

平成23年6月1日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791466

研究課題名（和文）miRNAによるRNA干渉効果を用いた新しい血小板遺伝子ノックダウン手法の開発

研究課題名（英文）Development of new gene knockdown techniques for platelets using miRNA

研究代表者

加藤 祐子（KATO YUKO）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：50398400

研究成果の概要（和文）：

ヒト CD34+ Progenitor Cell 及び、マウス骨髄細胞に、miR RNAi 発現ベクターを導入後、In Vitro で血小板細胞に分化させる事で、ターゲット遺伝子の発現が抑制され、トロンビン刺激又は、ADP 刺激による血小板凝集能、及び P-selectin 発現能が抑制されることを確認することができた。血小板抗体により血小板数が抑制されたマウスに遺伝子ノックダウン血小板を投与することにより、実験モデルを作成することに成功した。そのマウスに、遺伝子ノックダウン血小板を注入することで、肺梗塞の重症度、生存率が改善された。現在、さらに詳細を解析中である。

研究成果の概要（英文）：

After transfection of miR RNAi expression vector in human CD34⁺ progenitor cells and mouse bone marrow cells along with differentiating into platelets with 3-4week culture in vitro, we have confirmed the target gene knocked down in platelet cells. These platelets have less ability of aggregation and P-selectin expression in response to agonists. With injection of these gene knocked down platelets, survival and severity of pulmonary embolism have improved in mouse experimental model. Further studies are necessary to undergo detailed analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：血栓止血学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：周術期管理学、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

従来より分子生物学的研究手法を用いた血小板の研究は、血小板細胞自身に遺伝子導入等が不可能な為、遺伝子改変動物（ノックアウトマウス等）の血液を用いる等の手法に限られてきた為、他の血液細胞に比べ分子生物学的アプローチが遅れてきた。我々は、以前より培養細胞、血液細胞を含む初代細胞にRNA干渉(RNAi)法を用いて遺伝子ノックダウン法を用いて機能解析を行ってきた。RNA干渉法を用いた遺伝子抑制法はアンチセンス法に代わる新しい手法で、複数の遺伝子を一度にノックダウンできる可能性のある最新の研究手法である。また直接、遺伝子が核に移行する事で、（従来のElectroporation法に比べ）高率に遺伝子導入が可能なNucleofection法（Amaxa, 現有設備）を用いる事により、Primary Cell（初代細胞）にもsiRNAを効率良く導入できることが可能となった。最近の研究によるとヒト末梢血に存在するCD34+ Progenitor Cellや、マウスの骨髄細胞（造血幹細胞）に遺伝子導入し、GPIIb α Promoter（組織特異的）を用いて、特異的に血小板に将来分化する細胞に遺伝子導入する事で必要な遺伝子を発現させ、血小板の遺伝子治療の可能性を示唆する論文が報告された。今回我々はmiR RNAi発現ベクターを用いて、ターゲットのRNAi配列を含む人工のmiRNA(miR RNAi)を発現させ、内在性のmiRNA経路を利用してmRNAを分解することにより、遺伝子発現を抑制するシステムを用いて、遺伝子ノックダウンすることで、血小板機能の分子生物学的アプローチによる機能解析、将来の遺伝子治療導入の可能性を考えた。

2. 研究の目的

ヒトCD34+ Progenitor Cell及び、マウス骨髄細胞に、miR RNAi発現ベクターを導入後、In Vitroで血小板細胞に分化させる事で、

ターゲット遺伝子の発現が抑制され、血小板機能が抑制されるかどうかを確認すること。
(*In Vitro*系)

骨髄抑制マウスに、1.で遺伝子ノックダウンしたマウス骨髄細胞を末梢血より移植し、約1ヶ月後の末梢血血小板の遺伝子発現、機能の抑制を確認し、マウス肺梗塞モデルを用いて将来の遺伝子治療の可能性を検討すること。(Ex Vivo系, In Vivo系、)

3. 研究の方法

In Vitro系

- (1) miRNAの作成 GPIIb, CD62P, Akt, P38 α をターゲットにしたmiRNA塩基配列作成は、Invitrogen社でReady MadeのDNA64merの人工miR RNAiインサートを購入。
- (2) アニールリング及びクローニング Double Strandにアニールリング後pcDNA6.2-GW/EmGFP-miRにクローニングする。
- (3) 遺伝子導入 Heck-293細胞(培養細胞)に導入後、目的の遺伝子がノックダウンされていることを、Real Time PCR(RNAレベル)及び、Flow Cytometry法(タンパクレベル)で確認する。
- (4) CMV Promoter(又は血小板特異的なGPIIb α Promoterを作成後)、及びmiR RNAi entryクローンと共に、BP/LRクローニング反応によりpcDNA6.2-GW/EmGFP-miRよりデステイネーションベクター(pLenti6.4/R4R2/V5-DEST)にmiRNAを組み込む。作成したpLenti6.4/MSGW/EmGFP-miR expression plasmid DNAを293FT cellに感染後、ウイルスのタイターを測定。
- (5) 初代細胞採取 ヒトCD34+ Progenitor Cellは末梢血より、マウス骨髄細胞はマウス大腿骨骨髄より採取する。
- (6) ヒトCD34+ Progenitor Cell及びマウス

骨髓細胞が血小板に分化するようサイトカインを含んだ培養液 (IMDM with 1.5% BSA, Thrombopoietin, IL-6, IL-1b 各 10ug/ml, Stem cell factor 50ng/ml) に培養する。

- (7) 遺伝子導入 pLenti6.4/MSGW/EmGFP-miR expression plasmid DNA をヒト CD34+ Progenitor Cell 又はマウス骨髓細胞に導入する。
- (8) 血小板に分化後 (約 3-4week)、Real Time PCR (RNA レベル) 及び、Flow Cytometry 法 (タンパクレベル) で、ターゲットの遺伝子ノックダウンを確認する。
- (9) 血小板機能の確認。 GPIIb, 又は Akt の遺伝子ノックダウンにより血小板凝集反応が抑制されている事を、 CD62P, 又は P38 α のノックダウンにより血小板-白血球凝集反応が抑制されていることを確認する。

In Vivo 系

Ketamine/Xylazine (150/15mg, ip) 麻酔下の雄 CD-1 マウス (20-25g) に尾静脈より 1250U/kg のヒトトロンビン (80% のマウスが 5 分以内に死に至る量)、[又は collagen/epinephrine (800/60 μ g/kg、80% のマウスが 30 分以内に死に至る量)] (コントロールとして生理食塩水を投与) する事で肺梗塞を起こす。

(生存率) 血小板凝集薬剤を投与してからの時間軸で見た生存率に関して、miRNA によりノックダウンされた骨髓細胞を移植した群と negative control の miRNA を導入した骨髓移植した群との生存率の改善を検討する。

(肺梗塞重症度の定量化) 血小板凝集薬剤投与後一定時間 (3-5min) に安楽死を行い採血及び肺組織の摘出を行う。肺組織は、気管より 10% ホルマリン投与により固定し 24 時間後に 5-6 μ m スライスのパラフィン切片を作り phosphotungstic acid にて血管内フィブリン

を染色する 10 視野程度の鏡検で視野中に存在する血管でフィブリンが栓塞している割合の計測により肺梗塞の重症度を定量化する。

4. 研究成果

In Vitro 系

ヒト CD34+ Progenitor Cell 及び、マウス骨髓細胞に、miR RNAi 発現ベクターを導入後、In Vitro で血小板細胞に分化させる事で、ターゲット遺伝子の発現が抑制され、トロンビン刺激又は、ADP 刺激による血小板凝集能、及び P-selectin 発現能が抑制されることを確認することができた。

In Vivo 系

血小板抗体により血小板数が抑制されたマウスに遺伝子ノックダウン血小板を投与することにより、実験モデルを作成することに成功した。そのマウスに、遺伝子ノックダウン血小板を注入することで、肺梗塞の重症度、生存率が改善された。現在、さらに詳細を解析中である。

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 2 件)

- ① Transillumination by light-emitting diode facilitates peripheral venous cannulations in infants and small children. Hosokawa K, Kato H, Kishi C, Kato Y, Shime N. Acta Anaesthesiol Scand. 2010 Sep;54:957-61 査読有り
- ② Dexmedetomidine sedation in children after cardiac surgery. Hosokawa K, Shime N, Kato Y, Taniguchi A, Maeda Y, Miyazaki T, Hashimoto S. Pediatr Crit Care Med. 2010 Jan;11:39-43. 査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤祐子 (KATO YUKO)

京都府立医科大学・医学部附属病院・

専攻医

研究者番号：50398400