

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～H2009

課題番号：19790492

研究課題名(和文) 特発性門脈圧亢進症の病態解析

研究課題名(英文) Analysis of idiopathic portal hypertension

研究代表者

川村 悦史 (Kawamura Etsushi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・後期臨床研究医

研究者番号：60419710

研究成果の概要(和文)：human connective tissue growth factor(CTGF)の cDNA をコスミドベクターの E1 領域に導入することにより CTGF 組み換えアデノウイルス(adeno-CTGF)を作成した。7 週齢 Wister 系雄性ラットに adeno-CTGF および大腸菌の $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入したコントロール用アデノウイルスベクターを静注し、経時的に肝組織を採取した。CTGF は投与 3 日目に肝に発現していたが 7 日目には認められず、肝での発現は一過性であった。肝組織を用いた GeneChip による網羅的遺伝子発現の解析では線維化に関する遺伝子発現は 3 日目、7 日目共に亢進していた。

研究成果の概要(英文)：We introduced human connective tissue growth factor (CTGF) cDNA into the E1 region of cosmid vectors in order to create recombinant adenovirus CTGF (adeno-CTGF). Control adenovirus vectors into which adeno-CTGF and *Escherichia coli* beta-galactosidase genes were introduced were intravenously injected into 7-week-old male Wister rats, and their hepatic tissues were harvested 3 and 7 days later. CTGF was expressed in the liver 3 days after the administration, but its expression was not observed 7 days after the administration. A comprehensive analysis of gene expression by GeneChip using hepatic tissue showed that gene expression in fibrosis had been increased both 3 and 7 days later.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	32,000,000	570,000	3,770,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：肝臓病学

キーワード：CTGF、特発性門脈圧亢進症、動物モデル、組み換えアデノウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

特発性門脈圧亢進症(IPH)は脾腫、貧血、門脈圧亢進を特徴とする原因不明の疾患である。本疾患は中年女性に好発することや人種として東洋人、特に日本、インド、イラク

人に多いことより、その原因として免疫異常や遺伝子異常が示唆されている。本疾患の病態解明には特異的に発現する遺伝子やタンパクを解明することが重要とされている。

## 2. 研究の目的

我が国における IPH 患者の年間有病者数は約 1,500 人と推定されている。本疾患は原因不明のため有効な治療法がなく、脾腫や門脈圧亢進症に由来する病変の対症療法が行われるのみである。本疾患の発症機序として V $\beta$ 9 陽性 T 細胞の活性化や hemoxygenase(OH)-1 の関与などが報告されているが、いずれも IPH の発症と明確な関係があるという確証は得られていない。我々は IPH と健常者の肝組織を用いて、cDNA マイクロアレイ法により数種類の IPH 肝に特異的に発現する遺伝子群をピックアップし、その中で特に connective tissue growth factor(CTGF)に注目し検討を行ってきた。我々の施設にある検体保存センターの IPH 症例 125 例の血清を用い、ELISA 法にて測定した CTGF 値は健常コントロールや C 型慢性肝疾患患者に比べ異常高値を示す症例が存在した。さらに、IPH の肝組織中で in-situ hybridization を用いた mRNA レベルの発現の検討では、IPH の特異的病変である門脈線維化の周辺にシグナルが認められた。

このことは CTGF が IPH の病態と密接な関係にあることが示している。CTGF の機能解析のためにはトランスジェニックマウスの作成が必要となる。しかし、CTGF を用いた胚移植によるトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成は発育・継代が困難であることがすでに報告されている。そのため本疾患の動物モデルの作成にはアデノウイルスを用いた遺伝子導入法にて行う必要がある。

以上より、今回我々が検討する事項は以下の 2 点である。1)CTGF の機能解析および治療法の確立のため CTGF 遺伝子導入法による動物モデルの作成、2)動物モデルに対しプロテインチップシステムを用いることによる IPH に特異的な遺伝子の検索。

## 3. 研究の方法

**(1) CTGF 組み換えアデノウイルスの作成：**アデノウイルスへの遺伝子導入は Adenovirus Expression Vector Kit (Takara Biochemical) を用いて行った。human CTGF の mRNA から cDNA を作製し、コスミドベクターの E1 領域に導入する。E1 領域を制限酵素で切断し欠失させたアデノウイルスのゲノム DNA (DNA-TPC)とこのコスミドベクターを E1 を恒常的に発現している 293 細胞に co-transfection により導入する。293 細胞内で相同組み換えが起こり、組換えアデノウイルスが出現する。アデノウイルスは主として肝臓、神経に集まるため、これを調整、増殖させ動物に感染させることにより、目的の臓

器(肝臓)に CTGF を発現させることができる。

**(2) CTGF 遺伝子導入ラット肝組織の検討：**動物として 7 週齢 SPF/VAF 雄性ラット (Wistar 系) を使用した。投与方法としてアデノウイルスベクター単独での効果を調べるため、CTGF 組み換えアデノウイルスベクター (adeno-CTGF) および大腸菌の  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入したコントロール用アデノウイルスベクター (adeno-LacZ) を使用した。さらに TGF- $\beta$  および thiacetamide(TAA)との併用効果を調べるため TGF- $\beta$ +adeno-CTGF、TGF- $\beta$ +adeno-LacZ、TAA+adeno-CTGF、TAA+adeno-LacZ の組み合わせにより検討した (図 1)。

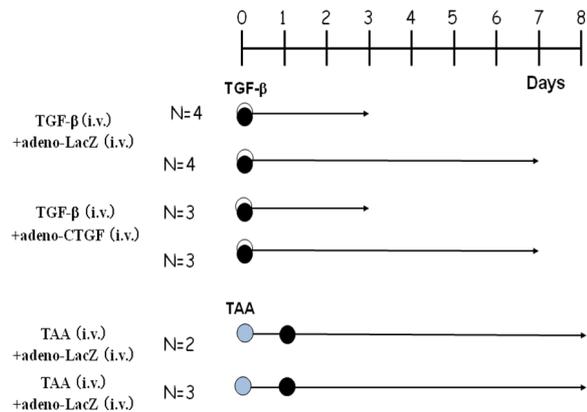


図 1. アデノウイルスベクターの投与方法

CTGF 遺伝子の発現確認をするためラット肝から totalRNA を抽出し、逆転写にて cDNA を作成した。これを PCR 反応にて増幅し、電気泳動にて発現確認をした。Primer F として 5'-CCT GAC GGC GAG GTC ATG-3'、Primer R として 5'-CAT GCC ATG TCT CCG TAC-3' を用いた。

**(3) CTGF 遺伝子導入ラット肝組織における遺伝子発現の検討：**肝臓を凍結状態のまま十分過剰量の Isogen へ浸漬、ポリトロンホモジェナイザーを用いて破碎し、ニッポンジーン社のマニュアルに従って Total RNA を調製した。分光光度計(SmartSpec 3000, BioRad 社)を用いて RNA 濃度を測定し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology 社)を用いた RNA クオリティチェックを行った。この RNA を用いた標準的 1 サイクル法により cDNA を合成し、ビオチン化 cRNA を合成した。これを GeneChip Array (Rat Genome 230 2.0 Array) へハイブリダイゼーションし、GeneChip 3000 Scanner により Array のスキャンを行い、画像データを所得した。GeneChip システムに標準装備されているデータ解析システム“GCOS”を用いて、取得した各サンプルの Array 画像データを数値抽出

可能な形式のファイルへ変換した。取得した GeneChip 数値データから、特定の生物学的現象に関連する遺伝子発現情報を抽出するために“Gene Ontology Database”を用いた。今回、生物学的用語として、extracellular matrix、inflammation、wound healing、cell growth、cell death の Term でデータ検索を試みた(表 1)。

Gene Ontology Database	n
Extracellular Matrix (Fibrosis)	263
Inflammation	91
Wound healing	8
Cell Growth	83
Cell Death	23

表 1. 遺伝子発現情報の抽出

fibrosis については、そのまま合致する term が GO に存在しなかったため、肝繊維化の指標として知られている extracellular matrix (ECM) をその代わりに対応する用語としてデータ検索・抽出に用いた。解析は、網羅的解析および K-means 法で 9 種のクラスターに分類したクラスター解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) CTGF 遺伝子導入ラットの肝機能検査値の検討：アデノウイルスの毒性を調べるため投与 3 日後の血清中 AST 値、ALT 値を測定した。AST 値は PBS 群 73.1±12.7IU/L、adeno-LacZ 群 76.3±20.2IU/L、adeno-CTGF 群 77.5±15.1IU/L であり 3 群間に有意差を認めなかった。ALT 値も同様に PBS 群 19.6±3.8IU/L、adeno-LacZ 群 19.1±5.3IU/L、adeno-CTGF 群 20.5±4.8IU/L であり 3 群間に有意差を認めなかった。

(2) CTGF 遺伝子導入ラット肝組織の CTGF 遺伝子発現および肝組織の検討：ラット肝からの cDNA を PCR 反応にて増幅し、CTGF の肝臓での発現を調べた。

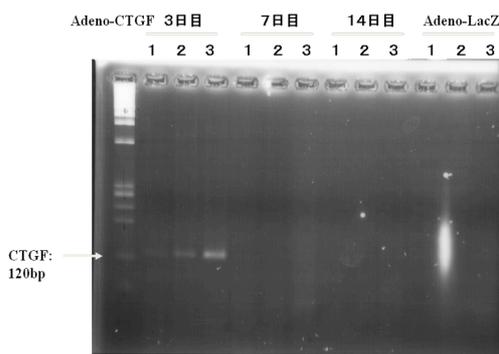


図 3. ラット肝での CTGF 遺伝子発現

adeno-CTGF 投与 3 日目の肝臓には CTGF を示す 120bp の band を認めたが、7 日目、14 日目および adeno-LacZ 投与 3 日目の肝臓では認めなかった(図 3)。

肝組織に関しては adeno-CTGF 単独投与 3 日目、7 日目は著変を認めなかった(図 3)。同様に adeno-CTGF+TGF-β 投与 7 日目、adeno-LacZ+TGF-β 7 日目、adeno-CTGF+TAA 投与 7 日目、adeno-LacZ+TAA 投与 7 日目の肝組織についていずれも著変を認めなかった。

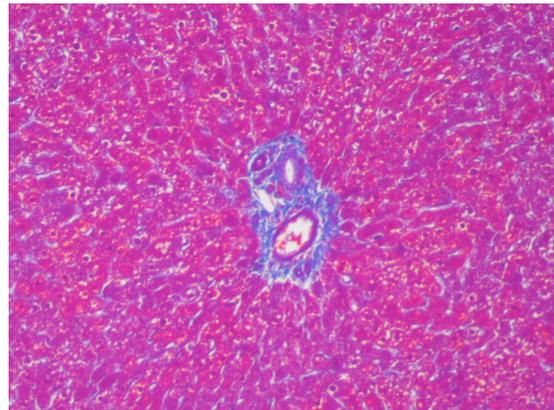


図 4. adenoCTGF 投与 7 日目

#### (3) CTGF 遺伝子導入ラット肝組織における網羅的遺伝子発現の解析：

Adeno-CTGF 投与 3 日目、7 日目の GeneChip 数値データに対し、adeno-LacZ 投与 3 日目をコントロールとして比を求め、1.5 以上を亢進、0.67 以下を減衰とした。inflammation に関する 91 遺伝子の発現は投与 3 日目では多くの遺伝子で亢進していたが、7 日目では減衰していた。extracellular matrix に関する 263 遺伝子の発現は投与 3 日目、7 日目共に多くの遺伝子で亢進していた。wound healing に関する 8 遺伝子、cell growth に関する 83 遺伝子、cell death に関する 23 遺伝子は投与 3 日目、7 日目共に大きな変動を認めなかった。

Day3/c	Day7/c	Gene Title
6.5	12.6	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
10.9	10.9	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
14.2	10.6	Secreted phosphoprotein 1
1.0	10.5	Laminin gamma 3
2.8	10.1	SPARC related modular calcium binding 2
10.0	6.9	Reelin
4.7	6.6	Elastin
5.2	5.8	Collagen triple helix repeat containing 1
0.8	5.3	Collagen, type V, alpha 3
1.1	5.2	Procollagen, type IX, alpha 1
4.6	4.7	Microfibrillar-associated protein 2
3.4	4.4	Laminin, gamma 1
1.5	4.1	Amelogenin X chromosome
0.2	4.0	Matrix metalloproteinase 11

表 2. 3 日目に高発現した線維化関連遺伝子

(4) CTGF遺伝子導入ラット肝組織における遺伝子発現のクラスター解析: CTGFクラスター解析においても、ECM関連遺伝子群は亢進群の中でも7日目に亢進するクラスター内に多く含まれていた。高発現した遺伝子群をみると3日目ではTissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)2、Matrix metalloproteinase (MMP)14、TIMP3、Hyaluronan and proteoglycan link protein 4、Collagen triple helix repeat containing 1、MMP3などが発現していた(表2)。

また、7日目ではTIMP3、TIMP2、Lamina gamma 3、SPARC related modular calcium binding 2、Elastin、Collagen triple helix repeat containing 1、Collagen, type V、Procollagen, type IXなどが発現していた(表3)。

Day3/c	Day7/c	Gene Title
6.5	12.6	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
10.9	10.9	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
14.2	10.6	Secreted phosphoprotein 1
1.0	10.5	Laminin gamma 3
2.8	10.1	SPARC related modular calcium binding 2
10.0	6.9	Reelin
4.7	6.6	Elastin
5.2	5.8	Collagen triple helix repeat containing 1
0.8	5.3	Collagen, type V, alpha 3
1.1	5.2	Procollagen, type IX, alpha 1
4.6	4.7	Microfibrillar-associated protein 2
3.4	4.4	Laminin, gamma 1
1.5	4.1	Amelogenin X chromosome
0.2	4.0	Matrix metalloproteinase 11

表3. 7日目に高発現した線維化関連遺伝子

(5) 考察: 取得したGeneChip数値データから、特定の生物学的現象に関連する遺伝子発現情報を抽出するために”Gene Ontology Database”を用いた。今回、生物学的用語として、fibrosis、Connective Tissue Growth Factor、inflammation、wound healing、cell growth、cell death等のTermでデータ検索を試みた。しかしfibrosisについては、そのまま合致するTermが存在しなかったため、肝繊維化の指標として知られているextracellular matrixをその代わりに対応する用語としてデータ検索に用いた。Connective Tissue Growth Factor (CTGF)に関して対応する遺伝子プローブは、今回使用したGeneChip Arrayには存在しなかったためCTGF関連の遺伝子発現はGeneChipでは検出できなかった。CTGF組み換えアデノウイルスをラットに静注し、経時的に肝組織の検討を行うことにより、CTGFは投与3日目に肝に発現していたが一過性であった。さらに、CTGF組み換えアデノウイルス単独およびTGF- $\beta$ 、thiacetamideとの併用効果を検討したが、いずれの場合も肝組織の変化は軽度であった。しかし、GeneChip解析では線維化に関する遺伝子発現は3日目、7とも日目共に亢進していた。このことより

CTGFの肝臓での発現により一過性の炎症が起こるが、線維化に関する遺伝子発現はその後も持続しており、繰り返し投与することによりIPHモデルの作成可能であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ①塩見進、川村悦史、森川浩安、榎本大、田守昭博、河田則文. 特発性門脈圧亢進症の病因・病態に関する解析と動物モデルの作製. 厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成二十年度研究報告書、無:17-20,2009.
- ②Kawamura E, Habu D, Morikawa H, Enomoto M, Kawabe J, Tamori A, Sakaguchi H, Saeki S, Kawada N, Shiomi S. A randomized pilot trial of oral branched-chain amino acids in early cirrhosis: validation using prognostic markers for pre-liver transplant status. Liver Transpl, 有,15:790-797,2009.
- ③塩見進、川村悦史、森川浩安、田守昭博、羽生大記、河田則文. CTGF組み換えアデノウイルス導入ラットによる肝組織内遺伝子発現の動態とクラスター解析. 厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成十九年度研究報告書、無:25-28,2008.
- ④Kawamura E, Habu D, Ohfuji S, Fukushima W, Enomoto M, Torii K, Kawabe J, Kondo K, Tamoi A, Kawada N, Shiomi S. Clinical role of FDG-PET for HCC: relationship of glucose metabolic indicator to Japan Integrated Staging (JIS) score. Hepato-gastroenterology, 有,55:582-586,2008.
- ⑤塩見進、川村悦史、森川浩安、田守昭博、羽生大記、河田則文. CTGF組み換えアデノウイルス感染ラットにおける肝組織における網羅的遺伝子発現の解析. 厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成十八年度研究報告書、無:19-24,2007.

[学会発表] (計3件)

- ①Kawamura E, Iwai S, Tamori A, Enomoto M, Takeda T, Habu D, Sakaguchi H, Kawada N, Shiomi S, Kawada N. A randomized pilot trial of oral branched-chain amino acids in early liver cirrhosis. 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, 2008年4月23日、Milan (Italy).
- ②Morikawa H, Shiomi S, Kawamura E, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. Induction of fibrotic gene expression by adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the rat liver. Seventh JSH Single Topic Conference, 2008年11月22日、Fukuoka (Japan).
- ③Morikawa H, Tamori A, Kawamura E,

Enomoto M, Takeda T, Habu D, Sakaguchi H, Nishiguchi S, Shiomi S, Kawada N. Induction of fibrotic gene expression by adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the rat liver. United European Gastroenterology Week, 2007年10月28日、Paris (France).

6. 研究組織

(1)研究代表者

川村悦史 (Kawamura Etsushi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・後期臨床  
研究医

研究者番号：60419710

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし