

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790949

研究課題名 (和文) 肝硬変合併肝癌に対する Smad7 遺伝子治療を応用した新規肝切除術の開発

研究課題名 (英文) New gene therapy of Smad7 for hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis

研究代表者

小澤 悟 (OZAWA SATORU)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40433354

研究成果の概要 (和文)：肝切除術は肝硬変合併肝癌に対し有効な治療ではあるが肝硬変による肝機能低下により適応外となることが多い。T $\beta$ TR は線維化進行において中心的な役割を果たす TGF- $\beta$  のシグナル伝達ブロックする作用を有する。本研究において、T $\beta$ TR を発現する遺伝子を肝硬変 10% 肝切除モデルに導入し、治療効果を検討したところ、対照群と比較し肝硬変および生存率の改善を認めた。以上の結果より T $\beta$ TR 遺伝子治療は肝硬変を改善することにより肝切除術適応拡大に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In a cirrhotic liver, the regenerative ability and specific functions are impaired; a hepatic resection increases the possibility of postoperative liver failure. A truncated type II transforming growth factor- $\beta$  receptor (T $\beta$ TR), which specifically inhibits TGF- $\beta$  signaling as a dominant-negative receptor, appears to prevent the progression of liver fibrosis. We demonstrated the therapeutic efficacy of adenovirus-mediated T $\beta$ TR gene transduction after partial hepatectomy for liver cirrhosis. Rats were treated with dimethylnitrosamine for 3 weeks, and they all had severe cirrhosis. After the 10% partial hepatectomy in rats of this model, we injected PBS, AdLacZ, and Ad T $\beta$ TR, into the portal vein, which was followed by an additional 2-week dimethylnitrosamine treatment. On histologic examination, fibrotic tissue had decreased in the livers of the Ad T $\beta$ TR-treated rats compared with rats that were treated by PBS and AdLacZ. Ad T $\beta$ TR treatment improved the survival rate after a partial hepatectomy. Our results suggest that the T $\beta$ TR gene therapy may increase the possibility of hepatectomy in a cirrhotic liver by improving fibrosis, hepatic function, and hepatocyte regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	400,000	120,000	520,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,400,000	270,000	1,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝切除術，肝硬変，肝再生，アデノウイルスベクター，TGF- $\beta$ ，Smad7

1. 研究開始当初の背景

肝臓に対し治癒的切除は長期生存を考えた上では最も有効な治療である。しかし、肝臓の大部分に肝硬変が合併しており、肝予備能不良のため術後肝不全が懸念され切除不能と判断されることが多い。このため、術前に門脈塞栓術（PTPE）を施行し、再生肥大を促し、残存予定肝体積を増加させることにより手術の安全性の向上が図られている。PTPEにより切除可能症例の増加が報告されているが、十分な代償性肥大が得られず肝予備能が安全域に達しないとの判断から肝切除が断念される症例もいまだ数多く存在するのが現状である。このように肝硬変による肝機能障害が肝臓治療の大きな障害となっていることは明らかである。

したがって肝切除術の適応を拡大するため、肝線維化および肝再生の機序を解明し、肝線維化抑制および肝再生に導く遺伝子導入による肝再生促進を肝切除に応用する必要がある。

2. 研究の目的

肝線維化は慢性的な傷害によって過剰に産生されたtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )がDisse腔に存在する肝星細胞に作用し活性化することにより開始されると考えられている。活性化した肝星細胞は筋線維芽様細胞に形態を変化させコラーゲンを主体とする線維成分を産生する。また、TGF- $\beta$ が過剰に産生されることにより肝細胞増殖

および抗線維化作用を示すhepatocyte growth factor (HGF)の発現も抑制される。このような機序により線維化が進行し肝硬変が成立するとされている。

TGF- $\beta$ のシグナル伝達はTGF- $\beta$ が結合したII型受容体がI型受容体と複合体を形成しI型受容体をリン酸化することにより開始される。truncated type II TGF- $\beta$  receptor (T $\beta$  TR)はTGF- $\beta$  II型受容体のキナーゼ部分を欠失させた変異型受容体であり、TGF- $\beta$ のシグナル伝達をブロックする作用を有する。したがって、T $\beta$  TRを過剰に発現するadenovirus expressing T $\beta$  TR (Ad T $\beta$  TR)を肝硬変に導入することにより肝硬変の進行を抑制することができると考えられる。

近年ではTGF- $\beta$ の細胞内シグナル伝達系についても解明が進んでいる。TGF- $\beta$ の細胞内シグナル伝達はSmadと呼ばれる一群のタンパク質群により制御されている。哺乳類ではこれまで8種類のSmadが報告されており、Smad 1～8と名づけられている。8種類のSmadはその構造と機能から3種類に分けることができる。すなわち、I型受容体によって活性化されて、TGF- $\beta$ 、アクチビンとBMPのそれぞれの経路で特異的なシグナルを伝える特異型Smad、すべての経路で共通に用いられる共通型Smad、シグナルに抑制的に作用する抑制型Smadである。TGF- $\beta$ が受容体に結合すると、II型受容体によって活性化されたI型受容体が、細胞内の特異型SmadであるSmad2/3をリン

酸化し、活性化する。活性化した特異型Smadは共通型SmadであるSmad4と複合体を形成し、細胞質から核へ移行する。Smadのヘテロ複合体は核の中で他の転写因子と協調し、標的遺伝子の発現を誘導する。リガンド刺激によって発現誘導された抑制型SmadであるSmad7はI型受容体に直接結合し、特異型Smadのリン酸化を阻害することでTGF- $\beta$ のシグナル伝達を抑制する。

本研究ではadenovirus vectorを用いて、抑制型SmadであるSmad7を発現する遺伝子を肝硬変に導入することにより肝線維化の機序を解明するとともに肝線維化改善効果、肝再生の促進、肝機能の改善を確認し、肝切除の適応拡大に寄与する可能性を実験的に評価することを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1)  $\beta$ -galactosidase 発現 adenovirus vector (AdLacZ), Smad 7 発現 adenovirus vector (Ad Smad 7), ヒト truncated type II TGF- $\beta$  receptor (T $\beta$  TR) 発現 adenovirus vector (AdT $\beta$  TR) の調整

今回、動物固体に Adenovirus vector を直接門脈内投与するため力価の高いウイルス液が必要であり、また培地や血清、すでに発現された目的蛋白質などの混入のない純化されたものが望ましい。このため入手したウイルス液をそのままでは実験に使用せず、十分な力価 ( $1.0 \times 10^9$  pfu / ml 以上, 少なくとも  $1.0 \times 10^8$  pfu / ml 以上) で十分なウイルス液を確保するために以下示す方法にて増殖、精製、濃縮を行う。

まず、ウイルス液 (AdLacZ, AdSmad7, AdT $\beta$  TR) の一部を 293 細胞に感染・増殖させ、得たウイルス液をストックする。

225 cm<sup>3</sup> のコラーゲンコートしたフラスコに 293 細胞を大量培養し、コンフルエントとなったものを 6 つ用意する。培養液を取り除き、ストックしておいたウイルス液 + 5% FCS-DMEM 5 ml を各フラスコに加える。1 時間インキュベーションした後、5% FCS-DMEM 15 ml 加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養する。3~4 日後、変性浮遊した細胞ごと培養液を回収し、無菌的に密閉型ソニケーター 200W 最高出力 2 分 30 秒で細胞を破碎し、ウイルスを遊離させる。3krpm, 4°C で 20 分遠心し、残渣を取り除き上清 (ウイルス液) を 50 ml チューブに回収する。

回収したウイルス液を 2 回 CsCl のステップグラジエントの超遠心をかけて精製濃縮する。P-28S 用クリアチューブに以下の順で重

層し、P-28S ローターで 25krpm, 4°C, 120 分にて第 1 回目超遠心を行う。

4. 0M CsCl/10mM HEPES, pH7.4	10ml
2. 2M CsCl/10mM HEPES, pH7.4	5ml
2×ウイルス液	20ml

ウイルスバンドをキャピラリーまたは、針付きシリンジで回収し、等量の飽和 CsCl を加える。

P-40ST 用クリアチューブに以下の順で重層し、P-40ST ローターで 35krpm, 4°C, 180 分にて第 2 回目超遠心を行う。

ウイルス回収液+飽和 CsCl	4~5ml
4. 0M CsCl/10mM HEPES, pH7.4	2ml
2. 2M CsCl/10mM HEPES, pH7.4	4~3ml

ウイルスバンドをキャピラリーまたは、針付きシリンジで回収し、透析チューブに移し、PBS(-)10%グリセロール 500ml 以上で 1 晩透析した後 1 回の使用量ずつ分注し、ドライアイスで急冷した後 -80°C で保存する。

回収したウイルス液を 2 回 CsCl のステップグラジエントの超遠心をかけて精製濃縮する。

また、ウイルス力価測定を 96 ウェルプレートを用い、簡便力価測定法にて行う。

### (2) 肝硬変モデルにおける治療実験

体重 200-250 g の Sprague-Dawley 系雌性ラットを使用する。1 週間飼育した後、dimethylnitrosamine (DMN) ( $10 \mu$  g / g 体重) を週 3 回連日腹腔内投与 3 週間行い、肝硬変を作成する。

DMN 最終投与後 5 日目にエーテル麻酔下にて上腹部正中切開を行い開腹する。肝硬変が作成されていることを肉眼的に確認した後、門脈本幹を剥離 tapping し、(1) PBS, (2) AdLacZ, (3) AdT $\beta$  TR を各群とし Adenovirus vector を 30G ハミルトン針にて 30 秒以上かけ緩徐に門脈内投与する。投与後 3-0 絹糸にて 2 層に閉腹する。AdLacZ および AdT $\beta$  TR は以前に当研究室にて調整したものを用い、投与量については以前、我々が報告した導入効率がよく、肝機能障害が少ない  $5.0 \times 10^8$  pfu とする。Adenovirus vector 投与後 7 日目より DMN ( $10 \mu$  g / g 体重) を週 3 回連日腹腔内投与 2 週間行い肝硬変を進行させる。3 週目にエーテル麻酔下にて上腹部正中切開にて再開腹し、腹水の貯留の有無など腹腔内を観察した後、下大静脈より 21G 留置針を用い採血を行い、さらに肝摘出も行う。以下の項目について検討し、発現効率および肝機能障害の程度から至適 Adenovirus vector 投与量を決定する。

① 体重、肝重量測定を行い比較検討する。

② 肝の萎縮および肝表面・辺縁の凹凸の程

度など肉眼的に比較検討する。

摘出した肝臓をホルマリン固定した後 Azan-Mallory 染色を行い線維化の程度を病理学的に検討する。また、各標本から 100 倍検鏡で無作為に 5 視野を選択し、Madden らによる肝障害分類 (Surgery 1970;68:260-268) を用い線維化の程度についてグレード化を行い比較検討する。

- ③ HE 染色もを行い、肝細胞壊死、炎症性細胞の浸潤の程度など評価し、肝障害の程度を病理学的に検討する。
- ④ 血清ヒアルロン酸、AST、ALT、アルブミンを測定し肝機能障害の程度を比較検討する

### (3) 肝硬変 70%肝切除モデルに対する治療実験

体重 200-250 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用する。1 週間飼育した後、dimethylnitrosamine(DMN) ( $10 \mu\text{g} / \text{g}$  体重) を週 3 回連日腹腔内投与 3 週間行い、肝硬変を作成する。

DMN 最終投与後 5 日目にエーテル麻酔下にて上腹部正中切開を行い開腹する。肝硬変が作成されていることを肉眼的に確認した後、全肝重量の約 70%に相当する肝葉を灌流する門脈枝をクランプし肝実質とともに 3-0 絹糸にて結紮した後切除する。切除断端からの出血がないことを確認した後 (出血が認められた場合は Adenovirus vector がも漏れる可能性があるため圧迫もしくは結紮止血を行う)、門脈本幹を剥離 taping し、(1)PBS, (2)AdLacZ, (3)AdSmad7 を各群(各 n=10)とし Adenovirus vector ( $1.0 \times 10^9$ pfu) を 30G ハミルトン針にて 30 秒以上かけ緩徐に門脈内投与する。投与後 3-0 絹糸にて 2 層に閉腹する。肝切除および Adenovirus vector 投与後 7 日目より DMN ( $10 \mu\text{g} / \text{g}$  体重) を週 3 回連日腹腔内投与 2 週間行い肝硬変を進行させる。3 週目にエーテル麻酔下にて上腹部正中切開にて再開腹し、腹水の貯留の有無など腹腔内を観察した後、下大静脈より 21G 留置針を用い採血を行い、さらに肝摘出も行う。

治療効果は以下の項目について各群比較検討する。

- ① 体重、肝重量測定を行い比較検討する。
- ② 肝の萎縮および肝表面・辺縁の凹凸の程度など肉眼的に比較検討する。
- ③ 摘出した肝臓をホルマリン固定した後

Azan-Mallory 染色を行い線維化の程度を病理学的に検討する。また、各標本から 100 倍検鏡で無作為に 5 視野を選択し、Madden らによる肝障害分類 (Surgery 1970;68:260-268) を用い線維化の程度についてグレード化を行い比較検討する。

- ④ HE 染色もを行い、肝細胞壊死、炎症性細胞の浸潤の程度など評価し、肝障害の程度を病理学的に検討する。
- ⑤ 血清ヒアルロン酸、AST、ALT、アルブミンを測定し肝機能障害の程度を比較検討する。

### (4) 肝硬変 70%肝切除モデルに対する治療実験における生存率の検討

実験Ⅲと同様にして、肝硬変 70%肝切除モデルを作成し、(1)PBS, (2)AdLacZ, (3)AdSmad7 を各群(各 n=10)とし実験 I で決定した投与量にしたがって Adenovirus vector を 30G ハミルトン針にて 30 秒以上かけ緩徐に門脈内投与する。肝切除および Adenovirus vector 投与後 7 日目より DMN ( $10 \mu\text{g} / \text{g}$  体重) を週 3 回連日腹腔内投与を長期間行い、生存率について比較検討する。死亡したラットは開腹し、腹腔内の観察を行った後、肝摘出を行い、ホルマリン固定の後 HE 染色および Azan-Mallory 染色を行い病理学的に検討する。

### 4. 研究成果

(1) ウイルス液の調整を行い、ウイルス力価測定を行った結果、AdLacZ, AdT $\beta$ TR において  $1.0 \times 10^9$ pfu /ml 以上の高力価ウイルス液を得ることができた。

(2) 肝硬変モデルにおける治療効果の検討  
まず、DMN3週投与後ラット肝硬変モデルの評価を行った。肉眼所見にて肝表面に凹凸を認め、肝は全体的に萎縮していた。Azan-Mallory染色による病理学的評価にて著明な線維性隔壁を認めた。また、血液検査にて線維化のマーカーであるヒアルロン酸が  $80 \pm 16$  (ng/mL) と DMN投与を行っていないラットと比較し、有意に上昇していた。  
① 体重、肝重量において PBS 群  $244 \pm 10$ (g),  $3.9 \pm 0.1$ (g)、AdLacZ 群  $238 \pm 29$ ,  $3.9 \pm 0.8$  に対し、AdT $\beta$ TR 群  $367 \pm 35$ ,  $9.5 \pm 2.0$  と有意に増加を認めた ( $p < 0.05$ )。また、腹水の有無について有意な差を認めなかった。

②Azan-Mallory 染色による病理組織学的評価にて PBS 群、AdLacZ 群と比較し、AdT $\beta$ TR 群において線維性隔壁が薄く線維化の改善が認められた。

③HE 染色による病理学的評価にて AdT $\beta$ TR 群では出血性壊死及び炎症性細胞浸潤からなる肝組織障害が軽度であった。

④血清ヒアルロン酸値において PBS 群  $1,243 \pm 444(\text{ng/mL})$ 、AdLacZ 群  $843 \pm 297$  に対し、AdT $\beta$ TR 群  $107 \pm 59$  と有意に低値を示し ( $p < 0.05$ )、血清アルブミン値において PBS 群  $3.0 \pm 0.4(\text{g/dL})$ 、AdLacZ 群  $3.0 \pm 0.3$  に対し、AdT $\beta$ TR 群  $3.7 \pm 0.4$  と有意に高値を示し、AdT $\beta$ TR 群で最も肝機能の改善を認めた。

### (3) 肝硬変 70%肝切除モデルに対する治療実験

肝硬変モデルに対し 70%肝切除を施行し、Adenovirus vector 門脈内投与を行った後、DMN を週 3 回連日腹腔内投与 2 週間行った結果、AdT $\beta$ TR 群 (治療群) において半数以上のラットが死亡した。死亡したラットの開腹所見にて著明な肝萎縮を認め、多量の腹水貯留を認めた。また、生存したラットについても著明な体重減少および肝萎縮、腹水貯留を認め、治療効果はみられなかった。今回、作成した肝硬変モデルは線維化が高度で肝機能が不良であるため、70%肝切除には耐術できないと考えられた。したがって、切除量を 10%減少し、治療実験を行ったところ、Azan-Mallory 染色による病理組織学的評価にて AdT $\beta$ TR 群において対照群と比較し線維化の改善を認めた。また、AdT $\beta$ TR 群において生存率の改善を認めた。

我が国では肝硬変合併肝癌が年々増加し、様々な治療が開発、試みられている。肝切除術は有効な治療ではあるが、肝硬変による肝機能低下により技術的には切除可能であっても適応外となることが多い。

近年、国内外において肝硬変に対する遺伝子治療の試みが数多く報告され、良好な結果が得られたものも少なくない。今回、adenovirus vector を用い T $\beta$ TR の遺伝子を肝硬変肝切除モデルに導入し、線維化を抑制した成果は遺伝子工学の手法を外科手術に導入する先駆けとなるものと位置づけられると考える。

今回、AdSmad7 において十分なウイルス量

を得ることができず、その治療効果を本実験系にて検討することができなかったが、AdSmad7a の肝線維化抑制効果については数多く報告があり、今後肝硬変の治療に大いに期待される場所である。また、今後、臨床応用に向け、安全で導入効率のよい遺伝子導入法の開発も必要である。

### 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)

[学会発表] (1) 件

①小澤 悟、肝切除術の適応拡大を目的とした遺伝子治療の基礎的研究、第 69 回日本臨床外科学会、2007. 11. 30、横浜

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 悟 (OZAWA SATORU)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40433354

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：