

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15483

研究課題名(和文) 肝臓グラフトへの移植前siRNA導入による肝炎ウイルス再感染予防法の開発

研究課題名(英文) Development of novel siRNA therapy to prevent hepatitis recurrence after the transplant by graft conditioning outside the body

研究代表者

武富 紹信 (Taketomi, Akinobu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70363364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝炎ウイルスの取り込みに関わるタンパク質の発現を移植後に一過性に抑制し、肝炎再発を抑制する方法を確立するために、グラフトへのsiRNA導入法を模索した。まず、1) 低侵襲のマウス同所性肝移植モデル、2) マウス肝臓の酸素化体外灌流モデルを作成した。3) 凝固第 7 因子siRNAをマウスに投与後に肝臓を摘出し、別のマウスに移植した。移植後72時間まで第 7 因子の発現が抑制された。体外灌流時のsiRNA治療は、25℃灌流では強い効果を示したが4℃では無効であった。本治療により移植後のグラフトにおける標的タンパク質の発現を抑制できた。標的遺伝子の発現抑制を同様に検証することで新規治療の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：We explored a novel graft conditioning method based on siRNA gene silencing with an aim of preventing recurrence of viral hepatitis after orthotopic liver transplantation (OLT).

We established 1) mouse OLT model, 2) graft perfusion machine and method for mouse livers, 3) donor pre-conditioning method using siRNA, and 4) graft conditioning method by extracorporeal administration of siRNA. Donor pre-conditioning with siRNA targeting coagulation factor 7 inhibited the gene expression in the recipient body up to 72 hours after OLT when the procurement was performed 2 hours or longer after siRNA administration to the donor. Extracorporeal siRNA treatment showed strong attenuated effect in machine perfusion at 25℃ but ineffective at 4℃. Therefore, machine perfusion at 37℃ seemed to be necessary to achieve the siRNA treatment. Here, we obtained the proof of concept that pre-transplant graft conditioning with siRNA is a therapeutic method against post-OLT recurrence of viral hepatitis.

研究分野：肝臓外科

キーワード：肝臓癌 外科 肝移植 臓器灌流 肝炎

1. 研究開始当初の背景

本邦では、成人肝移植症例のうち HBV 陽性症例が約 20% を占めている。移植後抗ウイルス治療の進歩により B 型肝炎の再燃は予防可能となったが、再感染率は依然高く、HBIG の長期投与にかかる医療コストは世界的にも問題となっている。すなわち肝炎ウイルスの再感染を防ぐことは肝移植における重要な課題の一つである。

McCaffrey らは、培養細胞およびマウス肝臓に HBV のゲノム配列を標的とする shRNA を導入することで、RNA 干渉作用により HBV の増殖が抑制される事を示した (McCaffrey AP et al. *Nat Biotechnol* 2003)。また、最近 sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) が HBV レセプターであるとの注目すべき研究成果が報告され、HBV 感染過程の分子基盤についての研究が加速している (Yan H et al. *Elife* 2012. Ni Y et al. *Gastroenterology* 2014.)

2. 研究の目的

肝移植において、肝グラフトへのヒト B 型肝炎ウイルス(HBV)の再感染予防は重要な課題の一つである。本研究の目的は、HBV ゲノムおよび HBV レセプターをターゲットとした siRNA を移植前のグラフトに導入し、肝グラフトの HBV 再感染抵抗性を獲得させる新規治療法の開発である。まず、目的達成のために必要な 1) マウス肝移植モデル、2) 遺伝子導入に依らない肝臓内遺伝子(タンパク質) 発現制御の至適条件、3) 治療効果の判定法を確立し、4) 最終的に HBV 持続感染マウスにおける NTCP 発現阻害の有効性検証を目指すものである。

3. 研究の方法

【マウス肝移植モデルの確立】

最終的にはドナー、レシピエントともに重度免疫不全肝障害マウス (uPA/SCID マウス) にヒト肝細胞を移植した PXB マウス (Phoenix Bio) を使用したマウス肝移植モデルの構築を目指す。PXB マウスは侵襲に弱いため、まず正常マウスの肝移植手術を改良し、低侵襲の術式を確立した。

ドナー手術: 吸入麻酔下に陰茎静脈よりヘパリンを投与し、固有肝動脈の切離、総胆管へのステント挿入の後、冷温乳酸リンゲル液にて大動脈、門脈から灌流し脱血し、グラフトを摘出した。

レシピエント手術: 吸入麻酔下に肝臓を摘出し、グラフトを挿入した。肝上部下大静脈を縫合し、門脈、肝下部下大静脈をカフ法により吻合し再灌流した。胆管はステント法により再建した。

【siRNA 投与によるマウス in vivo でのタンパク質発現制御の条件検討】

最終的には HBV 持続感染レシピエントマウスに対し、ドナー体内で治療用 siRNA を in vivo 導入した肝臓グラフトを移植し、HBV 感染の阻害法を確立するために、まず肝臓への siRNA の導入法を検討した。

ドナーマウスに Invivofectamine2.0 を導入試薬として治療用 siRNA を陰茎静脈より投与し、1~48 時間後に肝臓を摘出し、同系のレシピエントマウスに同所性肝移植を行った。siRNA 導入の効果判定は、肝臓に恒常的に発現する凝固第 Ⅲ 因子を標的とし、血液中の凝固第 Ⅲ 因子の推移で評価した。

【体外灌流による肝臓グラフト内のタンパク質発現の制御：至適条件の探索】

ドナーの体内で siRNA の効果が確認されたら、より安全性が高い方法を探索する必要がある。siRNA をドナーに投与する場合には、異物反応や off target 効果のリスクや、長期の安全性は未確認である。臓器移植において傷みやすいグラフトを体外で酸素化機械灌流して修復する方法が実用化しつつある。世界で治験が始まったものの、ゴールドスタンダードとなる方法は確立されていない。また、体外灌流中に siRNA をグラフトに導入する試みは報告されていない。

目的とする NTCP の発現抑制のための siRNA 導入の前に、まず、マウス肝臓を傷害させることなく灌流できる装置を開発し、本用途に使用できるように温度、流量、灌流液の至適条件を検討し、さらに治療用 siRNA 導入が可能かを検証した。

【37 での至適灌流条件の探索】

ラットの単離肝灌流モデル (Isolated Perfused Rat Liver; IPRL) を用いて、37 での至適灌流条件を検討した。酸素分圧、CO₂ 分圧、pH、流量等を変化させ、門脈抵抗、胆汁産生量、酸素消費率をモニタリングした。

4. 研究成果

【マウス肝移植モデルの確立】

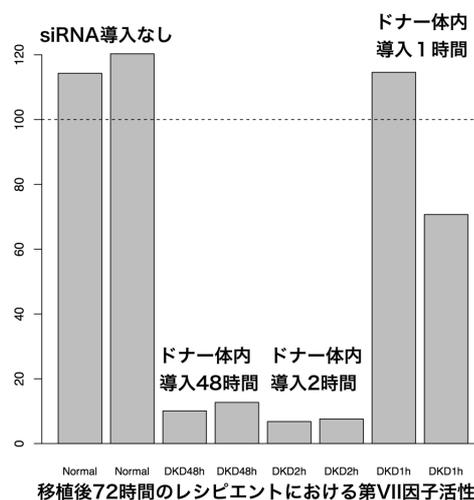
C57BL6/J を用いた同系移植において、無保存群ではほぼ全例が生存するモデルが確立された。また、グラフト肝を Williams' E Medium を用いて 60~120 分、酸素化体外灌流した後、肝移植をしても肝グラフトが生着することを確認した。これらの結果は、侵襲を極小化した移植モデルであることを示しており、ストレス許容域が狭い重症免疫不全マウスでのモデル作成の可能性が期待できるモデルと考えられた。

【siRNA 投与によるマウス in vivo でのタンパク質発現制御の条件検討】

siRNA の in vivo 投与により肝臓内のタンパク質発現を抑制できることの Proof of Concept (POC) 取得のために、肝臓で恒常的に発現する血液凝固第 Ⅶ 因子の siRNA を投与し、48 時間後に摘出した肝臓グラフトをレシピエントマウスに移植した。72 時間後のレシピエントマウスの血液中の凝固第 Ⅶ 因子活性を測定すると、siRNA 投与マウスから摘出した肝グラフトを移植したマウスでは、正常マウスの第 Ⅶ 因子活性に比較し約 10% 程度に抑制された。siRNA 投与から摘出までの時間を 1, 2, 48 時間に変化させると、2, 48 時間のグラフトを移植した場合には移植後の第 Ⅶ 因子活性が抑制されたが、1 時間で摘出したグラフトでは十分に抑制されなかった。

これらの結果から、siRNA 治療の効果を発揮させるためには、正常に代謝される条件下で 2 時間以上を要することが示された。このことは、正常を模倣する酸素化体外灌流が実現すれば、グラフト内のタンパク質の発現を調節できる可能性を示唆している。

HBV 感染レシピエントの治療を考慮すると、HBV の複製の場となる感染肝細胞 (肝臓) が摘出された後の 72 時間程度まで NTCP (HBV レセプター) の発現が抑制されるのであれば、術前後の血漿交換や抗 B 型肝炎免疫グロブリンの投与などを費用して血中のウィルス力価を低減させる治療を併用すれば、グラフトの肝細胞への HBV 感染を抑制できる可能性が期待された。(現在 NTCP の発現抑制が可能かを検証する準備をしている)



【体外灌流による肝臓グラフト内のタンパク質発現の制御：至適条件の探索】

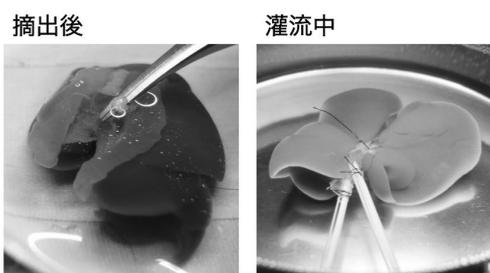
我々が開発したマウス肝臓用体外灌流装置はグラフトに流入路カテーテルと流出路カテーテルを挿入し、リザーバーを含む半閉鎖型灌流回路を形成している。気液コンタクターにより酸素化灌流が可能であり、グラフト保存容器と灌流回路は温度制御される。本装置によりマウス肝臓を任意の温度で長時間酸素化灌流することが可能になった。また、半閉鎖型回路での灌流は灌流液量を最少化でき、siRNA の体外導入には有効と考えられた。

実際、Williams'E 培養液を灌流液とし、第 Ⅶ 因子 siRNA と Invivofectamine2.0 の混合物を添加して、8~25 で 60~120 分間酸素化灌流を実施した。ドナー投与の場合と同様に肝移植後の血中第 Ⅶ 因子活性を評価すると、4 (冷温) での体外灌流では siRNA による第 Ⅶ 因子の発現阻害は認められな

った。25（非冷温；sub-normothermic perfusion）では、著明な抑制効果を認めた。

これらの結果から、肝グラフトに対する体外灌流中の siRNA 投与は 25 以上での灌流が必要であり、望ましくは 37 での酸素化灌流での検討が必要と考えられた。

実際に NTCP を標的とした治療や、ヒトキメラマウス肝を用いた検討を行う前に、siRNA の体外導入の至適化が必要と考えられた。



体外機械灌流



【37 での至適灌流条件の探索】

細胞のエネルギー需要は 10 の降下毎に 1/2 ずつ低下するので、27 では赤血球不含液でも pO_2 500 mmHg, 1.5 ml/min/g 程度で十分であった。しかし、37 になると 3 ml/min/g 以上の流量を要し、2 時間以上の灌流ではシアストレスによって内皮細胞が剥脱し、次第に門脈抵抗が上昇した。2 ml/min/g に減量すると酸素消費率、胆汁産生量が減少した。

2 ml/min/g を固定し、 pO_2 650 mmHg 以上として酸素供給の増加を図ると、門脈抵抗が迅速に上昇し、酸素消費率、胆汁産生量は寧ろ低下した。また、高流量では CO_2 分圧が著明に低下し、炭酸を主なバッファーとする液では急速なアルカリ化が惹起され、門脈圧上昇、酸素消費率低下、胆汁産生量低下が観察された。実際、炭酸ガスでバブリングし

pCO_2 を 30-35 mmHg に保つと pH は 7.35 ± 0.05 に保たれ、門脈抵抗が速やかに低下した。

これらの結果から、37 で 2 時間以上の酸素化灌流を行うためには、 pO_2 , pCO_2 , pH をモニタリングし、必要に応じて CO_2 バブリングにより迅速に pH を維持することが重要と考えられた。また、Perfluorocarbon、希釈血液、人工赤血球などの酸素担体が必要と考えられた。

そこで、10%量の血液を混合して酸素化灌流を行った。血液は酸素化ユニットにより十分に酸素化され、流量は 1-1.5 ml/min/g で十分な酸素供給が可能であったが、灌流時間とともに液の混濁が増強し、門脈圧が次第に増強した。ローラーポンプによる赤血球の破壊が原因と推測され、ポンプユニットの抜本的な改良が必要と考えられた。

【まとめ】

低侵襲のマウス同所性肝移植モデル、マウス肝臓の酸素化体外灌流モデルを作成した。血液凝固第 因子 siRNA の in vivo 投与により、肝移植後に肝グラフトで発現する第 因子を移植後 72 時間まで抑制できることを確認し、siRNA 治療の POC を取得した。体外灌流時の siRNA 投与の検討では、in vivo 投与で得られた効果と比較し、4 灌流では無効、15-25 灌流では軽度の抑制効果が得られたものの、37 での灌流が必要と考えられた。37 灌流の条件検討では、酸素担体を使用することにより流速を低下させる必要があると考えられた。希釈血液を用いた 37 灌流は長時間の灌流により赤血球の破壊に伴う灌流液の混濁がグラフトを傷害することが懸念された。

今後、希釈血液を用いることを念頭に装置の改良を行い、体外灌流による siRNA 治療の至適条件を確立し、NTCP 発現抑制の有効性を検証する必要があると考えられた。

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 7 件)

1. Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Doi H, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K,

- Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aoki Y, Fukai M, **Taketomi A**, Mizokami M, Kanto T. Pro-angiogenic TIE-2-expressing monocytes/TEMs as a biomarker of the effect of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2017 Sep 1;141(5):1011-1017. 査読有
2. Ohata T, Yokoo H, Kamiyama T, Fukai M, Aiyama T, Hatanaka Y, Hatanaka K, Wakayama K, Orimo T, Kakisaka T, Kobayashi N, Matsuno Y, **Taketomi A**. Fatty acid-binding protein 5 function in hepatocellular carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Med*. 2017 May;6(5):1049-1061. 査読有
 3. Shimada S, Wakayama K, Fukai M, Shimamura T, Ishikawa T, Fukumori D, Shibata M, Yamashita K, Kimura T, Todo S, Ohsawa I, **Taketomi A**. Hydrogen gas ameliorates hepatic reperfusion injury after prolonged cold preservation in isolated perfused rat liver. *Artif Organs*. 2016 Dec;40(12):1128-1136. 査読有
 4. Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aikata H, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Nozaki Y, Kawaguchi T, Torimura T, Abe M, Hiasa Y, Fukai M, Kamiyama T, **Taketomi A**, Mizokami M, Kanto T. Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2016 Jul 1;6:28814. 査読有
 5. Fukai M, Kobayashi N, Ishikawa T, Wakayama K, Shimada S, Umemoto K, Ohtani S, Fujiyoshi M, Yamashita K, Shimamura T, **Taketomi A**. 14-3-3ζ-mediated stimulation of oxidative phosphorylation exacerbates oxidative damage under hypothermic oxygenated conditions in human renal tubular cells (HK-2). *Transplant Proc*. 2016 May;48(4):1288-91. 査読有
 6. Morita K, Shirabe K, **Taketomi A**, Soejima Y, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Yamashita Y, Sugimachi K, Harimoto N, Itoh S, Ikeda T, Maehara Y. Relevance of microRNA-18a and microRNA-199a-5p to hepatocellular carcinoma recurrence after living donor liver transplantation. *Liver Transpl*. 2016 May;22(5):665-76. 査読有
 7. Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, **Taketomi A**, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Sci Rep*. 2016 Apr 19;6:24767. 査読有
- [学会発表](計6件)
1. 深井原, 島田慎吾, 梅本浩平, 中藪拓哉, 柴田賢吾, 早坂孝宏, 鈴木崇史, 大谷晋太郎, 橋本咲月, 三野和宏, 嶋村剛, **武重紹信**: 「臓器灌流時のコンディショニング法の探索」第44回日本臓器保存生物医学学会学術集会、大阪、2017年11月11日
 2. **武重紹信**: 「非B非C肝癌の実態と対策」JDDW2017(第21回日本肝臓学会大会および第15回日本消化器外科学会大会)特別発言、福岡、2017年10月13日)
 3. **武重紹信**、藤好直: 「肝細胞癌切除症例におけるWFA-M2BP測定の意義」第117回日本外科学会定期学術集会(招待講演)、横浜、2017年4月28日
 4. **Akinobu Taketomi**. “Current surgical treatment for hepatocellular carcinoma in Japan.” 4th International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology (FACO). Invited Lecture. September 22th, 2016. Xiamen, China.
 5. **Akinobu Taketomi**. “Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in Japan.” 7th Japanese-Mongolian International Joint Symposium on Surgical Treatment of Digestive Tract Cancers. Invited Lecture. August 27th, 2016. Ulaanbaatar, Mongolia.
 6. **Akinobu Taketomi**, Yousuke Tsuruga, Shingo Shimada, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Hideki Yokoo, Hirofumi Kamachi, Toshiya Kamiyama. “Operative planning for major hepatectomy to prevent liver failure.” The 28th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery July 2nd, 2016. Osaka, Japan.
- [図書](計0件)
- [産業財産権]

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武富 紹信 (TAKETOMI, Akinobu)
北海道大学・医学研究院・教授
研究者番号：70363364

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

横尾 英樹 (YOKOO, Hideki)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：70399947

後藤 了一 (GOTO, Ryoichi)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：10645287

(4) 研究協力者

藤好 真人 (FUJIYOSHI, Masato)