

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462826

研究課題名(和文) 肺胞上皮増殖因子遺伝子導入による肺保護戦略—臨床応用へのアプローチ

研究課題名(英文) Lung protective strategy by the gene delivery of lung epithelial grow factor.

研究代表者

馬場 靖子 (BABA, YASUKO)

横浜市立大学・大学病院・准教授

研究者番号：80453041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：KGF(Keratinocyte Growth Factor),MSC(Mesenchymal Stem Cell)は肺傷害の軽減や修復の促進に有効だという研究結果が報告されている。

MSCにKGFを遺伝子導入し、炎症部位に遊走したMSCがKGFを過剰発現させることでKGFの傷害軽減効果を増強できないか、検討した。

MSCにKGF発現アデノウイルスベクターを導入し、KGF遺伝子の発現を確認した。MSCをマウスに投与して、マウスの体内でKGFが発現したのを確認した。肺傷害の動物モデルとして、盲腸結紮後腸管穿刺後肺傷害、上腸管膜動脈阻血再還流後肺傷害のモデルを作製した。

研究成果の概要(英文)：Several reports shows that KGF(Keratinocyte Growth Factor) or MSC(Mesenchymal Stem Cell)ameliorates lung injury and promotes the repair processs. In this study, we transfected the KGF expressing adenovirus vector to MSC (KGF-MSC) and we hope that the KGF-MSC could deliver KGF to inflammation site efficiently.

We constricted the adenovirus vector that express the KGF. We confirmed that the KGF-MSC oriented KGF expression in the mouse. As the lung injury model, we established the conditions of the cecal ligation and puncture model and Supra mesenteric aretry(SMA) reperfusion injury model.

研究分野：急性肺傷害

キーワード：肺傷害 集中治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺傷害は、感染や外傷など様々な原因で生じ、高度の低酸素血症により、他臓器(腎、心、消化管等)の障害にも関連する。発症後の死亡率は40-60%で予後不良であり、傷害の軽減が患者の予後改善につながるが、現状有効な薬物療法は見当たらない。

(2) 我々は肺傷害の病態の首座が肺上皮細胞の脱落と機能障害による肺のバリア機構の破綻にあるとかがえており、以前の研究で、肺上皮細胞の増殖因子であるKeratinocyte growth factor(KGF, FGF-7)を高濃度酸素肺傷害の動物モデルに投与し、傷害が著しく軽減することを示した(Baba Y, Human gene therapy2007. 18:130-141)。Keratinocyte growth factor(KGF, FGF-7)は肺傷害の軽減作用を強力に示すが、傷害の原因より後の投与では、軽減効果が薄い。KGF投与のタイミングや、投与方法に工夫が必要と考えられている。

(3) 近年骨髄や中胚葉成分由来の内因性mesenchymal stem cell (MSC)が肺傷害部位へ遊走し、KGF等の液性因子を分泌する等の方法で傷害を軽減・修復の促進をする作用を有することが報告され、傷害時に外からMSCを投与し、傷害を軽減するか否かについて応用した研究がされている

2. 研究の目的

上記1-(2)(3)のことから、われわれはKGF遺伝子をMSCに導入し、炎症部位に遊走能を持つMSCから高濃度のKGFが発現し、作用させることができれば、肺傷害軽減作用が増強するのではないかと考えた。

- (1) 肺傷害の疾患モデルとして、LPS投与や盲腸結紮後腸管穿刺肺傷害等、臨床的な動物モデルを用いて実験を行う。
- (2) 今回の着想について、治療的効果のみならず、副作用の有無(増殖因子投与により懸念される、臓器別の悪性腫瘍の発症など)についても検討する。

3. 研究の方法

- (1) KGF発現アデノウイルスベクターの作成：研究協力者の鐘ヶ江先生(東京大学医科学研究所・遺伝子解析施設)の協力のもと、ベクターを作成した。プロモーターとして、アデノウイルス投与時に炎症惹起が少ないEF-1を用いる。またベクターの導入確認用のタグとして、KGF遺伝子の下流にGFP遺伝子を発現させる(名称：AdEF-KGF-GFP)。コントロールベクターとして、発現単位をもたないA×1w1を用いる。

(2) MSCの培養とウイルスベクターの遺伝子導入：ヒトMSCのセルラインと培地は市販品(ATCCより入手)を購入した。MSCの培養細胞上清にAdCAG-KGFを混注し、24時間反応させ、遺伝子導入するか否か確認した。

(3) KGF発現MSCをマウス尾静脈より静脈注射し、KGFがマウスの体内で発現するのを確認する：マウスの肝臓、肺、血清等を用いてウエスタンブロット法やELISA法でKGFの発現を確認する。

(4) 肺傷害モデルの作製：LPS腹腔内投与後、bacterial translocationによる肺傷害盲腸結紮後腸管穿刺肺傷害を作製する。

(5) 肺傷害の程度を評価する：生存率曲線肺組織学的評価(炎症細胞の浸潤の程度などをスコア化する)気管支肺胞洗浄液を採取し、アルブミンの定量、好中球の浸潤や炎症性サイトカイン、ケモカインの定量を行う。血液ガス分析

4. 研究成果

(1) MSCへのKGF発現アデノウイルスベクターの確認：AdEF-KGF-GFP作製期間に、以前の研究で用いたCAGプロモーターのKGF発現ベクター(AdCAG-KGF)を用いて、MSCの培養細胞に感染させた。24時間後の培養上清を用いてウエスタンブロット法でKGFの発現を確認した。

(2) AdEF-KGF-GFPの作製

作製途中で、HEK293細胞にtransfection(遺伝子導入)させて、力価を増やす段階で、293細胞の増殖が通常より悪かった。ウイルス液は原液で10の9乗PFU/mlと通常より薄い濃度しか得られなかった。

マウス(LPSモデル)への投与(予備実験)。雄性8週BALB/cマウスに大腸菌由来LPS(E.coli 055:B5, Sigma)を10mg/Kg気管内投与し、肺傷害モデルを作った。次にAdEF-KGF-GFPを 1×10^9 PFUをマウスの尾静脈から投与した(n=5)。

24時間後の生存率は0%であった。また別の1匹のマウスには、LPSを投与せず、AdEF-KGF-GFPを 1×10^9 PFU静脈注射したが、24時間後に生存しなかった。

のことから、作製したAdEF-KGF-GFP自体に毒性がある可能性が示唆された。

(3) マウス肺傷害モデルの作製

盲腸結紮後腸管穿刺肺傷害モデル：

雄性 8 週 BALB/c マウスに ketamine, Xylazine で麻酔の後、腹部に切開を置いて盲腸を露出した。2-0 絹糸で 1 cm の長さに結紮し、23G 注射針で結紮腸管を穿刺し、少量の腸管内容を出した。創縫合し、24 時間飼育した後、安楽死させた。血液ガス分析、肺の組織学的検査、気管支肺胞洗浄液中の好中球浸潤、サイトカイン定量により肺傷害を確認した。

上腸間膜動脈腸管阻血再還流傷害モデル：

雄性 8 週 BALB/c マウスに ketamine, Xylazine で麻酔の後、腹部に切開を置いた。肝臓下部を左方に脱転し、上腸間膜動脈 (SMA) を直視する。ヘモクリップを用いて、SMA を 30 分間阻血し、その後再還流する。4 時間後に安楽死させた。血液ガス分析、肺の組織学的検査、気管支肺胞洗浄液中の好中球浸潤、サイトカイン定量により肺傷害を確認した。

(4) KGF 遺伝子導入した MSC (mesenchymal stem cell) をマウスへ投与する：上記 (2) でウイルスベクターの毒性がうたがわれたため、AdEF-KGF-GFP を遺伝子導入した MSC を動物に投与することはしなかった。代わりに AdCAG-KGF-MSC を 1×10^5 個尾静脈から投与した。肺の凍結標本を作製した。MSC 単独を静脈内投与した肺の標本と比較して、組織内の KGF の産生量が多いことがわかり、マウス体内で KGF 遺伝子の発現が示唆された。

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 3 件)

- (1) Ohta S, Yazawa T, Tojo K, Baba Y, Uchiyama M, Goto T, Kurahashi K. Adrenaline aggravates lung injury caused by liver ischemia-reperfusion and high-tidal-volume ventilation. J Intensive Care; (2016)4:8D01 10.1186/s40560-06-0130-y
- (2) Tojo K, Nagamine Y, Yazawa T, Mihara T, Baba Y, Ohta S, Goto T, Kurahashi K. Atelectasis causes alveolar hypoxia-induced inflammation during uneven mechanical ventilation in rats. Intensive care Med Exp.3(1):56.2015
- (3) Uchiyama M, Tojo K, Yazawa T, Ohta S, Goto T, Kurahashi K. Edaravone prevents lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. J

Surg Res.194(2):551-557.2014

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Nagamine Y, Tojo K, Yazawa T, Baba Y, Kurahashi K. Inhibition of prolyl Hydroxylase Attenuates Fas Ligand-induced Apoptosis and Lung Injury in mice. American Thoracic society annual meeting, 2016.5.15-18, San Francisco.
- (2) Nagamine Y, Tojo K, Yazawa T, Baba Y, Kurahashi K. Dimethylloxalylglycine, a prolyl hydroxylase inhibitor, attenuates Fas ligand-induced apoptosis and lung injury in mice. 日本呼吸器学会学術講演会. 国立京都国際会館 2016.4.8-10.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
馬場 靖子 (BABA YASUKO)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授
研究者番号：80453041
- (2) 研究分担者
倉橋 清泰 (KURAHASHI KIYOYASU)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授

研究者番号：50234539

矢澤 卓也 (YAZAWA TAKUYA)

千葉大学・医学部・准教授

研究者番号：50251054

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(3) 研究協力者

東條 健太郎 (TOJO KENTARO)

長嶺 祐介 (NAGAMINE YUSUKE)

鐘ヶ江 裕美 (KANEGAE YUMI)