

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19333

研究課題名(和文)マトリックス分解酵素(MMP13)を用いた肝硬変に対する抗線維化治療の開発

研究課題名(英文)Development of gene therapy for liver cirrhosis utilizing MMP13

研究代表者

横尾 健 (Yokoo, Takeshi)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：80750629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：MMP13は肝線維化を改善させる酵素である。肝硬変ラットに対してMMP13遺伝子を導入して過剰発現させることで線維化が改善するかを検証した。ハイドロダイナミック法により硬変肝に十分量の遺伝子導入が達成された結果、線維化刺激を継続しながらMMP13導入を行った群では線維化進展抑制効果が、線維化刺激を終了後にMMP13導入を行った群では線維化改善効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化は高度進行例でなければ、肝内の炎症を鎮めることである程度の改善が期待できる。逆に進行した場合には回復が難しいことが知られており、point of no returnなどと表現される。本研究では、MMP13遺伝子導入の炎症が継続する肝内における線維化抑制効果、また、炎症収束後の肝内における線維化改善効果が示されており、肝硬変診療の新たな治療手段となり得ることを示したものであり、今後の肝硬変診療発展の基盤となり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：MMP13 is one of enzyme, which has the possibility of ameliorating liver fibrosis. We evaluated whether gene therapy using MMP13 could resolve liver cirrhosis of rat. Hydrodynamic gene delivery of MMP13 to the cirrhotic liver showed to suppress progression of liver fibrosis in the rats with continuous stimulation to cause liver inflammation and fibrosis. In addition, the delivery also demonstrated to decrease fibrotic tissue in the rats without the stimulation.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：肝硬変 MMP13 ハイドロダイナミック遺伝子導入法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝線維化治療の重要性

慢性 C 型肝炎における直接作用型抗ウイルス剤や、慢性 B 型肝炎における新規核酸アナログ製剤の登場により慢性肝疾患治療は大きな進歩を遂げ、次なる段階として肝線維化治療が注目されている。根本的治療法が未確立である NASH や、その他の代謝疾患、先天性肝線維症などの線維化進行に対しても、早期からの線維化予防治療や進展例での線維化改善治療の開発が望まれる。肝予備能低下・門脈圧亢進症・肝癌発生に深く関与する肝線維化に対する直接的治療法の開発は重要である。研究協力者である寺井らは自己骨髄細胞投与量法を開発し、先進医療として認可されている。申請者は、肝線維化治療の対象症例は多数に上るため、治療法の選択肢を増やし互いを補完することで、より多くの症例が恩恵を受容できるようにすることが肝要と考える。

(2) matrix metalloproteinase 13 (MMP13)の肝線維化における役割 (図 1)

MMP13はcollagenaseの1つであり、アデノウイルスベクターや化学物質を用いた遺伝子導入により肝線維化の改善が報告されている (Pathobiology 2011;78:239 - 252, Mol Ther 2011;19:355-361)。collagenase としての作用だけでなく、肝再生作用と抗線維化作用を有する HGF や gelatinase である MMP2、MMP9 の発現誘導も確認されており、肝線維化治療のキープクターとなりうる。

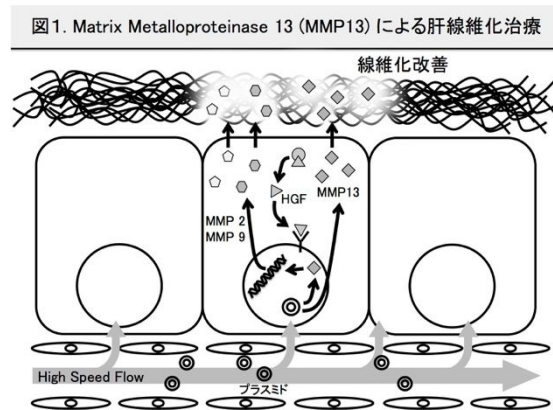


図1. Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13)による肝線維化治療

(3) コンピュータ制御システムによるハイドロダイナミック遺伝子導入法の開発(図2)

申請者らは、肝臓を対象としたハイドロダイナミック遺伝子導入法 (HGD)の研究を行ってきた。本方法は、対象領域に遺伝子溶液を急速注入し、流体力学的な外力のみを利用して遺伝子を細胞内へ送達する。肝細胞の形質を変化させ、肝臓本来の機能を回復または拡張することが可能であり、様々な病態への応用が期待される。臨床応用に際しては、ホストゲノムへの組み込みがないため発癌のリスクが極めて低いこと、特別なキャリアを必要としないため免疫応答のリスクが低く反復治療が可能であることが最大の利点である。申請者らは、遺伝子導入効率と血管内圧の関連性に着目して血管内圧フィードバック機構を備えたコンピュータ制御式 HGD システムを開発し、X線透視下カテーテル手技と組み合わせることにより、大動物への応用を実現した (図 3、Pharmaceutics. 2015 Sep 16;7(3):334-43.)。具体的には、イヌ、非ヒト霊長類(ヒヒ)に加え、正常肝であっても比較的線維量の多いブタにおいても、その有効性を報告した。これらの成果は、『誰もが、どのような患者にも』安全で効率的な HGD を再現性をもって行えることを意味する。また、臨床応用へ向け、申請者が開発したシステムが、医療機器として認可を受けるために必要な改良も施してきた。

図2. コンピュータ制御 HGD システムとその再現性

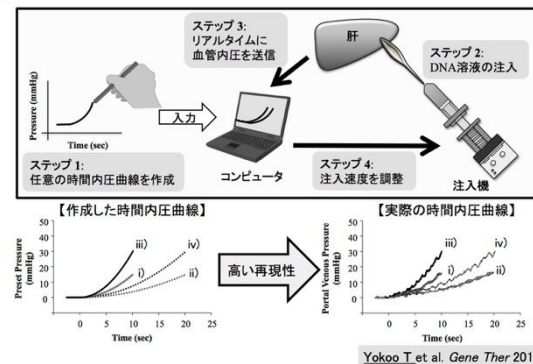
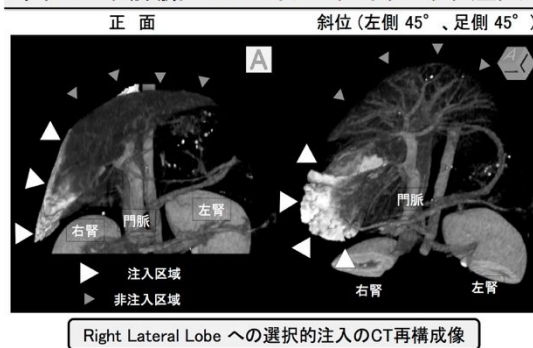


図3. ブタ肝臓へのハイドロダイナミック注入



Yokoo T et al. Pharmaceutics 2015.

(4) ラット肝硬変モデルにおける MMP13 の線維化予防効果と硬変肝への HGD (図 4、5)

申請者は、昨今の線維化治療の重要性と上記 HGD システムの有用性を踏まえ、MMP13 と HGD を利用した線維化治療研究を着想するに至った。既にラット正常肝に対して HGD により MMP13 を導入することで、胆管結紮後の肝線維化予防が可能であることを明らかにした (Mol Ther Nucleic Acids. 2016 Jan 5;5:e276.)。申請者らの使用した MMP13 発現プラスミド

(pBGI-MMP13)は60日間、有効なMMP13血中濃度を維持可能であった。胆管結紮のみのOL群、胆管結紮直前にMMP13遺伝子の導入を行ったML群において10週後の肝組織を比較するとML群の線維組織量はOL群より統計学的に有意に少なく、正常ラット群と同等であった。同時点におけるHGDによるルシフェラーゼ遺伝子の導入実験では、高度の線維化を有するOL群でも有意な遺伝子導入・タンパク発現が確認された。また、ML群は正常ラット群と同等の発現効率であった。

図4. MMP13の肝線維化予防効果

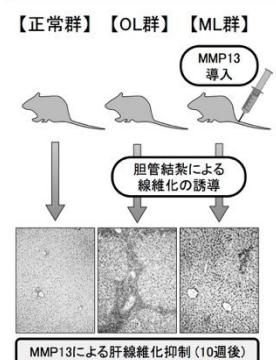
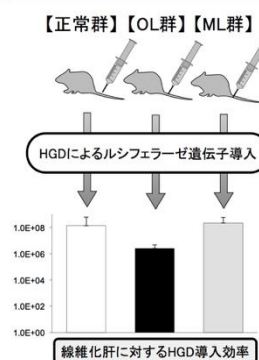


図5. 硬変肝へのHGD



2. 研究の目的

近年の慢性肝疾患診療の進歩は目覚ましく、次なるステップとして肝線維化治療が注目されている。肝線維化は肝予備能低下・門脈圧亢進症・肝発癌に深く関与しており、有効な治療法を確立すべき病態である。原疾患の制御による線維化改善効果は限定的であることから、過剰な細胞外マトリックスを直接的に分解する戦略が必要である。前項のように申請者は、ハイドロダイナミック遺伝子導入法(HGD)を用いて、collagenase作用を有するmatrix metalloproteinase 13 (MMP13)をラットの正常肝に強制発現させ、胆管結紮による肝線維化誘導を予防することに成功した。本研究では、硬変肝をターゲットとしたHGDの有効性と安全性を明らかとし、MMP13強制発現による肝線維化改善効果について肝硬変モデル動物(ラット、イヌ)を用いて検証することを目的とした。

チオアセトアミド(TAA)の反復投与による肝硬変モデル作成では、MMP13遺伝子導入後にTAA投与継続の有無を選択することにより、病勢制御可能な原疾患と困難な原疾患を想定した検証結果を得ることが可能である。本研究では、MMP13の強制発現による『病勢制御可能な原疾患における肝線維化の改善効果』と『制御困難な原疾患における肝線維化の進展抑制効果』に関する検証も行うこととした。

3. 研究の方法

(1) チオアセトアミド(TAA)投与によるラット肝硬変モデルの作成

文献報告(J Hepatol 2002;36:488-493)に基づき、TAA経口投与によりラット肝硬変モデルを作成した。TAAの不足・過剰による不十分な線維化・死亡を回避するため、既報に準じて体重を基準にTAA投与量は適宜調整した。12週間、TAAを内服したラットで血清線維化マーカー、ならびに組織所見の評価を行い、肝線維化の状態を確認した。

(2) 比較対象群の設定(図6)

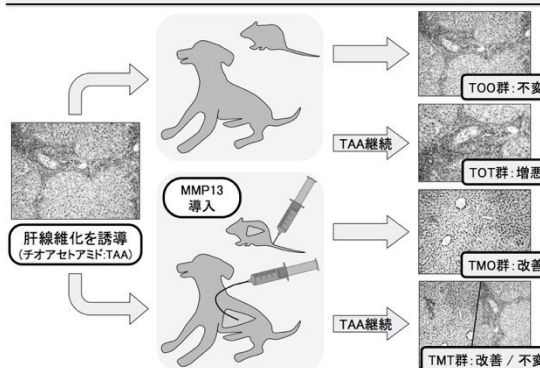
TAAを12週間、経口投与したラットを以下の4群、各5頭に分けた。

- T00群: MMP13導入なし、TAA終了
- TOT群: MMP13導入なし、TAA継続
- TMO群: MMP13導入あり、TAA終了
- TMT群: MMP13導入あり、TAA継続

(3) コンピュータ制御式HGDシステムを用いたハイドロダイナミック遺伝子導入(HGD)

TMO群、TMT群に対しては以下の方法でMMP13遺伝子を導入した。開腹下で下大静脈に2本のカテーテル(注入用、圧フィードバック用)を留置した。目標とする血管内圧上昇は申請者の既報に基づき30 mmHgとした。注入の際は、肝部下大静脈の頭側尾側を一時閉塞した状態として肝特異的な導入とした。

図6. 肝硬変モデル動物によるMMP13の線維化改善効果の検証



(4) 血中のALT、MMP13、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン7Sの経時的評価

TAA投与前、MMP13導入当日・翌日・1週後、4週後に採血を行う予定であったが、ラットの尾静脈からの採血量が当初の予測より制限されてしまった。TAA投与前のデータはコントロールとして用意した個体から得ることとし、一般生化学、ヒアルロン酸をMMP13導入当日、ならびに導入8週後の安楽死の際の血清から測定した。

(5) MMP導入8週後(TAA内服開始から計20週後)の肝線維化評価

MMP導入8週後にラットを安楽死させ、肝組織サンプルを採取した。肉眼所見と組織所見(シリウスレッド染色)、組織中ヒドロキシプロリンの解析により線維化の評価を行った。

(5) イヌ肝硬変モデルでの検証

ラットによる検証により MMP13 の遺伝子導入が肝線維化改善に有効であることが明らかとなった場合に、イヌモデルを用いて HGD による肝区域特異的な遺伝子導入・治療を検証することを計画した。

4. 研究成果

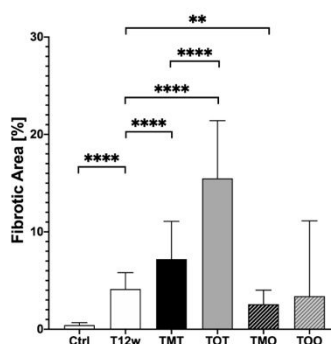
12週間のTAA内服後のラット(T12w)を開腹し、肉眼的に肝硬変を確認できた個体にMMP13遺伝子をコードしたプラスミドをHGDにより肝特異的に導入した。その後閉腹して飼育を継続し、8週後(TAA開始から20週後)に安楽死させ、肝組織を採取し解析を行った。図7は採取した肝組織にシリウスレッド染色を施し、ImageJ™で線維化領域を定量した結果である。

12wのTAA内服で有意に肝線維化が進行していた(Ctrl 0.42% vs T12w 4.13%, $p < 0.0001$)。この後に8wのTAA内服を継続したTMT群・TOT群はさらに線維化が進展した(いずれも $p < 0.0001$)が、TMT群とTOT群を比較するとMMP13を導入したTMT群で有意に線維化進展が軽度であった(TMT 7.20% vs TOT 15.49%, $p < 0.0001$)。TAAによる線維化刺激が継続したラットにおいてMMP13が線維化進行を抑制したと考えられた。次に12週でTAA内服を終了したTMO群・TOO群を比較したところ、MMP13を導入したTMO群で線維化が有意に改善していた(T12w 4.13% vs TMO 2.57%, $p = 0.0062$)。一方でTOO群に変化はなかった(T12w 4.13% vs TOO 3.41%, n.s.)。この結果は、線維化刺激がなくなった状況でMMP13が線維化改善を促進したことを示唆していると考えられた。血清中ヒアルロン酸はT12w(T12w 32.0 ng/mL)と比較してTOT群、TOO群では上昇する傾向(75.2 ng/mL, 73.6 ng/mL)であったが、TMT群、TMO群では低下の傾向(18.4 ng/mL, 10.4 ng/mL)であった。一方でヒドロキシプロリンは一定の傾向を示さなかった。

申請者は、既にラット肝に対する予防的MMP13遺伝子導入が胆管結紮後の線維化進展抑制に有用であることを報告している(Mol Ther Nucleic Acids. 2016 Jan 5;5:e276.)。加えて今回の研究成果からは、ラットの硬変肝に対する肝特異的HGDが可能であること(Mol Ther Nucleic Acids. 2016 Aug 30;5(8):e359.)、ならびに治療域のMMP13発現が肝線維化抑制・改善効果(投稿準備中)をもたらすことが明らかとなった。

ラットにおいて上記のような抗線維化効果が明らかとなったため、臨床応用に向けた大動物モデルでの検証を検討しており、現在は大動物モデルに対する肝区域特異的なHGDの詳細な条件検討を行っている。

図7. MMP13による線維化抑制・改善効果



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Gene Therapy for Pancreatic Diseases: Current Status. Kamimura K, Yokoo T, Terai S. Int J Mol Sci. 2018 Oct 31;19(11). pii: E3415. doi: 10.3390/ijms19113415.

臨床応用可能な肝臓選択的核酸医薬送達法の確立. 上村 顕也, 横尾 健, 寺井 崇二. BIO Clinica (0919-8237)33 巻 1 号 Page34-38(2018.01)

Efficacy and Safety of Pancreas-Targeted Hydrodynamic Gene Delivery in Rats. Ogawa K, Kamimura K, Kobayashi Y, Abe H, Yokoo T, Sakai N, Nagoya T, Sakamaki A, Abe S, Hayashi K, Ikarashi S, Kohisa J, Tsuchida M, Aoyagi Y, Zhang G, Liu D, Terai S. Mol Ther Nucleic Acids. 2017 Dec 15;9:80-88. doi: 10.1016/j.omtn.2017.08.009.

Liver-targeted hydrodynamic gene therapy: Recent advances in the technique. Yokoo T, Kamimura K, Abe H, Kobayashi Y, Kanefuji T, Ogawa K, Goto R, Oda M, Suda T, Terai S. World J Gastroenterol. 2016 Oct 28;22(40):8862-8868.

Effects of Fibrotic Tissue on Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery. Kobayashi Y, Kamimura K, Abe H, Yokoo T, Ogawa K, Shinagawa-Kobayashi Y, Goto R, Inoue R, Ohtsuka M, Miura H, Kanefuji T, Suda T, Tsuchida M, Aoyagi Y, Zhang G, Liu D, Terai S. Mol Ther Nucleic Acids. 2016 Aug 30;5(8):e359. doi: 10.1038/mtna.2016.63.

[学会発表](計2件)

肝硬変合併肝癌への遺伝子治療確立に向けた方法論の検討. 上村 顕也, 横尾 健, 阿部 寛幸, 小林 雄司, 小川 光平, 品川 陽子, 酒井 規裕, 坂牧 僚, 阿部 聡司, 山際 訓, 寺井 崇二. 日本消化器病学会雑誌 (0446-6586)114 巻臨増大会 Page A731(2017.09)

MMP13 遺伝子導入による肝線維化抑制効果. 横尾 健, 上村 顕也, 寺井 崇二. 日本消化器病学会総会. 肝臓 (0451-4203)57 巻 Suppl.1 Page A240(2016.04)

[図書](計1件)

Nucleic Acid-Based Therapy: Development of a Nonviral-Based Delivery Approach. Takeshi Yokoo, Kenya Kamimura, Tsutomu Kanefuji, Takeshi Suda and Shuji Terai. In

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小川 光平

ローマ字氏名：(OGAWA, kohei)

研究協力者氏名：小林(品川) 陽子

ローマ字氏名：(KOBAYASHI-SHINAGAWA, yoko)

研究協力者氏名：上村 顕也

ローマ字氏名：(KAMIMURA, kenya)

研究協力者氏名：大場 芳彦

ローマ字氏名：(OBA, yoshihiko)

研究協力者氏名：吉野 秀義

ローマ字氏名：(YOSHINO, hideyoshi)

研究協力者氏名：大塚 正人

ローマ字氏名：(OTSUKA, masato)

研究協力者氏名：尾田 雅文

ローマ字氏名：(ODA, masafumi)

研究協力者氏名：Dexi Liu

ローマ字氏名：(Dexi Liu)

研究協力者氏名：寺井 崇二

ローマ字氏名：(TERAI, shuji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。