

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790712

研究課題名（和文）アディポネクチン遺伝子導入マクロファージによる糖尿病壊疽の細胞治療

研究課題名（英文）Therapy with adiponectin gene over expression for diabetic gangrene

研究代表者

窪田 美幸（KUBOTA MIYUKI）

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：80514603

研究成果の概要（和文）：

糖尿病壊疽の細胞遺伝子治療の可能性を探るためにアディポネクチン遺伝子発現導入による血管障害モデルの有効性について検討した。評価における再現性の乏しさより一部モデルを修正して検討したが、今回の検討ではアディポネクチン遺伝子一過性強発現による血流回復促進効果を明確に示すには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to find out the potential benefit of transient adiponectine gene over expression on the diabetic gangrene due to the vascular injury. The experiments were examined with some modifications, and no significant benefit of adiponectine gene on the acceleration of recovery from the ischemia due to femoral arterial ligation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学・糖尿病壊疽

1. 研究開始当初の背景

足壊疽は、糖尿病患者における非外傷性の下肢切断の主要な危険因子である。糖尿病を有する患者の 15%が、生涯のどこかで足壊疽を発症し、壊疽を有する患者の 14-24%で下肢の切断が必要になると言われている (Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound care. American Diabetes Association. Diabetes Care 22: 1354-1360, 1999)。欧米の報告によれば、初回の足潰瘍は約 7 割の患者で治癒するが、そ

の再発率は 60%と高い。最終的に下肢切断、機能障害に陥る症例も多く、初回で治癒し、再発や機能障害を残さない症例(完全治癒)は 44%と少ない。また、初回の潰瘍を起こしてから 10 年以内の大血管障害も含めた死亡率も約 60%と高率であった (Long-Term Outcome and Disability of Diabetic Patients Hospitalized for Diabetic Foot Ulcers. Diabetes Care 31: 1288-1292, 2008)。日本の報告では、5 年生存率は 74.5%と欧米に比べて高いものの、最終的に趾肢切断を要

したものは全体の 48%と高率であり(A Clinical and Statistical Study of 140 Cases. *Jpn J Dermatol* 113: 125-144, 2003)足壊疽は患者の QOL および生命予後を左右する重要な合併症である。

2. 研究の目的

高齢化社会に伴い糖尿病の症例数が増加し、その QOL を損ない生命予後を悪化させる糖尿病壊疽の治療の重要性が高まっている。糖尿病壊疽の原因は糖尿病による循環障害、神経障害、易感染性、創傷治癒遷延と多岐に亘るにも関わらず、従来行われてきた介入は血糖コントロール改善と血流改善のみに留まっていた。今回我々は糖尿病壊疽に対し、アディポネクチン遺伝子を導入したマクロファージを血管内に投与する事で、マクロファージが生着した局所での VEGF 産生亢進を行い加えてアポトーシス細胞の処理を亢進する事が期待されるため、細胞治療ができるのではないかと考え、その効果を動物モデルにおいて検証したいと考えた。

3. 研究の方法

アディポネクチン遺伝子の導入を行ったマクロファージの培養細胞系における機能解析を行う。遺伝子導入マクロファージの導入効率向上を図り VEGF 産生亢進の蛋白レベルおよび mRNA レベルでの確認、アポトーシス細胞の貪食能の亢進を確認するとの方針の元に検討を行った。

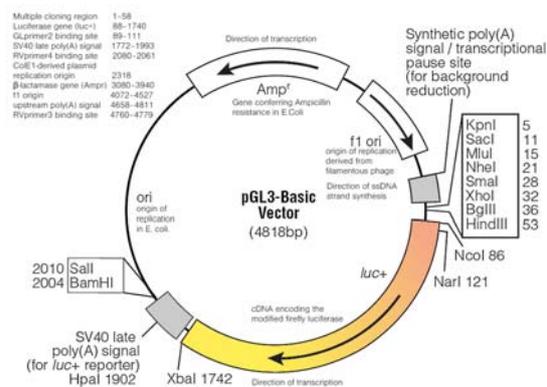
しかし一年目の段階で当初検討時点では軽度と考えられていた問題である“マクロファージ成長因子が高価である事”が非常に大きな支障となりうる事が明らかとなって来た。マウスより骨髓細胞を採取し、マクロファージを選択して培養する上で当然マクロファージ成長因子が必要とされ、実際にマクロファージ成長因子を購入しての培養自体には特別な支障はなかったが、実験を継続する上で、現実的には資金の限られた研究の遂行において非常に大きな問題であった。対策としてまずマクロファージ成長因子分泌細胞系の確立を先に行い、未精製の状態での上清を投与しての培養を行う方針を立てたが、この培養系の確立が進まず。またマウス間での骨髓細胞移植による免疫的不適合についての加えてカフ留置モデルも安定せず、マウス尾静脈よりの細胞注入手技も不安定なままであり、現実には当初の計画では実行困難、評価不能である事を受容せざるを得なくなった。

その段階で本学血管細胞(生理学講座)多久和陽教授に計画の見直しについての御相談を行い助言を得た。その中で一部の方法、評価法についての修正を行った。1) 今回はアディポネクチン遺伝子導入による血管障

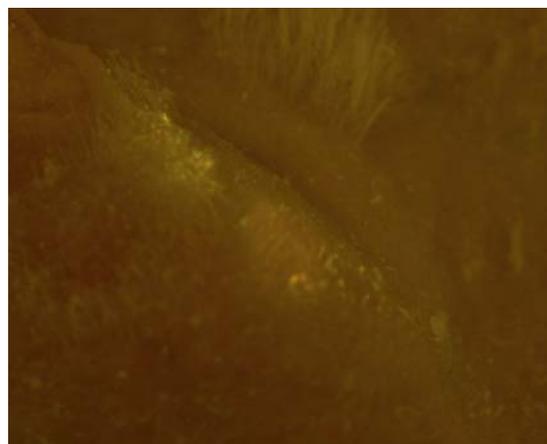
害の修復促進作用の有無についての評価を中心に行う、2) 血管障害モデルとして多久和研で確立されより再現性の高い大腿動脈結紮除去モデルを用いる、3) マクロファージを介した遺伝子導入では血管障害部位への遺伝子導入効率が向上および安定せず、また拒絶免疫の影響もあり、また導入効率も低い。そこで障害血管に近接した大腿筋へ直接遺伝子導入する。具体的な血管手術手技、評価については尾山治博士、岡本安雄准教授の御指導のもと一部修正したモデルでの検討を行った。マウスは C57BL/6、オス 6 週齢を用い、マウスアディポネクチン遺伝子発現ベクターは $4\mu\text{g}/\mu\text{l} \times 50\mu\text{l}$ を 5mm 間隔の針電極の間にシリンジを用いて注入、エレクトロポレーターは NEPA21 (ネッパジーン、千葉)を用いた。レクトロポレーションの条件は電極間抵抗 1Ω 以下(通常 $0.6-0.8\Omega$) 100V 、 $8-10\text{J}$ を目安にして施行した。マウス下肢血流の評価は MoorLDI (Moor 社、Minnesota、USA) を説明書通り使用して行った。

4. 研究成果

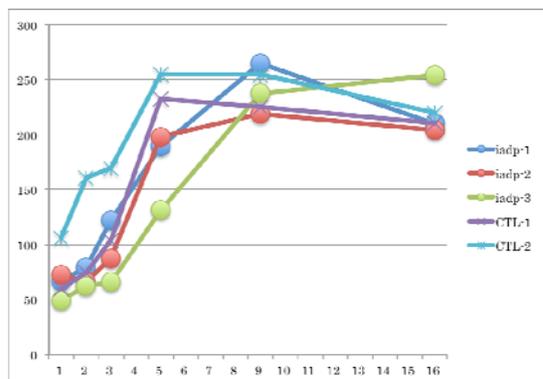
今回の検討で使用したマウスアディポネクチン遺伝子発現ベクターを示す。本ベクターは星薬科大学服部喜之先生の御厚意により使用可能となった。



予備的検討にて上記ベクターを GFP と共にマウス大腿筋に導入し発現を確認した。



今回の検討結果を示す。血流は従来の検討のように結紮翌日で定常状態の5%以下に低下していたもののみ採用した。その上で結紮後のエレクトロポレーションでPBSに空のベクターを投与したものに比してアディポネクチンの発現配列を含むベクターを投与し、発現を確認したもので明らかな優位性を示す結果ではなかった。



今回の検討を通しての問題点としてマウス尾静脈注入や大腿動脈結紮手技の確立に予想以上の時間を費やしてしまった事が挙げられる。加えて自身の出産/育児の時期と重なってしまった事も研究申請当初想定されていなかった事項ではある。いずれにせよモデルの一部修正等を加えることになるなど多少の紆余曲折はあったものの曲がりなりにも結果を出す事はできた。今後同モデルにての検討を追加で繰り返し、結果を確認した上で別な遺伝子過剰発現系にての検討を進めたい。またマクロファージへの遺伝子導入についてもマクロファージ成長因子分泌細胞系を確立した上で再度の検討を試みたいと考えている。

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1件)

1) Suzuki K, Yagi K, Oka R, Saiki Y, Kubota M, Sugihara M, Ito N, Kawashiri M, Nohara A, Horita H, Takeda Y, Yamagishi M, Kobayashi J: Relationships of serum haptoglobin concentration with HbA1c and glycoalbumin concentrations in Japanese type 2 diabetic patients. Clin Chem Lab Med, 47(1): 70-74, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計20件)

1) Yagi K, Funada A, Kobayashi J, Kitamoto E, Ohbatake A, Mori Y, Fujimoto A, Ito N, Kubota M, Yamaaki N, Takeda Y, Yamagishi M: Impact of daily dose of insulin on QT

interval of ECG in type 1 diabetes. ADA 70th Scientific Session, The Orange County Convention Center, Orlando, Jun 24-27, 2010.

2) Mori Y, Ito N, Yagi K, Fujimoto A, Kubota M, Yamaaki N, Takeda Y, Kobayashi J, Yamagishi M: Impact of red blood cell distribution width on risk of cardiovascular events in type 2 diabetes mellitus. ADA 70th Scientific Session, The Orange County Convention Center, Orlando, Jun 24-27, 2010.

3) 藤本彩, 山秋直人, 八木邦公, 森由紀子, 伊藤直子, 窪田美幸, 武田仁勇, 山岸正和: 敗血症にて治療中に昏睡状態となり髄液中メロペネム濃度異常高値が確認された一例. 第211回日本内科学会北陸地方会 (2010.6.13, 金沢大学医学類, 石川県)

4) 八木邦公, 舟田晃, 窪田美幸, 森由紀子, 藤本彩, 木場由希子, 伊藤直子, 中野薫, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和: 1型糖尿病症例におけるインスリン投与量は心電図QTc時間との相関を示す. 第53回日本糖尿病学会総会 (2010.5.27-29, 岡山コンベンションセンター, 岡山県)

5) 森由紀子, 伊藤直子, 八木邦公, 藤本彩, 木場由希子, 窪田美幸, 中野薫, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和: 2型糖尿病患者における赤血球容積分布幅(RDW)の臨床的意義. 第53回日本糖尿病学会総会 (2010.5.27-29, 岡山コンベンションセンター, 岡山県)

6) 窪田美幸, 八木邦公, 森由紀子, 藤本彩, 伊藤直子, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和: 2型糖尿病患者でのP波変動測定の有用性. 第53回日本糖尿病学会総会 (2010.5.27-29, 岡山コンベンションセンター, 岡山県)

7) 伊藤直子, 八木邦公, 森由紀子, 藤本彩, 木場由希子, 窪田美幸, 中野薫, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和: 2型糖尿病患者の糖毒性解除前後における平均血小板容積(MPV)の検討. 第53回日本糖尿病学会総会 (2010.5.27-29, 岡山コンベンションセンター, 岡山県)

8) 藤本彩, 八木邦公, 森由紀子, 木場由希子, 伊藤直子, 窪田美幸, 中野薫, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和: 糖尿病入院患者における悪性腫瘍のスクリーニング方法の検討. 第53回日本糖尿病学会総会 (2010.5.27-29, 岡山コンベンションセンター, 岡山県)

9) 山秋直人, 八木邦公, 中野薫, 窪田美幸, 伊藤直子, 木場由希子, 森由紀子, 伊藤直子, 藤本彩, 武田仁勇, 山岸正和: C-Peptide-Index (CPI) は BMI>25kg/m² や FBS>140mg/dl 以上ではよりインスリン抵抗性を強く含んだ評価となる. 第 53 回日本糖尿病学会総会 (2010. 5. 27-29, 岡山コンベンションセンター, 岡山県)

10) 山秋直人, 森由紀子, 藤本彩, 伊藤直子, 窪田美幸, 八木邦公, 武田仁勇, 山岸正和: 薬剤性過敏症候群 Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) を呈した 2 型糖尿病症例. 第 81 回日本糖尿病学会中部地方会 (2010. 4. 17, 金沢大学医学類, 石川県)

11) 森由紀子, 八木邦公, 小泉順二, 藤本彩, 伊藤直子, 窪田美幸, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和: 10 年以上の臨床経過を追えた common mutation を有する MODY3 の一例. 第 81 回日本糖尿病学会中部地方会 (2010. 4. 17, 金沢大学医学類, 石川県)

12) 藤本彩, 伊藤直子, 森由紀子, 山秋直人, 八木邦公, 武田仁勇, 山岸正和: 左室壁運動異常を合併した摂食障害の 1 例. 第 81 回日本糖尿病学会中部地方会 (2010. 4. 17, 金沢大学医学類, 石川県)

13) YAMA AKI N, KOBAYASHI J, YAGI K, NOHARA A, KOBA Y, ITO N, KUBOTA M, SUGIHARA M, KAWASHIRI M, TAKEDA Y, YAMAGISHI M: Comparison of Effects of Bezafibrate and Fenofibrate on Metabolic Markers Including Adipocytokines in Dyslipidemia Accompanied by Overweight or Type 2 Diabetes. ADA 69th Scientific Session, Morial Convention Center, New Orleans, Jun 5-9, 2009.

14) KUBOTA M, YAGI K, KOBAYASHI J, NOGUCHI T, KOBA Y, ITO N, SUGIHARA M, YAMA AKI N, NOHARA A, TAKEDA Y, YAMAGISHI M, INAZU A, KATSUDA Y, ONISHI A, NAKAMURA K, MORI Y: Relationship of Adiponectin to Lipid Profiles in Primary Hyperalphalipoproteinemia (HALP) by CETP Gene Mutation. ADA 69th Scientific Session, Morial Convention Center, New Orleans, Jun 5-9, 2009.

15) 窪田美幸, 八木邦公, 野口徹, 木場由希子, 杉原雅子, 山秋直人, 野原淳, 武田仁勇, 山岸正和, 稲津明広, 勝田裕子, 大西秋津, 中村圭吾, 森保道: CETP 遺伝子変異による原発性高 HDL 血症例におけるアディポネクチン

と脂質マーカーの関連の検討. 第 52 回日本糖尿病学会総会 (2009. 5. 21-24, 大阪国際会議場, 大阪府)

16) 伊藤直子 八木邦公 木場由希子 窪田美幸 杉原雅子 山秋直人 武田仁勇 山岸正和: 糖負荷試験における血小板由来マイクロパーティクルの検討. 第 52 回日本糖尿病学会総会 (2009. 5. 21-24, 大阪国際会議場, 大阪府)

17) 宮本由紀子, 伊藤直子, 八木邦公, 川野充弘, 木場由希子, 窪田美幸, 杉原雅子, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和: 自己免疫性膵炎を合併しない IgG4 関連疾患患者における耐糖能異常の臨床的特徴. 第 52 回日本糖尿病学会総会 (2009. 5. 21-24, 大阪国際会議場, 大阪府)

18) 杉原雅子, 八木邦公, 木場由希子, 伊藤直子, 窪田美幸, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和, 古川健治, 中島昭勝, 齋木優子, 吉本幸子, 高田裕之, 平岩善雄, 酒井智子, 若杉隆伸, 臼倉幹哉, 勝田裕子, 亀谷富夫, 宮元進: ミトコンドリア 3243A to G 変異を有する糖尿病患者の合併症進展についての検討. 第 52 回日本糖尿病学会総会 (2009. 5. 21-24, 大阪国際会議場, 大阪府)

19) 山秋直人, 八木邦公, 鈴木薫, 杉原雅子, 齋木優子, 伊藤直子, 窪田美幸, 武田仁勇, 山岸正和: 心血管イベントの既往歴の有無と血中グリコアルブミン/HbA1c 比の差異についての検討. 第 52 回日本糖尿病学会総会 (2009. 5. 21-24, 大阪国際会議場, 大阪府)

20) 伊藤直子, 八木邦公, 齋木優子, 窪田美幸, 杉原雅子, 山秋直人, 武田仁勇, 山岸正和: 糖尿病ケトアシドーシスと両側中大脳動脈領域の出血性脳梗塞を合併した 1 例. 第 79 回日本糖尿病学会中部地方会 (2009. 4. 18, 名古屋国際会議場, 愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 美幸 (KUBOTA MIYUKI)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号: 80514603