

平成 21 年 5 月 28 現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790732
 研究課題名（和文）川崎病モデルマウスを用いた動脈炎発症・進展における遺伝子治療に関する研究
 研究課題名（英文）Analysis of gene therapy for coronary arteritis in Kawasaki disease in vivo.
 研究代表者
 宗内 淳（Muneuchi Jun）
 九州大学・医学研究院・助教
 研究者番号：60448420

研究成果の概要：

川崎病との関与が指摘されている VEGF に機能に抑制的に働く soluble Flt-1 の遺伝子導入を行い、有効な遺伝子導入ができなかったものの、抗 VEGF 抗体投与により冠動脈病変の改善を認めており、導入効率を上げることで、soluble Flt-1 遺伝子治療が新しい川崎病治療法になる可能性がある。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学・川崎病

1. 研究開始当初の背景

原因不明の熱性疾患である川崎病は、現在有効な治療は確立されたものの、約 10%に冠動脈後遺症を合併する。冠動脈後遺症を減少または抑制し得る新たな治療法の確立が急務である。

冠動脈病変形成に血管内皮増殖因子 (VEGF) が関与している可能性が報告されており、その VEGF 機能に抑制的に働く VEGF 可溶性受容体である soluble Flt-1 (以下 sFlt-1 と略) が川崎病の新しい治療になる可能性が考えられた。

Candida albicans から抽出された菌体成分 (Candida albicans water-soluble fraction、

以下 CAWS と略) をマウス腹腔内に投与することにより、動脈炎が発症する。(図 1)

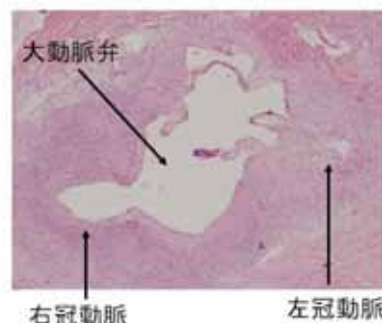


図 1

最も高頻度に侵襲されるのは冠動脈および起始部大動脈であり、侵襲動脈の分布は川崎病に類似すると報告されており、川崎病の病態や治療を検討する上で適当なモデルとされており、本モデルを使用して sFlt-1 による遺伝子治療について検討した。

2. 研究の目的

1) sFlt-1 遺伝子導入による治療効果についての検討

冠動脈病変形成を抑制する可能性のある sFlt-1 をマウスへ遺伝子導入し、冠動脈病変形成が抑制されるか検討する。

2) 抗 VEGF 抗体および抗 TNF 抗体による治療効果についての検討・比較

抗 VEGF 抗体および新しい治療法として期待されている抗 TNF 抗体を投与することによる冠動脈病変の抑制の有無を検討し、sFlt-1 による遺伝子治療結果と比較検討する。

3. 研究の方法

1) sFlt-1 遺伝子導入による遺伝子治療について

プラスミド pcDNA3 に sFlt-1 遺伝子を搭載した pcDNA3-sFlt-1、および発現効率の高いセンダイウイルスベクターに sFlt-1 遺伝子を搭載した SeV/HNL-sFlt-1 F を C57BL/6 マウスの両側大腿筋に注入し、血中 sFlt-1 濃度を ELISA で測定した。また、SeV/HNL-sFlt-1 F をマウス鼻腔内注入し、同様に血中 sFlt-1 濃度を測定した。有意な血中 sFlt-1 濃度が得られた場合、CAWS 誘発血管炎モデルに投与する。

CAWS 誘発血管炎モデルは C57BL/6 マウス、5 週に対し、CAWS 4mg/マウスを 5 日間腹腔内投与し、5 週目で病理学的評価を行う。

2) 抗 VEGF 抗体および抗 TNF 抗体による治療効果についての検討・比較

CAWS を 5 日間腹腔内投与し、最終投与 1.5 時間に、抗 VEGF 抗体および抗 TNF 抗体を 100 μg 腹腔内投与し、さらに抗体 100 μg を入れた浸透圧ポンプを腹腔内に留置し、1 週間持続投与した。病理学的評価は CAWS 投与終了後 5 週目で行った。(図 2)

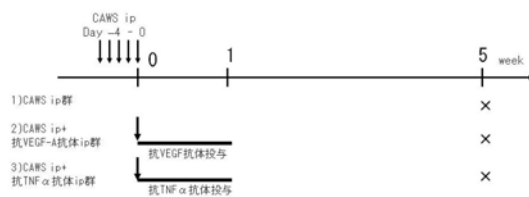


図 2

3) CAWS 誘発血管炎モデルの病理学的評価について

冠動脈病変および大動脈弁レベルの大動脈病変について病理学的評価を行い、半定量的に評価するためにスコアリングを行った。

冠動脈病変については、内膜肥厚 (1 点)、内弾性板障害 (1 点)、外弾性板障害 (1 点)、炎症細胞浸潤 (3 点) について評価を行った。(図 3)

冠動脈病変の程度(大動脈弁レベルの大動脈近位冠動脈を評価)

- ・内膜肥厚 (1 点)
- ・内弾性板障害(EVG) (1 点)
- ・外弾性板障害(EVG) (1 点)
- ・炎症細胞浸潤
 - 高度***全層性炎症細胞浸潤が血管腔内層の 0.2/0.2 以上 (3 点)
 - 中程度***全層性炎症細胞浸潤が血管腔内層の 1/2~0.2/0.2 (2 点)
 - 軽度***全層性炎症細胞浸潤が血管腔内層の 1/3 以下 (1 点)
 - 正常***炎症細胞浸潤を認めず (0 点)

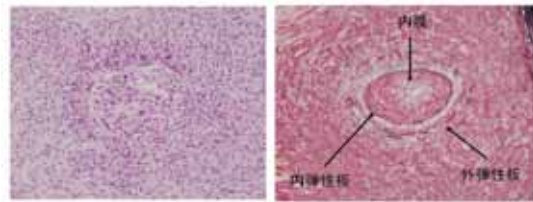
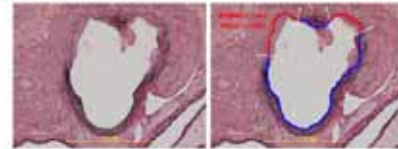


図 3

大動脈病変については、弾性線維障害 (3 点)、炎症細胞浸潤 (3 点) について評価を行った。(図 4)

大動脈病変の程度(大動脈弁レベル)

- ・弾性線維障害 (EVG)
 - 弾性線維が 0.2/0.2 以上障害されている部 0.1/0.1 地評価
 - 高度***全層性弾性線維障害が血管腔内層の 0.2/0.2 以上 (3 点)
 - 中程度***全層性弾性線維障害が血管腔内層の 1/2~0.2/0.2 (2 点)
 - 軽度***全層性弾性線維障害が血管腔内層の 1/3 以下 (1 点)
 - 正常***弾性線維障害を認めず (0 点)



- ・炎症細胞浸潤
 - 高度***全層性炎症細胞浸潤が血管腔内層の 0.2/0.2 以上 (3 点)
 - 中程度***全層性炎症細胞浸潤が血管腔内層の 1/2~0.2/0.2 (2 点)
 - 軽度***全層性炎症細胞浸潤が血管腔内層の 1/3 以下 (1 点)
 - 正常***炎症細胞浸潤を認めず (0 点)

図 4

合計 12 点とし、それぞれのマウスについてスコアリングし、病変の改善について評価を行った。

4. 研究成果

1-1) pcDNA3-sFlt-1 による発現について

pcDNA3-sFlt-1 の大腿筋内投与では筋肉内での sFlt-1 の発現は認めるが、血漿中の sFlt-1 の発現は認めなかった。

1-2) SeV/HNL-sFlt-1 F による発現について

SeV/HNL-sFlt-1 F の大腿筋内投与でも血漿中の sFlt-1 の発現は認めなかったため、より導入効率の高い投与方法である、鼻腔内投与を行ったが、血漿中での sFlt-1 の発現は認めなかった。

2-1) CAWS における血漿 VEGF、TNF 濃度について

血漿 VEGF は CAWS 最終投与時に高値を示し、5 日目には正常範囲に低下した。(図 5)

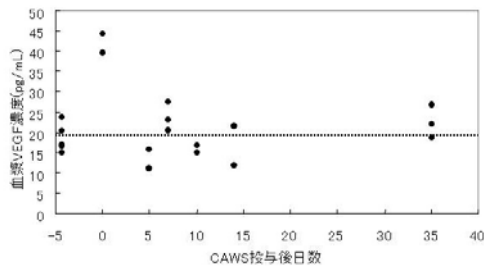


図 5

また、TNF は CAWS 最終投与 6 時間後をピークに 24 時間で検出濃度以下になった。(図 6)

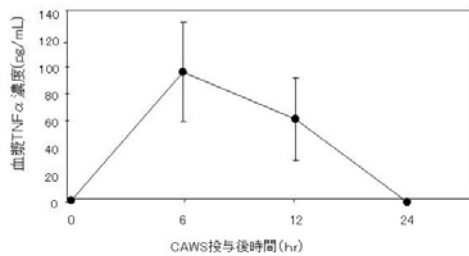


図 6

2-2) 抗 VEGF 抗体および抗 TNF 抗体による治療効果について (図 7、8、9)

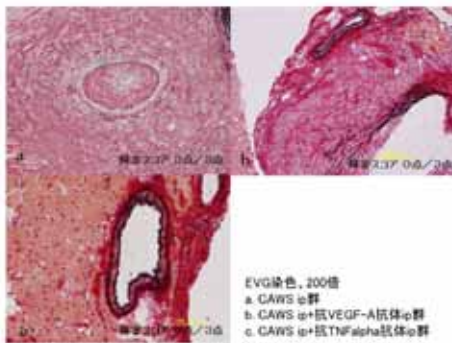


図 7 冠動脈病変の程度

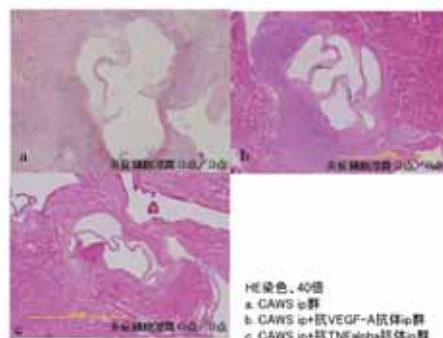


図 8 大動脈病変の程度

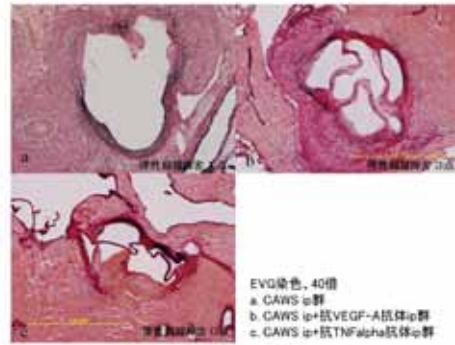


図 9 大動脈病変の程度 (EVG)

抗体無投与群では、n=8 で 11.4 ± 0.3 点、抗 VEGF 抗体投与群では、n=7 で 9.4 ± 0.6 点、抗 TNF 抗体投与群では、n=7 で 3.4 ± 1.6 点であった。(図 10)

		冠動脈	大動脈	計
CAWS	No.1	6	4	10
	No.2	6	6	12
	No.3	6	6	12
	No.4	6	6	12
	No.5	5	6	11
	No.6	6	6	12
	No.7	4	6	10
	No.8	6	6	12
	平均			11.4 ± 0.3
CAWS+ 抗 VEGF-A 抗体投与	No.1	3	6	9
	No.2	3	4	7
	No.3	6	5	11
	No.4	5	3	8
	No.5	5	6	11
	No.6	5	6	11
	No.7	3	6	9
	平均			9.4 ± 0.6
CAWS+ 抗 TNF-α 抗体投与	No.1	0	0	0
	No.2	0	1	1
	No.3	5	5	10
	No.4	5	4	9
	No.5	0	2	2
	No.6	0	2	2
	No.7	0	0	0
	平均			3.4 ± 1.6

図 10

Mann-Whitney の U 検定を行い、抗体投与群に対して、抗 VEGF 抗体投与群および抗 TNF 抗体投与群において有意差を認めた。一方、抗 VEGF 抗体投与群と抗 TNF 抗体投与群では有意差を認めなかった。(図 11)

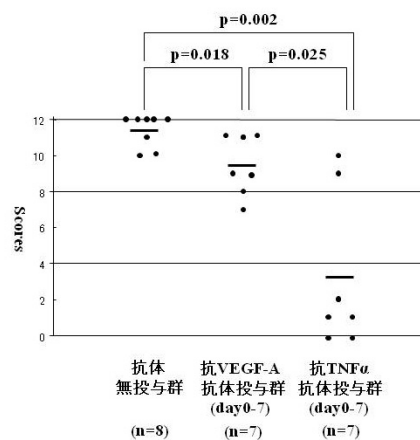


図 11

以上より、新しい川崎病治療法として現在臨床応用が検討されている抗 TNF 抗体に加えて、抗 VEGF 抗体投与による治療効果が期待できると考えられた。

今回センダイウイルスベクターを用いた sFlt-1 遺伝子治療を検討し、血漿中 sFlt-1 濃度の上昇を認めず、効果的な導入効率が得られなかったが、抗 VEGF 抗体投与により治療効果が得られており、今後ベクターの導入効率を改善することにより、sFlt-1 遺伝子治療が新しい川崎病治療になる可能性があると考えられた。

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5件)

1. Muneuchi J, Joo K, Higashiyama K, Mizushima A. Multislice spiral computed tomography in a neonate with vein of Galen aneurysmal malformation. *J Pediatr*. 2007 Mar;150(3):323-e1.
2. Muneuchi J, Joo K, Morihana E, Mizushima A. Detectable silent calcification in a regressed coronary artery aneurysm of a young adult with a history of Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol*. 2008 Jan;29(1):195-7. Epub 2007 Sep 9.
3. Ikeda K, Ihara K, Yamaguchi K, Muneuchi J, Ohno T, Mizuno Y, Hara T. Genetic analysis of MMP gene polymorphisms in patients with Kawasaki disease. *Pediatr Res*. 2008 Feb;63(2):182-5.
4. Inoue H, Muneuchi J, Ohno T, Arikawa A, Ishibashi T, Hara T. Central retinal artery occlusion following transcatheter balloon aortic valvuloplasty in an adolescent with aortic valvular stenosis. *Pediatr Cardiol*. 2008 Jul;29(4):830-3. Epub 2007 Dec 20.
5. Ohno T, Muneuchi J, Ihara K, Yuge T, Kanaya Y, Yamaki S, Hara T. Pulmonary hypertension in patients with congenital portosystemic venous shunt: a previously unrecognized association. *Pediatrics*. 2008 Apr;121(4):e892-9. Epub 2008 Mar 24.

[学会発表](計8件)

1. 第6回 九州川崎病研究会(2007年5月

26日、大分) 川崎病ガンマグロブリン不応例に対するメチルプレドニゾンパルス療法

2. 第43回 日本小児循環器学会(2007年7月6日、東京) TCPC術後患者におけるCPX中にみられるEOVの検討
3. 第444回 日本小児科学会福岡地方会(2007年4月2日) 胎児期にLSVCに関連した右室拡大を呈したIUGR児の一例
4. 第7回九州川崎病研究会(2008年5月17日、宮崎) インフリキシマブの効果が不十分であった重症川崎病の1例
5. 第111回日本小児科学会 東京国際フォーラム(2008年4月25日-28日、東京) 慢性活動性EBウイルス感染症(CAEBV)に関連した心合併症の検討
6. 第111回日本小児科学会 Fontan術後患者における心肺運動機能検査中にみられる周期性呼吸の検討
7. 第48回日本脈管学会(2007年10月25-27日、松本) 抗VEGF-A抗体、抗TNF抗体投与によるマウスCAWS誘発冠動脈炎の発症抑制効果に関する病理学的検討
8. 第97回日本病理学会総会(2008年5月15-17日、金沢) マウスCAWS誘発冠動脈炎の発生におけるVEGF-A、TNFの病理学的意義に関する検討

6. 研究組織

(1)研究代表者

宗内 淳(Muneuchi Jun)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号:60448420

(2)研究協力者

西尾 壽乘(Nishio Hisanori)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号:00507783