

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591070

研究課題名(和文) マイクロRNAを標的とした心筋再生療法に関する研究

研究課題名(英文) Myocardial regeneration by targeting to microRNA

研究代表者

大谷 肇 (OTANI, Hajime)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60168979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA (MiR)-92aを標的とした心筋再生医療を試みた。ラットの左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作成し、梗塞巣にアンタゴミア92a含有生体吸収性ゼラチンハイドロゲルパッチ(Ant-92aパッチ)を達着した。Ant-92aパッチはパッチ単独またはAnt-92aのスクランブルオリゴヌクレオチドを含有したパッチと比較して梗塞巣において内皮細胞の増殖、心筋幹細胞の梗塞巣への集積、心筋細胞の増殖を増加させた。Ant-92aパッチ群では梗塞瘢痕組織は縮小し、左室機能は改善した。Ant-92aパッチは心筋梗塞後の血管新生と心筋再生を促し、心筋再生医療として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether controlled release of antagomir designed to inhibit microRNA-92a leads to enhanced blood vessel growth and functional recovery after myocardial infarction (MI) in rats. There was no difference in LV wall motion between rats with the antagomir-92a patch and the patch alone 1 hour after MI. However, myocardial thinning was inhibited, and LV wall motion was improved 3 days after MI in rats with the antagomir-92a patch. Myocardial fibrosis was reduced by the antagomir-92a patch 14 days after MI. Angiogenesis within the infarct area was increased by the antagomir-92a patch associated with enhanced cardiomyogenesis. The patch alone or the patch impregnated with antagomir-Co had no effect on LV wall motion, myocardial fibrosis, angiogenesis and cardiomyogenesis after MI. These results suggest that controlled release of antagomir-92a using gelatin hydrogel microspheres-incorporated patch is an effective tool for cardiac regeneration therapy after MI.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋再生

1. 研究開始当初の背景

心筋再生医療は末期心疾患に対する画期的な治療法として注目されている。再生医療は大別すると、細胞治療と分子治療に分類される。細胞治療には骨髄または末梢血単核球、造血系幹細胞、間葉系幹細胞、筋芽細胞、心筋幹細胞がソースとなっているが、今後は iPS 細胞も有望である。これらの細胞は直接心筋内に注入するか、シートに培養して組織に張り付けるか、カテーテルで冠動脈内に注入するといった方法で導入される。一方、分子治療には血管内皮増殖因子やケモカインを用いたり、血管新生抑制的に働くメッセンジャー RNA をサイレンシングする方法があるが、血管新生のプロセスは複雑であり、これら単一の分子を標的にした分子治療には限界がある。

2. 研究の目的

我々は血管新生におけるマイクロ RNA の多彩な生物学的作用に注目した。マイクロ RNA は 20 から 25 の塩基からなるオリゴヌクレオチドで、その働きはタンパク質の翻訳ではなく、いくつかの関連したタンパク質発現の抑制にある。したがって、一つのマイクロ RNA を標的にすることによって一つの生物学的現象を統合的に制御することができる。その中でも我々は心血管系の発育に関わるマイクロ RNA に着目した。

転写因子がプロモーター領域に結合すると、まず primary RNA として転写される。Primary microRNA は drosha の働きで pre microRNA に変換され、次に dicer の働きでマイクロ RNA に変換される。一つのマイクロ RNA は関連した多数の mRNA に結合し、その翻訳を抑えるか、分解を促進する。我々は血管新生促進的に働くマイクロ RNA のうちで、mir17-92 集合体に注目した。

mir17-92 集合体の発現は心筋梗塞巣で VEGF, FGF, HGF といった血管内皮増殖因子によって活性化されるガン遺伝子、そして山中

遺伝子の一つである c-Myc によって亢進する。これら 6 つのマイクロ RNA のうち、mir92a のみが血管新生抑制的に働くというユニークな機能を持っている。そこで、mir92a に対して相補的に結合するアンタゴミアを用い、mir92a を選択的に阻害することは有効な血管新生療法になりうると考えられた。

しかし、アンタゴミアのようなオリゴヌクレオチドは組織に導入されても直ちに分解される。そこで我々は、長期間、安定的にアンタゴミアを組織で作用させるために、生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを開発した。ゼラチンハイドロゲルが徐々に組織で吸収される時、そこに含まれるアンタゴミアも徐々に放出されると予想される。薬剤動態を調べると、単独では 1-2 日で消失する薬剤もゼラチンハイドロゲルに含ませると約 2 週間かけて徐々に放出されることがわかった。そこで我々は、生体吸収性ハイドロゲル粒子にアンタゴミアを結合させたパッチを用いて、心筋梗塞巣局所で持続的にアンタゴミア 92a を徐放させる局所投与方法の有用性を検討した。

3. 研究の方法

生後 12 週齢の雄 S-D ラットを全身麻酔、調節呼吸下に左肋間開胸して心臓を露出し、左前下行枝を起始部で結紮して心筋梗塞を作成した。アンタゴミア投与群では左冠動脈結紮直後生体吸収性ハイドロゲル粒子結合アンタゴミアパッチ(アンタゴミア 100 μg 含有)を梗塞巣心外膜に縫着した。対照としてパッチのみと mismatch アンタゴミアを結合したパッチを同様に縫着した。分裂細胞を評価する実験では、これらのパッチに BrdU (1 mg) を添加した。鎮痛薬として buprenorphin (0.1 mg/kg)を皮下注射後閉胸、心筋梗塞作成 1 時間後に心エコー(GE 社製 Vivid 7)で左室壁運動スコアを測定して梗塞危険領域の程度に差のないことを確認した。心筋梗塞作成後 24 時間、14 日で心エコーにて左室機能を評価した後、過量のペントバルビタールを腹

腔内投与してラットを犠牲死させた。

4. 研究成果

アンタゴメア 92a パッチの血管新生促進効果

ゼラチンハイドロゲルパッチが血管新生におよぼす影響を検討すると、細胞増殖の指標である BrdU を取り込んだ CD31 陽性の内皮細胞は、非梗塞領域 (Non infarct area) では認められなかったが、アンタゴメア 92a パッチを貼り付けた心筋では梗塞3日後に BrdU 陽性の内皮細胞が多数出現しているのが認められた (図 1A)。その数は、パッチ単独 (GHM) またはアンタゴメア 92a (Ant-92a) のスクランブルオリゴであるアンタゴメアコントロール (Ant-C) に比較して有意に多いことが定量的計測で明らかになった。また、梗塞2週間後の毛細血管密度を比較しても、アンタゴメア 92a パッチ縫着群が開胸手術のみを行った Sham、パッチ単独やアンタゴメアコントロール群と比較して有意に高いことがわかった (図 1 B)。

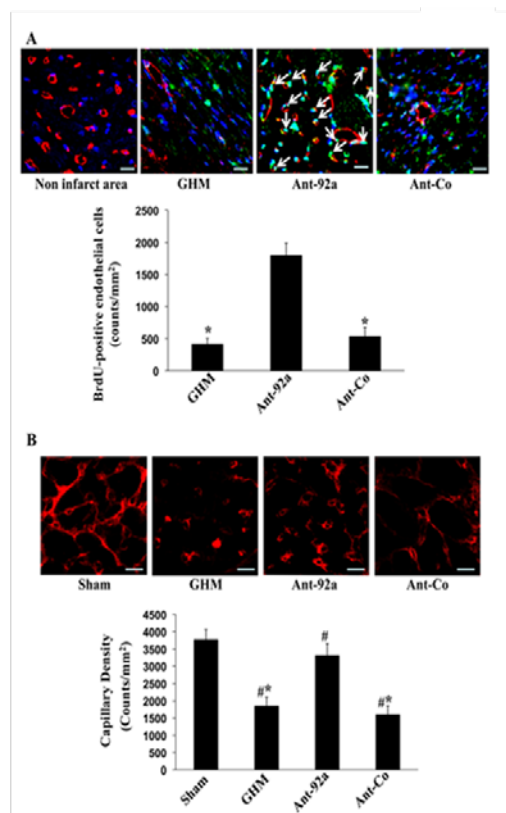


図 1. アンタゴメア 92a パッチの血管新生促進効果

A. 赤 ; CD31 陽性内皮細胞, 緑 ; BrdU 陽性

増殖細胞, 青 ; DAPI 陽性細胞核

B. 赤 ; 毛細血管

矢印 ; 増殖内皮細胞

*p<0.05 vs Ant-92a, #p<0.05 vs Sham

アンタゴメア 92a パッチの心筋幹細胞増殖効果

アンタゴメア 92a パッチによる血管新生の増加は心筋幹細胞の増殖を伴っていた。BrdU を取り込んだ c-kit 陽性の心筋幹細胞は、非梗塞領域では認められなかった (図 2)。これに対して心筋幹細胞はアンタゴメア 92a パッチを添付した梗塞巣で3日後に著明に増加しているのが確認された。一方、BrdU 陽性の心筋幹細胞はパッチ単独群やアンタゴメアコントロール群ではほとんど認められなかった。

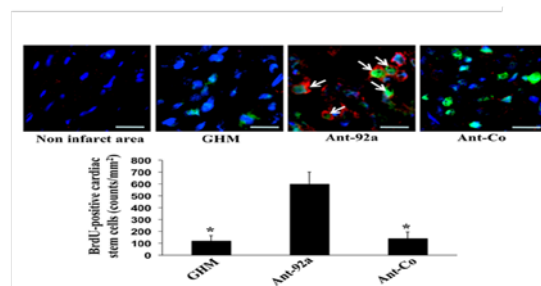


図 2. アンタゴメア 92a パッチの心筋幹細胞増殖効果

赤 ; c-kit 陽性心筋幹細胞, 緑 ; BrdU 陽性増殖細胞, 青 ; DAPI 陽性細胞核

矢印 ; 増殖心筋幹細胞 p<0.05 vs Ant-92a

アンタゴメア 92a パッチの心筋再生促進効果

心筋幹細胞の増殖は心筋再生を伴っていた。BrdU を取り込んだ心筋細胞は、非梗塞領域では認められなかった (図 3)。これに対してアンタゴメア 92a パッチを貼付した梗塞巣では2週間後に BrdU 陽性の小型心筋細胞が増加し、これらの細胞が梗塞巣の中で大きな島を形成しているのが確認された。一方、パッチ単独群やアンタゴメアコントロール群では BrdU 陽性の心筋細胞の島はほとんど認められなかった。

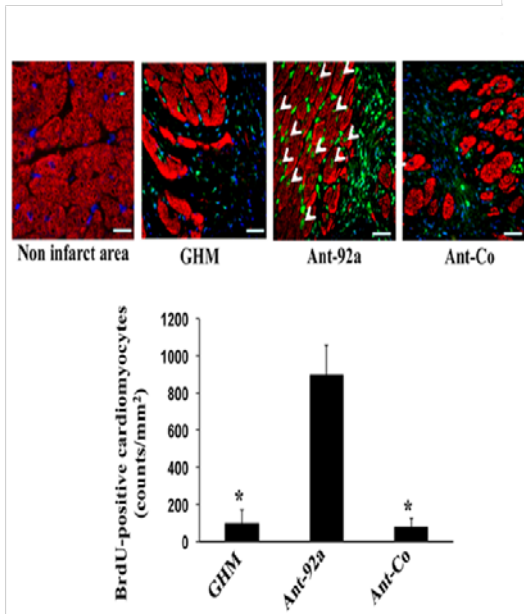


図3. アンタゴミア 92a パッチの心筋再生促進効果

赤；心筋細胞，緑；BrdU 陽性増殖細胞，
青；DAPI 陽性細胞核
矢印；増殖心筋細胞
p<0.05 vs Ant-92a

アンタゴミア 92a パッチの心筋線維化抑制効果

アンタゴミア 92a パッチを貼付した梗塞巣ではこのような心筋再生に伴って繊維化は抑制され、2 週間後の梗塞サイズはパッチ単独群やアンタゴミアコントロール群と比較して有意に小さいことがわかった (図4)。

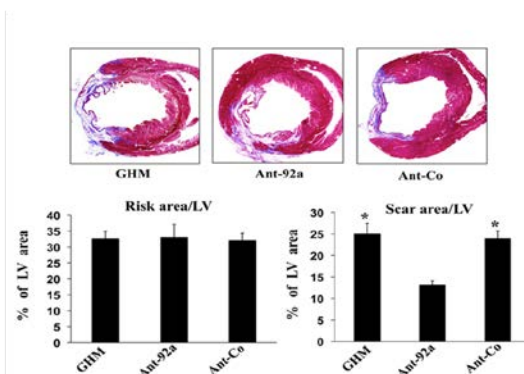


図4. アンタゴミア 92a パッチの心筋線維化抑制効果

赤；心筋組織，青；線維化組織
Risk area；梗塞危険領域，LV；左室容積，

Scar area；線維化組織

p<0.05 vs Ant-92a

アンタゴミア 92a パッチの心筋リモデリング抑制効果

左室壁運動異常 (Wall motion score index)は梗塞1時間後では各群で差を認めなかったが、梗塞2週間後にはアンタゴミア 92a パッチを貼付した左室の壁運動異常はパッチ単独群やアンタゴミアコントロール群と比較して有意に抑制されていた (図5 A)。

梗塞2週間後の左室リモデリングの程度を比較すると、左室拡張終期径 (LVDd)の拡大は、アンタゴミア 92a パッチ貼付群がパッチ単独群やアンタゴミアコントロール群と比較して有意に抑制されていた (図5 B)。また、左室収縮能の指標である%FS もアンタゴミア 92a パッチ貼付群がパッチ単独群やアンタゴミアコントロール群と比較して有意に改善していた (図5 C)。

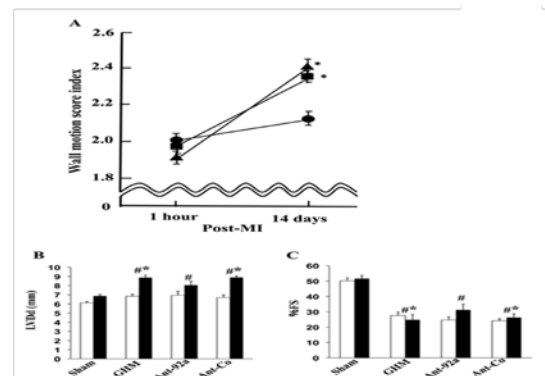


図5. アンタゴミア 92a パッチの心筋リモデリング抑制効果

*p<0.05 vs Ant-92a, #p<0.05 vs Sham

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 1 件)

Antagomir-92a Impregnated Gelatin Hydrogel Microsphere Sheet Enhances Cardiac Regeneration after Myocardial Infarction in Rats.

Masanori Fujita, Hajime Otani, Masayoshi Iwasaki, Kei Yoshioka, Takayuki Shimazu, Ichiro Shiojima, Yasuhiko Tabata.

Experimental & Clinical Cardiology. 査読有. Vol. 20, 2014, pp 1762-1787.

[学会発表] (計 4 件)

(1) マイクロ RNA92a を標的とした心筋再生医療

大谷 肇, 藤田昌哲, 岩崎真佳, 藤高啓祐, 塩島一朗, 田端泰彦.

第 13 回日本抗加齢医学会総会. 2013 年 6 月 28 日. 横浜市 (パシフィコ横浜)

(2) Cardiomyocyte Regeneration after Myocardial Infarction through Upregulation of Integrin Alpha5.

Masanori Fujita, Hajime Otani, Takayuki Shimazu, Kei Yoshioka, Toru Okazaki, Daisuke Sato, Masayoshi Iwasaki, Toshiji Iwasaka, Yasuhiko Tabata.

第 76 回日本循環器学会学術集会. 2012 年 3 月 17 日. 福岡市 (福岡国際会議場)

(3) Inhibition of MicroRNA-92a Enhance Angiogenesis and Cardiomyocyte Regeneration through Integrin α 5-dependent Accumulation of Cardiac Stem Cells into the Infarcted Myocardium.

Masanori Fujita, Hajime Otani, Takayuki Shimazu, Kei Yoshioka, Toru Okazaki, Daisuke Sato, Masayoshi Iwasaki, Toshiji Iwasaka, Yasuhiko Tabata.

American Heart Association Scientific Session 2011. 2011 年 11 月 15 日.

アメリカ, フロリダ州 Orlando (Orlando コンベンションセンター).

(4) Regeneration of the Heart by Controlled Release of Antagomir-92a Using Gelatin Hydrogel Microspheres-incorporated Patch in Rats with Myocardial Infarction.

Masanori Fujita, Hajime Otani, Takayuki Shimazu, Kei Yoshioka, Toru Okazaki, Daisuke Sato, Masayoshi Iwasaki, Toshiji Iwasaka, Yasuhiko Tabata.

60th Annual Scientific Session of American College of Cardiology. 2011 年 4 月 5 日.

アメリカ, ルイジアナ州 New Orleans (New Orleans コンベンションセンター)

[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

大谷 肇 (OTANI, Hajime)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60168979

(2) 研究分担者

岩崎 真佳 (IWASAKI, Masayoshi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30548706

(3) 連携研究者

田端 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号: 50211371