

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462134

研究課題名(和文) 低酸素応答システムを標的とした超音波遺伝子導入による病的心筋リモデリングの制御

研究課題名(英文) Regulation of pathologic cardiac remodeling targeting a hypoxia response system using a sonoporation.

研究代表者

松野 幸博 (MATSUNO, Yukihiro)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10542409

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)：本研究の目的は、心不全発症メカニズムにおいて重要とされる低酸素応答システムを標的とし、遺伝子工学的に作成した癌抑制遺伝子p53-Ig遺伝子およびHypoxia inducible factor-1(HIF-1)遺伝子を超音波遺伝子導入法を用いて心筋細胞へ導入することで病的心筋リモデリングを制御することである。in vitroにおける導入遺伝子の発現を確認し、in vivo実験にて既存のGFP遺伝子をマウス心へ導入し、その遺伝子発現を蛍光顕微鏡下で確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed that regulation of pathologic cardiac remodeling targeting a hypoxia response system using a sonoporation. We performed GFP gene delivery in vitro, and confirmed the gene expression in vivo.

研究分野：心臓血管外科学全般

キーワード：心筋疾患外科学 遺伝子治療 心筋リモデリング 低酸素応答

1. 研究開始当初の背景

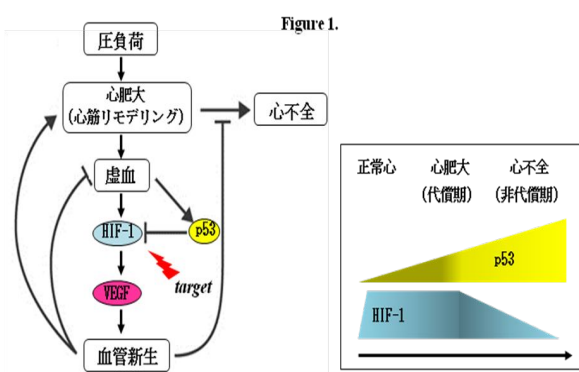
循環器疾患に対する治療は飛躍的な進歩を遂げているが、心筋梗塞、弁膜疾患などの多様な疾患の終末像である重症慢性心不全はいまだに先進諸国における主要な死亡原因のひとつである。内科治療が奏功しないほど重症化した心不全に対しては、補助人工心臓や心臓移植等の置換型治療が有効であるが、ドナー不足や免疫抑制、合併症など解決すべき問題が多く、すべての重症心不全患者に対する普遍的な治療法とは言い難い。一部では遺伝子治療(補充療法、分化誘導療法、分裂増殖誘導療法)・細胞移植による再生医療などの研究も進んでいるが、導入遺伝子の発現効率、移植細胞の定着・分化・誘導効率・移植後の不整脈など問題点も少なくないことから、今までとは全く異なる新しい治療法の開発が期待されている。

心不全は心臓がもつ内因性の適応能力が破綻することによって顕在化する病態である。さまざまな原因、例えば心筋梗塞や高血圧によって心負荷が増大すると、代償反応としての心筋細胞肥大が引き起こされるが、その負荷が改善されず持続すると適応的でない病的な心筋リモデリング(maladaptive myocardial remodelling)が進行し心不全に陥ることが知られている¹⁾。肥大心では個々の心筋細胞の酸素消費が増えること、血管からの拡散距離が大きくなること、間質の線維化によって酸素の拡散障害が生じることなどから、局所的に虚血・低酸素が生じている。最近の研究で、代償性心肥大の段階では心筋細胞が低酸素状態に陥ることによりHIF-1(hypoxia inducible factor-1)が活性化し、さらにそれによって誘導される血管新生因子 VEGF(vascular endothelial growth factor)の活性化を介して心臓での血管新生が促進され心機能が維持される。しかし負荷

が持続し非代償期となると遷延する低酸素状態により**癌抑制遺伝子 p53**の活性化が起こり HIF-1 と結合することにより HIF-1 および VEGF 活性が抑制され心機能が低下するということが明らかになった(Figure 1)²⁾。p53 ノックアウトマウスの圧負荷モデルにおいて、非代償期にも関わらず HIF-1 の活性化が持続し VEGF の発現増加に伴う血管新生の亢進が確認されており、その結果心筋肥大は進行するが、心機能は維持されることが証明されている²⁾。以上より心不全治療のストラテジーとしては、心不全の病態生理において重要とされる上述の心筋細胞と血管内皮細胞の細胞間ネットワークに着目し、**低酸素応答システムを標的**とすべきである。つまり代償期から非代償期に至る心筋細胞において、

- 1) p53 と HIF-1 の結合を阻害すること、
- 2) HIF-1 を高発現させ VEGF を誘導・活性化

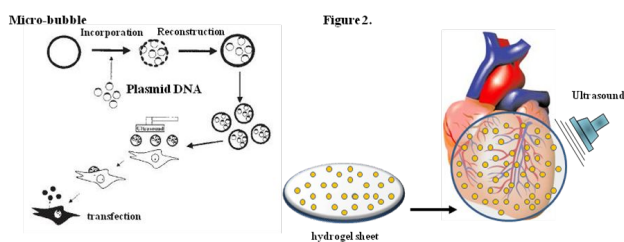
すること、により血管新生の促進が得られ、心肥大から心不全へ至る過程の病的な心筋リモデリングを抑制することが可能ではないかと考え、本研究を着想するに至った。



2. 研究の目的

本研究では、上述の心不全発症メカニズムにおいて重要とされる低酸素応答システムを標的とし、遺伝子工学的に作成した p53-Ig 遺伝子を心筋細胞へ効率的に導入すること

で HIF-1 との結合を阻害し、同時に HIF-1 遺伝子を導入し高発現させることで血管新生を促進し、病的心筋リモデリングを制御することを目的とする。遺伝子導入法としては、以前より当教室にて行っている非ウイルスベクター法を応用し発展させた「**超音波・遺伝子封入マイクロバブル法**」を用いる。具体的には、超音波造影剤に含まれるマイクロバブルの内部へ p53-Ig/HIF-1 遺伝子を封入し、超音波のキャビテーション作用によりバブルを破壊することで遺伝子導入を行う (Fig.2)。さらに心筋細胞全体への導入効率を高めるために、**遺伝子封入ゼラチンハイドロゲル心膜シート**を独自に開発する。つまり、遺伝子を封入したマイクロバブルをゼラチンハイドロゲルに混合し、シート状に加工することで心膜シートを作成し心臓表面全体を被覆する。ゼラチンハイドロゲルは生体吸収性であり徐放性をもつことから、代償期から非代償期に至る過程において心筋細胞内へ安全かつ効率的な遺伝子導入が可能であると考えられる。



< 引用文献 >

- 1) Knöll R et al. Towards a re-definition of ‘cardiac hypertrophy’ through a rational characterization of left ventricular phenotypes: a position paper of the Working Group ‘Myocardial Function’ of the ESC. European Journal Heart Failure 2011;13:811-819.
- 2) Sano M et al. p53-induced inhibition of

Hif1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. Nature 2007;446:444-448.

3 . 研究の方法

低酸素応答システムを標的とし、遺伝子工学的に作成した p53-Ig 遺伝子および HIF-1 遺伝子をゼラチンハイドロゲル心膜シートへ封入し、超音波マイクロバブル法を用いて心筋細胞へ効率的に導入することによる病的心筋リモデリングの制御効果を実験的に検討する。

1) **p53 遺伝子の精製・p53-Ig 遺伝子の構築 および HIF-1 遺伝子の精製** (松野担当)

cDNA より p53 の細胞外ドメイン領域を有する遺伝子を精製し、PCR 法を用いて p53 遺伝子を増幅する。その後、免疫グロブリン Fc 領域を有するクローニングベクター内へ挿入し、p53-Ig 遺伝子を構築する。同様にして cDNA より HIF-1 遺伝子を精製し、PCR 法を用いて HIF-1 遺伝子を増幅する。

2) **in vitro における遺伝子導入および導入遺伝子発現の確認**

p53 遺伝子および HIF-1 遺伝子の下流に蛍光タンパク質である GFP (green fluorescent protein) 遺伝子を挿入し構築した p53-GFP 遺伝子および HIF-1-GFP 遺伝子を作製する。既存の超音波遺伝子導入装置を用いて in vitro にて COS 細胞へ導入し、その遺伝子発現を ELISA 法、蛍光顕微鏡下で確認する。同時に GFP 遺伝子発現量の定量化 (Western blot analysis) および経時的変化を検討する。

3) **遺伝子封入マイクロバブルの作製・至適導入条件の設定**

上記にて精製・増幅した p53-GFP 遺伝子および HIF-1-GFP 遺伝子を、マイクロバブル内へ封入する。この際、バブルの殻の素材としてポリマーを用いて膜の厚みを変えた数種類のバブルを作製し、

- a) バブル破壊に必要な超音波照射量、
 - b) 単位バブルあたりの封入遺伝子量、
- につき検討し、それぞれの遺伝子導入・発現効率を比較検討することで至適導入条件を決定する。

4) 遺伝子封入ゼラチンハイドロゲル心膜シートの作成

上記にて作成した p53-GFP 遺伝子および HIF-1-GFP 遺伝子を生体吸収性ゼラチンハイドロゲルに混合し、シート状に加工する¹⁾。

混合するゼラチン含有量、シートの厚さを変え徐放時間の検討を行う。これまでに報告されているマウス圧負荷心不全モデルでは、圧負荷後 2 週間は代償期であり、以後非代償期となることが証明されているため²⁾、2 週間以上の徐放効果がられるように、ゼラチン含有量およびシート厚に関する徐放性の至適条件を検討する。

5) in vivo における遺伝子導入および導入遺伝子発現の確認

マウスを全身麻酔導入後、胸骨正中切開アプローチで心臓に達し上記にて作成した遺伝子封入ゼラチンハイドロゲル心膜シートを心臓表面へ被覆した後、超音波照射により遺伝子導入を行う。

- a) 遺伝子導入後 3 日、7 日、14 日、28 日目に心臓を摘出し、蛍光顕微鏡下で GFP 遺伝子発現を確認する。同時に遺伝子発現量の定量化および経時的变化を検討する。

- b) 混合するゼラチン含有量、シートの厚さを変え徐放時間の至適条件の検討を行う。

6) マウス圧負荷心不全モデルの作成

マウス(8-week-old male C57BL/6 mice)を用いて、腕頭動脈と左総頸動脈の間を 26G 径で縮窄することで圧負荷心不全モデルを作成する。下記文献の TAC(transvers aorta constriction) モデルを参考に³⁾。

7) in vivo における遺伝子封入ゼラチンハイドロゲル心膜シートを用いた超音波マイクロバブル法の有効性に関する検討

上記で作成したマウス圧負荷心不全モデルにおいて、遺伝子導入群と遺伝子非導入群の 2 群に分け、摘出心における下記評価項目につき比較検討を行う。導入遺伝子は、上述で作成した p53-Ig 遺伝子および HIF-1 遺伝子を用いる。

【評価項目】

- ・心重量比(HW/BW; mg/g)、
- ・左室壁厚(LVPW; mm)、
- ・心収縮力(FS; %)、
- ・血管数(vessel/cardiomyocyte)、
- ・心筋線維化; Azan 染色、
- ・p53, HIF-1, VEGF 発現の定量; Western blot analysis

4. 研究成果

初めに in vivo における遺伝子導入および導入遺伝子発現の確認を行い、続いて in vitro 実験にて確認した既存の GFP 遺伝子をマウス心へ超音波遺伝子導入法を用いて導入し、その遺伝子発現を蛍光顕微鏡下で確認した。

現在、機能性遺伝子の作成およびその遺伝子発現効果につき検討中である。また今後、遺伝子導入効率を上げるために遺伝子封入心膜シートの作成を試み、実験的検討を行う必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

松野 幸博 (MATSUNO, Yukihiro)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 1 0 5 4 2 4 0 9

(2)研究分担者

竹村 博文 (TAKEMURA, Hirofumi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 2 0 2 4 2 5 2 1

島袋勝也 (SHIMABUKURO, Katsuya)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 2 0 3 6 2 1 6 3

(3)連携研究者

()

研究者番号: