

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791245

研究課題名(和文) siRNA mTORによる静脈グラフト内膜肥厚抑制の検討

研究課題名(英文) Development of inhibitor of intimal hyperplasia after bypass operation using siRNA mTOR

研究代表者

榊原 賢士 (SAKAKIBARA KENJI)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40419338

研究成果の概要(和文)：

最近、sirolimus (rapamycin) が注目され薬物溶出性ステントに使用されており、冠動脈へステント留置後、再狭窄抑制作用があることが示されている。この sirolimus (rapamycin) 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内膜肥厚を抑制する。今回、mTOR を抑制する目的で siRNA mTOR を作成し、抑制効果の判定を行うこととした。ヒト大伏在静脈の平滑筋細胞の cell line に対して si RNA mTOR を使用し transfection を試みた。siRNA を導入することにより平滑筋細胞の観察細胞数の著しい低下をみとめ、内膜肥厚を抑制する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

Rapamycin (sirolimus), initially developed as antibiotic and then as an immunosuppressant, has recently been used in drug-eluting stents to prevent restenosis. Rapamycin's cellular effects appear to be mediated through the intracellular protein target of rapamycin (TOR). The inhibitory effect of rapamycin on vascular smooth muscle cell proliferation has been well established. We examined whether the siRNA mTOR affects proliferation. siRNA mTOR decreased proliferation in vascular smooth muscle cells. siRNA mTOR could inhibit intimal hyperplasia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：内膜肥厚, siRNA, 大伏在静脈

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症に対する静脈バイパス後のグ

ラフト閉塞は、吻合部での血管内膜肥厚が原因と考えられる。静脈グラフトは 10 年の間に約 60% は閉塞してしまうといわれている。

グラフト吻合部の内膜肥厚の原因として、1993年 Ross らによる報告では血管平滑筋の遊走能、増殖能の亢進、細胞外基質の堆積、アポトーシス抑制によるものが主な原因と考えられている。薬物溶出性ステント (DES) の出現により、冠動脈インターベンションに関しては一定の効果が認められている。しかし、外科領域で特に静脈グラフト閉塞が原因となる内膜肥厚の治療法について未だ定まった方法がない。そのため種々の試みが行われている。そのなかで、現在有望な薬剤として Silorimus (rapamycin) があげられる。Silorimus は動脈硬化の抑制作用、薬物溶出性ステントの主たる成分として局所投与で有効性が示されている。

Rapamycin の作用機所は選択的に mTOR (mammalian target of rapamycin) の活性を抑制する。mTOR は細胞増殖、蛋白質の産生、癌の発育、アポトーシスなどをつかさどる作用がある。また血管平滑筋において mTOR は発現し増殖、抑制をすることが確認されている。また、自身の経験では、血管平滑筋において増殖因子 (EGF, PDGF 等) の刺激だけではなく、細胞外基質の刺激 (コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなど) による、細胞遊走を強力に抑制することを確認している。

(Sakakibara, et al: Rapamycin inhibits fibronectin-induced migration of the human arterial smooth muscle line (E47) through the mammalian target of rapamycin. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005) 以上のことより mTOR は内膜肥厚に関する cell signaling の重要な役割を担っていることが予想される。

2. 研究の目的

ラパマイシンは強力な吻合部での肥厚抑

制効果が期待されるが、全身投与を長期にわたって継続した場合の全身へ副作用は不明である。今回、副作用を抑制する目的で吻合部局所の mTOR の発現を抑制するため siRNA (small interfering RNA) mTOR を用いることとした。

siRNA は目的とする遺伝子と相同な 2 本鎖 RNA が標的遺伝子の転写産物 (mRNA) の相同部分の分解を促進し、蛋白質の発現を特異的に抑制する現象である。この現象を利用して人工的に合成された 21 から 25 塩基の 2 本鎖 RNA を細胞に導入することで標的蛋白質発現を抑制する方法である。

siRNA の利点としては、

(1) 特異性が非常に高い。(2) 細胞中あたり微量の siRNA で効果がある。

(3) 細胞中での siRNA の半減期は 4 から 5 日と長い。(4) 他の薬剤と配合禁忌フリーである。

自身の経験で血管平滑筋細胞に対しても有効性を確認している。(Ryer, Sakakibara, et al. Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent mechanisms. J. Biol. Chem. 2005)

siRNA の細胞内導入の問題点としては細胞内へ送達技術である。siRNA はマイナス電荷を帯びているため同じように表面電荷がマイナスである細胞へ取り込みにくく細胞外では容易に分解されてしまう。In vivo で、遺伝子導入を行う方法として、直接 siRNA を注入、経静脈投与、ウイルスベクターを使った方法等が報告されているが、癌化や導入の効率を考慮し、今回われわれは平滑筋細胞へ導入実績があるアテロコラーゲン法 (高研バイオサイエンス研究所) を使用する予定としている。

アテロコラーゲンは細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲンを酸素可溶化したもので生体適合性が高いバイオマテリアルである。siRNA とアテロコラーゲンは複合体を形成し、ヌクレアーゼによる分解を回避し、安定した状態で存在し、効率よく細胞内へ導入できる。特に、ウイルスを使用した場合に比較し癌化等の副作用が少ない。このアテロコラーゲンを使用し siRNA mTOR を導入し評価することを目的とした。

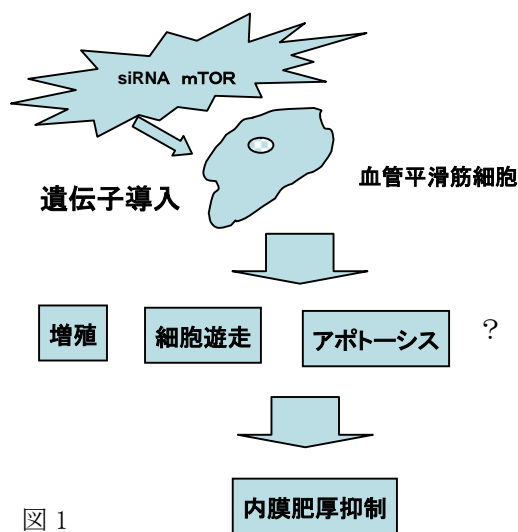


図 1

3. 研究の方法

In vitro の実験として、手術時に採取したヒト大伏在静脈の平滑筋細胞を培養し、コントロール siRNA (GFP：緑色蛍光タンパク質が発現する) を導入した。導入効率良好な条件で、siRNA mTOR を使用し、導入した細胞の mTOR のタンパク質、RNA の生成の抑制を評価する方針とした。

評価の方法として

- (1) タンパク質-Western blot 法,
- (2) RNA-Real time-PCR を使用し mTOR の抑制を確認する。次に、siRNA mTOR を導入した細胞とコントロールの細胞の生理学的評価を行う。
- (3) 細胞遊走— modified boyden chamber

を使用し膜を貫通し遊走した細胞を計測する予定。

- (4) 細胞増殖— コントロール群と siRNA mTOR 群での増殖の差を培養 1 日目、3 日目、7 日目で計測する。また、細胞増殖 ELISA, BrdU 発色キット (Roche) を使用する。(細胞分裂期に BrdU が細胞内に吸収されることを利用して増殖が測定できる。)
- (5) アポトーシス— Cell Death detection ELISA (Roche)。(アポトーシスが起こると DNA が切断される性質を利用して測定できる。)

4. 研究成果

現在、In vitro の実験として、手術時に採取したヒト大伏在静脈の平滑筋細胞を培養し cell line を作成した。

si RNA m TOR を使用する前に、まず rapamycin による平滑筋細胞の作用を検討した。血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) 刺激を行い、平滑筋細胞の細胞増殖、遊走を促進させラパマイシンで抑制するかどうか検討した。ラパマイシンは細胞増殖、遊走ともに抑制させた。次に siRNA を使用するにあたってコントロール siRNA (GFP) を transfection し、条件の検討をおこなった。そのコントロール条件を利用し、siRNA mTOR を transfection し、細胞増殖を測定すると siRNA 群において細胞増殖の抑制を認めた。

今後、Rat の静脈パッチモデルをバイパスモデルとして作成し siRNA mTOR を導入した場合内膜肥厚を抑制する結果が予測される。

現在、In vivo で siRNA 導入する方法として、直接、siRNA を注入、経静脈投与、ウイ

ルスベクターを使った方法等が報告されているが、今回われわれはすでに文献で実績報告されているアテロコラーゲンを使用する予定としている。具体的にはRatを用いて腹部大動脈に対して頸静脈を採取し vein patch モデルを作成し、siRNA mTOR を導入群とコントロール群を作成し比較することを考えている。

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)

[学会発表] (計1件)

①Matsubara H, Sakakibara k, Matsumoto M:
A novel non-small cell lung carcinoma
therapy using siRNA targeting mTOR
(CTCOMCON 2010. 3. 1, New Delhi)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 賢士 (SAKAKIBARA KENJI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40419338

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし