

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791232

研究課題名（和文） エレクトロポレーションを用いた、声帯萎縮・瘢痕に対する遺伝子治療

研究課題名（英文） Gene Therapy for Atrophy and Scar of Vocal Fold using Electroporation

研究代表者

稲垣 康治（INAGAKI KOJI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70348738

研究成果の概要：

声帯萎縮および瘢痕モデルにおけるエレクトロポレーションによる遺伝子導入効果の検討を行った。

声帯萎縮モデルラットの声帯筋、瘢痕モデルラットの声帯粘膜下にコントロール、HGF 遺伝子をそれぞれ注射し、エレクトロポレーションによる声帯筋の萎縮抑制効果および瘢痕治癒過程の改善効果について検討したが、両者に有意差を認めなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝子、再生医学、移植・再生医療、細胞・組織、神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

声帯萎縮は反回神経、迷走神経麻痺患者あるいは老人において高度嗄声によるコミュニケーション障害、誤嚥といった症状をきた

し、患者のQOLを著しく低下させる。また声帯早期癌や喉頭乳頭腫に対するレーザー治療は、第一線で活躍する世代の患者に施されることも多いが、治療後の声帯瘢痕による高度嗄声、発声障害は、やはり患者のQOLを著

しく低下させ、社会生活に支障をきたす。また老人においては声帯の粘膜固有層が菲薄化して硬化した溝状となり、癬痕声帯同様の嚙声の原因となる。低侵襲手術としてレーザー手術の適応が拡大され、また高齢化社会となってきた現在の、これらの疾患に悩む患者は増加の一途をたどっている。これまでこれらの患者に対する治療法として、頸部外切開による甲状軟骨形成術や声帯へのコラーゲン・脂肪などの注入術が施行されてきた。しかし前者は侵襲が大きい割に結果が不安定で、後者は注入後経時的に吸収されてしまうために結果が長続きしないなどの問題点があり、決定的な治療法とは言えない現状にある。また、これらの術式は基本的に声門間隙を狭くすることを目指す手術であり、声帯粘膜自体の粘弾性を回復させることは不可能で、とくに癬痕声帯・声帯溝症の場合根本的治療法は現状では皆無であり、この解決策の究明は急務といえる。

これらの疾患を治療する場合、低侵襲で安定した結果を低コストで安全に得られる治療法が、実際の臨床応用を考えた場合理想的といえる。近年報告されているような、筋の萎縮を防止（成長を促進）する、あるいは声帯の治癒過程で粘膜を硬化させるコラーゲンの産生を抑制する成長因子の局所投与は、前述の理想的治療の条件を満たす可能性がある。しかしながら成長因子（蛋白）の局所への投与は効果が持続せず、頻回の投与が必要である点が問題であり、実際喉頭内腔に局所投与を頻回に行うことは、臨床応用に際しては無理が生じる。この問題を解決する方法として、一度の投与で長期に目的とする因子を局所発現させることが可能である遺伝子治療は、非常に有望といえる。

研究代表者の所属する研究班では、喉頭、気管に対してアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入を試み、声帯粘膜にアデノウイルスベクターが導入発現可能であることを実証した。しかし、アデノウイルスベクターは高率、広範囲に遺伝子導入を行うことが可能であるという利点がある一方、増幅、精製といったステップが煩雑であり、またその抗原性から反復投与が出来ないといった欠点がある。何よりウイルスがその基本構造であるため、特に良性疾患に臨床応用するには倫理的問題が大きいと言える。その点プラスミドベクターは、作製、増殖、精製が容易な上、安全面でウイルスベクターに比べて圧倒的に優位と言えるが、導入効率の低さ、導入効率の個体差という大きな欠点が指摘されていた。当研究班では臨床応用を考えた際、より現実的に実行可能なプラスミドベクターに注目し、その最大の欠点であった導入効率の悪さを改善する方法として、エレクトロポレーション（電気穿孔法）の利用を試みた。

bi-directional エレクトロポレーションという、交互に電圧の向きを変える方法により、ラットモデルではほぼ全ての甲状披裂筋にレポーター遺伝子（EGFP）を導入・発現可能で、導入効率の個体差も少ないことをつきとめた。しかも遺伝子導入後、最長8週まで遺伝子の発現を確認し、この系がドラッグデリバリーシステムとして非常に有用であることを最近報告した。エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入後8週の喉頭を検証したところ、炎症反応はほとんど認めず、線維化もごく軽度であり、非常に安全性の高い導入方法であることもわかった。喉頭筋へのbi-directional エレクトロポレーションを用いた外来遺伝子の導入・発現は以上のようにすでに実証しているが、喉頭筋に高効率に治療遺伝子を導入・発現させれば、paracrine効果により、声帯粘膜、粘膜固有層にも治療効果は十分期待できると考えている。声帯萎縮および癬痕は高度嚙声によるコミュニケーション障害、誤嚥といった症状をきたし、患者のQOLを著しく低下させるが、これらに対する根本的治療法は現状では皆無である。これらの疾患を治療する場合、筋の萎縮を防止（成長を促進）する、あるいは声帯の治癒過程で粘膜を硬化させるコラーゲンの産生を抑制する成長因子を局所投与し、長期に目的とする因子を局所発現させることが可能である遺伝子治療は、非常に有望といえる。当研究班では臨床応用を考えた際、より現実的に実行可能なプラスミドベクターに注目し、その最大の欠点であった導入効率の悪さを改善する方法として、エレクトロポレーション（電気穿孔法）の利用を試みた。ラットモデルにおいて甲状披裂筋にレポーター遺伝子（EGFP）を導入・発現可能で、しかも遺伝子導入後、最長8週まで遺伝子の発現を確認し、この系がドラッグデリバリーシステムとして非常に有用であることを報告した。このシステムを利用し、喉頭筋に高効率に治療遺伝子を導入・発現させれば、paracrine効果により、声帯粘膜、粘膜固有層にも治療効果は十分期待できると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、bi-directional エレクトロポレーションを用いたプラスミド遺伝子の導入により、ラットの反回神経麻痺モデル、声帯粘膜損傷モデルにおける声帯筋萎縮治療効果、声帯粘膜癬痕治療効果を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 反回神経麻痺モデルの作製と HGF 遺伝子導入による声帯筋萎縮治療効果の検討

成体 Sprague - Dawley ラットを用いた。ネブタールおよびキシラジンを腹腔内投与にて麻酔し、頸部皮膚を切開して前頸筋群を分け、左気管食道溝に反回神経を同定後、神経を切断。5 mm 切除し、反回神経麻痺モデルを作製した。ここで声帯筋萎縮防止効果を検討する群と、萎縮後の治療効果を検討する群に分けた。

声帯筋萎縮防止効果を検討する群では、神経切断直後に甲状軟骨を截開し、左声帯に 27G 針をつけたハミルトンシリンジを用いて 15  $\mu$  の HGF プラスミドベクターを注射し、直ちに bi-directional エレクトロポレーションを施行した。コントロール群として、PBS 注射のみ、PBS 注射後に bi-directional エレクトロポレーションを施行、EGFP プラスミド注射後に bi-directional エレクトロポレーションを施行、の 3 群を作製した。声帯注入、エレクトロポレーション終了後、甲状軟骨は 7-0 ナイロン糸で閉鎖し、皮膚も 4-0 ナイロン糸で縫合した。なお、HGF プラスミドは、レポーター遺伝子である EGFP を用いて高率に導入可能であったプラスミドと同じ基本構造で、CMV プロモーター下に HGF を発現するものを作成済みであった。プラスミドは大腸菌 DH5 にトランスフェクトして保存し、適宜培養増幅して QIAGEN 社の Plasmid Maxi Kit を用いて抽出し、使用した。術後 1 週、4 週、8 週の各時点で深麻酔下にラット喉頭を摘出し、直ちに OCT 包埋してクライオスタットにて前額断方向で凍結切片を作製した。HGF 発現を確認するため、免疫組織染色および RT-PCR を施行し、HGF 発現の経時的変化を検討した。また ATPase 染色を施行し、顕微鏡下に声帯甲状披裂筋のデジタル画像を記録した上、画像解析ソフト IPLab を用いて筋繊維のサイズを測定し、群間で経時的に比較検討した。

#### (2) 声帯粘膜損傷モデルの作製と HGF 遺伝子導入による声帯癒痕治療効果の検討

成体 Sprague - Dawley ラットを用いる。前述同様全身麻酔下に頸部切開して喉頭を露出させ、甲状軟骨を截開した。左声帯粘膜をマイクロ手術用のハサミを用いて損傷させ、粘膜上皮欠損モデルを作製した。ここで急性粘膜損傷に対する癒痕防止効果を検討する群と、慢性癒痕に対する治療効果を検討する群に分けた。

癒痕防止効果を検討する群では、粘膜上皮

損傷直後に左声帯に 27G 針をつけたハミルトンシリンジを用いて 15  $\mu$  の HGF プラスミドベクターを注射し、直ちに bi-directional エレクトロポレーションを施行した。コントロール群は反回神経麻痺モデルと同様に 3 群作製し、閉創も同様に行った。術後 1 週、4 週、8 週の各時点で深麻酔下にラット喉頭を摘出し、凍結切片を作製した。HGF 発現の確認のほか、トリクローム染色（コラーゲンの検出）およびアルシアンブルー染色（ヒアルロン酸の検出）を行い、顕微鏡にてデジタル画像を撮影した。声帯粘膜下層におけるコラーゲンおよびヒアルロン酸の発現量ならびに粘膜下層の厚さを、画像解析ソフトを用いて測定・解析し、経時的に群間で比較検討した。また、粘膜上皮欠損部の上皮化に要する時間も群間で比較検討した。

慢性癒痕に対する治療効果を検討する群では、粘膜上皮欠損モデルを作製後一旦閉創し、6 週待機した後に再度喉頭を截開し、癒痕防止効果を検討する群と同様の方法で検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 声帯筋萎縮治療効果判定

HGF 導入群において、声帯筋内への遺伝子導入は免疫染色によって確認されたが、遺伝子導入後 1 週、4 週、8 週とコントロールの喉頭筋の体積に有意な差を認めなかった。

#### (2) 声帯癒痕治療効果判定

HGF 導入群において、治療後の粘膜下組織に経時的変化および癒痕治癒傾向は認められなかった。

今回の検討では、残念ながらいずれの神経栄養因子、成長因子においても遺伝子導入による治療効果を認めなかった。しかし遺伝子導入の手段としてのエレクトロポレーションの有用性は確立されており、今後新たな治療戦略の一助となるであろうと考えている。

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)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 康治 (INAGAKI KOJI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：70348738

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし