を切断したチャンネル遺伝子)を用いた。さらに開口確率を上昇させる目的にてKir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子にポイントミューテーションを入れたKir6.2 Δ C26C166Sチャンネル遺伝子(166番目のシスチン(C)をセリン(S)に置換: 図1)を用いた。

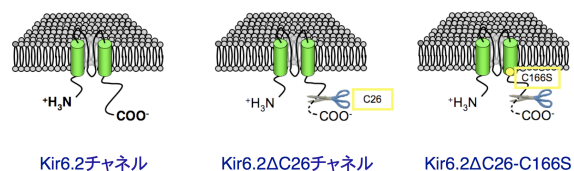


図1 Kir6.2 Δ C26チャンネルの変異体

さらにこのKir6.2 Δ C26C166Sチャンネル遺伝子を新型ハイブリッド・ナノバブル中に封入し、以下の研究に用いた。

(2) ソノポレーション法を用いたKir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子の培養細胞への導入効率

Kir6.2チャンネル遺伝子の末尾にGFP遺伝子配列を連結付加したベクターを作成し、ソノポレーション法にて HEK293 細胞に遺伝子導入した。Kir6.2チャンネル遺伝子を導入した HEK293 細胞では GFP 蛍光が確認されたが、チャンネル遺伝子を含まないベクターを遺伝子導入しても GFP 蛍光は全く観察されなかった (図2)。またその GFP 蛍光について FACS を用いて計測すると Kir6.2チャンネル遺伝子濃度を上昇に伴い、濃度依存的に GFP 蛍光が上昇し、その導入効率は約 20%であった。

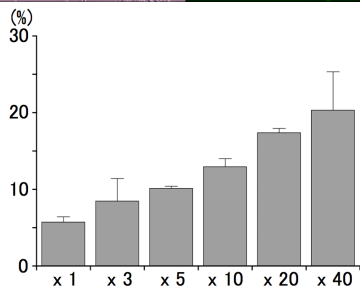
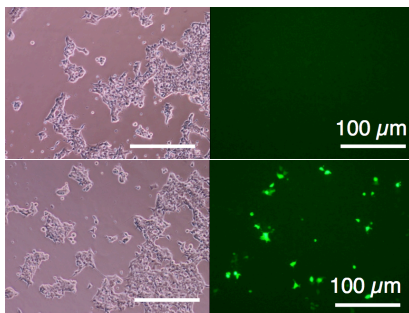


図2 Kir6.2 Δ C26チャンネルの導入効率

(3) 電気生理学的手法であるシングルチャンネル法を用いた単一電流の計測 (機能的解析)

ソノポレーション法を用いて HEK293 細胞に対して Kir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子を遺伝子導入し、パッチクランプ法にて単一電流を記録した。細胞外液/細胞内液共に 140 mM K⁺ という等張性溶液の状態にて記録した。細胞膜の電位を-100 mV に保持すると開口時間の短い約 8 pA の単一電流振幅を有するチャンネル開口が観察された。さらに Kir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子にポイントミューテーションを入れた Kir6.2 Δ C26C166A チャンネル遺伝子 (166 番目のシスチン(C)をアラニン(A)に置換) および Kir6.2 Δ C26C166S チャンネル遺伝子 (166 番目のシスチン(C)をセリン(S)に置換) をソノポレーション法にて HEK293 細胞に対し、遺伝子導入すると同じ電流振幅を有するチャンネル開口時間が長いチャンネル開口が観察された (図3)。

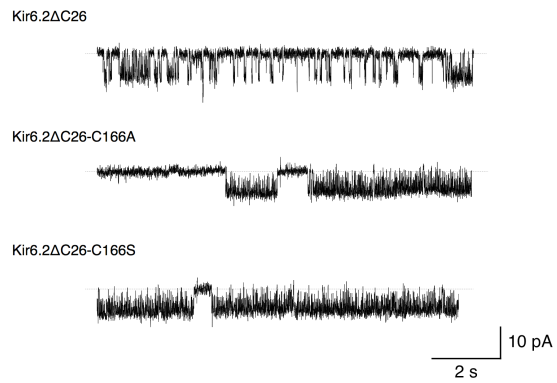


図3 Kir6.2 Δ C26チャンネルのチャンネル開口

また細胞膜の電位を-100 mV から-20 mV まで 10 mV ずつ変化させ、その時の各々の単一電流振幅を計測し、その値と膜電位とをプロットすると直線関係になった。チャンネルコンダクタンスを計測すると約 80 pS となり (図4)、このチャンネルコンダクタンス値はこれまで報告されてきた Kir6.2チャンネルのチャンネルコンダクタンス値とほぼ同じであり、このことはソノポレーション法にて Kir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子が導入され、Kir6.2チャンネルタンパク質が発現し、K⁺チャンネルとして機能していることが強く示唆された。

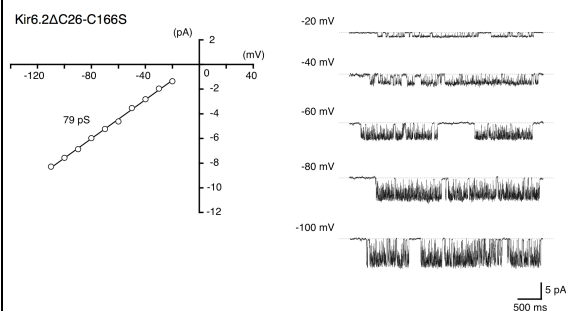


図4 Kir6.2 Δ C26チャンネルの電流-電圧関係

(4) ソノポレーション法を用いた Kir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子の血管組織への導入についての遺伝子およびタンパク質レベルでの解析

次に血管組織に対してソノポレーション法を行い、Kir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子が血管組織に導入されたか否かについて RT-PCR 法にて解析を行った。Kir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子を含む時のみ、Kir6.2チャンネル遺伝子の transcript の存在が確認され、Kir6.2 Δ C26チャンネル遺伝子を含まない遺伝子ベクターをソノポレーション法にて導入しても Kir6.2チャンネル遺伝子の transcript は観察

されなかった (図5)。血管には Kir6.2 チャンネルタンパク質は発現しておらず、RT-PCR 法にて同定された Kir6.2 チャンネル遺伝子の transcript はソノポレーション法にて導入された Kir6.2 Δ C26 チャンネル遺伝子の可能性が示唆された。

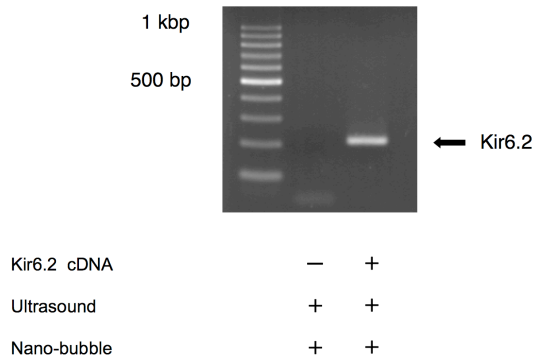


図5 Kir6.2 Δ C26 チャンネルの遺伝子発現

さらに Kir6.2 Δ C26 チャンネル遺伝子の末尾に myc タグを付け、ソノポレーション法にて導入を行い、Kir6.2 チャンネルタンパク質および myc タンパク質の各々に対して特異的に作用する抗体を用いて免疫組織化学染色法でその組織学的局在について解析するために蛍光2次抗体を用いて2重染色を行った (赤色は Kir6.2 チャンネルタンパク質を示し、緑色は myc タンパク質を示す)。ソノポレーション法を行った後、両タンパク質は血管に共存して発現が観察されたが、ソノポレーション法を行わなかった場合には両タンパク質とも検出されなかった (図6)。

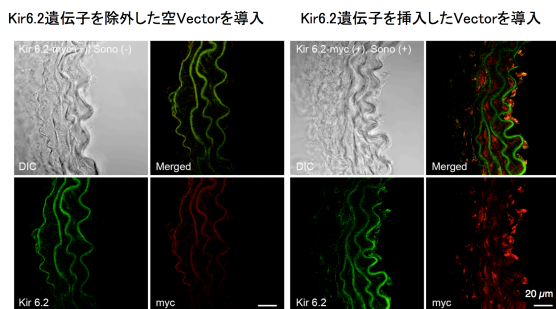


図6 Kir6.2 Δ C26 チャンネルのタンパク質発現

(5) ソノポレーション法を用いた Kir6.2 Δ C26 チャンネル遺伝子の血管組織への導入についての機能学的解析

ワイヤミオグラフィシステムを用いてマイクロテンションを計測した。

Kir6.2 Δ C26 チャンネル遺伝子を含まない空ベ

クター導入時ではフェニレフリンを濃度依存的に投与すると濃度依存性血管収縮反応が観察された (図7)。一方、Kir6.2 Δ C26 チャンネル遺伝子を含むベクターを導入した場合はフェニレフリン投与で全く血管収縮反応が観察されなかった (図7)。このことは Kir6.2 Δ C26 チャンネル遺伝子導入にて Kir6.2 チャンネルが発現し、チャンネル開口にて血管が弛緩したことを示唆する。

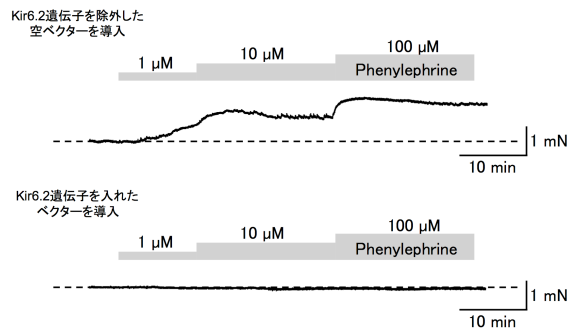


図7 Kir6.2 Δ C26 チャンネルによる弛緩反応

次に血管平滑筋組織の膜電位を微小電極法にて計測した。ソノポレーション操作後、膜電位を計測すると膜電位は約-57 mV であり、一方、Kir6.2 Δ C26 チャンネル遺伝子を含まない空ベクターを導入しても膜電位の値にはほとんど違いは無かった。また Kir6.2 Δ C26 チャンネル遺伝子を含むベクターを導入した時、有意に膜電位が過分極していた (図8)。

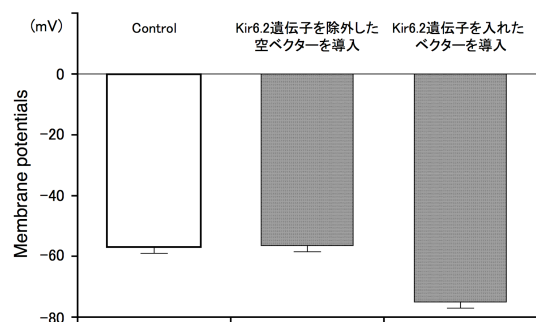


図8 Kir6.2 Δ C26 チャンネルによる過分極反応

(6) まとめ

低侵襲性 *in vivo* 導入法であるソノポレーション法にて Kir6.2 遺伝子は血管に導入され Kir6.2 チャンネルを発現し、そのチャンネル開口にて平滑筋の膜電位を過分極させ、最終的に血管平滑筋を弛緩させた。ソノポレーション法を用いた遺伝子治療は「安心・安全」な医療技術への応用が、今後、期待される。

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12件)

- ① Kodama T、他
Evaluation of transfection efficiency in skeletal muscle using nano/microbubbles and ultrasound.
Ultrasound in Medicine and Biology、査読有、Vol.36、No.7、2010、1196-1205
- ② Zhu HL、他
Characterization of $\text{Na}_v1.6$ -mediated Na^+ currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens.
Journal of Cellular Physiology、査読有、Vol.233、No.1、2010、234-243
- ③ Zhu HL、他
Actions of veratridine on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na^+ currents, $\text{Na}_v1.6$, in murine vas deferens myocytes.
British Journal of Pharmacology、査読有、Vol.157、No.8、2009、1483-1493
- ④ Teramoto N、他
ATP-sensitive K^+ channels of pig urethral smooth muscle cells are heteromultimers of Kir6.1 and Kir6.2.
American Journal of Physiology-Renal Physiology、査読有、Vol.296、No.1、2009、F107-F117
- ⑤ Zhu HL、他
Molecular and biophysical properties of voltage-gated Na^+ currents in murine vas deferens.
Biophysical Journal、査読有、Vol.94、No.8、2008、3340-3351
- ⑥ Zhu HL、他
The actions of propiverine metabolites (M1 and M2) on voltage-dependent Ca^{2+} currents and Ca^{2+} transients in murine urinary bladder.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、査読有、Vol.324、No.1、2008、118-127

[学会発表] (計12件)

- ① 寺本 憲功、久留 和成
ソノポレーション法とチャネル遺伝子を用いた末梢循環障害の新規治療法の確立
第63回 日本薬理学会西南部会、2010年11月26日、鹿児島
Folia Pharmacologica Japonica、42P、B-18
- ② 寺本 憲功
ソノポレーション法とチャネル遺伝子を用いた末梢循環障害の新規治療法の確立
日本機械学会2010年度年次大会、2010年

9月6日、名古屋

日本機械学会論文集、2010、J0203-2-2

- ③ 岩佐 憲臣、寺本 憲功、他
ナノバブルと超音波を用いた K^+ チャネル遺伝子導入による末梢循環障害に対する新規治療法の開発
第110回 日本外科学会、2010年4月10日、東京
日本外科学会雑誌、Vol.111、Supplement 3、血管基礎 OP-267-1
- ④ Iwasa K、他
Transfection of Kir6.2 channel genes into native vascular smooth muscle using sonoporation.
第83回 日本薬理学会年会、2010年3月17日、大阪
Journal of Pharmacological Sciences、112、Supplement 1、96P、02B-1-5

[図書] (計1件)

- ① Wassall RD、Teramoto N、Cunnane TC
Elsevier Limited, Academic Press, New York、査読有
Noradrenaline、2009、1221-1230

[その他]

ホームページ等

<http://evalwww.cc.saga-u.ac.jp/search/IST?ISTActId=FINEJPDdetail&ISTKidoKbn=&ISTErrorChkKbn=&ISTFormSetKbn=&ISTTokenChkKbn=&userId=100000127>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 憲功 (TERAMOTO NORIYOSHI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：40294912

(2) 研究分担者

稲井 哲一郎 (INAI TETSUICHIRO)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：00264044
(H20→H21：連携研究者)

(3) 連携研究者

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)
東北大学・大学院医工学研究科・教授
研究者番号：40271986
伊東 啓行 (ITO HIROYUKI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：40271986