

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591527
 研究課題名（和文） ナノバブルを用いた新規遺伝子治療による細胞外マトリックス制御による内膜肥厚抑制
 研究課題名（英文） Inhibition of intimal hyperplasia by newly developed gene therapy utilizing nanobubble to control extracellular matrix
 研究代表者
 伊東 啓行（ITO HIROYUKI）
 九州大学・大学病院・特任講師
 研究者番号：10346778

研究成果の概要（和文）：

- ① Sonoporation 法による細胞への遺伝子導入の確立
- ② Sonoporation 法による摘出組織への遺伝子導入の確立
- ③ 細胞外基質産生抑制効果を有するアディポネクチン、エプレレノンによる内膜肥厚抑制効果

研究成果の概要（英文）：

- ① Successful gene transfection in desired cells by sonoporation technique
- ② Successful ex-vivo gene transfection into mouse aortic tissue by sonoporation technique
- ③ Inhibition of intimal hyperplasia by adiponectin and eplerenon which has an inhibitory effect for ECM production

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010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：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：外科学一般／血管外科学

キーワード：血行再建、新生内膜肥厚、血管平滑筋細胞、細胞外基質、sonoporation、遺伝子治療、ナノバブル

1. 研究開始当初の背景

1. 新生内膜肥厚研究における細胞外基質 (ECM) 研究の現況

下肢慢性閉塞性動脈疾患に対する血行再建術としては自家静脈グラフトを用いたバイパス手術や、血栓内膜摘除術、血管形成術が行われるが、その長期成績は必ず

しも満足できるものではなく約 20～30% に晩期閉塞がみられる。晩期閉塞の主な原因として考えられている新生内膜肥厚は、血管平滑筋細胞 (VSMC) の中膜から内膜への遊走、内膜での増殖、細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 産生という過程からなると考えられている。その中でも ECM は内膜肥厚成分の約 60-70% を

占めており、ECM の産生制御を可能とすることは新生内膜肥厚を抑制し、血行再建術後の長期成績の改善へとつながると考えられた。

これまでに行われてきた新生内膜肥厚制御の研究においては、主として VSMC 増殖制御に重点がおかれ、ECM 産生制御に重点を置いた研究は少なく、また臨床的に応用されたものは存在しなかった。

2. ECM が血管平滑筋細胞に及ぼす影響

ECM は単に内膜肥厚組織を構成する成分としてのみでなく、VSMC に対する強力な遊走刺激となることが報告されている (Nelson PR et al, J Vasc Surg 1996)。特に血小板由来増殖因子 (PDGF) と同時に刺激を与えると VSMC 遊走に対して相乗的な効果が見られている (Nelson PR et al, J Vasc Surg 1997)。これらの ECM と VSMC との相互反応には ECM のレセプターである integrins、特に VSMC においては $\beta 1$ integrin, $\alpha \beta 3$ integrin が関与しており、ECM と integrins が結合することにより、focal adhesion kinase (FAK) を介して VSMC 遊走の制御がなされている (Itoh H et al, J Vasc Surg 1997)。

一方で、VSMC 増殖に対しても non-receptor tyrosine kinase, Src を介して ECM による相乗的増殖促進の可能性や (Hollenbeck S, Itoh H et al, Biochem Biophys Res Commun 2004)、ECM ゲル内での VSMC 増殖抑制 (Koyama et al, Cell 1997) が報告されており、ECM は VSMC 増殖に対しても重要な増殖促進/抑制因子となりうると考えられていた。

3. ECM に対する増殖刺激とその制御

TGF- β は VSMC において、代表的 ECM、fibronectin の分泌を強力に促進する。また、EGF も fibronectin 分泌に対して刺激となる (Kaiura TL, Itoh H et al, J Vasc Surg 2000)。TGF- β , EGF 刺激による VSMC からの fibronectin 産生は MAPK(ERK1,2), $\alpha \beta 3$ integrin を介することが示されている。一方で TGF- β のシグナルは Smad2, Smad3 をリン酸化することで伝達されることが知られている。これらのシグナル分子が移植自家静脈グラフトや血管形成術後の内膜肥厚巣内における ECM 沈着に直接及ぼす影響と、それにより新生内膜肥厚がどのように制御されているかは解明されて

いなかった。

2. 研究の目的

本研究における主たる目的は、ECM 産生を制御することにより自家静脈グラフト内膜肥厚を抑制することである。その目的のために以下の点を明らかにすることを目的とする。

1. In vitro での TGF β 刺激による fibronectin 産生抑制。

大伏在静脈由来の VSMC において、TGF β シグナルの下流に存在する Smad 2/3 を抑制することで、TGF β による fibronectin 産生が有効に抑制しうるかどうかを検討する。それとともに VSMC における TGF β レセプターである TGF β -I 型レセプター (TGF β -IR) を antisense oligodeoxynucleotide (ODN) 導入によりノックアウトし、in vitro での ECM 産生抑制方法としていずれが優れているかを検討する。

2. 自家静脈グラフト内膜肥厚、動脈内膜擦過後内膜肥厚における TGF β の役割

TGF β は in vitro に於いては ECM 産生を促進する一方、VSMC の増殖、遊走を抑制すると報告されている。新生内膜肥厚に対しては相反する効果を有すると考えられており、生体内での働きは複雑である。上記 1 の結果 TGF β シグナルを有効にブロックしうると考えられる分子の遺伝子を自家静脈に ex vivo で導入し、これを自家静脈グラフトとして動脈に移植し、新生内膜肥厚の程度を検討する。同様に動脈バルーン擦過モデルにも遺伝子導入を行い、血管形成術後内膜肥厚に関しても検討する。

また、この TGF β シグナルがブロックされた自家静脈グラフトを当教室が開発した低 shear stress モデルに移植することで TGF β の作用が血行動態で影響を受けるか否かを検討する。

3. TGF β シグナルをブロックすることによる新生内膜肥厚における ECM 沈着の抑制効果とそれによる VSMC 増殖への影響

上記で作成した自家静脈グラフトにおいて内膜肥厚巣における ECM 沈着が抑制されているかどうかを定量する。また、ECM 沈着が抑制されたことで内幕肥厚巣における VSMC の増殖がどのように影響されたかについても評価する。

3. 研究の方法

《In vitroでのTGFβ刺激によるfibronectin産生》

1. ヒト大伏在静脈より血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) を培養する。
2. **TGF-βI receptor** に対する antisense ODN、TGF-βシグナルを下流に伝達する **Smad2**、**Smad3** に対する antisense ODN を作成する。
3. **Nanobubble** を用いた **Sonoporation** によりこれらの ODN を VSMC に導入し、TGF-β刺激により、培養液中に分泌された fibronectin 産生を Western blotting にて評価する。

《自家静脈グラフト、および動脈内膜擦過後内 膜肥厚におけるTGFβの役割》

1. ウサギ大腿静脈を採取し、**Sonoporation 法**を用いて TGF-βI レセプターに対する antisense ODN、Smad2、Smad3 に対する antisense ODN、scrambled ODN を導入する。
2. 各種 ODN を導入したウサギ大腿静脈を自家静脈グラフトとして大腿動脈に移植・間置する。
3. 移植後4週で自家静脈グラフトを摘出し、自家静脈グラフト内膜肥厚を評価する。
4. 動脈内膜擦過モデル：ウサギ大腿動脈を露出し、これに 2Fr バルーンカテーテルを挿入して内膜を擦過する。血流再開前に内腔に上記と同様の各種 ODN/nanobubble 溶液を注入、sonoporation 法によって動脈壁に ODN を導入する。4週後に内膜肥厚の評価を静脈グラフトの場合と同様に行う。

《自家静脈グラフト、バルーン擦過動脈の肥厚 内膜におけるECM産生制御》

1. 自家静脈グラフト、バルーン擦過動脈における内膜肥厚巣において**各種ECM**につき、免疫組織化学的手法により検討する。
2. 肥厚内膜における **TGF-βI receptor**、**Smad2**、**Smad3** の mRNA 発現を検討し、sonoporation による遺伝子導入効果について検証する。
3. 同様に肥厚内膜内の各種 ECM についてタンパク量を Western blotting にて、mRNA を Northern blotting にて半定量化し、TGF-βシグナル抑制による肥厚内膜内 ECM 産生についてその効果を検討

する。

4. 肥厚内膜内における VSMC の増殖について PCNA 染色を用いて評価する。

《血行動態の変化による TGF-βシグナルの修飾と、肥厚内膜におけるECM産生》

1. ウサギ大腿動脈に **low shear stress**、**low blood flow rate** モデルを作成。血流が安定する2週後にODNを導入した大腿静脈グラフトを移植する。
2. 4週後に静脈グラフトを摘出。正常血流肢、低血流肢とのあいだで新生内膜肥厚巣中における各種 ECM 沈着について組織学的、分子生物学的に検討を加える。
3. TGF-β、Smad2、Smad3 の発現を免疫組織化学的、および Western blotting、Northern blotting にて検討し、血行動態が TGF-βシグナル伝達に及ぼす影響について検討する。

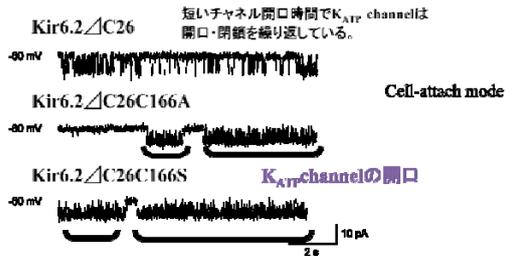
《自家静脈グラフト、および動脈内膜擦過後内 膜肥厚における、ECM産生に影響を及ぼす薬 剤の効果》

1. ウサギをコントロール群とピオグリタゾン投与群に分け、手術1週間前より薬剤入りの餌を開始する。頸動脈に外頸静脈をグラフトとして移植し、術後28日目に静脈グラフトを採取、内膜肥厚を評価する。
2. 2Fr バルーンカテーテルをラット頸動脈に挿入し、内膜擦過する。選択的アルドステロン受容体拮抗薬で、ECM 産生抑制効果が認められているエプレレノンをブルニックに溶解し、頸動脈外膜側に塗布する。術後2週間めに内膜肥厚を評価する。

4. 研究成果

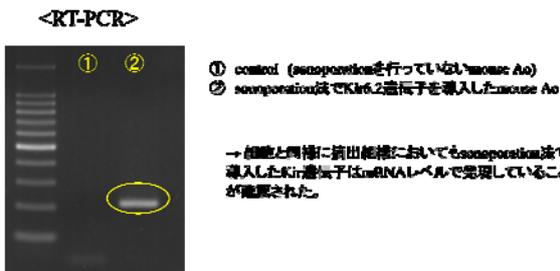
① Sonoporation 法による細胞への遺伝子導入の確立

細胞における sonoporation を用いた遺伝子導入効率を向上させるべく、平滑筋細胞に先立ち、条件設定を行う意味で HEK293 細胞を用いて Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子導入実験をまず行った。HEK293 細胞に対してナノバブルに各種濃度の GFP 遺伝子を加え、超音波照射を行ったところ、遺伝子濃度を上昇させることによって、約 20% 程度の遺伝子導入効率を得ることができた。また、この内因性カリウムチャンネルを持たない HEK293 細胞にカリウムチャンネル遺伝子を導入したところパッチクランプ法にて、遺伝子導入されたカリウムチャンネルが機能していることが証明できた。



② Sonoporation 法による摘出組織への遺伝子導入

次に摘出した血管組織（動脈・静脈）に対して sonoporation による遺伝子導入を行った。マウス大動脈組織を摘出し、摘出した標本に sonoporation 法にて LacZ 遺伝子、Myc-Kir 遺伝子あるいは Kir 遺伝子を導入。DMEM (FBS -), plasmid-DNA 20 μ g, Bubble 40 μ l 溶液で満たし、24 穴プレートにて、超音波照射 (frequency 2MHz, duty ratio 50%, intensity 2.5W/cm², time 20sec)。LacZ 遺伝子を導入したものは、48 時間後に組織固定・染色を行い、さらに 24 時間後に評価する。K⁺チャンネル遺伝子を導入したものは 48 時間後に張力を測定した。



Kir 遺伝子 (K⁺チャンネル遺伝子) を導入したマウスの大動脈は control と比べて収縮反応の減弱が疑われた。

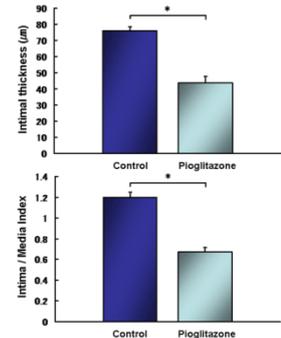
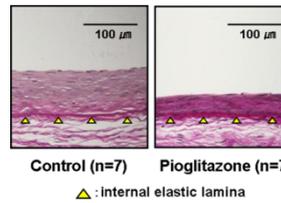
③ アディポネクチン分泌亢進による自家静脈グラフト内膜肥厚抑制効果

ウサギ頸動脈に外頸静脈を静脈グラフトとして移植し、これに ECM 産生抑制効果を有するアディポネクチン分泌亢進効果を有するピオグリタゾン投与した。

ピオグリタゾンによる内膜肥厚抑制効果

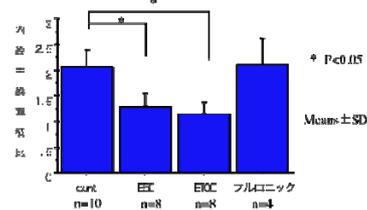
Pioglitazone inhibits intimal hyperplasia.

Elastica Van Gieson Stain



* Results are expressed as the mean \pm SEM. P < 0.01

④ECM 産生抑制効果を有するアルドステロン受容体拮抗薬によるバルーン擦過による内膜肥厚の抑制効果



Cont: コントロール群 EEC: エプレレノン 50 μ g 投与群 EEC+フルロニック: エプレレノン 50 μ g 投与群 + フルロニック投与群

⇒エプレレノンの投与によって、有意に新生内膜肥厚は抑制された。

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 5 件)

1. Matsumoto T, Iwasa K, Kyuragi R, Honma K, Guntani A, Ohmine T, Itoh H, Onohara T, Maehara Y. The efficacy of oral beraprost sodium, a prostaglandin I₂ analogue, for treating intermittent claudication in patients with arteriosclerosis obliterans. *Int Angiol.* 2010 Apr;29(2 Suppl):49-54.
2. 伊東啓行, 米満吉和, 井口博之, 福永亮大, 松本拓也, 前原喜彦. 重症虚血肢に対する血管新生遺伝子療法の実況と問題点. *血管外科*; 28(1); 21-26, 2009.
3. 伊東啓行, 米満吉和, 井口博之, 福永亮大, 高井真紀, 岩佐憲臣, 本間健一, 吉田久美, 居石克夫, 前原喜彦. 慢性重症虚血肢に対する FGF2 遺伝子搭載センダイウイルスベクターを用いた新規血管新生遺伝子治療臨床研究: 中間報告. *脈管学*; 50: 309-314, 2010
4. 間野洋平, 福永亮大, 伊東啓行, 本間健一, 井口博之, 前原喜彦. 総大腿動脈外膜囊腫の 1 例. *日本血管外科学会雑誌* 18; 673-676, 2009

5. 諸富洋介、伊東啓行、井口博之、内山秀昭、米満吉和、前原喜彦。多発性内臓動脈瘤に対する1手術例。日本血管外科学会雑誌 19; 17-21, 2010

〔学会発表〕(計1件)

1. 第109回日本外科学会定期学術集会(2009年4月2日、福岡)シンポジウム(1)外科領域における遺伝子治療・再生医療の問題点と今後の展開
慢性重症虚血肢に対する FGF2 遺伝子搭載センダイウイルスベクターを用いた革新的血管新生遺伝子治療臨床研究：第2報
伊東啓行、米満吉和、井口博之、福永亮大、吉田久美、居石克夫、前原喜彦

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 啓行 (ITO HIROYUKI)
九州大学・大学病院特任講師
研究者番号：10346778

(2) 研究分担者

寺本 憲功 (TERAMOTO NORIYOSHI)
佐賀大学医学部 薬理学教授
研究者番号：40294912

(3) 連携研究者

井口 博之 (INOBUCHI HIROYUKI)
九州大学・大学病院医員
研究者番号：20432940