

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592545

研究課題名(和文) 難治性喉頭疾患に対する遺伝子治療の応用

研究課題名(英文) Gene therapy for refractory laryngeal diseases.

研究代表者

荒木 幸仁 (ARAKI, Koji)

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・病院・講師)

研究者番号：70317220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：有効な治療法がない喉頭難治性疾患(1)反回神経麻痺、(2)癒痕性喉頭気管狭窄に対する臨床応用を目指した新しい治療法の開発を目的とした基礎研究を行った。

(1)については、過誤神経再生克服を目標とした基礎的検討を行い、モデルおよび評価法を確立し、チューブによる神経再生の評価を行った。今後遺伝子治療へと発展させる基礎研究を遂行できた。(2)についてはラットを用いた安定した喉頭気管狭窄モデルを作成し、センダイウイルスベクターを用いたFIR遺伝子治療効果を検討し、その有効性を示すことができた。(3)また遺伝子導入法として頭頸部癌に対するLISWなどを用いた遺伝子導入の基礎検討なども行った。

研究成果の概要(英文)：We performed basic research to develop novel treatment for refractory laryngeal diseases such as (1) Recurrent laryngeal nerve (RLN) palsy and (2) Laryngotracheal stenosis (LTS).

(1) Animal model to evaluate the misdirection of nerve regeneration was established. The utility of novel nerve regeneration tube was also assessed. The basic model and techniques were established to evaluate RLN regeneration after the gene therapy for RLN palsy. (2) The rat LTS Model was established. The novel treatment for LTS using Sendai virus mediated FIR gene therapy was assessed and demonstrated preventive effect for LTS. (3) Additionally, novel gene transduction technique using LISW was also assessed and proved to be useful.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝子治療 反回神経麻痺 喉頭気管狭窄 神経再生チューブ センダイウイルスベクター c-myc FIR laser-induced shock wave

1. 研究開始当初の背景

喉頭は呼吸や発声、嚥下を司る、生活のうえで必要不可欠な重要臓器である。その機能が障害された場合には著しいQOL低下をきたす。

反回神経麻痺は特発性のものやウイルス感染性の麻痺に対してはステロイドホルモンを中心とした薬物治療が行われ、外傷や手術合併症等による神経断裂例では、神経再吻合術、神経移植術等も行われる。しかしながら、治療不応例は数多く存在し、特に神経断裂例では神経筋機能が回復しないことが多い。機能回復に至らない最大の原因として神経過誤再生が問題となる。反回神経は声帯の開大筋と閉鎖筋の両方を支配しており、過誤支配による声帯の開大と閉鎖の不均衡が生じる。そこで過誤支配の問題を解決するための研究を計画した。

喉頭・気管狭窄は長期気管挿管、炎症性疾患、気管外傷、熱傷などにより喉頭・気管粘膜が損傷され、その創傷治癒機転において余剰な肉芽形成、癒痕化、線維化を生じた結果、気道が狭窄する疾患である。その治療には、レーザー切除、バルーン拡張術、喉頭気管管状切除端々吻合など様々な外科的治療が試みられているが、複数回の手術や長期の気管切開を要することが多く、再発率も高い。なぜなら外科的治療自体が粘膜への侵襲であるので、その創傷治癒過程での余剰な細胞増殖によって再狭窄が起こりやすいからである。従って、傷害を受けた気管粘膜における創傷治癒を抑制的にコントロールすることが術後の再狭窄予防の鍵となると考えられる。補助療法としてステロイド投与、トラニラスト内服などが用いられているが、効果は満足できるものではなく、新たな治療法が望まれており、その解決策を目指した研究を計画した。

また遺伝子治療は、安全性への懸念から、これまで悪性疾患や重症の遺伝性疾患に限定されてきたが、安全なウイルスベクターにより単回投与で持続的に治療因子が局所に発現されれば喉頭・気管狭窄のような良性疾患に対しても理想的なドラッグデリバリーシステムとなりうる。これら喉頭疾患に対する安全な遺伝子導入についての検討も併せて行った。

2. 研究の目的

有効な治療法がない喉頭難治性疾患(1)反回神経麻痺、(2)癒痕性喉頭気管狭窄に対する遺伝子治療などを用いた臨床応用を目指した新しい治療法の開発を目的とした基礎研究を行った。

(1)については、過誤神経再生克服を目標とした基礎的検討として、まず反回神経障害モデルおよび評価法を確立した。その上で神経再生チューブによる神経再生の評価を行い、今後遺伝子治療へと発展させる基礎研究

を遂行した。

(2)については、手術や外傷により気道粘膜が損傷され、その創傷治癒機転で気管という限られたスペースに過剰な増殖が起こると狭窄がおこる。そこでラットを用いた安定した喉頭気管狭窄モデルを作成し、センダイウイルスベクター(SeV)による遺伝子導入が可能であるか、さらに治療遺伝子として細胞増殖に關与するc-mycに対して抑制的に作用するFIR(FUSE binding protein interacting repressor)を用いた狭窄防止治療効果の検討を行った。

(3)また遺伝子導入法として安全な遺伝子導入法であるLISWを用いた頭頸部癌に対する遺伝子導入の基礎検討、新しい遺伝子治療へと発展可能なドラッグデリバリーシステムについての基礎検討なども併せて行った。

3. 研究の方法

(1)反回神経過誤神経支配に対する新しい治療法の開発

安全かつ気道への導入効率が良いとされるセンダイウイルスベクター(SeV)を用いた喉頭への遺伝子導入の検討を行った。最終的には治療遺伝子を導入し、特に運動機能回復を目的とした治療効果の検討を目的としているが、まずモデルの作成および評価法の確立について検討した。ラット反回神経切断モデルを作成し、神経トレーサー(ファストブルー:FB、ディアミドイエロー:DY)を喉頭筋(甲状披裂筋披裂、後輪状披裂筋)にそれぞれ投与し二重染色を行い疑核にて観察を行った。さらに喉頭筋電図を用いた電気生理学的機能再生についての評価系の検討を行った。また、神経切断部の治療環境として、神経再生チューブ(ナーブブリッジ)を用いた神経再生環境の評価を行った。

(2)癒痕性喉頭気管狭窄に対する新しい治療法の開発

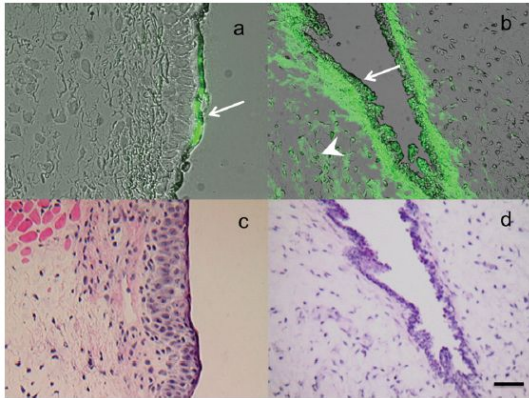
ラットを用いた気管狭窄モデルを作成した。気管切開孔よりナイロンブラシにより気管粘膜を全周性に損傷し、3日後に狭窄度の評価を行った。また傷害された気道粘膜に対する遺伝子導入の検討を気管狭窄に対する遺伝子治療の前段階として、SeVベクターが効率的に遺伝子導入できるかを検証した。さらにFIR搭載SeVによる気管狭窄防止効果についての検討を行った。

(3)ウイルスを用いない安全な遺伝子導入法として、laser-induced stress waves(LISW)を用いた頭頸部癌細胞への遺伝子導入の検討をIn vitroおよびIn vivoにおいて行った。さらにベクターなどのデリバリーシステムへと応用可能な、市販コロイドキットを用いたICGの生体内動態についての検討を行った。

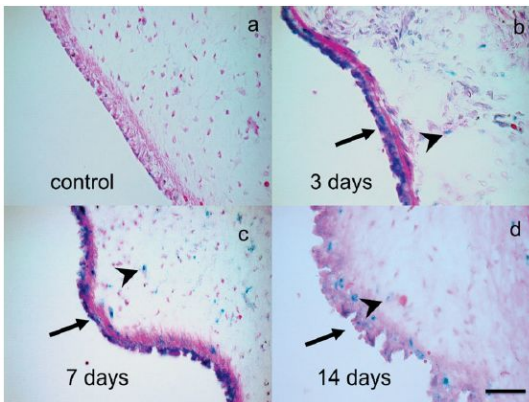
4. 研究成果

(1) 反回神経過誤神経支配に対する新しい治療法の開発

SeV を喉頭へ噴霧または注入し、レポーター遺伝子の発現を検討した。注入群、噴霧群いずれも遺伝子発現を確認し、噴霧群では GFP 発現が声帯粘膜全体にみられ、粘膜下組織にも発現していた(図1)。経時的観察では噴霧3日後に発現は最大となるものの、14日後においても発現を確認でき、噴霧という簡便な方法によるドラッグデリバリーシステムについての有用性を確認できた(図2)。

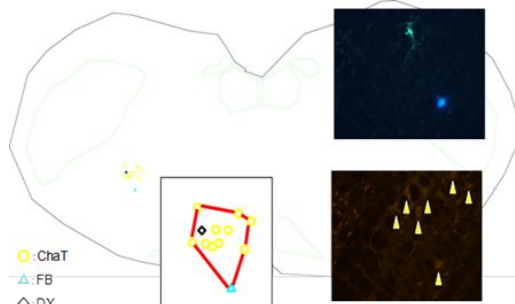


(図1 声帯 GFP 発現 a,c 注入、b, d 噴霧)

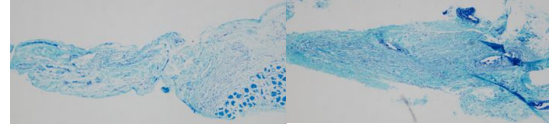


(図2 声帯 LacZ 発現の経時的変化)

また神経再生、機能回復における過誤支配の克服に向けて神経切断モデルを作成し、神経トレーサーによる二重染色を行い疑核にて観察を行うことに成功した(図3)。さらに喉頭筋電図による機能評価法を確立した。神経切断部の治療環境として、神経再生チューブ(ナープブリッジ)を用いて反回神経切断モデルの架橋モデルを作成した。形態学的に神経再生促進が確認でき(図4) 治療因子を投与することが可能な神経再生環境の場としても優性が高いことを示すことができた。



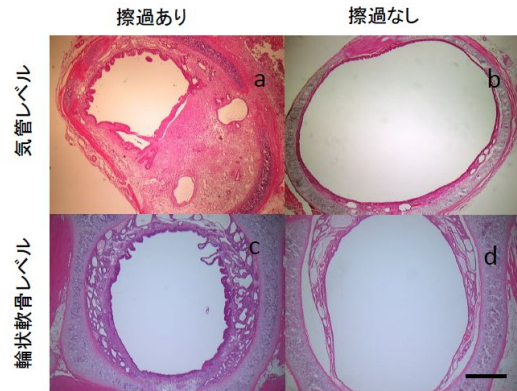
(図3 疑核の二重染色による過誤支配評価)



(図4 反回神経断面 クリュババレーラ染色 左 吻合、右 チューブ架橋)

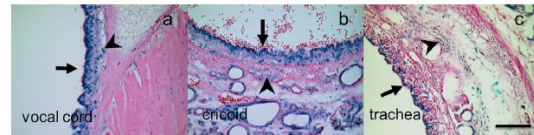
(2) 癒痕性喉頭気管狭窄に対する新しい治療法の開発

ラット喉頭気管狭窄モデルにおいて、再生粘膜上皮の過形成、粘膜下組織の肥厚を認め、気管レベル、輪状軟骨レベルともに有意な狭窄が見られた(図5)。物理的傷害(擦過)による安定したラット喉頭気管狭窄モデルを確立した。



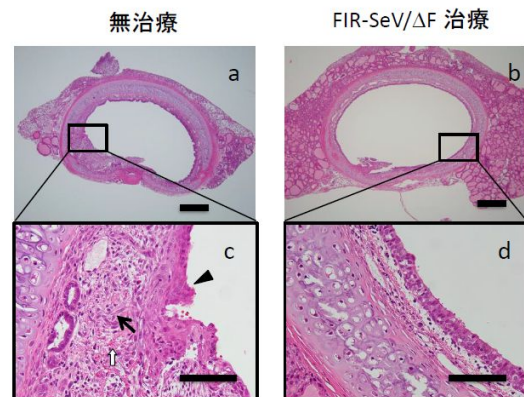
(図5 気管狭窄モデル気管断面)

またこのラット喉頭気管狭窄モデルにレポーター遺伝子(LacZ)を搭載したSeVを噴霧したところ、遺伝子の発現を確認した(図6)。



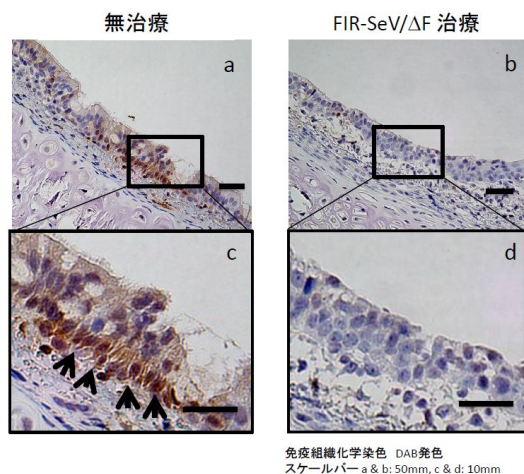
(図6 気管狭窄モデルでの LacZ 発現)

続いて治療遺伝子FIRを搭載したSeVを投与し、気管狭窄防止効果を検討したところ、治療群で有意な狭窄防止効果を確認した(図7)。



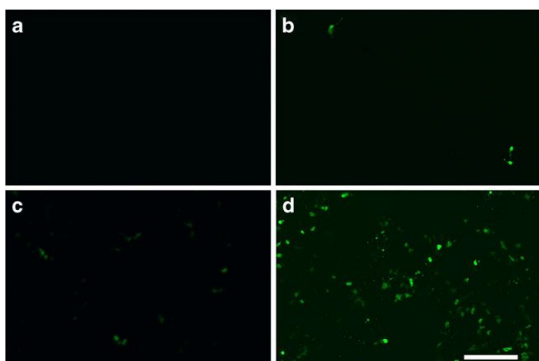
(図7 SeV-FIR 治療により狭窄を抑制)

C-Myc 免疫染色により、治療群では c-Myc 発現の抑制を確認し(図 8) そのメカニズムが FIR による c-Myc 抑制であることが示された。



(図 8 c-Myc 免疫染色 FIR 治療に発現抑制)

(3) LISW により頭頸部癌細胞へ細胞障害を与えることなく、レポーター遺伝子が導入可能であることが示された。(図 9)



(図 9 In vitro での GFP 発現)

また市販のフチン酸キットと ICG を混合することで、その動態に変化が起こることが示された。これを応用し遺伝子治療の新たなドラッグデリバリーシステムとして発展応用の可能性があることが推察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Mizokami D, Araki K, Tomifuji M, Mori Y, Shiotani A. Two Cases Involving the Use of Composite Hyoid Interposition Grafts for Laryngotracheal Stenosis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* (In press)
- 2) Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H, Kosuda S, Shiotani A. Novel Indocyanine Green-Phytate Colloid Technique for Sentinel Node Detection in Head and Neck: Mouse Study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Apr 14. [Epub ahead of print]

- 3) 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.
- 4) Araki K, Mizokami D, Tanaka N, Suzuki H, Sato S, Shiotani A. Targeted Gene Transfer into Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Nanosecond Pulsed Laser-induced Stress Waves. *Lasers Med Sci.* 29(1), 231-238. 2014. [Epub ahead of print] 2013 Apr 24. doi: 10.1007/s10103-013-1324-3

[学会発表](計 6 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. 2013 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO in Vancouver, Canada, 2013.9
- 2) Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Kosuda S, and Shiotani A: Feasibility Animal Study of Novel ICG Sentinel Node Detection Technique in Head and Neck Region. 2013 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO in Vancouver, Canada, 2013.9
- 3) 荒木幸仁、溝上大輔、富藤雅之、山下拓、藤井博史、小須田茂、塩谷彰浩：頭頸部癌における ICG 法によるセンチネルリンパ節生検の工夫．ICG-コロイド化法の基礎的検討．第 15 回 SNNS 研究会学術集会，釧路，2013.9.
- 4) 溝上大輔，富藤雅之，荒木幸仁，森有子，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 2012.11 (東京)
- 5) Daisuke Mizokami, Koji Araki, Nobuaki Tanaka, Hiroshi Suzuki, Tomifuji M, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Shiotani A. Sendai Virus-Mediated Transgene Expression in the Novel Laryngo-tracheal Stenosis Model. The 92nd Annual meeting of American Laryngological Association at COSM in San Diego, USA. 2012.4
- 6) Daisuke Mizokami, Koji Araki, Nobuaki Tanaka, Hiroshi Suzuki, Shiotani Akihiro. Sendai Virus Vector Mediated Transgene Expression in the Larynx. The 91st Annual meeting of American Laryngological Association at COSM in Boston, USA 2011.5

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒木 幸仁 (ARAKI, Koji)
防衛医科大学校・病院・講師
研究者番号：70317220

(2)研究分担者

塩谷 彰浩 (SHIOTANI, Akihiro)
防衛医科大学校・病院・教授
研究者番号：80215946