

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791308

研究課題名（和文） 骨髄由来平滑筋細胞を標的とした病的血管リモデリングに対する遺伝子治療

研究課題名（英文） Gene therapy for pathological vascular remodeling targeting bone marrow-derived smooth muscle progenitor cells.

研究代表者

松野 幸博（MATSUNO YUKIHIRO）

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10542409

研究成果の概要（和文）：

骨髄由来平滑筋前駆細胞を標的とし超音波・遺伝子封入ナノバブル法を用いて、病的血管リモデリングに対する遺伝子治療効果を実験的に検討した。in vitro における遺伝子導入および発現実験として、GFP 遺伝子を in vitro にて超音波遺伝子導入法により COS 細胞へ導入し、その遺伝子発現を ELISA 法、蛍光顕微鏡下で確認した。また in vivo での効果・発現実験としてラット頸動脈へ導入し、その遺伝子発現を蛍光顕微鏡下で確認した。今後、遺伝子封入ナノバブルの作成および同方法による機能性遺伝子を用いた効果・発現実験を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：

We investigated gene therapy for pathological vascular remodeling targeting bone marrow-derived smooth muscle progenitor cells. In vitro study, green fluorescent protein (GFP) gene was transferred to COS-7 cells using sonoporation and the expression was confirmed by Western blotting and fluorescence microscopy. In vivo study, GFP gene was transferred to rat carotid artery and the gene expression was confirmed by fluorescence microscopy. We will prepare nano-bubbles and evaluate the further effects using a functional gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：心臓血管外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

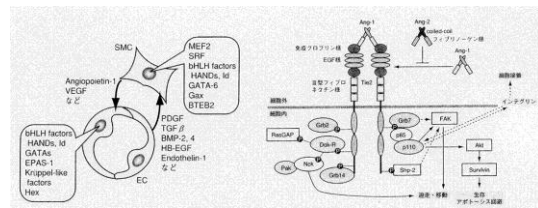
キーワード：遺伝子治療、血管リモデリング、超音波、ナノバブル、平滑筋前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化、血管形成術後再狭窄、バイパス術後グラフト狭窄などの循環器領域における増殖性血管病変において、平滑筋細胞の過剰な増殖を主体とした病的血管リモデリングが認められる。その病態に関する詳細は現在のところ不明であり、有効な治療法は確立していない。血管リモデリングは血行動態の変化ないしは液性因子の作用に反応して生じる血管構築の変化であり本来適応現象とみなされるが、しばしば病的結果をもたらす。従来、中膜平滑筋細胞が形質転換し内皮下へ遊走し、増殖と細胞外基質産生によって病変を形成し平滑筋に分化し増殖することが示唆されている。したがって、病的血管リモデリングに対する治療戦略としては、骨髄由来の平滑筋前駆細胞を標的とすべきであると考えられる。

一方、血管形成の分枝メカニズムに関する研究において、アンジオポイエチン-1/チロシンキナーゼ型レセプターシステム(以下、Ang-1/TIE2)が平滑筋細胞の分化・増殖に重要な働きをしていることが示唆されている。Ang-1は分化初期の血管平滑筋細胞などから産生され、傍分泌的に血管内皮細胞上に発現するTIE2(tyrosine kinase with Ig and EGF homology domain 2)に結合する。その結果、血管内皮細胞が活性化されPDGF、TGF- β などの増殖因子を産生し、これらのシグナルを介して平滑筋が内皮細胞周囲に遊走することで未分化間葉細胞から分化し、正常な血管形成が行われることが解明されている。これらのことから、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞はそれぞれの分化・増殖・機能発現の過程において、前駆細胞の段階から相互作用を及ぼし合っていることが示唆される。従って、これらの血管形成に関わる分子メカニズムを

応用し、本来適応現象であるはずの血管構築の変化に異常を生じた病的血管リモデリングに対して、Ang-1による血管内皮細胞に対する初期の刺激を阻害することができれば、平滑筋細胞の内皮細胞周囲への過剰な遊走を阻止でき、その結果病的血管リモデリングを制御することが可能であると考えられる。



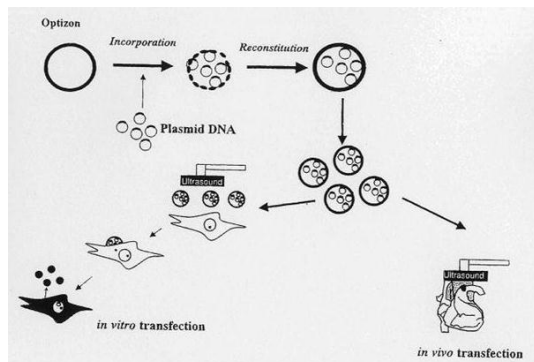
2. 研究の目的

本研究では、上述の Ang-1/TIE2 システムを標的とし、遺伝子工学的に作成した TIE2-Ig 遺伝子を傷害血管局所へ効率的に導入することで病的血管リモデリングを制御することを目的とする。

動脈硬化、血管形成術後再狭窄、バイパス術後グラフト狭窄などの平滑筋細胞の増殖を主体とした病的血管リモデリングは、骨髄細胞が流血中に前駆細胞として動員されたのち傷害血管に遊走・定着し、平滑筋に分化し過剰に増殖することによって生じると考えられている。この内皮細胞への遊走前段階で、血管形成の分子メカニズムに重要であるとされる Ang-1/TIE2 システムを標的として病的な血管リモデリングを制御することにこの研究の特色がある。

本研究の独創的な点は、血管内皮細胞に対する独自に開発しようとする遺伝子デリバリーシステムにある。つまり近年のナノテクノロジーを応用し、細胞レベルの精度で遺伝子導入を“狙い撃ち”できるナノバブルを使用する。具体的には、超音波造影剤に含まれるナノバブルの内部へ TIE2-Ig 遺伝子を封入

し、超音波のもつキャビテーション作用によりバブルを破壊することで血管内腔から血管内皮細胞へ効率的に遺伝子導入を行うことにある。この超音波・遺伝子封入マイクロバブル法により血管内皮細胞へ TIE2-Ig 遺伝子を効率良く導入し、流血中の骨髓由来平滑筋前駆細胞から産生される Ang-1 を競合的に阻害することで平滑筋前駆細胞の血管内皮細胞周囲への遊走を阻止し、病的な血管リモデリングの制御が確立される。また、この超音波・遺伝子封入ナノバブル法は、超音波装置として血管内超音波カテーテルを用いることにより、診断用超音波で血管内腔を観察した後にカテーテル先端からターゲットとなる組織に局所選択的にバブルを集積させ、治療用超音波エネルギーに変換することでバブルを破壊し、その部位で遺伝子導入が行える。



3. 研究の方法

遺伝子導入法としては、以前より当教室に行っている非ウイルスベクター法を応用し発展させた「超音波・遺伝子封入ナノバブル法」を用いる。具体的には、超音波造影剤に含まれるナノバブルの内部へ TIE2-Ig 遺伝子を封入したものを目的部位へリリースし、超音波のキャビテーション作用によりバブルを破壊することで血管内腔から血管内皮細胞へ効率的に遺伝子導入を行う。遺伝子導入された血管内皮細胞がその部位で TIE2-Ig

タンパクを高発現・高分泌させることで、骨髓由来の平滑筋前駆細胞から産生される Ang-1 を競合的に阻害し、病的な血管リモデリングを制御できるか否かを検討する。

1) in vitro における GFP (green fluorescent protein) 遺伝子導入および導入遺伝子発現の確認

in vitro にて超音波遺伝子導入法を用いて COS 細胞へ導入し、その遺伝子発現を ELISA 法、蛍光顕微鏡下で確認する。

2) TIE2-Ig 遺伝子の構築

cDNA より TIE2 の細胞外ドメイン領域を有する遺伝子を精製し、PCR 法を用いて TIE2 遺伝子を増幅する。その後、免疫グロブリン Fc 領域を有するクローニングベクター内へ挿入し、TIE2-Ig 遺伝子を構築する。また同時に、遺伝子発現とそのパターンを検討するために、TIE2 遺伝子の下流に蛍光タンパク質である GFP 遺伝子を挿入し構築した TIE2-GFP 遺伝子を作製する。

3) TIE2-Ig 遺伝子封入ナノバブルの作製

ナノバブル内へ TIE2-Ig 遺伝子を封入する。この際、バブルの殻の素材としてポリマーを用いて膜の厚みを変えた数種類のバブルを作製し、それぞれの遺伝子導入効率について比較検討する。

4) in vitro における遺伝子導入および導入遺伝子発現の確認

2) で構築した TIE2-Ig, TIE2-GFP 遺伝子を *in vitro* にて超音波・遺伝子封入ナノバブル法により COS 細胞へ導入し、その遺伝子発現を ELISA 法、蛍光顕微鏡下で確認する。同時に導入遺伝子の発現量および発現期間についての検討を行う。GFP 遺伝子発現量

の定量化および経時的変化を確認する。

5) in vivoにおけるGFP遺伝子導入および導入遺伝子発現の確認

in vivo における遺伝子導入および発現実験として、GFP 遺伝子を超音波遺伝子導入法によりラット頸動脈へ導入し、その遺伝子発現をELISA法、蛍光顕微鏡下で確認する。

6) in vivoにおける超音波・遺伝子封入ナノバブル法の有効性に関する検討

ラット大腿動脈よりルシフェラーゼ遺伝子を封入した超音波造影剤を注入し、その後下肢へ超音波照射を行うことで、血管内皮細胞への遺伝子導入を行う。その発現量をルシフェラーゼ活性を測定することで確認し、in vivo における至適条件設定に関し検討する。同様の検討をラット冠動脈においても行う。

4. 研究成果

1) in vitro における GFP (green fluorescence protein) 遺伝子導入および導入遺伝子発現の確認

in vitro にて超音波遺伝子導入法を用いてCOS細胞へ導入し、その遺伝子発現をELISA法、蛍光顕微鏡下で確認した。

2) in vivoにおけるGFP遺伝子導入および導入遺伝子発現の確認

in vivo における遺伝子導入および発現実験として、GFP 遺伝子を超音波遺伝子導入法によりラット頸動脈へ導入した。その遺伝子発現を蛍光顕微鏡下で確認した。今後、遺伝子封入ナノバブルの作成および同方法による機能性遺伝子を用いた効果・発現実験を行う予定である。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 幸博 (MATSUNO YUKIHIRO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10542409

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：