

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592032

研究課題名(和文) mTORを分子標的としたバイパス開存率向上の研究

研究課題名(英文) Improvement in graft patency after bypass grafting by inhibition of mTOR

研究代表者

榭原 賢士 (SAKAKIBARA, Kenji)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：40419338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラパマイシンはmTORを抑制することにより内膜肥厚を抑制する。今回このメカニズムをバイパス吻合部に応用することを考えた。吻合部となる平滑筋細胞(冠動脈、大動脈)に対して siRNAを使用してmTORの発現を抑制した。mTORの一つ下流にあたるp70S6kinaseと比較するとsiRNA群でリン酸化が抑制された。また、実際のバイパス吻合部を観察すると狭窄、閉塞部位で石灰化を伴っていることが多い。石灰化も狭窄、閉塞をもたらす原因の一つと考えられる。石灰化を引き起こすリスクを検討すると糖尿病、透析で石灰化を促進する傾向を認めた。そのシグナリングを解明することが開存率上昇につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Rapamycin has been used in drug-eluting stents to prevent restenosis. The mechanism that underlies rapamycin's potent effect on intimal hyperplasia is inhibition of mTOR. Inhibition of mTOR decreases proliferation and migration, stimulates apoptosis. After siRNA mTOR is transfected into vascular smooth muscle cells derived from coronary artery or aorta, siRNA inhibits phosphorylation of S6Kinase which is downstream of mTOR. We can see a localized severely calcified stenosis in the anastomosis site. The graft occlusion is also caused by vascular calcifications. Computed tomography (CT) is useful for identifying vascular calcification. We find vascular calcification is more severe in patients with diabetes mellitus or hemodialysis.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：mTOR

## 1. 研究開始当初の背景

下肢のバイパスや冠動脈バイパス手術においてグラフト閉塞の原因となる内膜肥厚に対し、抗凝固剤や抗血小板剤投与が行われてきた。しかし、現在までのところ、これらの内服薬は確実な内膜肥厚の抑制法として確立されていない。Ross らによると、この内膜肥厚は、血管平滑筋細胞の増殖、遊走の促進、アポトーシスの抑制が原因であると報告されている。そのため、いくつかの分子学的方法によりこのメカニズムを抑制することを行われてきた。そのなかで冠動脈ステント術に使用される薬物溶出性ステントの成分であるラパマイシンは再狭窄抑制作用があることが示されている。そのラパマイシンは mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) を抑制し、細胞増殖、遊走の抑制、アポトーシスを促進し冠動脈内の内膜肥厚を抑制する。このメカニズムにより冠動脈ステントの開存率が改善されている。バイパス手術における血管吻合部でも mTOR を抑制することにより内膜肥厚を抑制されることが予測される。

## 2. 研究の目的

われわれは今回の研究を開始するまでに大伏在静脈の平滑筋細胞において siRNA mTOR を使用し mTOR をノックダウンし、In vitro での増殖抑制効果を報告してきた。しかし、実際の吻合部での内膜肥厚は、大伏在静脈のグラフトだけでなく、吻合部での冠動脈、動脈の内膜肥厚も観察される。そして、その吻合部をさらに詳細に観察すると石灰化を伴っていることが多い。そのため、再狭窄の予防はグラフト内膜肥厚の抑制だけでなく、その周囲組織の内膜肥厚を抑制し、さらに石灰化をコントロールすることが長期にわたってグラフトを開存を

維持するために重要であると考えられる。



## 3. 研究の方法

今回の研究で mTOR の発現を抑制しコントロールする方法は引き続き siRNA mTOR を使用することとした。siRNA による遺伝子発現を抑制する機序は人工的に合成された 21 から 25 塩基の 2 本鎖 RNA を平滑筋細胞へ導入することにより対象となる遺伝子発現を抑制する。siRNA を使用する利点として特異性が高く、局所のみ作用させることが可能である。

### 実験方法

- (1) 吻合部に存在する大動脈細胞、冠動脈細胞においても siRNA mTOR で抑制されるかどうか In vitro で検討する。
- (2) 動脈石灰化について大動脈弁狭窄症の上行大動脈について Computed Tomography にて解析し、石灰化をきたすリスクファクターを解析する。

#### 4. 研究成果

大動脈由来の平滑筋細胞、冠動脈由来の平滑筋細胞に対して siRNA mTOR を導入した。導入後、FBS で刺激し mTOR の 1 つ下流にあたる p70S6kinase の活性を ELISA を用いる方法で測定した。コントロール群と比較し siRNA mTOR 群では冠動脈由来の平滑筋細胞、大動脈由来の平滑筋細胞とともに活性化（リン酸化）が抑制されていた。このことにより、いままでグラフトの静脈平滑筋細胞へ siRNAmTOR を導入し内膜肥厚を抑制することは確認されていたが、その吻合部での動脈平滑筋細胞においても siRNA により十分 mTOR の発現を抑制することが可能であることが確認された。さらに、この siRNAmTOR を使用し検討を続けることによって In vivo( グラフトバイパスモデル) で内膜肥厚を抑制させる有用性を示す可能性があると思われる。

大動脈弁狭窄症に対して待機的に大動脈弁置換術を施行した 81 例を対象とした。胸部単純 CT にて上行大動脈 1 スライス上、動脈壁の石灰化が全周の 25% 以上認めた場合を Cal 群( 25 例) それ以下の場合 Con 群(56 例) とした。その背景を検討すると糖尿病群 ( Con 群:19.6%, Cal 群:32.0%), 透析群 ( Con 群:3.6%, Cal 群:28.0% ) で石灰化を促進する傾向を認めた。今後、上記 2 種の細胞内でのシグナリングを検討することにより石灰化を抑制することが可能になるとと思われる。特に糖尿病においては終末糖化産物 ( advanced glycation endproducts) のシグナリングをコントロールすることにより石灰化が抑制できるのではないかと考えている。

今後の方針として、mTOR siRNA をグラフト吻合部に導入し内膜肥厚を検討する

こと、また、血管平滑筋での石灰化のシグナリングを同定することを目標とする。

#### 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 5 件 )

Sakakibara K, Matsumoto M, Katsu M, Suzuki S. Mediastinal radiation therapy-induced multiple cardiovascular diseases. Intern Med. 2015;54(6):683-4. doi: 10.2169/internalmedicine.54.2314. 査読有

Sakakibara K, Shindo S, Matsumoto M, Yoshida Y, Kimura M, Honda Y, Kamiya K, Katsu M, Kaga S, Suzuki S. Splenic artery aneurysm of the hepatosplenomesenteric trunk. Ann Vasc Dis. 2013;6(4):730-3. doi: 10.3400/avd.cr.13-00057. 査読有

Sakakibara K, Matsumoto M, Motohashi S, Suzuki S. Recurrent refractory arterial thromboembolism in a patient with anti-phospholipid antibody syndrome. Intern Med. 2013;52(10):1145-6. 査読有

Matsubara H, Sakakibara K, Kunimitsu T, Matsuoka H, Kato K, Oyachi N, Dobashi Y, Matsumoto M. Non-small cell lung carcinoma therapy using mTOR-siRNA. Int J Clin Exp Pathol. 2012;5(2):119-25. 査読有

Sakakibara K, Matsumoto M, Kaga S, Suzuki S. Giant left ventricular pseudoaneurysm after myocardial infarction. Intern Med. 2012;51(4):445-6. 査読有

[学会発表](計3件)

Sakakibara k, In-hospital Operative Mortality of Abdominal Aortic Aneurysm in octogenarians

(The 23rd Annual Meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery, Hong Kong, China, 2015)

Sakakibara k, Study of aortic valve stenosis associated with calcified ascending aorta.

(The 22nd Annual Meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery, Istanbul, Turkey , 2014)

Sakakibara k, An investigation into cases in which aortic valve replacement was carried out to treat aortic stenosis in elderly patients.

(The 21st Annual Meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan, 2013)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

榊原 賢士 (SAKAKIBARA Kenji)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：40419338

### (2)研究分担者

松本 雅彦 (MATSUMOTO Masahiko)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：30372501