

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 3 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591810

研究課題名（和文） プラスミドベクターの肺高血圧症に対する遺伝子治療への応用

研究課題名（英文） Gene therapy for treatment of pulmonary hypertension using plasmid vector

研究代表者

水野 祐介（MIZUNO YUSUKE）

横浜市立大学・医学部麻酔科・講師

研究者番号：80433192

研究成果の概要（和文）：

肺高血圧ラットの肺組織中において神経伝達物質 VIP, PACAP の発現低下とその受容体の亢進を発見した。VIP, PACAP は血管拡張、臓器保護作用が報告されており、肺高血圧ではこれらの低下に対し、受容体が代償的に増加していると推定された。PACAP 発現誘導により肺高血圧症の改善を図れると仮説を立てた。肺組織に持続的に発現させるため、PACAP 発現プラスミドベクター及びレンチウイルスベクターを作成し、導入条件を検討した。

研究成果の概要（英文）：

We found decreased expression of neuropeptide VIP, PACAP and decreased expression of their receptors in lung of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. It was assumed that the receptor might be induced to compensate for the decrease of VIP and PACAP. Thus, we hypothesized that induction of PACAP in lung could improve pulmonary hypertension. To examine the hypothesis, we created PACAP encoding plasmid and lentivirus vectors and examined the way to introduce them to the lung.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：麻酔科

科研費の分科・細目：

キーワード：肺高血圧、遺伝子治療、PACAP, HO-1、プラスミドベクター、レンチウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性肺高血圧症や先天性疾患による

アイゼンメンジャー症候群、慢性呼吸器疾患
終末期での不可逆的な肺血管損傷は根本的

な治療法はない。

呼吸器疾患への遺伝子治療には、呼吸器への親和性からアデノウイルスベクターが用いられてきた。急性呼吸器疾患への遺伝子導入では効果が得られていたが、アデノウイルスベクターの発現は一過性で、免疫反応を惹起するため複数回投与が不可能であった。従って慢性疾患への応用は困難であった。また安全性の面からウイルスベクターの臨床応用へのハードルはまだ高かった。一方、非ウイルスベクターとしてカチオニックリポソーム等との複合体をベクターとする方法もあるが免疫系への障害の問題があった。一方、プラスミドベクターは哺乳動物の筋肉、肝臓等に直接投与すると数ヶ月間細胞内で発現することが知られているが、低い導入効率が課題だった。

以上から、肺血管障害等の慢性肺疾患に対する遺伝子治療にはアデノウイルスベクターに代わる、より持続的に発現するベクターを検討する必要がある。

2. 研究の目的

原発性、及び二次性肺高血圧症に対する遺伝子治療を行うため、肺組織へ目的遺伝子の導入方法を確立させ、また HO-1、PACAP 等の臓器保護作用の期待されるタンパク発現による治療方法の確立を目的とした。

CO は心血管系の保護作用が注目されており、HO-1 inducer 投与による低酸素性肺高血圧、高血圧の改善が動物モデルで報告されていた。また神経伝達物質 PACAP、VIP の血管拡張作用、臓器保護作用が報告されており、これらを遺伝子導入により肺で発現されることで肺高血圧を改善できるとの仮説を立てた。これを検証するため以下の検討を行うこととした。

(1) モノクローリン誘発肺高血圧モデルを

用い、肺組織において保護的作用が報告されている HO-1、神経伝達物質 PACAP、VIP 等を発現させ、肺高血圧に対する遺伝子治療法を検討する。

(2) 慢性肺疾患に対する遺伝子治療を目的とし、プラスミドベクター等をラット肺組織へ導入し、持続的に発現させる条件を確立する。

3. 研究の方法

モノクローリン誘発肺高血圧ラットモデルを用い肺組織における HO-1、VIP、PACAP の発現による治療効果の検討、及び肺高血圧症に対する遺伝子治療のため肺へ遺伝子導入し目的タンパクを発現させる条件検討を行うため、以下の実験を行った。

(1) ラット肺高血圧モデル作成；モノクローリン 60mg/kg 皮下投与し肺高血圧、右室肥大モデルを作成した。投与4週間後に右室圧/血圧比、右室/左室重量比を測定した。

(2) Western blot analysisによるタンパク定量

肺組織におけるHO-1, また神経伝達物質VIP, PACAP及びその受容体であるVPAC1, VPAC2, PAC1等のタンパク発現量をWestern blotにより定量した。

(3) Real-time PCRによるmRNA定量

肺組織におけるHO-1, また神経伝達物質VIP, PACAP及びその受容体であるVPAC1, VPAC2, PAC1等のmRNA発現をReal-time PCRにより定量した。

(4) 免疫組織学的検討

肺組織におけるHO-1, また神経伝達物質VIP, PACAP及びその受容体であるVPAC1, VPAC2, PAC1の中のVIP受容体VPAC2、PACAP受容体PAC1等のlocalizationを免疫

組織学的に検討。

(5) レポーター遺伝子GFP発現プラスミドベクター、及びGFP発現レンチウイルスベクターの肺組織への導入検討。

(6) PACAP発現プラスミドベクター、レンチウイルスベクター作成。肺組織への導入。

4. 研究成果

(1) ラット肺高血圧モデル作成；モノクロタリン投与4週間後に右室圧/血圧比、右室/左室重量比はコントロールラットに比較し有意に増加しており、肺高血圧、右室肥大を来していることを確認した。

(2, 3, 4) Western blot analysis、Real-time PCR, 免疫組織学的検討；

Expression of PACAP and VIP mRNA in lung

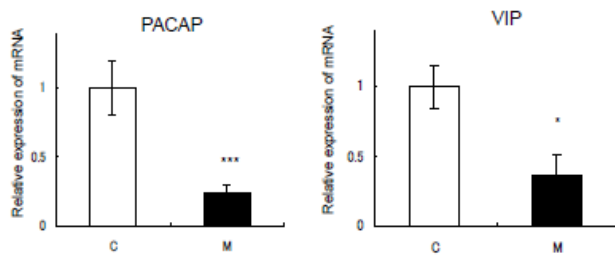


Fig. 3 Quantitative real-time PCR was performed to determine the mRNA expression of VIP and PACAP. Expressions of VIP and PACAP mRNA were significantly lower in group M than those in group C. mRNA expression in group C was expressed as 1 arbitrary unit. P-values: * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$.

肺高血圧ラット肺組織中のVIP、PACAPのmRNAは肺高血圧ラット肺組織中では低下していた。

Protein expressions of VPAC1, VPAC2 and PAC1 in lung

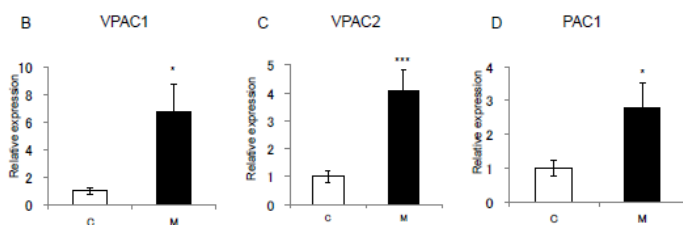


Fig. 5 Western blot analysis of VPAC1, VPAC2 and PAC1 in lung. (A) Tissue homogenates were subjected to SDS/PAGE and blotted for VPAC1 (B), VPAC2 (C), and PAC1 (D). Expression of VPAC1 in group M was more than 5-fold higher than that in group C. VPAC2 and PAC1 also increased significantly in group M compared to group C. Decreases in VIP and PACAP are associated with increases in its receptors in the lung of MCT-induced pulmonary hypertension. C: control. M: treated with monocrotaline. P-values: * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$

一方、VIP受容体VPAC1, VPAC2及びPACAP受容体PAC1の発現量の有意な増加を認めた。mRNA発現量も同様の結果であった。免疫染色では条件検討が不十分で、検出ができなかった。

これらの結果よりVIP、PACAP発現減少に対し代償的に受容体VPAC1, VPAC2, PAC1が増加していると推定した。この仮説を検証するためPACAP補充により肺高血圧の治療効果の検討のためPACAP発現ベクターを作成することとした。

また、HO-1は肺高血圧モデルにおいて発現増加が認められた。

(5) レポーター遺伝子GFP発現プラスミドベクター、及びGFP発現レンチウイルスベクターの肺組織への導入検討；

GFP発現プラスミドベクターをlipofectamine LTX用い、静脈注射によりマウス及びラット肺で発現することを確認した。また当初の予定になかったレンチウイルスベクターの検討を開始した。レンチウイルスは発現が長期間安定し、また非増殖細胞を含む殆どの細胞に感染するなどの利点を持っていたが、HIV由来であることから安全性が課題だった。しかし近年増殖能を欠損させた第三世代が開発されたことで安全性が格段に高まったことから検討を行った。マウスにおいて静脈注射、経鼻投与により肺組織で発現することを確認した。

(6) PACAP発現プラスミドベクター、レンチウイルス作成；マウス脳組織mRNAからcDNAを得た。PACAPをクローニングした後、哺乳動物細胞で発現するCMVプロモーターを持つpSecTagベクターに組み込み作成した。レンチウイルスベクターはWisconsin大学麻酔科Yang教授より供与されたpLL3.7 IRES-EGFPを使用した。PACAP発現レンチウイルスベクターを作成した。このベ

クターを肺高血圧ラットに導入し、治療効果の検討中である。

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)

[学会発表] (計 3 件)

1, Attenuation of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by heme oxygenase-1 involves Toll-like receptor 4 signaling. Hiromasa Kawakami, Yusuke Mizuno, Motokazu Koga, Takahisa Goto. European Society of Anesthesiologists. Euroanesthesia 2010 Helsinki Finland.

2, Altered expression in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Yusuke Mizuno, Motokazu Koga, Tomoya, Irie, Kakahisa Goto, European Society of Anesthesiologists. Euroanesthesia 2011 Amsterdam Netherlands.

3, HO-1 expression attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through toll-like receptor 4 signaling. 水野祐介、川上裕理、古賀資和、後藤隆久、日本麻酔科学会59回学術集会 2011年神戸

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 祐介 (MIZUNO YUSUKE)
横浜市立大学・医学部麻酔科・講師
研究者番号：80433192

(2) 研究分担者

馬場 靖子 (BABA YASUKO)
横浜市立大学・市民総合医療センター・講師
研究者番号：80453041

川上 裕理 (KAWAKAMI HIROMASA)
横浜市立大学・医学部麻酔科・助教
研究者番号：90407958

(3) 連携研究者

なし