

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 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390265

研究課題名（和文）ミクロRNAを用いた血管細胞分化増殖制御による新規心血管治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment method for cardiovascular disorders with phenotype regulation of vascular cells using micro RNAs

研究代表者 南方 謙二（MINAKATA KENJI）

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60539675

研究成果の概要（和文）：

虚血性疾患に対する外科的バイパス術後の移植グラフ血管、特に静脈グラフの劣化やステント治療後の再狭窄などは、平滑筋増殖による内膜肥厚などの血管リモデリングが原因となっている。本研究では、ウサギ頸動脈バイパスモデルを用いて、ミクロRNA-145 (miRNA-145) が平滑筋増殖抑制に特異的に作用する性質を応用し、内膜肥厚抑制効果について検討した。コントロール群（遺伝子導入なし）と miR-145 導入群（自家静脈グラフトにエレクトロポレーション法にて miR-145 を導入）の 2 群に分け、日本白ウサギの頸動脈を自家頸静脈グラフトに置換し、その後の内膜肥厚について評価を行った。4 週間後の新生内膜の厚さ及び内膜/中膜面積比は有意に miR-145 群で小さかった。また、平滑筋分化の指標である SM-1 及び SM-2 免疫染色において miR-145 群において増殖型が抑制され、細胞増殖の指標である Ki-67 免疫染色でも miR-145 群において内膜肥厚部の細胞増殖が抑制されていた。以上の結果から、血管平滑筋フェノタイプを制御できる miR-145 を自家静脈グラフトへ遺伝子導入することで、新生内膜増殖による移植グラフトの内膜肥厚を抑制できるため、外科的バイパス術後のグラフト開存率が改善されることが期待できる。さらにはウイルスベクターを用いない遺伝子導入法を用いた事で、基礎研究段階から臨床応用への可能性も広がったと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Intimal hyperplasia is the major cause of vein graft disease. Proliferation and migration of smooth muscle cells (SMCs) into the intima are key mechanism in this process. Recent studies have revealed that microRNA-145(miR-145) is a specific mediator in the regulation on phenotype of SMCs, proliferative or differentiative. We aimed to investigate the impact of miR-145 on intimal hyperplasia with rabbit vein graft disease model using electroporation-mediated gene transfer. We harvested right jugular vein of male Japanese white rabbit and injured the endothelium by balloon catheter. Vein graft was transduced with miR-145 encoding plasmids by electroporator and interposed at ipsilateral carotid artery. Four weeks after surgery, we explanted the venous graft and performed histological studies (hematoxylin and eosin staining, and elastica van Gieson staining for elastic fiber). Intimal thickness and intima/media area ratio were evaluated. Furthermore, immunohistochemistry for mature smooth muscle marker myosin heavy chain smooth muscle-1 and -2 (SM-1 and SM-2) and proliferation marker Ki-67 were performed to study the degree of differentiation and proliferation of SMCs. MiR-145 transduction significantly reduced neointimal thickness and intima/media area ratio compared to the grafts without gene transfer. Immunohistochemistry revealed that miR-145 transduced grafts contained more SM-2 positive mature SMCs and less Ki-67 positive proliferating cells. Considering these results, we conclude that electroporation-mediated non-virus transfer of miR-145 into the vein bypass graft potently regulates SMC phenotype and would be promising to prevent intimal hyperplasia in vein graft disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
23年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
24年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：胸部外科学、心臓血管外科学

キーワード：マイクロRNA、血管平滑筋、内膜肥厚

1. 研究開始当初の背景

冠動脈バイパス術および四肢末梢血管疾患における外科的血行再建術において自家静脈グラフトが重要な位置を占めることに異論はない。しかし、静脈グラフトの長期開存率は未だ満足すべきものではない。主因の一つに、平滑筋増殖による内膜肥厚などの血管リモデリングが原因としてあるため、移植グラフトの長期開存率の改善及びそれによりもたらされる生命予後改善のためにも静脈グラフトの内膜肥厚抑制が大きな課題である。

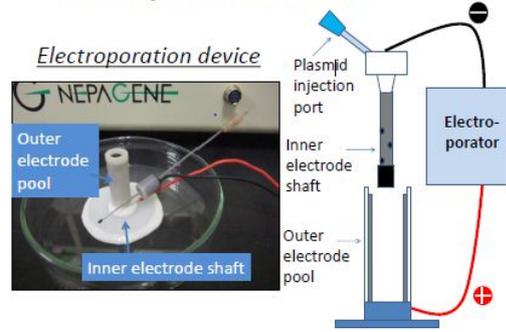
2. 研究の目的

マイクロRNAの平滑筋増殖抑制作用を利用して、静脈グラフトの開存率の改善及び臨床応用を目指すことである。

3. 研究の方法

遺伝子導入なしのコントロール群、及びマイクロRNA-145 (miR-145) 発現プラスミドをエレクトロポレーション法にて自家静脈グラフトに遺伝子導入したmiR-145導入群の2群に分け、実験を行った。全身麻酔下にて、日本白ウサギの頸部を切開し、頸静脈を剝離後、バルーンカテーテルを用いて静脈内膜を除去し、切離する。続いて、miR-145導入群のみエレクトロポレーション法を行い遺伝子導入し(図1)、その静脈グラフトを用いて頸動脈を置換し4週間後の内膜肥厚抑制効果を比較検討した。また、平滑筋分化の指標であるSM-1、SM-2、及び細胞増殖の指標であるKi-67にて免疫染色を行い両群間で比較検討も行った。

Electroporation Procedure

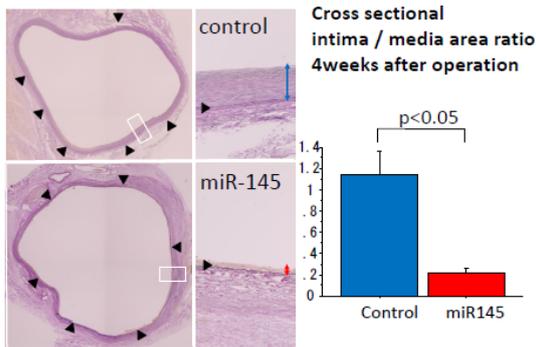


(図1) エレクトロポレーション法による静脈グラフトへのmiR-145導入

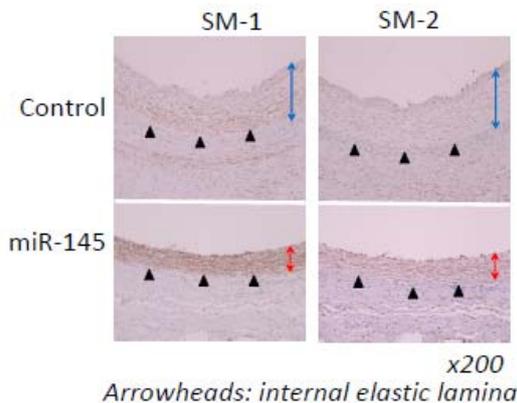
4. 研究成果

4週間後の新生内膜の肥厚はmiR-145群で有意に小さく(コントロール群: 136.5 ± 38.34 vs miR-145群: $42.4 \pm 4.8 \mu\text{m}$, $P < 0.05$)、内膜/中膜面積比においても有意にmiR-145群で小さかった(コントロール群: 1.129 ± 0.233 vs miR-145群: 0.216 ± 0.043 , $p < 0.01$) (図2)。また、SM-1およびSM-2免疫染色においてもmiR-145群において増殖型が抑制されていると考えられた(図3)。Ki-67を用いた免疫染色でもmiR-145群において内膜肥厚部の細胞増殖が抑制されていた(図4)。

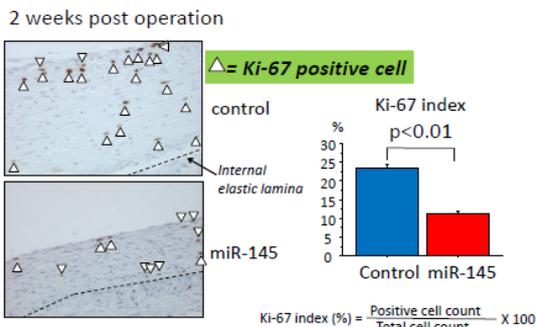
以上より、血管平滑筋フェノタイプを分化型に制御できるmiR-145を自家静脈グラフトへ遺伝子導入することで、静脈グラフトの開存率を改善できた。さらにはウイルスベクターを用いない遺伝子導入法を用いた事で、基礎研究段階から臨床応用への可能性も広がったと考えられた。



(図2) 内膜/中膜面積比



(図3) SM-1 および SM-2 免疫染色



(図4) Ki-67 免疫染色

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6件)

① Yamaguchi S, Yamahara K et al, The role of microRNA-145 in human embryonic stem cell differentiation into vascular cells, *Atherosclerosis*, 査読有、219(2):468-74、2011

② Kenji Minakata. Ventricular Approach for Functional Mitral Regurgitation in Cardiomyopathy、*World Journal of*

Cardiovascular Surgery, 査読有、3:8-14、2013

③ Marui A et al. Benefits of off-pump coronary artery bypass grafting in high-risk patients, *Circulation*, 査読有、126: S151-157、2012

④ Marui A et al. Significance of off-pump coronary artery bypass grafting compared with percutaneous coronary intervention: a propensity score analysis、*Eur J Cardiothorac Surg*, 査読有、41(1): 94-101、2012

⑤ Ishikawa H, Nakamura Y, Jo J, Tabata Y. Gelatin nanospheres incorporating siRNA for controlled intracellular release、*Biomaterials*, 査読有、33(35): 9097-9104、2012

⑥ Yoshikawa E, Marui A, Tsukashita M, Nisina T, Wang J, Muranaka H, Ikeda T, Komeda M. Carvedilol may alleviate late cardiac remodeling following surgical ventricular restoration. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*、査読有、37(2):362-367、2010

[学会発表] (計2件)

① Ohnaka M, Marui A, Yamahara K, Ikeda T et al. Impact of MicroRNA - 145 to prevent vein graft disease in rabbit by regulation of smooth muscle cell phenotype、*American Heart Association, Scientific Sessions 2012 (AHA 84th)* 2012年11月3-7日、Los Angeles, USA、

② Ohnaka M, Marui A, Yamahara K, Minakata K, Yamazaki K, Kumagai M, Masumoto H, Ikeda T, Sakata R, Poster1, microRNA-145 Prevents Intimal Hyperplasia in Rabbit Vein Graft Disease Model by Regulation of Smooth Muscle Cell Phenotype、*The 21st Annual Meeting Of The Asian Society For Cardiovascular And Thoracic Surgery (ASCVTS2013)* 2013年4月4-7日、Kobe, Japan (**Adult Cardiac 部門 Best poster award 受賞**)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0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 0 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/study/03/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南方 謙二 (MINAKATA KENJI)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60539675

(2) 研究分担者

池田 義 (IKEDA TADASHI)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40281092

丸井 晃 (MARUI AKIRA)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60402856

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

山原 研一 (YAMAHARA KENICHI)
国立循環器病研究センター・再生医療部・
室長
研究者番号：844049925

(3) 連携研究者

()

研究者番号：