

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006 ～ 2008 年度
 課題番号：18790482
 研究課題名（和文）
 血管内皮前駆細胞を用いたデリバリーシステムによる肝再生促進療法の確立
 研究課題名（英文）
 Growth factor delivering system by endothelial progenitor cells in regenerating liver
 研究代表者
 谷口 英太郎（TANIGUCHI EITARO）
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号：50341318

研究成果の概要：これまでに血管内皮前駆細胞移植が急性肝不全モデルマウスの肝再生を促進し、生存率を改善することを報告してきた。このことは血管内皮前駆細胞移植が劇症肝炎や重症肝炎などの急性肝不全患者の治療法になる可能性を示唆しているものと思われる。しかし、臨床応用するには血管内皮前駆細胞数の絶対的不足が問題となることが予想され、より再生促進能力が高い血管内皮前駆細胞の作製が必要となる。そこで急性肝不全モデルマウスにヒト型肝細胞増殖因子を強発現する血管内皮前駆細胞を移植し、マウスの肝臓の再生が促進し、生存率が改善するかどうか検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,400,000	0	1,400,000
平成 19 年度	1,100,000	0	1,100,000
平成 20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科・消化器（肝臓）

キーワード：血管内皮前駆細胞、肝再生

1. 研究開始当初の背景

血管内皮前駆細胞は骨髄由来の細胞で、血管の再構築に関与する重要な細胞である。これまでに虚血性心疾患や下肢虚血性疾患などの病態を改善するという研究が多数報告されており、現在では日本においてもこれらの疾患患者の治療法の一つとして確立している。

同様に肝再生には血管の再構築が重要と考えられているが、血管内皮前駆細胞と肝再生に関する研究報告は極めて少ない。我々は

初めて血管内皮前駆細胞移植が急性肝不全モデルマウスの肝再生を促進し、生存率を改善させることを報告してきた。以上の結果は、血管内皮前駆細胞移植が劇症肝炎や重症肝炎などの急性肝不全患者の治療法になる可能性を示唆しているものと思われる。

しかし、臨床応用する際、マウスとヒトでは体格が大きく異なるため、大量の血管内皮前駆細胞が必要と予測された。細胞移植を頻回に行い細胞数を確保するという手段も考えられたが、急性の病態を考えると細胞移植を頻回に行うという時間的猶予はないと考

えられた。そこで1回の細胞移植でも十分な効果を発揮できるような工夫が必要と考えられた。

2. 研究の目的

移植する血管内皮前駆細胞数を減らしても十分に肝再生を促進する治療システムを確立させることが今回の研究目的である。

3. 研究の方法

- (1) ヒトの末梢血から濃度勾配法にて単核球分画を分離した。ゼラチンコートした培養皿上に、血管内皮細胞を培養する市販の培養液を用いて血管内皮前駆細胞の培養を行った。培養開始から1週間後に細胞を回収した。
- (2) ヒト型肝細胞増殖因子遺伝子をアデノウイルスベクターに導入し、血管内皮前駆細胞にヒト型肝細胞増殖因子を強発現するように形質転換させた。またリポゾーム法を用いて、同様にヒト型肝細胞増殖因子を強発現するように形質転換させた。ヒト型肝細胞増殖因子遺伝子の導入はRT-PCR法にて確認した。またヒト型肝細胞増殖因子の発現は、抗肝細胞増殖因子抗体を用いて免疫細胞染色およびELISA法にて確認した。遺伝子導入効率を検討するために、ヒト型肝細胞増殖因子遺伝子の代わりにLacZ遺伝子を導入し、x-galで青色に染色し、染色された細胞の比率を検討した。
- (3) 5~6週齢のヌードマウスを使用した。急性肝不全モデルとして、マウスの腹腔内にオリーブオイルで希釈した四塩化炭素(20 μ L/g、10倍希釈)を投与し、急性肝不全を惹起させた。四塩化炭素を投与した翌日に、培養し、細胞増殖因子を強発現するように形質転換させた血管内皮前駆細胞10000個を脾臓から投与した(血管内皮前駆細胞移植群)。またコントロール群として四塩化炭素を投与した翌日に、開腹のみで血管内皮前駆細胞移植を行わないシャム手術を施行した。その後の血管内皮前駆細胞移植群およびコントロール群のマウスの生存率を比較検討した。また各群の肝組織を経時的に採取し、肝組織の変化および肝細胞の増殖を比較検討した。肝組織の変化はHE染色で比較検討した。肝細胞の増殖は肝組織を抗PCNA抗体で染色し、PCNA陽性肝細胞の割合(ラベリングインデックス)で比較した。

4. 研究成果

- (1) 血管内皮前駆細胞を培養するため、ヒトの末梢血より濃度勾配法にて抽出した単核球を血管内皮増殖因子含有の培養液中に混ぜ、ゼラチンコートした培養皿上でこの単核球を培養した。約5~7日程度でブラッドアイランド様の細胞コロニーを形成した。さらに10日頃になると培養皿一面にスピンドル状の細胞が認められるようになった。一部では血管に極めて類似したコード様構造物を形成していた。これまでの報告から、これらの細胞が血管内皮前駆細胞と考えられ、血管内皮前駆細胞の培養に成功した。
- (2) これまでの研究報告から肝細胞増殖因子は肝再生を促進する重要な増殖因子と考えられている。そこで、これまでに使用してきた血管内皮前駆細胞が肝細胞増殖因子を強発現するように形質転換させれば、より肝再生促進能力が高い血管内皮前駆細胞になると考えられる。特に血管内皮前駆細胞は再生肝に取り込まれることから、肝臓内の肝細胞増殖因子は高濃度となり、より効果が高まることを期待される。そこで血管内皮前駆細胞にヒト型肝細胞増殖因子遺伝子を導入するために、供与して頂いたヒト型肝細胞増殖因子遺伝子をアデノウイルスに導入し、ベクターを作製した。また同様にコントロールおよび遺伝子導入の確認のため、ヒト型肝細胞増殖因子遺伝子の代わりにLacZ遺伝子を導入したベクターも作製した。このヒト型肝細胞増殖因子遺伝子を導入したアデノウイルスベクターを血管内皮前駆細胞に感染させ、ヒト型肝細胞増殖因子を強発現するように血管内皮前駆細胞を形質転換させることとした。
- (3) x-gal染色によりLacZ遺伝子の遺伝子導入効率を検討したが、遺伝子導入効率は約30%程度であり、決して良好な遺伝子導入率とはならなかった。また回収される血管内皮前駆細胞そのものの数もアデノウイルスによる細胞障害により減少している傾向があった(マウスに投与する血管内皮前駆細胞の数を少なくするのが今回の研究目的のひとつでもあったので、あまり問題にはならなかった)。
- (4) より高い遺伝子導入効率を目指すため、遺伝子導入方法をリポゾーム法に

変更し、x-gal 染色により LacZ 遺伝子の遺伝子導入効率を再検討してみたが、アデノウイルスベクターを用いた方法より遺伝子導入効率が上回ることはなく、むしろ導入効率は低い傾向であった。そのためヒト型肝細胞増殖因子を強発現するようにする血管内皮前駆細胞の形質転換はアデノウイルスベクターを用いた方法に決定した。

- (5) 次に、実際にヒト型肝細胞増殖因子遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターにより血管内皮前駆細胞がヒト型肝細胞増殖因子を強発現しているか確認した。抗肝細胞増殖因子抗体による免疫細胞染色の結果では、血管内皮前駆細胞はもともと肝細胞増殖因子を発現しており、多くの細胞に染色陽性を示すが、その中に強陽性を示す細胞が散在的に確認された。
- (6) また ESISA 法により肝細胞増殖因子の定量を行ったが、LacZ 遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞に比べ、ヒト型肝細胞増殖因子遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞の方が単位細胞数あたりの肝細胞増殖因子の量は有意に多かった。
- (7) 次にヒト型肝細胞増殖因子を強発現させた血管内皮前駆細胞を急性肝不全モデルマウスに移植し（移植した細胞数は以前に報告した研究の 1/10）、生存率に与える影響を検討した。コントロール群における急性肝不全モデルマウスの生存率は約 2 割程度であった。一方、肝細胞増殖因子を強発現させた血管内皮前駆細胞移植群においても約 2 割程度であり、両群間における生存率には統計学的有意差を認めなかった。
- (8) 次にヒト型肝細胞増殖因子を強発現させた血管内皮前駆細胞を急性肝不全モデルマウスに移植し（移植した細胞数は以前に報告した研究の 1/10）、肝臓の組織学的な比較検討を行った。血管内皮前駆細胞移植後 1 日目における肝組織において、コントロール群における肝組織と比較しても HE 染色では両群における組織学的な相違点はほとんど見いだせなかった。また抗 PCNA 抗体により肝細胞の増殖活性を比較したが、PCNA 陽性肝細胞の割合は血管内皮前駆細胞移植群とコントロール群を比較しても組織学的に特に違いはなかった。またラベリングインデックスで統計学的

に比較検討を行ったが、コントロール群のラベリングインデックスが約 20%程度だったのに対し、血管内皮前駆細胞移植群においても約 25%程度であった。血管内皮前駆細胞移植群において肝細胞の増殖活性がやや高いように思われたが、統計学的に有意差を認めなかった。

- (9) ここまでの検討ではヒト型肝細胞増殖因子を強発現させた血管内皮前駆細胞を急性肝不全モデルマウスに移植しても十分な結果が得られなかったため、モデルマウスの再検討を行った。四塩化炭素により肝障害を惹起させる方針には変わりなかったが、投与する四塩化炭素を半量 ($10 \mu\text{L/g}$) にしてマウスの生存率を検討した。しかしこの量で強い肝障害が惹起されないようで、ほとんどのマウスは生存した。四塩化炭素の量を $15 \mu\text{L/g}$ でも検討してみたが、マウスの生存率が一定とは言えず、血管内皮前駆細胞移植群とコントロール群のマウスの生存率を比較するのは困難と思われた。次に希釈濃度を変化させてマウスの生存率を検討した。四塩化炭素をオリーブオイルで 20 倍に希釈し、同量の四塩化炭素量（総量としては 2 倍）で腹腔内投与を試みた。しかしマウスの腹腔内に十分な量を注入するのが困難であった。そのため 15 倍希釈でも検討してみたが、マウスの生存率が一定とは言えず、血管内皮前駆細胞移植群とコントロール群のマウスの生存率を比較するのは困難と思われた。
- (10) 使用している血管内皮前駆細胞はヒトの末梢血からの初代培養細胞であったため、血管内皮前駆細胞の細胞株にヒト型肝細胞増殖因子遺伝子を導入し、恒常的にヒト型肝細胞増殖因子を発現する血管内皮前駆細胞株の樹立も考慮した。しかし臨床的見地から考えた場合、自分自身の細胞以外を用いれば生体の免疫反応により移植を行った細胞は生体より排除されると考えられ、検討は行わなかった。
- (11) 以上の結果からは、移植する血管内皮前駆細胞数を減らしても十分に肝再生を促進する治療システムを確立させるまでには至らなかった。今後は慢性肝疾患モデルマウスでの研究も考慮していく予定である。

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)

〔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

谷口 英太郎 (TANIGUCHI EITARO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 50341318

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: