

機関番号：37104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790517

研究課題名 (和文) 抗線維化遺伝子修飾血管内皮前駆細胞を用いた肝臓再生療法の開発

研究課題名 (英文) Development of liver regeneration therapy using of anti-fibrotic gene-modified endothelial progenitor cells

研究代表者

中村 徹 (TORU NAKAMURA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30341332

研究成果の概要 (和文)：これまで我々は四塩化炭素肝硬変モデルにおいて、血管内皮前駆細胞 (EPC) 移植による肝再生促進と肝硬変の進展阻止、生存率の改善を報告した。さらなる治療効果を目指し、EPC を目的遺伝子のベクターとした HGF 遺伝子導入 EPC による肝再生遺伝子治療の開発を試みた。アザン染色による肝線維化率は、EPC 移植群より HGF 遺伝子導入 EPC 移植群ではさらに低値を示した。Ki67 染色による肝細胞陽性率は、EPC 移植群より HGF 遺伝子導入 EPC 移植群ではさらなる細胞増殖活性を示した。血液生化学的検査値は、EPC 非移植群と比し、EPC 移植群で有意な改善を認めたが、HGF 遺伝子導入 EPC 移植群ではさらなる改善を認めた。HGF 遺伝子導入 EPC 移植によるさらなる治療効果が示された。

研究成果の概要 (英文)：Previously we reported that endothelial progenitor cell (EPC) transplantation could reduce established liver fibrosis and promote hepatic regeneration. In the current study, we investigated the hypothesis that gene transfer can be used to achieve phenotypic modulation of EPCs. Especially, we investigated the effect on regenerative properties of human hepatocyte growth factor (hHGF)-transduced EPCs in cirrhotic rat liver. In AdhHGF-transduced group, the degree of liver fibrosis was suppressed compared to those in AdLacZ-transduced group at 10 weeks after CCl₄ treatment. Ki67-positive hepatocytes in AdhHGF-transduced group were significantly increased. Moreover, serum total protein and albumin levels were significantly higher in AdhHGF-transduced group than those in AdLacZ-transduced group. In conclusion, this enhanced regenerative acceleration of transplanted EPCs by hHGF transfer will provide novel therapeutical strategy for hepatic regeneration in severe cirrhotic liver disease patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：7202

キーワード:血管内皮細胞(EPC), 細胞療法, 肝線維化, 肝硬変症, 肝再生, アデノウイルスベクター, 肝細胞増殖因子(HGF)

1. 研究開始当初の背景

肝硬変症の進展に伴う肝不全による本邦での死者は年間約9,200人にのぼる(平成14年度人口動態統計による)。さらに、B型・C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者の多くは肝細胞癌を発症する。肝細胞癌による年間死亡者数は年々増加し、2002年には約34,000人となっており、肝硬変症に関連した年間死亡者数は約40,000人を超える計算になる。また、肝硬変患者の中には結果的に医療行為によってC型肝炎ウイルスに感染した患者も多く含まれておりこれらの患者に対して十分な対策を講じることは急務と考えられる。しかし、進行した肝硬変症に対する根本的な治療法は肝移植しかなく、その肝移植も慢性的なドナー不足に悩まされ一般的な治療法として普及していない現状がある。

近年、骨髄由来の一部の細胞には血球細胞以外にも様々な種類の細胞に分化する能力が存在することが証明され、これを契機に骨髄由来の細胞を用いた再生療法の基礎的研究が多くの臓器において精力的になされ、その一部はすでに臨床応用もなされている。血管内皮前駆細胞(EPC)は1997年に浅原らによって末梢血中から発見された骨髄由来で将来内皮細胞に分化することを運命づけられた細胞であるが、この細胞は炎症部位や腫瘍部位へ特異的に遊走して血管の形成に関与することが分かっている。

申請者らは、マウス急性肝障害モデルおよびラット肝硬変症モデルにおいてEPCを投与することで肝内の血管形成の促進とEPCの持つ各種増殖因子などにより線維化の抑制、肝

再生の促進、予後の改善が認められたことを明らかにした。EPC投与による肝硬変症治療の有効性が動物実験レベルで明らかにされたわけだが、さらにEPCの遺伝子治療は理想的な応用法と考えられる。虚血部位あるいは障害部位に血管内皮細胞の増殖因子の遺伝子、あるいはその周囲細胞(組織)に対しプラスに作用する遺伝子を導入したEPCを集積させることで、形成中の血管そのものでその増殖因子を発現させることができる。これまでに他の領域での研究であるが、通常の細胞治療よりはるかに少ない量の細胞を用いて投与(治療)したところ、血管新生・血流改善の面で通常をしのぐ治療効果を報告している。

2. 研究の目的

さらなる治療効果を目指し、EPCを目的遺伝子のベクターとした肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子導入EPCによる肝再生遺伝子治療の開発を試みた。HGFは肝細胞の増殖因子として1980年代に発見されたが、その後、強力な内皮細胞増殖作用、血管新生作用をもつことが明らかになっている。さらに、HGFの繰り返し投与あるいはHVJ(センダイウイルス)envelope法を用いた肝臓への遺伝子導入により、肝硬変症の改善作用が示されているばかりでなく、(肝不全患者に対する)ヒトへの臨床応用もされている遺伝子である。

3. 研究の方法

Wistar系雄性ラットにフェノバルビタール水を1週間自由飲水させたのち、腹腔内に

週 2 回 6 週間四塩化炭素 (CCl₄) を投与し肝硬変症を作製した。あらかじめ正常ラット骨髓由来 EPC を培養・採取しておき、以下の 3 群に分けて実験を行った。CCl₄ 投与開始 7 週目より週 1 回のペースで 1) 生食水、2) EPC、3) ヒト HGF (hHGF) プラスミドをアデノウイルスベクターを用いて導入した hHGF 遺伝子導入 EPC を各々合計 4 回尾静脈より投与し、その間も CCl₄ は投与し続け、CCl₄ 投与開始後 71 日目に屠殺した。線維化の評価として Azan 染色, collagen-I, α-SMA, TGF-β に対する抗体を用いた免疫組織化学および血液生化学的検討を行った。肝細胞増殖活性の評価として抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織化学で検討し、生存率を各群間で比較した。

4. 研究成果

Azan 染色による線維化率は EPC 非移植群 (対照群) 10.9 ± 1.7% に対し、EPC 移植群では 5.3 ± 1.0% と有意に低下し、hHGF 遺伝子導入 EPC 移植群ではさらに低値の 4.2 ± 1.4% を示し、肝線維化の進展が阻止された。免疫組織化学でも collagen-I, α-SMA, TGF-β、ともに hHGF 遺伝子導入 EPC 移植群で発現は低下していた。Ki67 染色による肝細胞陽性率では対照群より EPC 移植群では明らかな肝細胞増殖活性を示した。血液生化学的検査値は EPC 移植群で有意な改善を認めたが、hHGF 遺伝子導入 EPC 移植群では、総蛋白、アルブミン値に関してはさらに有意な改善を認めた。生存率を各群間で比較すると、EPC 移植により対照群と比し生存率は有意に向上し (対照群: 40% vs EPC-LacZ 群: 66%)、hHGF 遺伝子導入 EPC 移植群との比較ではさらなる向上を示した (EPC-HGF 群: 75%)。

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Toru Nakamura, et al.、Dose-dependent contribution of human peripheral blood CD34-positive cell transplantation to hepatic regeneration after CCl₄ chronic liver injury、61th Annual Meeting of The American Association For The study of Liver Disease、Oct. 29-Nov. 2, 2010、Boston, MA, USA
- ② 中村徹、鳥村拓司、佐田通夫、健常ヒト末梢血 CD34 陽性細胞を用いた肝再生医療、第 18 回日本消化器関連学会週間 (JDDW)、平成 22 年 10 月 13-16 日、横浜
- ③ Toru Nakamura, et al.、Human peripheral blood CD34-positive cells exhibit increased potency for therapeutic hepatic regeneration in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis model nude rats、15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid、Aug 29-Sep. 1, 2010、Pasadena, California, USA
- ④ 中村徹、血管内皮前駆細胞を用いた肝臓再生療法-基礎研究から臨床研究へ-、第 8 回九州 BMT 研究会、2010 年 2 月 6 日、福岡
- ⑤ 中村徹、鳥村拓司、他 4 名、肝硬変症に対する血管内皮前駆細胞を用いた肝臓再生療法、日本臨床分子形態学術学会、2009 年 9 月 5 日、神戸
- ⑥ 中村徹、血管内皮前駆細胞を用いた肝硬変の治療、第 1 回福岡医学会総会、2009 年 1 月 25 日、福岡
- ⑦ 中村徹、鳥村拓司、他 5 名、血管内皮前駆細胞への HGF 遺伝子導入による肝再生遺伝子治療の試み、第 22 回肝類洞壁細胞研究会 学術集会、2008 年 11 月 29 日、久留米

[図書] (計 1 件)

- ① 中村徹、佐田通夫、アークメディア、肝胆膵 血管内皮前駆細胞を用いた肝臓再生療法、Vol. 57、No. 3、2008、pp. 459-466

[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〕
特記無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 徹 (Nakamura Toru)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：30341332

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：