

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249016

研究課題名(和文)血管新生誘導 siRNA による虚血性疾患の治療法開発

研究課題名(英文)Clinical development of angiogenesis-induced siRNA for ischemic diseases

研究代表者

芝崎 太 (SHIBASAKI, Futoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・参事研究員

研究者番号：90300954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,500,000円、(間接経費) 11,250,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、低酸素反応性因子HIF2 α の解析を進め、結合因子であるInt6/eIF3eを同定した。このInt6は低酸素に関係なくHIF2 α に結合し、分解を誘導するNegative feed-back作用がある事を発見した。このInt6に対するsiRNAを用いてマウス皮下に導入したところ、正常動静脈が形成されたため、ラットおよびブタの心筋梗塞モデル、マウスの脳梗塞モデル、皮膚損傷モデルに応用したところ正常動静脈が形成されると主に、梗塞巣や損傷皮膚が改善された。さらに詳しく解析するために、KOマウス作製を進めてきた。しかしながらこれまでに有望なES細胞が得られず、再度クローニングを開始中である。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found the binding protein Int6/eIF3e from hypoxia inducible factor 2 α (HIF2 α). The Int6 works as a negative feedback factor to induce degradation of HIF2 α even under normoxia. To further investigation of HIF2 α function, we designed the siRNA and induce it into mouse intradermal space. The injection of siRNA clearly showed the normal angiogenesis of arteries and veins. In addition, we injected the siRNA into ischemic hearts of pigs and rats, ischemic brains of mouse, and injured skin of mice. These experiments demonstrated the clear recovery from ischemic damage and injury. To analyse the mechanisms, we tried to make conditional KO mice to target the Int6 gene. However, we could not get the good ES cells after several screening. We now perform recloning of targeting vectors and try again to make the KO mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学 応用薬理学

キーワード：血管新生 核酸医薬 虚血性疾患 心筋梗塞 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

低酸素ストレス応答に関する遺伝子として転写因子HIF (Hypoxia-inducible factor) は、腫瘍の血管新生に必須なVEGF(血管内皮細胞増殖因子)の誘導や、ミトコンドリアのエネルギー代謝に関わる多くの解糖系酵素の転写制御を行っていることが報告されている。これまでの研究でHIFのサブタイプの1つであるHIF2 α は、低酸素のみでは説明できない不明な点が指摘されていた。私達はこのHIF2 α に焦点を絞り、酵母Two-Hybrid法を用いて解析を進めた結果、HIF2 α の結合因子としてInt6/eIF3eを同定した。Int6はマウスおよびヒトにて乳癌の癌抑制遺伝子として報告されているが、これまでの詳細な解析により、Int6がHIF2 α に直接結合し低酸素非依存的にHIF2 α を分解する新たな機序を発見した(Chen et al. JBC 2007)。さらに、Int6-siRNAをマウス皮下に導入したところ、5日間でこれまでに例のない顕著な正常血管(動脈)が新生された。以上の結果から、Int6はHIF2 α を介した血管新生を調節する「マスタースイッチ」の一つであることが示唆された(Chen et al. Circulation 2010)。このInt6-siRNAは、左環状動脈結紮、脳損傷、皮膚損傷、下肢動脈閉塞の各モデルにて著明な改善が認められた。これらの結果から、Int6-siRNAが創薬の候補として応用可能であることが明確になり、企業との共同研究でサルを用いた毒性試験でも問題なく、上記の治療薬として開発中である。しかしながら、Int6もともと翻訳調節因子の一つeIF3eであり、また、HIF2 α の分解機序、正常血管のスイッチング、各組織での役割やInt6の発現機序など不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では主としてin vivoでのInt6の機序、またはInt6の新たな結合因子との詳細機序の解析するために、Int6欠損した遺伝子マウスの作製を行い詳細な研究を行うこと、および創薬研究への応

用を目指す。

3. 研究の方法

(1) Int6のHIF2 α 分解に関する基礎的な解析: 昨年度Int6およびHIF2 α の各変異体作製を終了し、この変異体を用いてそれぞれの結合サイトを詳細に検討してきた。またGFP等の蛍光蛋白質を用いた結合アッセイ系の構築もほぼ終了し、年内中にはその結合に関わる因子の同定と機能解析を終了させる予定である。Int6はC-末端にPINTドメインと呼ばれるsignalosome結合ドメインを持っている。この結合ドメインは、プロテアゾームのLidの部分に結合することが報告されており、Int6はこの結合を介してユビキチン・プロテアゾーム系と密接に関わっていることが予想される。

(2) Int6欠損マウスの作製(早川英毅、連携研究者:小野富男) Int6の役割を解析する上で、siRNAの発現ベクターによる遺伝子導入マウス作製を試み、軟骨や体重の異常が見られたが、遺伝子導入の頻度や安定性が悪く、解析が困難であった。そのため昨年度、Cre/Lox法による誘導型遺伝子欠損マウス作製のためのベクター構築を完成させ、現在ES細胞への導入後の確認を行っている。本年6月頃までにはマウス胚へのES細胞の導入による変異マウス作製を継続する。

(3) Int6-siRNA導入による各種動物モデルを用いた解析:これまで、HGFやVEGF、bFGFなどの血管新生因子による血管新生の報告があるが、持続的な投与が必要であるが、頻回になりすぎると血中への漏れが起き、副作用の問題が指摘されている。このような問題に対して、int6-siRNAの導入では、局所の細胞から血管新生因子群が継続的に分泌され、正常血管が新生されることが判明している。これまでにラットやマウスの下肢閉塞モデルや心筋梗塞モデル、脳卒中モデルなど、血管の閉塞モデルを用いて予備的な実験を行った。昨年度はブタを用いた心筋梗塞モデルにて、血管新生などの明確な証拠が得られた。今年度はオリゴ型siRNAの使用やオイントメントによる投与など実際の臨床使用に適した方法でInt6-siRNAの効果を評価する。

(4) siRNA 処理血管新生誘導細胞の検討：Int6-siRNA 導入した線維芽細胞は、細胞自身が産生する血管新生因子群が持続的に誘導され、この線維芽細胞などのキャリアー細胞を局所に導入することにより、これまでにない効率的な正常動脈血管誘導が可能と予想される。昨年度から、最適なキャリアー細胞として脱分化脂肪細胞を用いる方法を導入した。今年度はこの脱分化脂肪細胞の基礎的な検討に加え、Int6-siRNA のキャリアー細胞として、まずはマウスやラットの小動物を用いた移植実験による血管新生の効果を確認する予定である。

4. 研究成果

本研究の中で、得られた結果に基づく達成度とその理由は以下の様にまとめられる。

(結果) 大動物の NIBS ミニブタ(♂)を用いた心臓左冠動脈前下行枝結紮による急性心筋梗塞モデルでは、Int6-siRNA ベクターを投与し、4 週間後、血管新生により腹側血行路が形成され、結紮された前下行枝の下流への血流が回復していることが心臓造影にて確認できた。組織染色および心臓エコー検査の結果、対照群と比較して梗塞巣の縮小や心機能の回復には至っていないことが分かった。この原因として、ベクターを投与してから血管新生因子の放出、腹側血行路の形成までの間に虚血部位の心筋細胞が死滅してしまうことが考えられた。そのため、現状では急性虚血性疾患の治療への応用は難しいと考えられる。

(結果) Int6-siRNA (合成 dsRNA)を導入した、脱分化脂肪(DFAT)細胞の移植では、特定の siRNA(Int6-si219)のみが HIF2 α mRNA を上昇させた。他の配列も調べた結果、Int6-si219 による HIF2 α mRNA 上昇には、Int6 抑制による効果よりむしろ siRNA のオフターゲット効果が影響を及ぼしている可能性が高いと考えられた。

(結果) 野生型マウスとの交配による産仔(F1)の Genotyping を行うことで Germ Line Transmission を確認したところ、135 匹の F1 の解析で生殖細胞への寄与は確認されなかった。使用した ES 細胞は他の遺伝子の改変にお

いて良好な結果が得られており、原因として相同組換えに用いたベクターに問題がある可能性が考えられたため、今後ベクターを改良もしくは変更して再度 ES 細胞への導入と組換え体のスクリーニング、およびキメラ作製を行う必要がある。

【今後の研究の推進方策】

(結果) 大動物の NIBS ミニブタ(♂)を用いた心臓左冠動脈前下行枝結紮による急性心筋梗塞モデルでは、Int6-siRNA ベクターを投与時に心筋の動きに合わせ組織外へ漏れ出る可能性があることで、投与方法を改善することが重要である。4 週間後、腹側血行路が形成されたにも拘わらず、梗塞巣の縮小や心機能の回復には至っていないことより、血管新生のみを誘導しても、梗塞にて死滅した心筋細胞を回復させることは不可能であり、この点からは心筋の再生と同時に血管新生を行う必要性が考えられた。

(結果) 上記の結果にも関連する研究内容であったが、Int6-siRNA を導入した脱分化脂肪(DFAT)細胞の移植では、特定の siRNA(Int6-si219)のみが HIF2 α mRNA を上昇させ、DFAT 細胞では siRNA のオフターゲット効果も影響している可能性が結果として得られた。HIF2 α が上昇し、血管新生が誘導される以外にもさらに重要なファクターがあると考えられたため、Int6-si219 に配列近傍の mRNA (21mer の配列中 5 ミスマッチ以内)のリストを作成し(RNAi 社) DNA microarray による遺伝子発現データと組み合わせることで、HIF2 α の発現に影響を及ぼす可能性のある遺伝子を探索したが、有力な候補を見出すには至らなかった。

(結果) 最初に得られた 2 クローンはサザンブロットで正しく相同組換えしていないことを確認したため、TV の 3'ホモロジーアームが 0.6kb と短かったことから、3'アームを 5.7kb に伸長したベクターで再度スクリーニングを行っている。また、*Neo^R* 遺伝子の発現効率が悪い可能性もあり、*Neo^R* の方向を逆転させることで改善される可能性がある。

Int6 コンディショナルノックアウト(CKO)マ

ウス作製に関して以下の研究を行った。

CKO マウス作製のために、まずターゲティングベクター(TV)を構築する。TV には後に Cre リコンビナーゼにより第 2 エクソンを切断するための loxP 配列、ネオマイシン耐性遺伝子(Neo^R)を含み、それらの 5'側および 3'側にマウスゲノム配列と相同なホモロジーアームが含まれている。TV をマウス ES 細胞(C57BL6/N マウス由来 RENKA 株)にエレクトロポレーションにより導入し、G418 薬剤耐性遺伝子が導入された ES 細胞のコロニーを選別する。さらに、PCR およびサザンブロットにより TV がゲノム上の正しい位置で相同組換えを起こしているかを確認する。この段階で CKO-ES クローンを得る。

CKO-ES クローンをマウス 8 細胞期胚と凝集させ、仮親マウスの子宮で発生させてキメラマウスを得る。

キメラマウスと野生型 C57BL/6N マウスを交配し、F1 個体に CKO 遺伝子座が受け継がれているか(Germ Line Transmission, GLT)を確認する。

CKO 遺伝子座を持つ F1 個体を交配し CKO ホモ個体を得る。

Cre マウスとの交配により、時期もしくは部位(臓器)特異的 Int6 欠損マウスを作出し、機能解析に用いる。

・上記ターゲティングベクターTV1 を ES 細胞に導入し、スクリーニングをこれまで 3 回行ったが、CKO 遺伝子座を有する ES クローンが 1 つしか得られなかった(クローン#1-2)。
・この#1-2 クローンを用いて、3 回に分けてキメラマウス計 9 匹を作出し、野生型 B6N マウスとの交配で生まれた F1 個体 合計 135 匹の遺伝子解析を行ったが、GLT が確認されず、CKO マウスが得られなかった。

・使用した ES 細胞は他の遺伝子欠損マウス作製において実績があるため、ベクターに問題がある可能性がある可能性が高いとの結論に達し、現在ベクターの改良を行った。具体的には、3'arm を伸長して相同組換え効率を上昇させること、および Neo^R 遺伝子の方向を逆転し発現効率を上昇させることである。

・自作 TV および ES 細胞に問題があった場合のバックアップとして、EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program) にて作製された Int6(eIF3e) CKO ES クローンを 3 クローン購入したが、サザンブロットによる遺伝子解析の結果、いずれも正しく相同組換えが起きていないものであることが判明し、使用できなかった。また EUCOMM のベクターの購入手続きを平成 24 年 4 月に行ったが、ベクター製造元で Quality Control がとれておらず、平成 25 年 2 月現在で未納品のままとなっている。直接の原因ではないが、購入品が欠陥品であったことも遅延の要因の一つであった。

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 4 件)

1. Hayakawa H and Shibasaki F (Review): New Aspect of Hypoxic and Non-Hypoxic Regulation in Angiogenesis through HIFs. *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis*. (Jawahar L. Mehta and Naranjan S. Dhalla Editors, Springer, Chapter 6, 93-106, 2013.(査読有))
2. R. Miyashita, L. Chen, H. Oshiro, H. Uchino and F. Shibasaki. "Int6 silencing causes induction of angiogenic factors in neuronal cells via accumulation of hypoxia-inducible factor 2alpha and decreases brain damage in rats." *Neurosci Lett* 528(1): 83-88, 2012. (査読有)
3. A. Endler, L. Chen, J. Zhang, G. T. Xu and F. Shibasaki. "Binding of the ERalpha and ARNT1 AF2 domains to exon 21 of the SRC1 isoform SRC1e is essential for estrogen- and dioxin-related transcription." *J Cell Sci* 125(Pt 8): 2004-2016, 2012. (査読有)
4. Higashimura Y, Nakajima Y, Yamaji R, Harada N, Shibasaki F, Nakano Y, Inui H.: Up-regulation of

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression by HIF-1 activity depending on Sp1 in hypoxic breast cancer cells.

Arch. Biochem. Biophys. 509:1-8, 2011. (査読有)

[学会発表](計10件)

1. 貞任大地、田島陽一、陳リー、芝崎 太 : HIF-2 α と新規結合因子 CGI-97/SBDS の相互作用解析 第12回 Conference for BioSignal and Medicine 2013.7.13 山梨県
2. 貞任大地、田島陽一、陳リー、芝崎 太 : HIF-2 α と新規結合因子 CGI-97/SBDS の相互作用解析 第35回日本分子生物学会年会 2012.12.12 福岡県
3. 貞任大地、陳リー、芝崎 太 : Shwachman 症候群原因因子 SBDS は低酸素誘導因子 HIF-2 α を介して遺伝子発現を調節する 第35回日本分子生物学会年会 2012.12.5 兵庫県
4. 早川英毅、小野富男、石兼 真、秋武義治、細田洋司、風間智彦、松本太郎、池田智明、芝崎 太 : Int6 抑制による血管新生の機序解明と臨床応用. 第11回 Conference of BioSignal and Medicine (CBSM), 2012, 9.1, 伊勢市.
5. 貞任大地、田島陽一、陳リー、芝崎 太 : HIF-2 α と新規結合因子 CGI-97/SBDS の相互作用解析 第11回 Conference for BioSignal and Medicine 2012.9.1 三重県
6. 早川英毅、小野富男、石兼真、秋武義治、風間智彦、細田洋司、松本太郎、池田智明、芝崎 太 : Int6 抑制による血管新生の機序解明と臨床応用. 第34回日本分子生物学会年会, 2011, 12.13, 横浜.
7. Hideki Hayakawa, Shin Ishikane, Yoshiharu Akitake, Tomohiko Kazama, Hiroshi Hosoda, Taro Matsumoto, Tomoaki Ikeda, Futoshi Shibasaki: Int6 silencing promotes outgrowth of functional vessels: its regulatory system and clinical application. The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization / The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting, 2011.12.9. Tokyo
8. 早川英毅 : Int6 抑制による血管新生作用の機序解明と臨床応用. 医学研ポスター発表会. 2011.10.11 医学研講堂
9. 石兼 真、細田洋司、Jung Kyongsook、秋武義治、三島健一、岩崎克典、藤原道弘、早川英毅、芝崎 太、池田智明 : 卵膜由来間葉系幹細胞を用いた再生医療における他家細胞移植療法の確立 Conference of BioSignal and Medicine, 2011, 6.25, 軽井沢..
10. 早川英毅、小野富男、石兼 真、秋武義治、風間智彦、細田洋司、松本太郎、池田智明、芝崎 太 : Int6 抑制による血管新生の機序解明と臨床応用. Conference of BioSignal and Medicine (CBSM), 2011, 6.25, 軽井沢.

[その他]

ホームページ等

<http://www.molmed.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

芝崎 太 (SHIBASAKI, Futoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム

医科学研究分野・参事研究員

研究者番号 : 90300954

(2)研究分担者 : なし

(3)連携研究者

小野富男 (ONO, Tomio)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤研

究センター・基盤技術研究職員

研究者番号 : 60231239