

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592311

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） Gene transduction of VEGF (vascular endothelial growth factor) receptor 2 for intestine ischemia reperfusion induced lung injury.

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・手術部・講師

研究者番号：80453041

研究成果の概要（和文）：

急性肺傷害は血管透過性亢進によって肺間質浮腫がおこるが、血管内皮増殖因子（VEGF）の分泌により過剰反応が起きている可能性があった。VEGF レセプターの細胞外構造を過剰に遺伝子導入し、VEGF 作用を減弱させようと試みた。上腸管膜動脈阻血再環流後肺傷害の動物モデルを用いて検討したが、研究期間内に予想されるような有効性は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

The vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a role for progressing permeability of lung vessels. We constructed the recombinant adenovirus that expressing the extracellular domain of VEGF receptor II (Ad-VEGFR2), and tried to suppress the effect of the VEGF. The model of lung injury, we used the ICR male mice, clamped the supra mesenteric artery for 30 min' s and after that, re-perfused the intestines. We investigated the effect of VEGF for lung permeability or inflammation, but couldn' t get the enough results than we have expected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	2500000	750000	3250000
22 年度	800000	240000	1040000
23 年度	300000	90000	390000
年度			
年度			
総 計	3600000	1080000	4680000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：救急医学

キーワード：集中治療学

## 1. 研究開始当初の背景

急性肺傷害は多様な原因から肺の血管透過性亢進、高度の炎症反応が惹起される病態である。肺傷害の患者のうち、ARDS まで病態が進行した患者は血漿や気管支上皮被覆液中の VEGF 分泌が多いという報告がある (David R, Am J Respir Crit Care Med;166,

1332-1337, 2002) VEGF のサブタイプのうち VEGF-A は血管透過性亢進に関与するため、肺傷害時の過剰な分泌は病態を悪化する可能性がある。VEGF レセプター (VEGFR) -1 の中和抗体等の投与により、肺傷害が軽減する報告がされた (David R, *et al.* Am J Respir Crit Care Med;164, 1601-1605,

2001 Perkins G D, *et al* Thorax:60, 153-158, 2005)。VEGF-A は VEGFR 2 との affinity が強く、その細胞外構造のみの decoy タンパク質をウイルスベクターで過剰に発現することによって、dominant negative 様式に VEGF の過剰反応を抑制し、肺傷害の進展をコントロールできないかと考えた。

## 2. 研究の目的

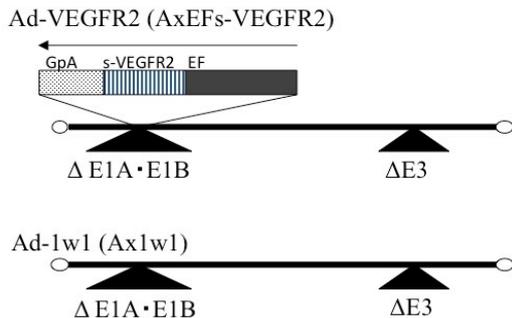
VEGFR には 1 から 3 のサブタイプがある。肺傷害のコントロールに VEGFR-1 の抑制が効果ある報告があるが、VEGFR-2 の効果は検討されておらず、また VEGFR-2 は VEGF の多くのサブタイプと反応するため、抑制した場合の効果は大きいと考えた。

## 3. 研究の方法

(1) VEGFR-2 の細胞外構造のみをコードする遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-VEGFR2) を作製。コントロールベクターは発現単位を持たない Ad-1w1 (Ax1w1) を用いた。

### adenovirus vector

VEGFR-2 発現アデノウイルスベクター (AxEFs-VEGFR2、以下 Ad-VEGFR2) コントロールベクター (Ax1w1、以下 Ad-1w1)



(2) ICR マウスの尾静脈に静脈注射し、肺内に過剰発現させる。

(3) vector 投与 24 時間後に、マウスの手術を行い、上腸間膜動脈 (SMA) 阻血再環流

(ischemia reperfusion: IR) 後肺傷害モデルを作製する。IR 手術：マウスを開腹、SMA を血管クリップで阻血 (45 分間)、その後クリップを外し再環流、閉腹、4 時間経過後、検体採取。

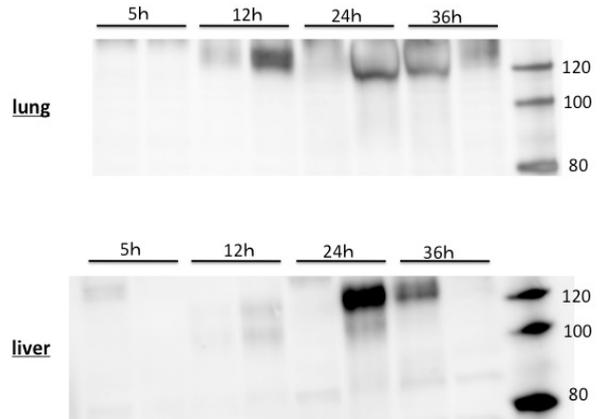
Sham 手術：マウスを開腹、SMA を確認するのみで閉腹。

(4) SMA-IR によって分泌された VEGF の作用が、Ad-VEGFR2 投与によって抑制されるかどうか検討する。血管透過性亢進の評価として、組織学的検討、肺乾湿重量比、エバンスブルーアッセイを行った。また炎症の程度の評価と

して、血漿中のサイトカイン、ケモカインの定量、接着因子の発現評価、アポトーシスの評価 (caspase3/7 assay) も行った。

## 4. 研究成果

(1) (2) Ad-VEGFR2 をマウス尾静脈に静脈注射、肺内での発現の時間経過を western blotting で確認した。



(3)

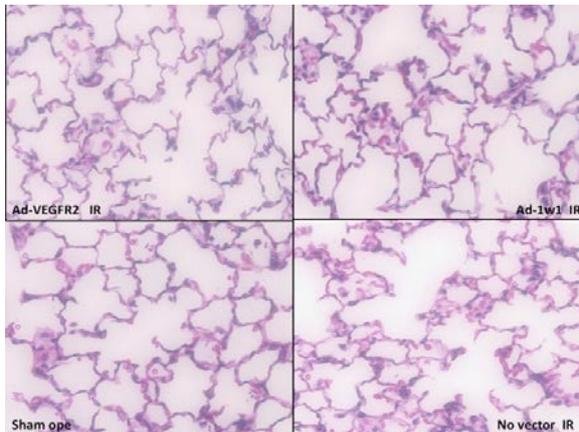
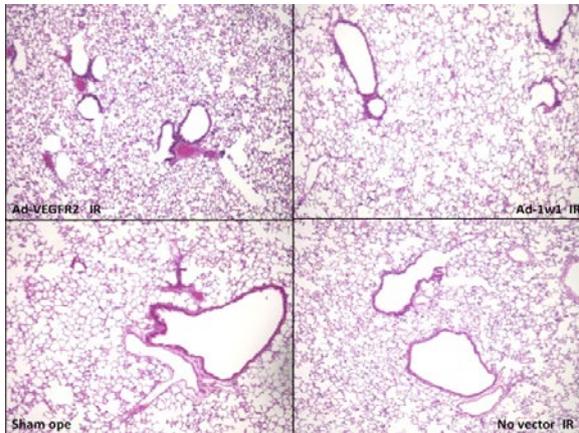
① SMA-IR 手術により血漿 VEGF-A の上昇を確認した (ELISA 法)。

② 肺血管透過性亢進への作用

<組織学的検討>

SMA-IR 群 (no vector IR) は sham ope 群に比較して肺間質の浮腫、炎症細胞浸潤が多かった。Vector 投与群 (Ad-VEGFR2 IR, Ad-1w1 IR) は SMA-IR 群 (no vector IR) に比較して肺間質の浮腫、炎症細胞浸潤が多かったが、virus 投与による炎症反応が加味しているためと考えた。Ad-VEGFR2 IR 群と Ad-1w1 IR 群を比較した場合、Ad-VEGFR2 IR 群が若干肺間質の炎症細胞浸潤が多く認めた。VEGFR2 細胞外構造を過剰発現させて、VEGF の作用を抑制しているが、血管透過性亢進の抑制効果は認めなかった。

(HE 染色、upper x100, lower x400)



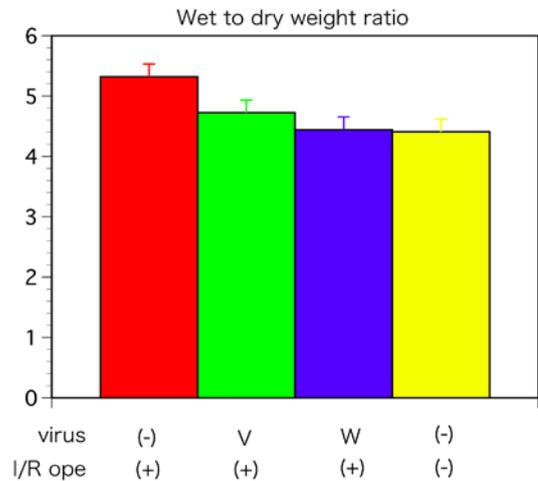
Ad-VEGFR2 投与群 (V 群) とでコントロールベクター (Ad-1w1) 投与群 (W 群) と差を認めなかった。

<Evans Blue Dye Assay>  
lung vascular permeability を評価する方法。  
(J Surg Res 2011, 168(1) 34-41)

Ad-VEGFR2 投与群 (V 群) とでコントロールベクター (Ad-1w1) 投与群 (W 群) と差を認めなかった。

<肺乾湿重量比>

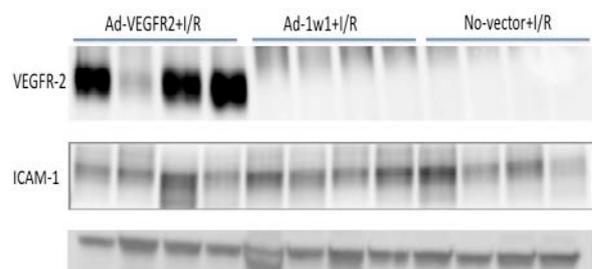
Ad-VEGFR2 投与群 (V 群) とでコントロールベクター (Ad-1w1) 投与群 (W 群) と差を認めなかった。



Sham ope 群 (黄色) に比較して、no-vector IR 群 (赤) は肺の浮腫を認めた。Virus vector 投与群 (緑、青) は no-vector IR 群と差がなかった。Ad-VEGFR2 投与で肺の血管透過性亢進は認められなかった。

(4) 炎症抑制効果に関する検討：

- ① 血漿中 TNF-a、CXCL 1 濃度について V、W 群に差を認めなかった。
- ② 肺内の接着因子 (ICAM-1, E-selectin) 発現についても V、W 群に差はなかった。



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)  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 靖子 (BABA YASUKO)  
横浜市立大学附属市民総合医療センター・手術部・講師  
研究者番号：80453041

(2) 研究分担者

倉橋 清泰 (KURAHASHI KIYOYASU)  
横浜市立大学附属市民総合医療センター・麻酔科・准教授  
研究者番号：50234539

矢澤 卓也 (YAZAWA TAKUYA)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号：50251054

(3) 連携研究者

鐘ヶ江 裕美 (KANEGAE YUMI)  
東京大学・医科学研究所・助手  
研究者番号：80251453