

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462699

研究課題名(和文) 気管狭窄に対する遺伝子導入と分子標的薬を用いた新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Novel treatment for tracheal stenosis by gene therapy and molecular target therapy

研究代表者

富藤 雅之 (Tomifuji, Masayuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・講師)

研究者番号：80327626

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)：喉頭気管狭窄のモデルとして擦過によりラットにおける安定した喉頭気管狭窄モデルを作成した。センダイウイルスベクター(SeV)は核内に取り込まれない安全なウイルスベクターであるが、SeVの局所スプレー塗布を行い、塗布により3-4%程度の範囲で創部に遺伝子導入が可能であることを示した。c-myc抑制遺伝子であるFIR遺伝子を搭載したSeV投与により気道狭窄の改善が見られ、生存率の低下も回避した。免疫染色ではc-Mycの発現低下がみられ、FIRによるc-myc遺伝子発現抑制による気管狭窄を抑制効果と考えられた。免疫抑制剤タクロリムスの気管狭窄治療予防効果についても低用量タクロリムスの有用性を報告した。

研究成果の概要(英文)：Animal model of laryngeal and tracheal stenosis was established by brushing from tracheostoma. We chose Sendai virus vector (SeV) as a gene transfer method. Gene transfer to laryngotracheal wound was possible by spraying SeV in 3-4 % of wound area. Administration of FIR gene which is a suppressor of c-myc gene carried by SeV improved tracheal stenosis and survival rate. Immunohistochemical staining of c-Myc also showed low expression level by FIR gene administration in laryngotracheal brushing model. Effect of systemic administration of immunosuppressant tacrolimus for prevention of tracheal stenosis was evaluated. Low dose tacrolimus administration showed preventative effect of tracheal stenosis by suppressing calcineurin/ nuclear factor of activated T cell / interleukin 2 pathway.

研究分野：laryngology, otorhinolaryngology

キーワード：tracheal stenosis laryngeal stenosis sendai virus c-myc FIR

1. 研究開始当初の背景

喉頭・気管狭窄は長期気管挿管、炎症性疾患、気管外傷、熱傷などにより粘膜の肉芽形成、癒痕化、線維化を生じる難治性の疾患であり、生命や quality of life(QOL)にも重大な影響を及ぼしうる疾患である。現在明らかなエビデンスのある治療法はなく、新たな治療法の開発が望まれている。

センダイウイルスベクター(以下 SeV)は転写・複製がすべて細胞質内で行われ、複製の際の DNA 相がないことを特徴とする RNA ウィルスで、宿主染色体との相互作用が原理的になく、ヒトに対する病原性は報告されていない。さらに気道粘膜への遺伝子発現効率はアデノウイルスベクター以上とされており、簡便で非侵襲的な喉頭・気管上皮への導入方法を確立すれば耳鼻咽喉科領域で難治性疾患として知られる癒痕性喉頭・気管狭窄への臨床応用が期待できる。狭窄の予防や肉芽形成抑制といった治療は数週間程度の期間において治療薬の効果が発現する必要があるが、遺伝子導入は単回投与で持続的に長期間にわたり治療因子が局所に発現されるというドラッグデリバリーシステムとして最適である。

2. 研究の目的

本研究では喉頭・気管狭窄に対するセンダイウイルスベクター遺伝子導入と炎症や癒痕化抑制のための治療遺伝子導入の効果を検討する。また分子標的薬を用いた新しい治療法の開発や機序の解明を目的とする

3. 研究の方法

(1) 喉頭気管狭窄モデルとして気管切開孔から喉頭気管をブラッシングすることにより狭窄モデルを作成した。Fusion 遺伝子を欠失させたレポーターセンダイウイルスベクター-GFP-SeV/ F を投与し、正常喉頭気管粘膜における発現を評価した。次に粘膜擦過による喉頭気管狭窄モデルに対して SeV を注射しないし局所スプレー塗布を行い導入遺伝子発現を評価した。次に LacZ 遺伝子を搭載した SeV 遺伝子導入を行い、遺伝子発現期間について検討を行った。

(2) SeV による遺伝子導入が可能であることを確認し、治療遺伝子として細胞増殖に強く関与する c-myc 抑制遺伝子である FIR(far upstream element (FUSE)-binding protein interacting repressor) 遺伝子を搭載し、さらに安全性を高めるために融合蛋白を欠損させて非伝播型とした FIR-SeV/ F を構築した。気管粘膜ブラッシングのモデルを用いて、FIR-SeV/ F を創部に直接投与を行った。比較対照群としては気管切開孔よりブラッシングのみを行い、両群とも死亡時または 5 日後に喉頭気管摘出し創傷治癒について評価を行った。

(3) 次に喉頭気管狭窄の病態については過剰な免疫反応によるものと考えられる症例も多いため、冠動脈の狭窄予防で薬剤溶出性ステントにも用いられているタクロリムスの効果について検討を行った。前述のラット気管粘膜ブラッシングモデルを用いて気管孔から粘膜の擦過を行った。タクロリムス 0.2 mg/Kg, 1.0mg/Kg の低用量、高用量の二群に分けて各々 5 日間連続全身投与を行った。効果についてはブラッシングの 9 日後に喉頭気管摘出を行い、気道の HE 染色による面積評価を行い、nuclear factor of activated T cell (NFATC) と interleukin 2 に対する免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 気管孔からのブラッシングによる狭窄モデルは安定した喉頭気管狭窄を生じ、狭窄の程度は面積において平均 60%であった。正常喉頭気管粘膜における GFP 遺伝子の発現を評価すると投与方法としては局所塗布が有用であった。LacZ-SeV/ F 導入遺伝子の発現は 3 日でピークを迎えその後 14 日まで減弱していき、比較的長期間の遺伝子発現が可能であった。LacZ 遺伝子産物である ガラクトシダーゼ発現領域を調べたところ、投与後 3 日 5.22%、7 日 2.44%、14 日 1.45%であった。

気管、輪状軟骨、声帯レベルにおける損傷粘膜に対しての SeV による遺伝子導入効率は 3.35 - 3.66%であり、正常粘膜と同等の遺伝子導入効率であった。部位としては粘膜、粘膜下層の組織に遺伝子導入を行うことが可能であった。レポーター遺伝子導入の実験において喉頭気管の粘膜損傷に対する遺伝子導入が可能であることが示された。

(2) 治療遺伝子投与実験では、対照群においては気道粘膜の過形成、線維化、血管新生、膠原線維の増生を認めしたが、FIR-SeV/ F 処置群においては気道狭窄の程度は改善しており、気道狭窄による生存率の低下も回避しえた。c-Myc 免疫染色の結果では FIR-SeV/ F 処置群において c-Myc 発現の低下を認め、FIR 遺伝子導入が c-myc 遺伝子発現を抑制することにより気管狭窄を抑制していると考えられた。術後再狭窄予防のための補助的治療や長期気管挿管などのハイリスク患者への予防投与への臨床応用が期待できる。

(3) タクロリムスによる気管狭窄予防目的の実験においては無治療群では高度の線維化、血管新生、コラーゲン沈着が見られた。低用量 0.2 mg/Kg のタクロリムス全身投与で狭窄の予防効果が認められた。高用量 1.0mg/Kg での増強効果は認められなかった。免疫染色ではタクロリムスの投与後に NFATC と IL2 が粘膜下の線維芽細胞、新生血管、腺組織において抑制されていた。低用量のタクロリムスはカルシニューリン/NFATC/IL2 の

経路を抑制することにより免疫反応を抑え、喉頭気管狭窄を予防する効果があると考えられた。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計4件)

1)

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Matsushita K, Shimada H, Shiotani A. Tacrolimus Prevents Laryngotracheal Stenosis in an Acute Injury Rat Model. Laryngoscope. 2015. 125: E210-215. 2015. Feb 3. doi: 10.1002/lary.25178. [Epub ahead of print] 査読有

2)

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Ueda Y, Shimada H, Matsushita K, Shiotani A. Gene therapy of the c-myc suppressor far upstream element binding protein-interacting repressor by using Sendai virus delivery prevents tracheal stenosis. PLoS One. 2015 Jan 8; 10(1): e0116279. doi: 10.1371/journal.pone.0116279. eCollection 2015. 査読有

3)

Tanaka N, Araki K, Mizokami D, Miyagawa Y, Yamashita T, Tomifuji M, Ueda Y, Inoue M, Matsushita K, Nomura F, Shimada H, Shiotani A. Sendai Virus-mediated Gene Transfer of the c-myc Suppressor Far-upstream Element-Binding Protein-Interacting Repressor Suppresses Head and Neck Cancer. Gene Therapy. 2015 Jan 15. doi: 10.1038/gt.2014.123. [Epub ahead of print] 査読有

4)

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H,

Tomifuji M, Yamashita T, Inoue M, Hasegawa M, Shiotani A. Sendai virus transgene in a novel gene therapy for laryngotracheal disease. Laryngoscope. 2013 Jul;123(7):1717-24. doi: 10.1002/lary.23917. Epub 2013 May 10. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1) Araki K, Mizokami D, Yamashita T, Tanaka N, Tomifuji M, Shiotani A: Tacrolimus Prevent the Development of Laryngo-tracheal stenosis in the Novel Rat model. 117th AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO in Vancouver, Canada, 2013.9.29-10.2

2) 溝上大輔 荒木幸仁 田中伸明 鈴木洋 山下拓 富藤雅之 上田泰次 島田英昭 松下一之 塩谷彰浩. 非伝播型 c-myc 転写抑制因子 FIR 搭載組換えセンダイウイルスベクターによる気管狭窄の遺伝子治療 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会 2014.5.14-17 福岡

3) 溝上大輔 荒木幸仁 塩谷彰浩. センダイウイルスベクターを用いた気管狭窄の遺伝子治療. 第 27 回日本喉頭科学会総会学術講演会 2015.4 東京

4) 溝上大輔、富藤雅之、荒木幸仁、塩谷彰浩. 有茎舌骨弁による喉頭・気管狭窄治療. 第 64 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会. 2012.11 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富藤 雅之 (TOMIFUJI, Masayuki)
防衛医科大学校 その他部局 講師
研究者番号: 80327626

(2) 研究分担者

荒木 幸仁 (KOJI, Araki)
防衛医科大学校 その他部局 准教授
研究者番号: 70317220

塩谷 彰浩 (AKIHIRO, Shiotani)
防衛医科大学校 その他部局 教授
研究者番号：80215946