

飛永 修一 論文内容の要旨

主 論 文

Keratinocyte growth factor gene electroporation into skeletal muscle as a novel gene therapeutic approach for elastase-induced pulmonary emphysema in mice

マウス肺気腫モデルに対する keratinocyte growth factor 発現プラスミドを用いた
新たな遺伝子治療手段の検討

飛永 修一、松本 桂太郎、永安 武、古川 克郎、阿保 貴章、
山崎 直哉、土谷 智史、宮崎 拓郎、小路 武彦

Acta Histochemica et Cytochemica, 2015, in press

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：永安 武 教授)

緒 言

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は気流閉塞を伴う進行性の疾患であり、日本でも 40 歳以上の約 10%が COPD への罹患を疑われている。気管支拡張薬やステロイド薬を用いた治療が行われているが長期的な肺機能低下を改善するには至っていない。これまで種々の肺気腫動物モデルが作成され肺機能改善や急性増悪の予防を目標とした研究が行われてきた。Keratinocyte growth factor (KGF)は Keratinocyte growth factor receptor (KGFR)を介して選択的に上皮細胞に作用する。特に II 型肺胞上皮細胞の増殖を促進し、肺サーファクタント蛋白の産生を誘導することが示されている。これまでわれわれは KGF 発現プラスミドを electroporation 法により肺へ直接遺伝子導入することで、ラットにおける肺切除後残存肺の代償性増殖を促進することを示した。本研究ではマウス肺気腫モデルを用いて、大腿筋への KGF 遺伝子導入による肺気腫の治療効果を検討した。

対象と方法

8 週齢 BALB/c male mice に porcine pancreas elastase (PPE) 2 単位を気管内投与し肺気腫モデルを作成。同時に両側大腿筋を露出しそれぞれに recombinant

human KGF (rhKGF)発現プラスミド(pKGF-FLAG)もしくは対照ベクター(p-FLAG)を40 µg ずつ筋注し electroporation 法による大腿筋への遺伝子導入を行った。Western blotting、及び ELISA 法にて大腿筋と肺での KGF タンパクの発現状況を検討した。さらに肺内での KGF、KGFR、surfactant protein A (SP-A)、増殖細胞(proliferating cell nuclear antigen(PCNA))について免疫組織学的に検討した。Apoptosis 細胞については TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling)法により検出を行った。一方で大腿筋に発現させた rhKGF タンパクによる肺への影響を確認するため、内因性の KGF mRNA、KGFR mRNA の発現を in situ hybridization 法にて検討した。肺機能評価として血液ガス分析を用いた。

結 果

- ・ Electroporation 法により遺伝子導入された rhKGF の発現が大腿筋で確認され、肺においても ELISA 法にて rhKGF の存在が確認された。
- ・ PPE 気管内投与により作成した肺気腫モデルマウスに electroporation 法を用いて rhKGF 発現遺伝子を導入した。遺伝子導入後 3 日目に免疫組織化学にて肺上皮細胞における KGF、SP-A、PCNA の有意な発現増強を認めた。PCNA 陽性細胞では SP-A や KGFR の共発現を認めた。
- ・ rhKGF は apoptosis 細胞数の変化に影響を与えなかった。
- ・ 大腿筋に異所性に発現させた rhKGF により肺での KGF mRNA、KGFR mRNA の発現が亢進した。
- ・ 肺機能評価として PPE 投与後 14 日目における動脈血酸素分圧測定を施行した。p-FLAG 遺伝子導入マウスでは正常マウスと比較して有意に酸素分圧が低下したのに対して pKGF-FLAG 遺伝子導入マウスでは動脈血酸素分圧の減少を抑制することができた。

考 察

本研究では肺気腫マウスモデルに対し electroporation 法にて大腿筋への KGF 発現遺伝子導入を行うことにより、肺上皮細胞の SP-A 発現増加、細胞増殖の促進、および動脈血酸素分圧の減少抑制効果がみられた。導入した rhKGF が直接肺上皮細胞に影響を与えたことに加え、肺での内因性 KGF また KGFR の発現亢進を促した可能性が示唆されたことは興味深い結果であった。骨格筋への electroporation 法による遺伝子導入は簡便な方法であり、肺気腫の急性増悪を抑制する治療法の発展に寄与し得ると考えられた。