

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462136

研究課題名(和文) マイクロRNA徐放を用いた細胞フェノタイプ制御による新規心不全治療の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic method for heart failure through cellular phenotype control using sustained release of microRNA

研究代表者

山崎 和裕 (Yamazaki, Kazuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50464227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：COS-7細胞に対するゼラチン水和ゲルとmiR-29bの組成条件の検討を行った。COS-7細胞へは高効率でmiR-29bの完全相補遺伝子をもつプラスミドを導入でき、マイクロRNAの徐放担体への導入における条件を導き出すことができた。

乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を用いたmiR-126のマウス下肢虚血モデルへの導入効率を検討した。PLGA封入miR-126投与群で血流改善を認め、遺伝子レベル・タンパク発現レベルでも、miR-126によるシグナル活性を示した。PLGAを用いたmiRNAの局所投与による標的細胞への十分な移行性が示され、心臓組織へのマイクロRNA徐放における基礎的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We performed the evaluation for optimal mixture condition of gelatin hydrogel and miR-29b using COS-7 cells. We could find the condition to efficiently induce miR-29b complementary plasmid within COS-7, providing suitable condition of better microRNA induction using sustained-release vehicles.

We next evaluated the efficiency of transduction of miR-126-incorporated poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) for mice hindlimb ischemia model. Treatment with miR-126-incorporated PLGA led to increased blood flow and activation of signaling pathway related to miR-126 in gene and protein expression level. We showed fair efficiency of transduction of microRNA into the target cells which provides a basic knowledge for sustained release of microRNA into the heart muscle tissue.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：心筋疾患外科学 心筋リモデリング 心不全

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症や虚血性心筋症による末期心不全患者は予後不良である。末期心不全は心筋肥大・線維化など細胞フェノタイプによる心筋リモデリングが引き金となる。また、末期心不全治療には補助人工心臓技術も進歩してきているが、心移植の架け橋となっても未だ回復への架け橋とはなりえていない。そこで、マイクロ RNA(miRNA)の発現調節が、心臓フェノタイプの制御、心筋リモデリング抑制に繋がると考えた。

現在、miRNA の局所発現は難しく他臓器での有害作用が危惧される。そこで、ゼラチンハイドロゲルを徐放化システムとして用いることで、心臓局所に効率よく miRNA を発現させるため、心筋リモデリングを抑制することで末期心不全に対する新たな治療法の構築を目指す。また、左室補助人工心臓における細胞フェノタイプ制御の役割を解明し、心移植の架け橋から回復への架け橋にすることを旨とする。

2. 研究の目的

心臓はじめ生体局所への効率的な miRNA 徐放システムを確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ゼラチン水和ゲルを用いたマイクロ RNA の細胞への導入のための基礎検討

マイクロ RNA を導入する際に用いるゼラチン水和ゲルの最適な組成条件の検討を行った。マイクロ RNA は心筋線維化および心筋リモデリング抑制の働きをもつ miR-29b を使用し、miR-29b の完全相補遺伝子を組み込ませた dual luciferase をもつプラスミドを用いた。

乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を用いたマイクロ RNA のマウス下肢虚血モデルへの導入の検討

次に、miR-29 の長期作用についても検討するために、プラスミドの luciferase が長期発現する細胞が必要と考え、安定発現細胞株の作製を試みたが、安定性を得るのが困難であった。そのため心臓組織への導入検討を行うのはさらに時間を要することが考えられたため、すでに安定したマイクロ RNA の導入に成功している、乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を用いた miR-126 の導入効率を検討することとした。miR-126 は VEGF シグナルを介した血管新生に働くことが知られている。PLGA 封入 miR-126 のマウス下肢への血管新生効果を検討後、心臓にその条件を応用する方針とした。

マウス下肢虚血モデルとして、大腿動脈を

結紮・切除により作製し、モデル作製直後に PLGA 封入 control RNA 投与群と PLGA 封入 miR-126 投与群に分けて、その投与効果と比較した。評価項目は、レーザー Doppler 血流計による下肢の血流評価、採取標本の免疫組織学的評価、qRT-PCR による遺伝子レベルの評価およびウエスタンブロットティングによるタンパク発現レベルの評価を行った。

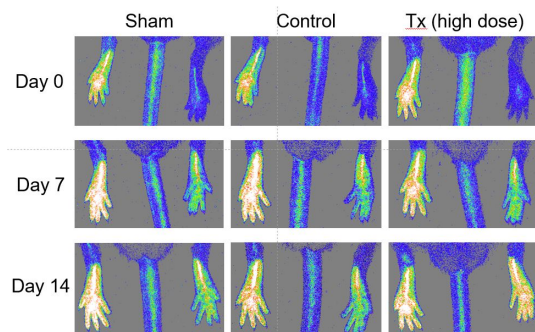
4. 研究成果

ゼラチン水和ゲルを用いたマイクロ RNA の細胞への導入のための基礎検討

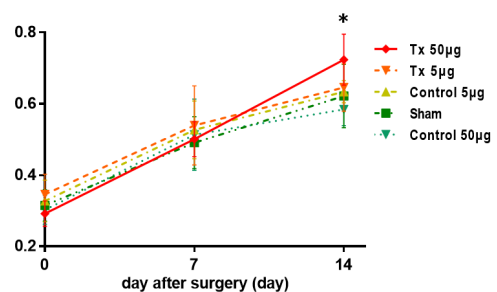
ヒト心筋線維芽細胞にこのプラスミドおよび miR-29b を直接導入したところ導入効率が低く、ゼラチン水和ゲルの条件検討にヒト心筋線維芽細胞を用いることは難しいと考えられた。そこで、遺伝子導入に適した COS-7 細胞をゼラチン水和ゲル組成条件の検討に使用することとし、その後ヒト心筋線維芽細胞での検討を行う方針とした。COS-7 細胞へは高効率でこのプラスミドを導入でき、ゼラチン水和ゲルを用いたマイクロ RNA の導入における基礎的な条件を導き出すことができた。

乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を用いたマイクロ RNA のマウス下肢虚血モデルへの導入の検討

miR-126 投与群で血流改善を認め(図 1)、組織学的にも血管新生および動脈形成の有意な増加が得られた(図 2)。また、遺伝子レベルおよびタンパク発現レベルも、miR-126 の血管新生経路を示すことが出来た(図 3)。



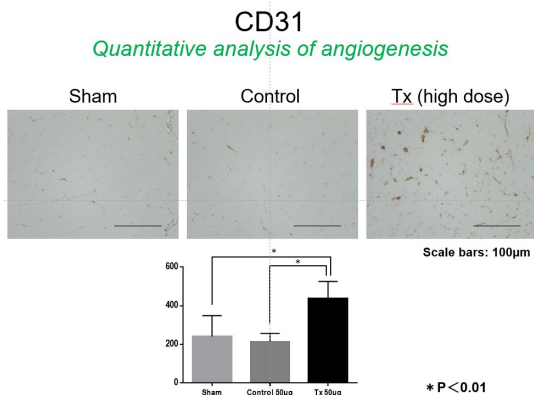
レーザー Doppler 血流計インデックス



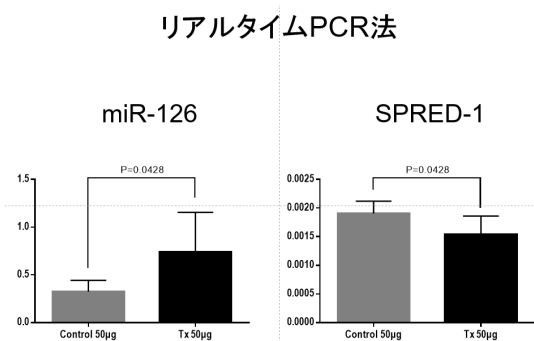
ANOVA P<0.0001

* P<0.05 compared to other groups

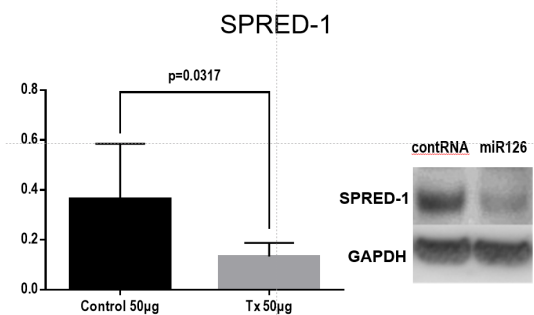
(図1) PLGA 封入 miR-126 投与によるマウス下肢虚血モデルの血流改善



(図2) PLGA 封入 miR-126 投与による CD31 陽性血管内皮細胞の増加および血管新生



ウェスタンブロッティング



(図3) PLGA 封入 miR-126 投与による血管申請抑制因子 SPRED-1 の発現抑制

以上より、PLGA を用いた miRNA の局所投与によるその標的細胞への十分な移行性が示された。この結果は心臓組織へのマイクロRNA 徐放を行ううえでの基礎的知見をもたらしたと言える。

5. 主な発表文等

(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 7 件)

1. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M,

Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNAs and Lipoprotein Metabolism. J Atheroscler Thromb. 2014;21:17-22.

2. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. Nat Commun. 2013;4:2883.
3. Zhang W, Liu J, Tabata Y, Meng J, Xu H. The effect of serum in culture on RNAi efficacy through modulation of polyplexes size. Biomaterials. 2014;35:567-77.
4. Miura N, Shimizu M, Shinoda W, Tsuno S, Sato R, Wang X, Jo J, Tabata Y, Hasegawa J. Human RGM249-derived small RNAs potentially regulate tumor malignancy. Nucleic Acid Ther. 2013;23(5):332-43.
5. Ono K. MicroRNA-133a in the Development of Arteriosclerosis Obliterans. J Atheroscler Thromb. 2015;22:342-3.
6. Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe S, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Otsu K, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 exacerbates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy in mice through suppression of the LKB1/AMPK pathway. Circ Res. 2015;116:279-88.
7. Matsuo T, Masumoto H, Tajima S, Ikuno T, Katayama S, Minakata K, Ikeda T, Yamamizu K, Tabata Y, Sakata R, Yamashita JK. Efficient long-term

survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2015;5:16842.

[学会発表](計 13 件)

1. Masumoto H, Sakata R, Yamashita JK et al. The transplantation of human iPS cell-derived cardiac cell sheets to rat myocardial infarction model ameliorates cardiac dysfunction through neovascularization. The 21st Annual Meeting of The Asian Society of Cardiovascular and Thoracic Surgery (ASCVTS 2013) (Kobe, Japan) 2013.4.4.-4.7.
2. 升本英利、南方謙二、丸井晃、池田義、清水達也、岡野光夫、山下潤、坂田隆造. 再生医学研究が変える外科の近未来 細胞シート技術を用いた多能性幹細胞による心筋再生研究 機能的再生から組織再生へ 第 113 回日本外科学会定期学術集会 (福岡) 2013.4.11-13.
3. Masumoto H, Sakata R, Yamashita JK et al. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-engineered tissue sheets with defined cardiovascular cell populations for infarct rat hearts. International Society for Stem Cell Research 11th annual meeting. (Boston, USA) 2013.6.12.-6.15.
4. 尾野亘. マイクロ RNA のバイオマーカーとしての応用. 第 45 回日本動脈硬化学会 (東京) 2013.7.19.
5. Matsuo T, Sakata R, Yamashita JK et al. An efficient piling up of pluripotent stem cell-derived cardiac tissue-like sheets that robustly promotes cell engraftment and ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction. European Society of Cardiology Congress (Amsterdam, Netherlands) 2013.8.31-9.4.
6. 尾野亘. microRNA と動脈硬化・心不全. 第 23 回循環薬理学会(福岡) 2013.12.6.
7. 田畑康彦. 再生医療への科学技術インテグレーション-再生研究と再生治療-. 第 13 回日本再生医療学会総会 (京都) 2014.3.4-6.
8. Horie T, Nishino T, Ono K et al. MicroRNA-33 deficiency leads to high fat diet-induced obesity and insulin resistance in vivo. European Society of Cardiology Congress (Barcelona) 2014.8.30.
9. Nishino T, Horie T, Ono K et al. MicroRNA-33, embedded in Srebf2 intron, regulate fatty acid synthesis through targeting SREBP-1 in vivo. European Society of Cardiology Congress (Barcelona) 2014.8.30.
10. Tsumaru S, Sakata R et al. Therapeutic angiogenesis by local sustained release of microRNA-126 in murine hindlimb ischemia. 第 80 回日本循環器学会学術集会 (仙台) 2016.3.18-20.
11. Tsumaru S, Sakata R et al. Therapeutic angiogenesis by local sustained release of microRNA-126 in murine hindlimb ischemia. The 24th Annual Meeting of Asian Society of Cardiovascular and Thoracic Surgery (Taipei) 2016.4.6-10.
12. 津丸真一、坂田隆造ほか. マウス下肢虚血モデルにおける microRNA-126 の局所徐放による血管新生効果. 第 44 回日本血管外科学会総会 (東京) 2016.5.25-27.

13. 津丸真一、坂田隆造ほか. マウス下肢虚血モデルにおける microRNA-126 の局所徐放による血管新生効果. 第 46 回日本心臓血管外科学会学術集会 (名古屋) 2016.2.15-17.

〔図書〕(計 1 件)

1. 升本英利、坂田隆造. Annual Review 循環器：心筋再生医療の進歩. 中外医学社. 2016

〔産業財産権〕
出願状況 (計 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 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

<http://www.kyoto-cvs.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎和裕 (YAMAZAKI KAZUHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50464227

(2) 研究分担者

尾野 亘 (ONO KOH)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00359275

坂田隆造 (SAKATA RYUZO)
京都大学・大学院医学研究科・名誉教授
研究者番号：20325781

田畑泰彦 (TABATA YASUHIKO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：