

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670592

研究課題名(和文) 新規治療用遺伝子CSDAによる血管内膜肥厚抑制療法の開発

研究課題名(英文) CSDA, as a novel suppressor of intimal hyperplasia.

## 研究代表者

齊藤 幸裕 (SAITO, Yukihiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80540583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：背景：血行再建術に使用する自家血管グラフトに発生する内膜肥厚は開存率を低下させる重大な問題である。目的：新規治療用分子CSDAの内膜肥厚抑制効果を明らかにする。結果：血管平滑筋細胞の実験では、CSDA遺伝子導入によりE2F, NFkB, SRE, CRE, HIF活性が有意に抑制されることから細胞増殖能, 遊走能が低下していた。マウス大腿動脈ワイヤ擦過障害モデルの作成に成功した。今後超音波法でCSDAを遺伝子導入して治療効果を観察する。まとめ：CSDAはこれまで報告のあった多くの治療候補分子の機能を一つの分子で再現することが可能な多機能分子であり、新たな治療用分子として有望であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Background: Intimal hyperplasia (IH) is the main cause of clinical complication after vascular surgery or angioplasty. Objective: The goal of the present study is to investigate the therapeutic efficacy of CSDA on IH. Methods and Results: Gene transfer of CSDA suppressed cellular proliferation (MTS assay) and migration (modified Boyden chamber method) of VSMCs, via down-regulation of E2F, NFkB, SRE, CRE, and HIF activity. We established the wire-injury mouse model. Now we plan the CSDA gene therapy on this model. Conclusion: We believed that CSDA is a novel multi-functional therapeutic molecule for IH.

研究分野：血管外科

キーワード：内膜肥厚 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 動脈閉塞性疾患治療の現状

動脈閉塞症は心筋梗塞、脳卒中の原因となり、癌とともに我が国の死亡原因の大部分を占める最重要疾患である。これらの動脈閉塞症による虚血障害の重症病変に対しては動脈や静脈をグラフトとした血行再建が第1選択の治療であるが、バイパス術後2年程度で発症する進行性内膜肥厚によるグラフト狭窄によって再手術が必要となり、ひいては患者の生命予後にも影響する。この自家血管グラフトの内膜肥厚の抑制は血管外科学の長年の研究テーマであるが、未だ有効な予防、治療方法は確立されていない。

### (2) 内膜肥厚形成のメカニズムと我々の仮説

内膜肥厚過程のメカニズムは内皮傷害を端緒とし種々の炎症性変化にから血管平滑筋細胞の活性化によって引き起こされる多段階メカニズムである<sup>1)</sup>。この中で治療ターゲットとして報告された分子は40以上にのぼるが治療に結びついたものはない。

我々はこれまでに血管新生、リンパ管新生を抑制する新規治療用分子として Cold Shock Domain Protein A(CSDA)を同定し、その機能を解明し報告した<sup>2, 3)</sup>。この研究により CSDA がこれまで内膜肥厚誘導分子として報告されてきた多くの分子を抑制することが可能であるということが明らかとなり、内膜肥厚形成メカニズムにおいて多段階的に複雑に機能する一連の分子群を一網打尽に抑制することが可能で、最終的に内膜肥厚形成を抑制できるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は2年の研究期間で、CSDAが内膜肥厚を抑制する治療効果を細胞、動物レベルの前臨床試験で確認することを目標とする。

本研究の最終的な目標は、橋渡し研究を経てヒトでの治験を施行し、内膜肥厚抑制治療法を確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

ヒト血管平滑筋細胞は Lonza 社より購入した growth supplement を添加した SmGM-2 (Lonza 社) で培養した。低酸素培養は AnaeroPack system (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。遺伝子導入は LipoTrust™ EX Gene reagent (Hokkaido System Science Co., Ltd., Hokkaido, Japan) を使用した。TNF- $\alpha$ 、PDGF-BB による刺激は

R&D SYSTEMS 社よりヒトリコンピナントタンパクを購入した。

### (2) Real-time Quantitative PCR

細胞から RNA の抽出は QIAGEN 社 RNeasy Plus を用いて行った。mRNA から cDNA へのコンバートは Roche 社 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit を使用した。real-time quantitative PCR は TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて Roche 社 LightCycler96 により測定した。 $\beta$ -actin の発現により補正し、standard curve により標準化した。

### (3) Western blotting

細胞から核蛋白を M-PER™ (Promega) を用いて抽出した。Western blotting は標準的な方法によって行った。

### (4) レポータージーンアッセイ

各レポータージーンは Clontech 社より購入した。各レポータージーンは CSDA および GFP と共導入された。細胞は Promega 社の Lysis buffer にて溶解し、Luciferase Assay Systems を用いてルミノメーターで計測した。

### (5) 細胞増殖能、遊走能

増殖能は Promega 社 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation を用いて吸光度計により測定した。遊走能は modified Boyden chamber 法によって測定した。

### (6) マウス大腿動脈ワイヤ擦過障害モデル

全ての動物実験は旭川医科大学動物実験委員会の審査、承認に基づき施行された。

使用したマウスは C57BL/6J, オス, 10 週齢である。既報<sup>4)</sup>に従って左大腿部にワイヤ擦過障害を作成した。マウスは手術後 21 日目に深麻酔下で頸椎脱臼により犠牲死させ、障害動脈を採取した。採取した血管はホルマリン固定の後、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色, エラスティカ・ワンギーソン (EVG) 染色, マッソン・トリクローム (MT) 染色を行い評価した。

### (7) 統計学的処理

すべてのデータは means  $\pm$  SEM で示されている。2群間の比較は Student t test で、多群間の比較は ANOVA により検定された。P<0.05 を統計学的有意差とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血管平滑筋細胞での内膜肥厚関連遺伝子の発現

内膜肥厚を誘導する環境として過酸化水素による酸化ストレス及び低酸素培養で血管平滑筋細胞を培養し real time PCR で各遺伝子の発現を測定した (図1). CSDA の発現はすべての環境で発現の上昇を認めた. 全体として HIF1 $\alpha$ , NF $\kappa$ B, p53, TGF- $\beta$ 1 は増加傾向, VEGF-A, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MMP2, IGF-1 は減少傾向であった.

同様に液性因子として TNF- $\alpha$ , PDGF-BB で刺激したところ (図2), CSDA は低濃度 TNF- $\alpha$  で増加, 低濃度 PDGF-BB で減少傾向を示した. 全ての条件で HIF1 $\alpha$ , VEGF-A が増加傾向を示し, IGF-1 が減少傾向を示した. また TNF- $\alpha$  刺激で IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, NF $\kappa$ B, MMP2, TGF- $\beta$ 1 が増加傾向を, 低濃度 PDGF-BB 刺激で NF $\kappa$ B, MMP2, p53, TGF- $\beta$ 1 が減少傾向を示した.

##### (2) 細胞内シグナル

酸化ストレス, 低酸素, TNF- $\alpha$ , PDGF-BB で刺激した細胞からタンパクを抽出し ERK, Akt, NF $\kappa$ B の各シグナルをウェスタンブロットで確認した (図3). ERK の発現, リン酸化は severe な低酸素, TNF- $\alpha$ , PDGF-BB 刺激で減少していた. Akt は低酸素でリン酸化が増強していた. NF $\kappa$ B は低酸素でリン酸化が増強し, TNF- $\alpha$ , PDGF-BB 刺激で発現, リン酸化が減少していた.

(3) CSDA 遺伝子導入によるパスウェイ解析  
血管平滑筋細胞に CSDA 発現プラスミドおよび shRNA プラスミドを遺伝子導入し, 内膜肥厚を誘導すると考えられる Cre, NF $\kappa$ B, HIF, SRE, Myc, E2F の各因子の活性をレポータージーンアッセイで検討した (図4). これら全ての因子は CSDA 過剰発現で有意に抑制さ

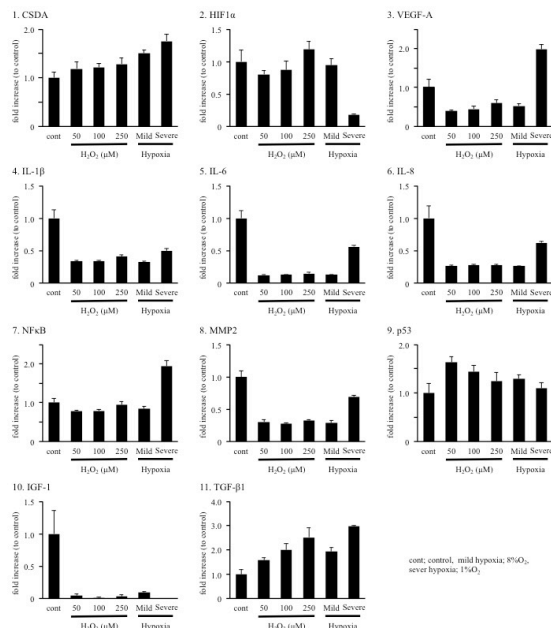


図1. 血管平滑筋細胞での内膜肥厚関連遺伝子の発現 (酸化ストレス, 低酸素)

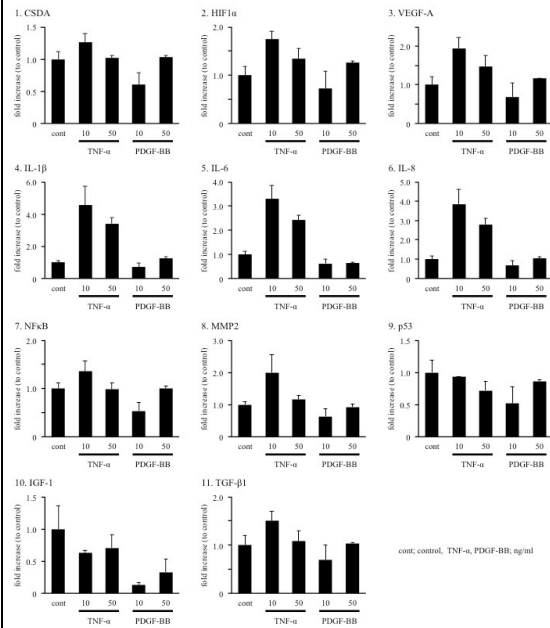


図2. 血管平滑筋細胞での内膜肥厚関連遺伝子の発現 (TNF- $\alpha$ , PDGF-BB刺激)

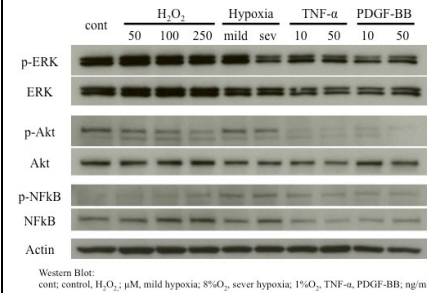


図3. 血管平滑筋細胞内のシグナル

れ, CSDA のノックダウンで有意に増強された.

この結果から CSDA が血管平滑筋細胞において他分子を同時に調節することが証明され, CSDA の過剰発現が内膜肥厚を抑制する可能性が示された.

##### (4) 血管平滑筋の増殖および遊走

同様に血管平滑筋細胞に CSDA を過剰発現, ノックダウンし, 細胞増殖能 (MTS assay) と遊走能 (modified Boyden chamber 法) を検討した (図5). 増殖能, 遊走能ともに CSDA の過剰発現で有意に低下し, CSDA のノックダウンで有意に増加した.

以上の細胞レベルでの検討から, CSDA は血管平滑筋細胞において種々のストレスで発現が変動していることがわかり, さらに CSDA の発現を変化させることで内膜肥厚関連の

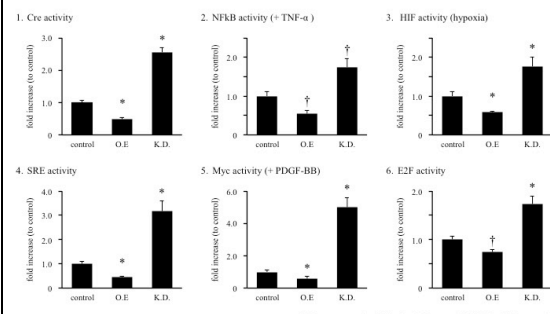


図4. CSDA過剰発現, ノックダウンでのパスウェイ解析

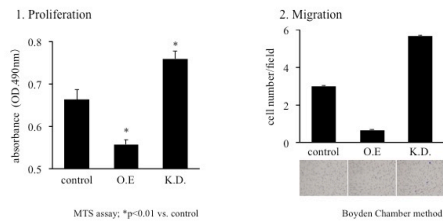


図5. CSDA発現による増殖能、遊走能の変化

多くのパスウェイを同時に調節することから血管平滑筋細胞の増殖と遊走をコントロールできることが確認された。

#### (5) 動物モデルの作成

細胞レベルでの実験を踏まえ、実際の内膜肥厚を CSDA によって抑制できるかを検討するため、マウス大腿動脈ワイヤ擦過障害モデルを使用した。ワイヤ擦過障害後 21 日目で HE, EVG, MT 染色を施行し検討したところ(図 6), ピンホールの内腔を残して、極めて強い内膜肥厚を誘導することができた。

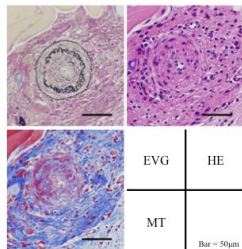


図6. ワイヤ傷害モデル組織染色(コントロール群)

このモデルを使って CSDA 及び対照として GFP 遺伝子を導入し検討する予定であった。遺伝子導入にはマイクロバブルによる超音波導入を行う予定であったが、この際使用するカチオニックマイクロバブル(レボピスト)が研究中止となり入手ができなくなった。そこで市販されている他のマイクロバブルを使用し血管壁への遺伝子導入を試みたが十分な導入効率を得られなかった。この検討からカチオニックであることが必要であるとの結論に達し、研究用試薬であり臨床には使用できないものの、ネッパジーン社から販売されている TS-601 Targesphere 超音波遺伝子導入剤が現状で最適であると判断した。

今後この薬剤を用いて動物実験を施行する。

#### <引用文献>

- ① Muto A, Model L, Ziegler K, Eghbalieh SD, Dardik A. Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies. *Circ J.* 2010 Aug;74(8):1501-12.
- ② Saito Y, Nakagami H, Kurooka M, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K, Morishita R, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y; Cold shock domain protein

A represses angiogenesis and lymphangiogenesis via inhibition of serum response element; *Oncogene* (2008) 27, 1821-1833

- ③ Saito Y, Nakagami H, Azuma N, Hirata S, Sanada F, Taniyama Y, Morishita R, Kaneda Y, Sasajima T. Critical Roles of Cold Shock Domain Protein A as an Endogenous Angiogenesis Inhibitor in Skeletal Muscle. *Antioxidants & Redox Signaling*; 15, 2109-2120, 2011.
- ④ Sata M, Walsh K. Fas ligand-deficient mice display enhanced leukocyte infiltration and intima hyperplasia in flow-restricted vessels. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Aug;32(8):1395-400.

#### 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 1 件)

- ① 齊藤 幸裕, 東 信良, 笹嶋 唯博、新規治療用遺伝子 CSDA による血管内膜肥厚抑制療法の開発、第 41 回日本血管外科学会学術総会、2013 年 5 月 30 日、大阪府

[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]

特になし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 幸裕 (SAITO, Yukihiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80540583