

学 位 論 文 題 名

PDGF 受容体に対するアンチセンスオリゴを
用いた血管平滑筋細胞増殖抑制

学位論文内容の要旨

【緒言】経皮的冠動脈形成術 (PTCA) は、冠動脈バイパス術に比べ侵襲が少なく、また反復して施行可能なことから、狭心症や心筋梗塞に対する有力な治療法として定着しつつある。しかし、PTCA 後の冠動脈再狭窄は、約半数近くの症例で認められ、虚血性心疾患の治療に PTCA を用いる上で最大の問題点となっている。PTCA 後再狭窄の機序としては、バルーンによる血管内皮の機械的損傷に伴う血栓形成、それに引き続く中膜平滑筋細胞の内膜への遊走・増殖が主体と考えられており、この過程には PDGF をはじめとしていくつかの増殖因子やサイトカインの関与が推定されている。この様な PTCA 後再狭窄を防止する目的で、現在までに様々な薬物が検討されてきたが、十分な効果は得られていない。

近年、血管平滑筋細胞に外来性遺伝子を強制的に発現させたり、内在性遺伝子の発現を抑制することにより、PTCA 後再狭窄を制御しようとする遺伝子治療の可能性が検討されている。本研究では、PDGF α 受容体 mRNA に対する Antisense oligonucleotide を用いて血管平滑筋細胞の増殖抑制を試みた。

【方法】1. Antisense oligonucleotide の合成

ラット PDGF α 受容体 mRNA に対する 3 種類の phosphorothioate antisense oligonucleotide (AS-No.1~No.3) を合成し、AS-No.2, No.3 に対応する sense oligonucleotide (Sense-No.2, No.3) を対照とした。

2. AS による DNA 合成抑制の検討

培養ラット胸部大動脈血管平滑筋細胞 (A10細胞) を 24 well plate で 4,000 cells/cm² となるまで 10% fetal bovine serum (FBS) で培養した。24 時間 同調培養した後、AS 0~1 μ M 存在下に 1~4 日間培養し、その後 3% FBS 又は

PDGF-AA, -AB, -BB (10ng/ml) で24時間刺激した。増殖因子によるDNA合成の程度は、 ^3H -thymidine の取込みにより定量した。

3. PDGF α , β 受容体 mRNA の発現量の検討

A10細胞から抽出した total RNA から、RT-PCR 法により、ラット PDGF α 及び β 受容体部分 cDNA を増幅・精製し、Northern blot 法の標識プローブを作成した。Northern blot 法で A10細胞における PDGF α , β 受容体 mRNA の発現量を検討した。また AS が α 受容体 mRNA の発現量に与える影響は、定量的 RT-PCR 法で検討した。

【結果】 1. アンチセンスオリゴ (AS) による DNA 合成抑制の検討

3種類の AS $1\mu\text{M}$ を A10細胞に3日間作用させたところ、AS-No.3 は PDGF-AB 刺激による DNA 合成をコントロールに比べ有意に低下させた ($p<0.01$)。また AS-No.3 $1\mu\text{M}$ を3日間 A10細胞に作用させると、3% FBS および PDGF-AB, -BB 刺激による DNA 合成を有意に抑制した (コントロール群に比較し、それぞれ 51%, 44%, 49%)。また Sense-No.2 には DNA 合成抑制効果は認めなかった。異なる濃度の AS-No.3 (0.25, 0.5, $1\mu\text{M}$) は 3% FBS 及び PDGF-AB, -BB 刺激による DNA 合成を、用量依存性に抑制した。AS との培養時間を変化させて検討した結果、AS-No.3 は血清刺激による DNA 合成を2日で 35% 抑制し、以後4日目まで同様の抑制を示した。以上より AS-No.3 は、A10細胞の DNA 合成を用量依存性に抑制し、その効果発現は 48時間以内に最大となることが示唆された。

2. PDGF α , β 受容体 mRNA の発現の検討

Northern blot 法で検討した結果、A10細胞では PDGF β 受容体 mRNA の発現を認めたが、PDGF α 受容体 mRNA の発現は同定されなかった。また、AS-No.3, Sense-No.3 ($1\mu\text{M}$) は PDGF β 受容体 mRNA の発現に影響を与えなかった。RT-PCR 法による検討では、AS-No.3 ($1\mu\text{M}$) は PDGF α 受容体 mRNA の発現を低下させたが、Sense-No.3 では変化がなかった。

【考察】近年、PTCA 後再狭窄を防止する目的で、アンチセンス遺伝子の血管平滑筋細胞への導入が試みられる様になった。現在までに、細胞周期関連遺伝子では proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cdc 2 や cdk 2 kinase, oncogene では c-myc や c-myc 遺伝子等の mRNA に対するアンチセンス遺伝子について検討されており、いずれも平滑筋細胞に導入することにより増殖抑制効果を有する事が報告されている。しかし細胞周期関連遺伝子はすべての

増殖細胞で普遍的に発現することから、その発現を抑制するアンチセンス遺伝子を用いた場合、分裂細胞の豊富な他の臓器・組織への影響が懸念され、実際の臨床応用には問題が多いと思われる。本研究では、PDGF α 受容体 mRNA に対する AS を用いて、主要な増殖因子である PDGF に由来する増殖シグナルの抑制を試みた。PDGF α 受容体は各細胞種によりその発現の程度が異なることから、同受容体を AS の標的とすることで臓器選択性を高めることが可能である。

血小板由来増殖因子 PDGF は分子量約 3 万の A 鎖と B 鎖の 2 本の polypeptide の dimer からなる蛋白質で、PDGF-AA, -AB, -BB の 3 つの isoform が存在する。一方、PDGF 受容体には α , β の 2 つの subtype が存在し、PDGF と結合した後 dimer を形成する。PDGF-A 鎖は α 受容体と特異的に結合し、B 鎖は α , β 両受容体に対して親和性を有する。本研究で検討した PDGF α 受容体 mRNA に対する AS は、平滑筋での α 受容体の発現を抑制することで、動脈硬化巣において発現の亢進した PDGF-A 鎖の細胞増殖促進作用をより効果的に抑制することが期待される。

本研究で検討を加えた AS-No.3 は、3%FBS, PDGF-AB,-BB 刺激による DNA 合成を $1\mu\text{M}$ までの濃度で用量依存性に抑制した。受容体 mRNA の発現の検討では、AS-No.3 は α 受容体 mRNA の発現を低下させたが、 β 受容体 mRNA の発現には変化がなかった。センスオリゴは DNA 合成、及び受容体 mRNA の発現に影響を与えなかった。このことから、AS-No.3 は標的である PDGF α 受容体 mRNA の発現を配列特異的に低下させ、その結果 A10 細胞の DNA 合成を抑制する事が示唆された。AS による DNA 合成抑制の時間依存性を検討した結果、血清刺激の場合、AS 添加 2 日目において 35% の DNA 合成抑制が認められ、以後 4 日目まで同程度の抑制効果が観察された。AS 遺伝子は、PDGF 受容体の de novo 合成を抑制するが、すでに発現している受容体に対しては抑制効果を持たず、AS の効果発現には受容体蛋白の代謝回転を待たなくてはならない。この実験結果から、細胞膜に存在する PDGF 受容体の代謝分解には 48 時間は必要である事が示された。したがって本研究で検討を加えた AS を in vivo で応用する際には、短期間で PDGF の作用を抑制するような受容体阻害剤との併用が必要となると思われる。

本研究において、PDGF α 受容体に対するアンチセンスオリゴを用いることで、血管平滑筋細胞の DNA 合成を著明に抑制し得た。今後、最適な塩基配列の決定や、動物モデルを用いた in vivo での検討が必要であるが、PTCA 後の再狭窄の予防に本法が有用である可能性が強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

PDGF 受容体に対するアンチセンスオリゴを用いた血管平滑筋細胞増殖抑制

経皮的冠動脈形成術 (PTCA) は虚血性心疾患の有力な治療法として定着しつつあるが, PTCA 後に生じる冠動脈再狭窄は, 約半数近くの症例で認められ, 虚血性心疾患の治療に PTCA を用いる上で最大の問題点となっている. PTCA 後再狭窄の機序としては, バルーンによる血管内皮の機械的損傷に伴う血栓形成, それに引き続く中膜平滑筋細胞の内膜への遊走・増殖が主体と考えられており, この過程には PDGF をはじめとしていくつかの増殖因子やサイトカインの関与が推定されている. 近年, PTCA 後再狭窄の予防を目的にアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子治療の可能性が検討されている. 本研究では, PDGF α 受容体 mRNA に対するアンチセンスオリゴを用いて血管平滑筋細胞の増殖抑制を試みた.

方法としては, ラット PDGF α 受容体 mRNA に対して合成されたアンチセンスオリゴ (AS), 及びセンスオリゴ $0 \sim 1 \mu\text{M}$ 存在下にラット培養血管平滑筋細胞 (A10細胞) を 1~4 日間培養した後, 3% 胎児ウシ血清 (FBS) 又は PDGF-AA, -AB, -BB (10ng/ml) で 24 時間刺激し, 増殖因子による DNA 合成の程度を, ^3H -thymidine の取込みにより定量した. また AS が PDGF α 受容体 mRNA の発現量に与える影響は, 定量的 RT-PCR 法で検討した.

その結果, AS $1 \mu\text{M}$ を 3 日間 A10 細胞に作用させると, 3% FBS および PDGF-AB, -BB 刺激による DNA 合成は有意に抑制された. またセンスオリゴには DNA 合成抑制効果が認められなかった. 異なる濃度の AS (0.25, 0.5, $1 \mu\text{M}$) は 3% FBS 及び PDGF-AB, -BB 刺激による DNA 合成を, 用量依存性に抑制した. AS との培養時間を変化させて検討した結果, AS は血清

刺激によるDNA合成を2日で35%抑制し、以後4日目まで同様の抑制を示した。以上よりASは、A10細胞のDNA合成を用量依存性に抑制し、その効果発現は48時間以内に平衡状態となることが示唆された。またPDGF α 受容体 mRNA の発現量を定量的 RT-PCR 法で検討した結果、ASはPDGF α 受容体 mRNA の発現量を低下させたが、センスオリゴは α 受容体 mRNA の発現量に変化を認めなかった。このことから、ASは標的であるPDGF α 受容体 mRNA の発現を配列特異的に低下させ、その結果PDGF α 受容体の減少を介して、A10細胞の受容体刺激依存性DNA合成を抑制する事が示唆された。

本研究において、PDGF α 受容体に対するアンチセンスオリゴを用いることで、血管平滑筋細胞のDNA合成を著明に抑制し得た。今後、アンチセンスオリゴの最適な塩基配列の決定や、動物モデルを用いた *in vivo* での検討が必要であるが、PTCA後の再狭窄の予防に本法が有用である可能性が示唆された。

口頭発表の審査会において、菅野教授より、生体内のPDGF受容体の代謝回転について、アンチセンス遺伝子の生体内への delivery の方法、PDGF阻害薬についての質問がなされた。安田教授より、血管平滑筋細胞の増殖期への移行を防止するためのその他の検討について、抗血小板療法と本研究との接点についての質問がなされた。また、小林教授より、PTCA後再狭窄を防止するため、アンチセンス遺伝子をどの程度の時間作用させるべきか、またPDGF α 受容体のアンチセンスだけで十分な再狭窄予防効果が得られるか、アンチセンスオリゴの細胞内の安定性についての質問がなされた。これらに対し、申請者は概ね妥当な回答を行った。その後、行われた菅野、安田両審査教授との試問においても、概ね妥当な回答がなされた。

本研究は、血管平滑筋細胞の主要な増殖因子であるPDGFの受容体に対するアンチセンスオリゴを用いて血管平滑筋細胞の増殖を抑制するという新知見を含んでおり、本法がPTCA後再狭窄を防止する遺伝子治療に有用である可能性を示唆し、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。