

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

RNA interference targeting embryonic myosin heavy chain isoform inhibited mRNA expressions of phenotype markers in rabbit cultured vascular smooth muscle cells

(胎児型ミオシン重鎖アイソフォームを標的とする RNA 干渉は家兎培養血管平滑筋の形質変換関連標識群の mRNA 発現を抑制した)

氏名 島田誠二 

(直筆)

【目的】血管内膜肥厚による血管内腔の狭窄は、形質変換により遊走・増殖能を獲得した合成型血管平滑筋 (VSM) 細胞が原因とされている。合成型 VSM 細胞には胎児型 myosin heavy chain (MHC) isoform (SMemb) mRNA の発現が増加している。本研究では、SMemb mRNA 発現の抑制が VSM 細胞の形質変換を修飾するかを検討した。【方法】1) 細胞培養：体重約 2.5 kg の家兎より胸部大動脈をペントバルビタール麻酔下に摘出し、移植片培養法により培養 VSM 細胞を確立した。10% 牛胎児血清 (FBS) を含む DMEM 培地を用いて 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 下に継代培養を行った。継代数 4 から 8 の培養細胞を実験に用いた。2) SMemb 特異的 siRNA の作製：家兎 SMemb cDNA (DDBJ 登録番号 D10280) 配列情報から、Ambion 社の siRNA 設計アルゴリズムを用いて検索して得られた複数の候補部位より、SMemb 3' 非翻訳領域を選択し、Silencer™ siRNA 作製キット (Ambion 社製) を用いて SMemb-siRNA を作製した。対照として SMemb-siRNA と同じ塩基組成の配列が異なる Scramble-siRNA を作製した。3) siRNA の細胞内導入

: Lipofectamine™ (Invitrogen 社製) 添加培地で 48 時間培養し、siRNA を細胞内に導入した。fluorescein-4-isothiocyanate 標識加 SMemb-siRNA を用いて導入確認を行った。

4) comparative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) : 培養 VSM 細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応後特異的プライマーを用いて PCR 反応を行った。PCR 反応物が指数関数的に増加する反応サイクル数での PCR 反応生成量を、アガロース電気泳動により比較した。5) 蛍光免疫染色法 : 10% ホルマリン液にて細胞固定後、mouse anti-rabbit SMemb monoclonal 抗体を用いて SMemb 蛋白発現を検出した。核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole を用いた。蛋白発現に基づく蛍光強度は NIH image にて解析した。6) 蛋白定量 : 培養 VSM 細胞由来ミオシン粗抽出液をニトロセルロース膜上にスポットし、mouse anti-rabbit SMemb monoclonal 抗体を用いて SMemb 蛋白発現量を測定した。ミオシン粗抽出液中の蛋白をポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にて分離後 PVDF 膜に転写し、monoclonal anti-SM  $\alpha$ -actin 抗体を用いて smooth muscle (SM)  $\alpha$ -actin 蛋白発現量を測定した。7) 細胞増

殖測定： $3.0 \times 10^3$  個の培養VSM細胞を96-wellプレートに播種し、9時間後(SMembsiRNA処理前)と57時間後(処理後48時間)にWST-1(Roche Diagnostics社製)を用いて生細胞数を測定した。8)統計処理：3群間以上の比較には、一元配置分散分析およびBonferroni/Dunn's多重比較検定を行い、2群間の比較にはStudent's unpaired *t* 検定を行った。【結果】SMembsiRNAは濃度依存性に培養血管平滑筋細胞に導入された。SMembsiRNA(100 nM)処理後48時間では、対照群に比してSMemb mRNA発現量、蛋白発現量共に有意に減少した。一方、SMemb以外のMHC isoform(SM1、SM2)のmRNA発現量は対照群との間には有意差はみられなかった。形質変換関連標識群のplasminogen activator inhibitor(PAI)-1および $\beta$ -actin mRNA発現量は有意に減少した。SM $\alpha$ -actin蛋白発現量および細胞増殖能は、SMembsiRNA処理により、対照群に比して有意の変化はみられなかった。【考察】SMemb遺伝子は、PAI-1および $\beta$ -actinの転写に関与するが、SM $\alpha$ -actinの転写やVSM細胞増殖には関与しない可能性が示唆された。

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏 名	島田 誠二
論文審査委員	審査日	平成 18 年 7 月 26 日		
	主査教授	加藤 誠也 		
	副査教授	酒井 哲郎 		
	副査教授	山本 秀幸 		
(論文題目)				
RNA interference targeting embryonic myosin heavy chain isoform inhibited mRNA expressions of phenotype markers in rabbit cultured vascular smooth muscle cells (胎児型ミオシン重鎖アイソフォームを標的とするRNA干渉は家兎培養血管平滑筋の形質変換関連標識群の mRNA 発現を抑制した)				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に対して、研究に至る背景と目的、研究内容(実験方法および結果)、研究の成果の意義と学術的水準について慎重に審査し、以下の審査結果を得た。				
I 研究の背景と目的				
血管平滑筋ミオシン重鎖(MHC)はSM1、SM2およびSMemb(胎児型)の3種類のアイソフォームから構成されている。血管平滑筋MHCの遺伝子発現は形質変換に連動して調節されている。遊走および増殖能を獲得した合成型血管平滑筋細胞ではSMemb遺伝子発現量が増加するのが知られている。血管平滑筋細胞の形質変換におけるSMembの役割解明が動脈硬化症に伴う血管内膜肥厚や血管形成術後の血管再狭窄の治療および予防の基盤となり得る。本論文では、SMemb遺伝子発現抑制が血管平滑筋細胞の形質変換を抑制するかを検討している。すなわち、SMemb mRNAを標的とするsiRNA(SMembsiRNA)を作製し、家兎培養血管平滑筋細胞のSMemb遺伝子発現の抑制効果を検討した。さらに、SMembsiRNAによる血管平滑筋細胞の形質変換関連標識群(SM1、SM2、PAI-1およびβ-actin)mRNA発現、細胞増殖およびsmooth muscle(SM)α-actin蛋白発現量への修飾を検討した。				

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
  - 2 要旨は800字-1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。

## II 論文の内容

### 実験方法：

1)細胞培養：体重約 2.5 kg の家兎より胸部大動脈をペントバルビタール麻酔下に摘出し、移植片培養法により培養血管平滑筋細胞を確立した。10%牛胎児血清加 DMEM 培地を用いて 5% CO<sub>2</sub>、37°C 下に継代培養を行った。継代数 4 から 8 の培養細胞を実験に用いた。2) SMemb 特異的 siRNA の作製：家兎 SMemb cDNA 配列情報から、siRNA 設計アルゴリズムを用いて検索して得られた複数の候補部位より、SMemb 3'非翻訳領域を選択し、Silencer™ siRNA 作製キットを用いて SMemb-siRNA を作製した。対照として SMemb-siRNA と同じ塩基組成であるが配列が異なる Scramble-siRNA を作製した。3) siRNA の細胞内導入：Lipofectamine™添加培地で 48 時間培養し、siRNA を細胞内に導入した。fluorescein-4-isothiocyanate 標識加 SMemb-siRNA を用いて導入確認を行った。4) comparative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)：培養血管平滑筋細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応後、特異的プライマーを用いて PCR 反応を行った。PCR 反応物が指数関数的に増加する反応サイクル数での PCR 反応生成量を mRNA 発現量として測定した。5)蛍光免疫染色法：10%ホルマリン液にて細胞固定後、mouse anti-rabbit SMemb monoclonal 抗体を用いて SMemb 蛋白発現を検出した。核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole を用いた。6)蛋白発現量の測定：培養血管平滑筋細胞由来ミオシン粗抽出液をニトロセルロース膜上にスポットし、mouse anti-rabbit SMemb monoclonal 抗体を用いて SMemb 蛋白発現量を測定した。ミオシン粗抽出液中の蛋白をポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)にて分離後 PVDF 膜に転写し、monoclonal anti-SM  $\alpha$ -actin 抗体を用いて SM  $\alpha$ -actin 蛋白発現量を測定した。7)細胞増殖測定： $3.0 \times 10^3$  個の培養血管平滑筋細胞を 96-well プレートに播種し、9 時間後 (SMemb-siRNA 処理前)と 57 時間後 (処理後 48 時間)に WST-1 を用いて生細胞数を測定した。8)統計処理：3 群間以上の比較には、一元配置分散分析および Bonferroni/Dunn's 多重比較検定を行い、2 群間の比較には Student's unpaired *t* 検定を行った。

### 実験結果と考察：

SMemb-siRNA は濃度依存性に培養血管平滑筋細胞に導入された。SMemb-siRNA (100 nM)処理後 48 時間では、対照群に比して SMemb mRNA 発現量、蛋白発現量共に有意に減少した。一方、SM1 および SM2 の mRNA 発現量は対照群との間には有意差はみられなかった。形質変換関連標識群の plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 および  $\beta$ -actin mRNA 発現量は有意に減少した。細胞増殖能および SM  $\alpha$ -actin 蛋白発現量は、SMemb-siRNA 処理により、対照群に比して有意の変化はみられなかった。以上の結果より SMemb 蛋白の発現抑制が、形質変換に連動したいくつかの遺伝子発現の制御に関与する事が示唆された。また、細胞増殖は SMemb の発現レベルに影響されず、独立して調整されている可能性が高いと考えられた。

## III 研究成果の意義と学術的水準

本研究の成果は、siRNA 法を用いた SMemb 遺伝子発現抑制が家兎培養血管平滑筋細胞の形質変換関連標識群 mRNA 発現を抑制するのを初めて示したものであり、国際的水準においても高く評価される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値する内容であると判断した。