

機関番号 : 22701

研究種目 : 若手研究 (スタートアップ)

研究期間 : 2007~2008

課題番号 : 19890177

研究課題名 (和文) 急性肺傷害治療における血管内皮細胞増殖因子分泌型レセプター遺伝子導入の効果

研究課題名 (英文) The effect of the gene transfection of soluble form - VEGF (Vascular endothelial growth factor) receptor II for acute lung injury.

研究代表者 馬場 靖子 (BABA YASUKO)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号 : 80453041

研究成果の概要 (和文) :

急性肺傷害の血管透過性亢進状態に関与する因子である血管内皮細胞増殖因子(VEGF; vascular endothelial growth factor)に着目し、そのレセプターの一つである VEGFR-2(KDR/flk-1)の細胞外の構造のみ (sflk-1;soluble form of flk-1) をコードする遺伝子をクローニング、肺内に発現させることで VEGF の作用を減弱することができる。これにより肺傷害時の VEGF の作用について検討をおこなった。マウスの肺から総 RNA を抽出し、sflk-1 の cDNA をサブクローニングし、発現プラスミドを作製した。エレクトロポレーションによる遺伝子導入を試みたが、肺での発現が確認できなかったため sflk-1 発現アデノウイルスベクターを作製した。マウス尾静脈からベクターを静脈注射し、肺内に sflk-1 発現が確認できた。また肺傷害モデルとして盲腸結紮後腹膜炎モデル(CLP; Cecal ligation and puncture)作製を試みた。条件を試行錯誤したが、肺の透過性亢進状態が軽微であり、今回の実験には適当でないと判断した。変わって腸間膜動脈の阻血再還流による肺傷害モデルを用いて研究を続行する方針とした。

研究成果の概要 (英文) :

The complement DNA (cDNA) of extra cellular domain of VEGF receptor II (KDR/flk-1) was subcloned by mouse total RNA extracted from Balb/C mouse lung. The plasmid expressing sflk-1 (p-sflk-1) was made. Because the amount of sflk-1 gene expression by electroporation was not satisfactory, the adenovirus vector expressing sflk-1 (Ad-sflk) was generated. The vector was intra-venously administered via tail vein. The sflk-1 expression was confirmed in mouse lung by western blotting.

In the acute lung injury model, CLP (cecal ligation and puncture) model was not appropriate for our research, because the lung epithelial permeability was trivial. We try to change lung injury model to that occurred by ischemia-reperfusion of mesenteric artery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	380,000	0	380,000
2008年度	960,000	288,000	1,248,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,340,000	288,000	1,628,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔、蘇生学 7306

キーワード：遺伝子、ウイルス、生体分子

1. 研究開始当初の背景

急性肺傷害は肺血管透過性亢進が病態の中心であり、VEGF(vascular endothelial growth factor)も原因分子と考えられている。VEGFレセプター(VEGFR)1, 2, 3のうちVEGFR-1の細胞外ドメインである sflt-1(soluble form of the flt-1)の投与により dominant negative 様式にVEGFの作用を減弱し、肺水腫やブレオマイシン肺臓炎の炎症が軽減する報告がされている(Hamada, *J. Immunol.* 2005)

2. 研究の目的

今回ターゲットとする VEGFR-2 (KDR/Flk)は VEGF のシグナル伝達経路において広範の反応に関与しており、この細胞外ドメイン (sflk-1; soluble form of the flk-1)の投与により、肺傷害の軽減効果は高いと考えられるが、これについて検討した報告はみあたらないのでこの点について検討する。

3. 研究の方法

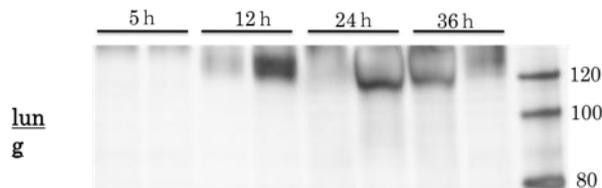
(1)マウス肺の総 RNA から VEGFR-2 (flk-1)の cDNA をサブクローニングし、発現プラスミドを作製する。エレクトロポレーションまた

はアデノウイルスベクターによりマウス肺内に sflk-1 を発現させる。

(2)肺傷害モデルとしてマウスの盲腸結紮後腹膜炎モデル(CLP; Cecal ligation and puncture)を作製する。組織学的検討やアルブミンの肺間質への漏出量の比較等を行い、sflk-1 投与による肺傷害進展の抑制効果について比較検討する。

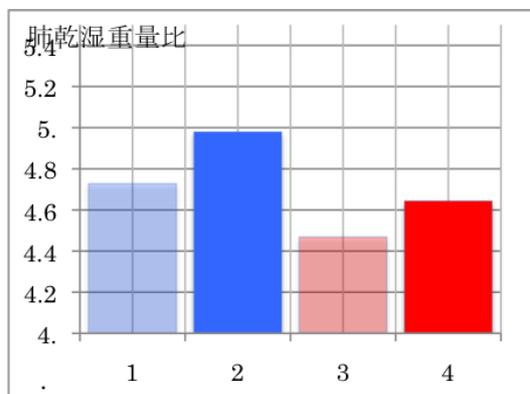
4. 研究成果

(1) sflk-1 (VEGFR-2) 発現プラスミドを作製し、マウスにエレクトロポレーションによる遺伝子導入を試みた。ウエスタンブロットにより肺内での発現確認を試みたが、発現量が少なく、上手く確認できなかった。次に sflk-1 (VEGFR-2) 発現アデノウイルスベクターを作製した。マウスの尾静脈より静脈注射し、肺での発現を経時的に確認したところ、投与後 12 時間未満では発現量にばらつきがみられ 24 時間から 36 時間が安定した発現量と考えられた(図・1)。



図・1 Ad-f1k 静脈注射後の肺内における f1k-1 発現量の経時的変化 (右は分子重量マーカー、f1k-1 は 120 kD 付近)

(2) 肺傷害モデルの CLP モデルは、盲腸結紮量、穿孔させる穴の大きさ、数により生存率等重傷度が異なる。試行錯誤を重ねたが、手術後 24 時間で 50%程度死亡する侵襲度の高い条件にしても肺の透過性亢進については比較的軽度にとどまり(図・2)、今回の実験目的のモデルとして適当でないと結論づけた。次に腸間膜動脈阻血再還流による肺傷害モデルに変更する方針となった。



図・2 肺乾湿重量比の比較

グラフ左から empty vector 投与後、sham ope(1), empty vector 投与後、CLP ope (2), Ad-sflt 投与後、sham ope(3), Ad-sflt 投与後、CLP ope (4). 乾湿重量比では CLP ope による肺の透過性亢進を Ad-sflt 投与で軽減している結果が得られた。しかし組織学的な変化はきわめて軽微であり、腸間膜動脈阻血再還流による肺傷害モデル

ルに変更する方針となった。

## 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 2 件)

- ① Baba Y., *et. al.*, Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates acute lung injury and mortality in mice, Human Gene Therapy, 査読あり Vol 18, 2007, 130-141.
- ② Ohta, S. Baba Y., *et. al.*, High tidal volume ventilation induces lung injury after hepatic ischemia-reperfusion 査読あり Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol Vol 292, 2007, 625-631

[学会発表] (計 3 件)

- ① 坂本聖子、馬場靖子他 2 名、ブレオマイシン肺線維症マウスにおける Keratinocyte growth factor (KGF) 発現アデノウイルスベクターによる治療効果の検討、2007、第 15 回バイオフィジオロジー研究会、京都
- ② 坂本聖子、馬場靖子他 3 名、ブレオマイシン肺線維症マウスにおける keratinocyte growth factor (KGF) 発現アデノウイルスベクターによる治療効果の検討、2008、第 55 回日本麻酔学会総会、横浜
- ③ Sakamoto S, Baba Y., *et. al.*, Effects of adenovirus-mediated keratinocyte growth factor gene transduction on bleomycin induced lung fibrosis 2008 American Thoracic Society, International Conference, Toronto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 靖子 (BABA YASUKO)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80453041