

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591987

研究課題名(和文) 形質転換を凶った肝前駆細胞移植による肝不全治療法の開発に関する研究

研究課題名(英文) The treatment of liver cirrhosis by transplantation of the hepatic progenitor cells with transformation

研究代表者

水本 雅己 (MIZUMOTO, MASAKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80567868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変治療を目的に、肝硬変の責任分子の一つと考えられるTGF- β に対する阻害物質であるBMP7の発現プラスミドベクターを作成し、CCL4の投与により作成したマウス肝硬変モデルに遺伝子導入した。結果、BMP7遺伝子導入群と対照群の肝硬変の程度をHE染色、Masson-Trichrome染色、コラーゲン1a発現を肝線維化の指標として比較したところ、両群間に差は無く、肝硬変治療におけるBMP7の意義を確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：One of the purpose of this study was to evaluate the effectiveness of BMP7. BMP7 is an inhibitor of TGF- β which is one of the key molecule of liver cirrhosis. We made BMP7 expressing plasmid vector, and performed transfection using a model of liver cirrhosis induced by CCL4. However, the findings of the liver cirrhosis showed by HE staining, Masson Trichrome staining (MT staining), and RT-PCR for collagen 1a gene expression were not different between the group with BMP7 transfection and without BMP7 transfection in the mouse liver cirrhosis model. With these results, we could not show the effectiveness of BMP7 in the treatment of liver cirrhosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、肝臓外科学

キーワード：肝線維化 TGF- β BMP7 肝硬変

1. 研究開始当初の背景：肝前駆細胞の増殖能、多分化能を利用して、形質導入により成熟肝細胞への分化、増殖を誘導し、肝硬変症における肝線維化を抑制することで、肝不全の治療法を新規開発することが本研究の目的である。肝硬変症における肝不全の障害肝から産生される炎症性サイトカインや諸種の因子が、肝前駆細胞を成熟肝細胞ではなく細胆管増生や線維芽細胞などへ分化を異常に誘導することに着眼した。肝不全の治療として肝前駆細胞移植を行うにあたり、移植肝前駆細胞への遺伝子導入により、ドナー肝前駆細胞の肝細胞への分化増殖を誘導し、線維化を抑制することにより、肝硬変環境に適合したテーラーメイド治療の創出をめざすものである。

2. 研究の目的：肝線維化には肝星細胞において TGF による Smad/non-Smad signaling pathway を介する機序が挙げられるが、肝外産生性サイトカインである BMP7 はこのうち Smad signaling pathway に拮抗的に作用することが知られている。

このため、肝硬変症に対して BMP7 を過剰発現させることで肝線維化の抑制作用があるかどうかについて検討した。

また transposon プラスミドベクターは、非ウイルス性ベクターであること、挿入した遺伝子を除去することが可能であることから、遺伝子導入のためのベクターとしては安全性が高いことからプラスミドベクターによる BMP7 遺伝子導入を行うこととした。

3. 研究の方法：

・ BMP7 cDNA の作成(図 1)：

成体マウス肝から、Qiagen 社の RNeasy キットを用いて mRNA を抽出した。

mouse BMP7 full length mRNA 用 PCR プライマー。+
制限酵素サイト (赤字、Xba1/BamH1)

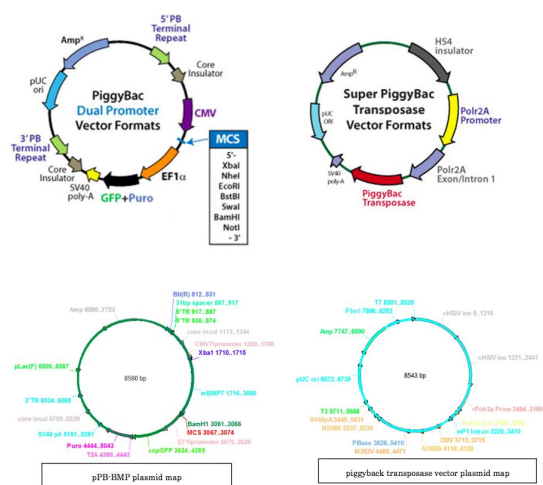
forward GCTCTAGACCCGGATCGCGCTAGAG
reverse CGGGATCCGCAAAGGTCAGGTCTCAG

Product size: 1345,

・ プラスミドベクター：

System Biosciences 社より購入した dual promoter piggybac ベクターのマルチクロニングサイトにマウス BMP7 を insert することにより BMP7 強制発現 piggybac ベクター (以下 piggybac ベクター) を作成した。これは、同社より購入した transposase 発現ベクターと co-transfection することにより、双方がともに導入された細胞内では BMP7 およびマーカー遺伝子である copGFP が piggybac ベクターから切り出されて細胞の染色体にランダムに挿入され強制発現する。

PiggyBac Transposon Vector System (System Biosciences)



・ 遺伝子導入方法 (hydrodynamics 法)：

piggybac ベクターおよび transposase 発現ベクターをマウス体重の 8% の生理食塩水に混じ、27G 針を用いて 5 秒間ほどの時間内にマウス尾静脈へ注入する。

・ 肝線維化モデルマウス：8-12 週齢の雄

C57BL/6 マウスに 1 週間に 2 回の頻度で CC14 の腹腔への反復投与により肝障害を惹起させ、4 週経過後に hydrodynamics 法により遺伝子導入を行う。その後も同様のペースで CC14 を与え、8 週終了時に評価を行うため sacrifice する。

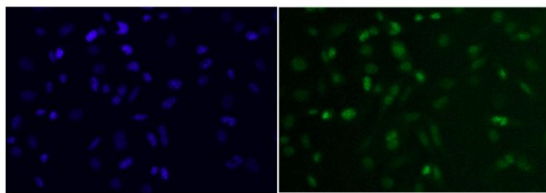
・ 遺伝子導入の評価：piggybac ベクターおよび transposase 発現ベクターを投与量を変え

て遺伝子導入し、72 時間後に非験マウスの肝細胞を 2tsep 灌流法および低速遠心にて回収する。遺伝子導入された細胞は緑色蛍光を発するはずであり、FACS を用いて蛍光細胞の比率を調べ、最適なベクター投与量を検討した。

・肝線維化の評価：CC14 投与 4 週目に遺伝子導入したマウスを導入群、遺伝子導入を行っていないものを非導入群とし、この 2 群間での差異を比較評価する。CC14 投与 8 週目にサクリファイスして肝病理組織切片を作成し、これを HE 染色、Masson-Trichrome 染色 (MT 染色) にて細胞障害の程度および線維化の程度を評価する。また肝組織より mRNA を抽出し、得られた cDNA から RT-PCR によりコラーゲン 1a 遺伝子の発現量を評価する。

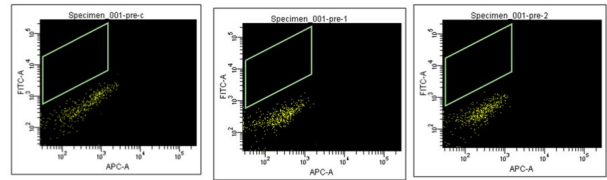
4. 研究成果

・ベクター：マウス BMP7 を dual promotor piggybac ベクターのマルチクローニングサイトに組み込み作成した piggybac ベクターをマウス線維芽細胞にトランスフェクションし、GFP による緑色蛍光を確認した。また免疫蛍光染色 (Anti-BMP7 antibody, abcam) により、遺伝子導入された細胞において BMP7 が発現していることを確認した。



・遺伝子導入 (hydrodynamics 法)：上記方法により piggybac ベクターと transposase 発現ベクターを、計 1.8-27ug、また 2 つのベクターの比率を 1:1-10:1 となるよう条件を変えてマウス尾静脈より同時に注入し、72 時間後に肝細胞を回収して FACS 解析を行った。非導入群をコントロールとして FITC 強度を比較したが、いずれの条件においても導入群で FITC 強度の向上は確認できなかった。またベクター導入後の肝組織において GFP に対

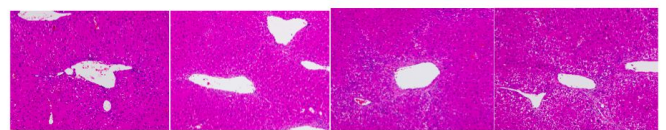
する免疫蛍光染色 (Anti-GFP antibody, CHEMIKON を行ったが確認できず、ベクターが肝組織内に適切に導入されていない可能性が示唆された。



・肝線維化の評価：健常マウス肝と比較し CC14 を 4 週間投与したマウス肝において HE 染色、MT 染色において肝障害および線維化が確認された。これらの変化は CC14 を 8 週間投与後の非導入群においてより顕著であった。

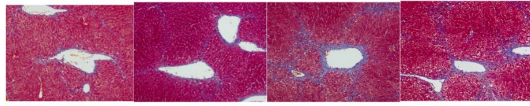
CC14 を 8 週間投与した導入群において、HE 染色および MT 染色所見は非導入群と明らかな差異が見られず同程度の肝障害・肝線維化が起きているものと考えられた。これにより、やはりベクターが肝組織内に適切に導入されていない可能性が示唆された。

HE 染色：順に健常肝、CC14 4 週投与、CC14 8 週投与、CC14 8 週投与+BMP7 遺伝子導入



健常肝組織と比較し、CC14 を 4 週投与した C14-4w 群では細胞の空胞変性が見られ、この変化は CC14 を 8 週投与した C14-8w 群で顕著である。また CC14 の 8 週投与と遺伝子導入を行った CC14-8w+HD 群では C14-8w 群と同様の組織像が見られ、細胞変性の抑制は得られていないと考えられる。

Masson-trichrome 染色：順に健常肝、CC14 4 週投与、CC14 8 週投与、CC14 8 週投与+BMP7 遺伝子導入



健常肝組織と比較し、CC14 を 4 週投与した C14-4w 群では脈管構造周囲に青く染まる弾性繊維の増生が見られ、CC14 を 8 週投与した C14-8w 群ではさらに間質内に広がる線維化の進行が見られる。また CC14 の 8 週投与と遺伝子導入を行った CC14-8w+HD 群では C14-8w 群と同様の組織像が見られ、線維化の抑制は得られていないと考えられる。

考察

研究計画の当初の予定では、BMP7 による肝線維化抑制効果を確認した上で BMP7 遺伝子導入を行うことで形質転換させた肝前駆細胞をマウス肝硬変モデルに細胞移植し、肝再生への効果を検討する予定であったが、今回の実験結果では、BMP7 発現プラスミドベクターの遺伝子導入効率が問題となった。

現段階で BMP7 の肝硬変の肝線維化及び肝再生に対する効果については確認できていない。

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 0 件)

〔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

水本 雅己 (MIZUMOTO Masaki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号：80567868

(2) 研究分担者

石井 隆道 (ISHII Takamichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号：70456789

(3) 連携研究者

森 章 (MORI Akira)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・

講師

研究者番号：60324646