

平成22年05月30日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790936

研究課題名（和文） 肝硬変に対する新規細胞遺伝子治療の開発

研究課題名（英文） Development of new cellular and gene therapy for liver cirrhosis

研究代表者

上野 昌樹 (UENO MASAKI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90405465

研究成果の概要（和文）：

肝硬変合併肝癌に対し、肝切除治療は有効な治療であるが、肝硬変による肝機能低下により適応外となることも多く、また、切除治療後も肝硬変状態は存在するため、長期生存を目指すためには、肝硬変に対する治療（再生治療）が必要である。本研究においては、細胞分化能促進・障害組織に対する抗アポトーシス作用・抗線維化作用など、肝再生を促進させるさまざまな生理活性を有する肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor; HGF）を用いて、薬剤起因性肝硬変モデルおよびその肝切除モデルに対する治療実験を行い、肝線維化の改善・切除後生存率の改善を認め、HGFを用いた肝硬変への治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In a cirrhotic liver, the hepatic functional reserve are impaired, therefore administration of hepatectomy are limited. Moreover, in order to elongate the survival outcome, therapeutic strategy against cirrhosis is needed. In this study, we demonstrated the administration of the hepatocyte growth factor (HGF) which were recognized as a promoter of cellular proliferation and as an anti-apoptotic or anti-fibrotic factor for injured tissue to drug inducing cirrhosis model and hepatectomy model and revealed improvement of fibrotic status and survival outcome after hepatectomy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：再生医学・肝硬変・遺伝子治療・細胞治療・Hepatocyte growth factor

1. 研究開始当初の背景

本邦において肝細胞癌は死亡率第4位の悪

性腫瘍疾患であり、多くの症例が背景に肝硬変を有しており、長期生存を得るためには肝

硬変の克服が必須である。

1989年に肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor（以下 HGF））が、培養肝細胞に対し著しい増殖活性を持つタンパクとして発見され、その後、細胞分化能促進や、細胞遊走能促進などの生理活性を有することが判明し、さらには、障害組織に対する抗アポトーシス作用や線維化組織に対する抗線維化作用など、肝再生を促進させるさまざまな生理活性を有することが分かってきた。また、組織レベルでの検討では、肝硬変状態の肝組織では、間質細胞である星細胞が活性化され、TGF β の発現が亢進した状態となっており、コラーゲン増生が促された状態となっていることが分かっている。HGFは、TGF β の発現抑制作用を有していることが分かっており、肝硬変状態において投与すると、活性型星細胞が減少し、コラーゲン増生が抑制されることになる。さらに、HGFは、MMP-9の発現誘導作用も認められており、直接コラーゲンを分解することで、線維化が抑制されることが証明されており、肝硬変に対する有力な治療アイテムとなる。

一方、肝再生治療のもう一つのリソースとして、骨髄細胞が注目されている。骨髄の単核球分画を肝硬変モデルに対する細胞移植にて、線維化抑制が認められ、間質系骨髄細胞の肝硬変モデルへの細胞移植では、肝間質組織へ分布することが確認されている。また、それらの細胞は matrix metalloproteinase を発現し、組織の修復再生に関与していると考えられる。

2. 研究の目的

これまで障害肝に対する再生治療に有用とされてきた HGF 遺伝子治療、及び骨髄細胞移植治療を融合させることで、新たな再生医療の局面を展開する。特に以下の点を明らかにすることを目標とする。

(1) 骨髄間質細胞の肝組織への分布の程度。及び、HGF 遺伝子を導入した際の肝組織への分布の変化。

(2) 肝組織に分布した骨髄間質細胞の機能解析。及び、HGF 遺伝子を導入することによる機能発現の変化。

(3) 周辺肝組織への影響。及び、HGF 遺伝子を導入することによる変化。

3. 研究の方法

(1) マウス肝硬変モデルの作成

6週齢の Balb/c マウスに対し、四塩化炭素(以下 CC14) 50%溶液を Kg 体重あたり 10mg の腹腔内投与を週 2 回×6 週間行い作成する。

(2) 骨髄（間質）細胞の準備

6週齢の Balb/c マウスの大腿骨より骨髄細胞を採取。これを約 14 日間の培養により、接着細胞を得る（これが骨髄間質細胞）。

(3) HGF プラスミドの準備

RIKEN バイオリソースセンターより供与を受ける。当施設の P1, P2 実験室にて、増幅・精製を行う。

(4) 骨髄間質細胞への遺伝子の導入効率の検討

得られた骨髄間質細胞に対し、in vitro においてベクター量を段階的に決め、導入実験を行い、viability を観察、及び HGF 発現量を ELISA にて測定し、導入最適量を決定する。

(5) 骨髄間質細胞の障害肝への治療効果の検討

得られた骨髄間質細胞に lacZ 遺伝子を導入したうえで、CC14 障害肝マウスに対し、静脈投与による細胞移植を行い、移植後も CC14 投与により肝障害を維持した後に犠死させ、以下の項目について検討する。

① 障害肝組織への骨髄細胞の分布の程度を、lacZ 染色下に顕微鏡にて観察・定量化する。

② 分布した骨髄細胞に関する機能解析（肝臓特異的遺伝子の PCR 解析）を行う。

- ③ 移植マウスの生化学所見 (albumin, AST, ALT, ヒアルロン酸の測定) を検討する.
- ④ 移植マウスの肝組織学的所見 (fibrosis index の算出による肝線維化程度の測定, PCNA index の算出による肝細胞分裂能の測定) を検討する.
- (6) HGF 遺伝子導入された骨髄間質細胞の障害肝への治療効果の検討
- (5) と同様の実験系で HGF 遺伝子導入された骨髄間質細胞の細胞移植を行い, 以下の項目について検討する.
- ① 障害肝組織への骨髄細胞の分布の程度を, 顕微鏡にて観察・定量化する.
- ② 分布した骨髄細胞に関する機能解析 (肝臓特異的遺伝子の PCR 解析) を行う.
- ③ 移植マウスの生化学所見 (albumin, AST, ALT, ヒアルロン酸の測定) を検討する.
- ④ 移植マウスの肝組織学的所見 (fibrosis index の算出による肝線維化程度の測定, PCNA index の算出による肝細胞分裂能の測定) を検討する.
- ⑤ lacZ 遺伝子を導入した骨髄間質細胞移植との比較を行い, HGF 遺伝子導入による肝再生の上乗せ効果を検討する.
- (7) 障害肝/肝切除モデルにおける HGF 遺伝子導入骨髄間質細胞移植の肝再生効果の検討
- 障害肝モデルを作成した後に, 70%肝切除術を施行. 直ちに lacZ 遺伝子導入骨髄細胞 (或いは HGF 遺伝子導入骨髄細胞) を移植し, その後の肝再生への影響を以下の項目について, 非移植群をコントロールとして検討する.
- ① 残肝重量/体重比の変化を検討する.
- ② 残肝組織中における, 骨髄細胞の分布を顕微鏡にて観察・定量化する.
- ③ 分布した骨髄細胞に関する機能解析を行う.
- ④ 肝組織学的所見 (fibrosis index の算出による肝線維化程度の測定, PCNA index の算出

による肝細胞分裂能の測定) を検討する.

4. 研究成果

四塩化炭素 (10mg/g) の腹腔内反復投与による肝硬変マウスを作成し, 投与終了後の肝組織像より肝硬変状態になっていることを確認した.

その後, 骨髄移植用のドナーマウスより骨髄細胞を採取し, 14日間の培養により接着細胞 (骨髄間質細胞) を得ることが出来た. 更に, LacZ 発現アデノウイルスベクター接種による導入実験にて, この接着細胞にアデノウイルスベクターが導入できることを確認し, アデノウイルスベクターの最適投与量を同定した. これにより, アデノウイルスベクター系における各種遺伝子導入の可能性が展開できるようになった. 続いて, HGF 発現アデノウイルスベクターを作成して, 同様の実験を施行. 培養液よりの HGF の ELISA 測定を行い, 十分量の HGF タンパク発現があることを確認し, HGF を長期的に発現できる骨髄間質細胞を確立した.

次いで, 四塩化炭素障害肝マウスに対し, lacZ 遺伝子が導入された骨髄間質細胞の投与実験を行い, レシピエントマウスの摘出肝組織の lacZ 染色にて, lacZ 陽性細胞の散在を確認することが出来た. ただし, 移植細胞はコロニーを形成するには至っていない. 組織像としては, 肝硬変の状態を維持しており, 各種血液データ所見も肝硬変を支持するものであった. 次に, HGF 発現アデノウイルスベクターが導入された骨髄間質細胞の投与実験を行った. レシピエントマウスの摘出肝組織を碎片し, タンパクを抽出. HGF の ELISA 測定にて, コントロール群と比較して HGF タンパク発現に有意な差を確認した. 肝障害にともなう肝線維化の程度は, NIH image を用いて半定量的に測定し, HGF 発現骨髄移植群は, コントロール群と比較して, 線維化の程

度が有意に改善していた。また血液生化学検査においては、線維化マーカーである血清ヒアルロン酸値とアルブミン値の有意な改善をHGF発現骨髄間質細胞移植群において認めた。また、顕微鏡観察にて、移植した細胞は肝臓内に分布することを確認できた。しかし、コロニーを形成するには至らず、移植細胞の機能解析を行うには至らなかった。

70%肝切除モデルにおいてでは、HGF発現骨髄間質細胞移植群は、PCNA染色による細胞増殖活性の測定にて、有意に多くのPCNA陽性細胞を観察した。また、残肝重量の増加も認め、生存率の向上に寄与した。しかし、PCNA陽性細胞のすべてが移植細胞によるものとは限らず、もともと肝細胞の分裂能が移植細胞から発現されるHGFにより促進されたものと考えられた。

一方、HGF遺伝子発現アデノウイルスベクター単独投与による実験系でも同様に、線維化の改善、血清ヒアルロン酸・アルブミン値の改善を認めたが、HGF発現骨髄間質細胞移植の実験系と比較して同等の結果であり、よって、HGF発現骨髄間質細胞移植による肝再生に関わる効果の上乗せを証明するには至らなかった。

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3件)

1. Ueno M, Uchiyama K, Ozawa S, Hayami S, Kiriya S, Yamaue H. A new prediction model of postoperative complications after major hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Dig Surg*. 2009;26:329-9. 査読有.

2. Ueno M, Uchiyama K, Ozawa S, Nakase T, Togo N, Hayami S, Yamaue H. Prognostic impact of treatment modalities on patients

with single nodular recurrence of hepatocellular carcinoma. *Surg Today*. 2009;39:675-81. 査読有.

3. Uchiyama K, Mori K, Tabuse K, Ueno M, Ozawa S, Nakase T, Kawai M, Tani M, Tanimura H, Yamaue H. Assessment of liver function for successful hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma with impaired hepatic function. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2008;15:596-602. 査読有.

[学会発表] (計8件)

1. 上野昌樹, 当科における腹腔鏡補助下肝切除の工夫, 日本外科学会, 2010年4月9日, 名古屋

2. 上野昌樹, 肝細胞癌(HCC)に対するHr2以上の肝切除における新たな術後合併症予測式の確立, 日本外科学会, 2009年4月3日, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 昌樹 (UENO MASAKI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90405465

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: