

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12501
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K15964
研究課題名（和文）非代償性肝硬変の体外細胞分化誘導によるアルブミン補充療法の確立に向けた基礎的検討

研究課題名（英文）Basic study to establish albumin supplementation therapy by in-vitro cell differentiation induction in non-compensated cirrhosis

研究代表者
清野 宗一郎（KIYONO, Soichiro）

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00773326
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：アルブミンは肝臓のみで産生され、肝硬変患者では病態進展に伴い低アルブミン血症をきたす。低アルブミン血症は浮腫や胸腹水を惹起しADL低下や肝癌治療の障壁となり、結果として全生存率を短縮させる。治療として献血由来アルブミンの補充や分岐鎖アミノ酸製剤による栄養療法が行われるが、その治療効果は限定的である。我々の施設では、アルブミンと同様に肝臓のみで産生される脂質代謝酵素の家族性欠損症に対し、患者自身の脂肪細胞に正常遺伝子を導入し自家移植する細胞療法の臨床試験を開始しており、本研究では、脂肪細胞へのアルブミン高産生プラスミドを導入およびアルブミン高産生脂肪細胞の樹立を目指したが、達成されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
進行した肝硬変患者への長期間のアルブミン投与は、腹水や浮腫の改善をもたらすのみではなく、肝硬変に伴うその他の合併症や生命予後を改善することが報告されており、アルブミンの長期投与が推奨されている（Lancet 2018）。医薬品としての血漿由来ヒト血清アルブミンは医療の現場で広く用いられており、その有用性も確立されているが、供給量が限られていることなどが問題となっている。その他の治療法として分岐鎖アミノ酸製剤による栄養療法が行われるが、その治療効果は限定的である。新たなアルブミン補充の方法が待たれる状況であり、アルブミン産生細胞系統の樹立はその有力な解決策となり得た。

研究成果の概要（英文）：Albumin is produced only in the liver, and hypoalbuminemia occurs as the disease progresses in patients with cirrhosis. Hypoalbuminemia causes edema and pleural effusions, which impair activities of daily living and hinder the treatment of hepatocellular carcinoma, resulting in a shortened overall survival rate. The treatment includes supplementation with albumin from donated blood and nutritional therapy with branched-chain amino acid products, its effects are limited. We have started a clinical trial of cell therapy for deficiency of lipid metabolism enzymes, which are produced only in the liver like albumin. In this study, we aimed to introduce an albumin-producing plasmid into adipocytes and to establish albumin-producing adipocytes, which unfortunately was not achieved.

研究分野：門脈圧亢進症

キーワード：低アルブミン血症

様 式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

非代償性肝硬変の体外細胞分化誘導によるアルブミン補充療法の確立に向けた基礎的検討
Basic study to establish albumin supplementation therapy by *in-vitro* cell differentiation induction in non-compensated cirrhosis

1. 研究開始当初の背景

本邦における肝硬変患者は 40 - 50 万人に及び、病態の進展とともに肝不全、肝細胞癌、静脈瘤出血などを来す。年間約 5 万人が死亡しており、肝硬変治療は肝臓疾患における最大のアンメットメディカルニーズと言える。

肝硬変患者の多くが protein energy malnutrition を合併しており、87%に蛋白質またはエネルギー低栄養状態が存在する（Tajika M et al., Nutrition 2002）。临床上の栄養評価の指標には様々なものがあるが、その中でも肝硬変患者において、血清アルブミン値は最も重要な指標である。慢性肝疾患患者においては血清アルブミン値が 3.5g/dL 以下では肝硬変が示唆され、病態の進展に伴い肝硬変患者では 1 年で平均 0.15g/dL 低下していき、非代償性肝硬変へと進展していく。アルブミン値の低下は胸腹水の出現や浮腫および ADL 低下の原因となるだけでなく、肝細胞癌治療において治療方針の決定に大きく関わり、薬物療法の中断を余儀なくされる原因でもあり、その値は肝硬変患者の予後と深く関わっている。

肝硬変ではアルブミンの半減期は延長し、異化率も低下していることもあり、現在、我が国では肝硬変患者への過剰なアルブミン投与は、適正使用の観点からも行うべきではないとされている。しかし、欧米では進行した肝硬変患者への長期間のアルブミン投与は腹水や浮腫の改善をもたらすのみではなく、肝硬変に伴うその他の合併症や生命予後を改善することが報告されており、アルブミンの長期投与が推奨されている（Caraceni P et al., Lancet 2018）。

医薬品としての血漿由来ヒト血清アルブミンは医療の現場で広く用いられており、その有用性も確立されているが、血漿由来であることから未知の感染性物質の伝播の可能性や、供給量が限られていることが問題である。近年、新たなアルブミン補充として遺伝子組み換え酵母で産生されるアルブミンが開発されたが、その後に品質管理問題が発覚したために現在は普及していない状況である。その他の治療法としては分岐鎖アミノ酸製剤による栄養療法が行われるが、その治療効果は限定的であり、新たなアルブミン補充の方法が待たれる状況である。

我々の施設では、肝臓のみで産生される脂質代謝酵素 LCAT の家族性欠損症に対し、患者自身の前脂肪細胞に正常遺伝子を導入し自家移植する細胞療法の臨床試験を開始している。まだ臨床試験の結果は出ていないが、これまでにマウスに遺伝子導入前脂肪細胞を移植することにより安定した病態モデルを作成できており、これまでに LCAT 以外にインスリン遺伝子や抗 HER2 抗体遺伝子を導入した前脂肪細胞を自家移植することに成功（Ito M et

al., Diabetologia 2005) しており、これからも様々な難治性疾患の治療に応用可能であると期待される。

これらの背景を踏まえ、低アルブミン血症を伴う非代償性肝硬変患者への革新的な治療方法として脂肪細胞の自家移植を利用するという着想に至った。

2. 研究の目的

その着想過程で「アルブミン高産生プラスミドを導入した前脂肪細胞を樹立することはできるのか」そして「その細胞を自家移植することによって肝硬変における低アルブミン血症およびその生命予後は改善されるのか」という本研究課題の核心をなす学術的「問い」が生まれた。

その前段階として、本研究ではまずマウス前脂肪細胞にアルブミン高産生プラスミドを導入しアルブミン高産生脂肪細胞を樹立し、次に、低アルブミン血症を有する肝硬変モデルマウスにアルブミン高産生前脂肪細胞を移植し、低アルブミン血症および病態の改善効果を検証することを目的とする。ひいては革新的アルブミン補充細胞療法の開発にむけた臨床研究への展開を目指した。

我々の施設ではすでに実際の患者さんを対象とした遺伝子導入前脂肪細胞の自家移植が行われており、本研究にてマウスモデルにおけるアルブミン遺伝子導入前脂肪細胞の有用性が示されれば、今後はヒトを対象とした臨床試験に発展する可能性があり、革新的な治療法を生み出すことが期待された。

3. 研究の方法

(1) マウス前脂肪細胞を用いた検討

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 に GFP 発現レトロウイルスベクターを用いて、数種類のプロモーター支配下にアルブミン遺伝子を導入し、アルブミン産生能について ELISA を用いて比較検討し、最もアルブミンを多く産生する系を樹立する。また継代にてアルブミンの発現が変化するかについても検討する。

(2) マウス初代培養脂肪細胞を用いた検討

4 - 5 週齢の C57BL/6 雄性マウスの脂肪組織を腸間膜・鼠径部皮下・副睾丸周囲よりそれぞれ無菌的に摘出し、コラゲナーゼを含む通常培地で震盪消化した後に遠心により浮遊層を分離し、数回の遠心後に 10 - 14 日間天井培養した後に初代脂肪細胞を回収する。1) にて導き出したアルブミン高発現プラスミドをレトロウイルスにより遺伝子導入し、脂肪組織採取部位別のアルブミン産生能を比較検討する。また継代によるアルブミン産生能の変化についても検証する。

(3) アルブミン高産生前脂肪細胞をマウスへ自家移植した検討

上記 2) にて得られた最適の採取部位の脂肪組織より得られたアルブミン遺伝子導入脂肪細胞をマトリゲルと混濁し、四塩化炭素肝硬変マウスモデルおよび胆管結紮術を施行した

マウスモデルの背部皮下に自家移植し、血清中のアルブミン値をコントロール群と比較する。自家移植する脂肪細胞数は 2×10^6 cells/mL のマトリゲルを 0.2mL ずつ複数か所移植し、適正の移植量を検討する。また、アルブミン投与による肝機能や全身への影響を検討するために、血清の肝機能の推移、肝組織、腎組織、筋肉量についても比較検討する。

4. 研究成果

アルブミンは肝臓のみで産生され、肝硬変患者では病態進展に伴い低アルブミン血症をきたす。低アルブミン血症は浮腫や胸腹水を惹起し ADL 低下や肝癌治療の障壁となり、結果として全生存率を短縮させる。治療として献血由来アルブミンの補充や分岐鎖アミノ酸製剤による栄養療法が行われるが、その治療効果は限定的である。我々の施設では、アルブミンと同様に肝臓のみで産生される脂質代謝酵素の家族性欠損症に対し、患者自身の脂肪細胞に正常遺伝子を導入し自家移植する細胞療法の臨床試験を開始しており、本研究では、脂肪細胞へのアルブミン高産生プラスミドを導入およびアルブミン高産生脂肪細胞の樹立を目指したが、達成されなかった。

進行した肝硬変患者への長期間のアルブミン投与は、腹水や浮腫の改善をもたらすのみではなく、肝硬変に伴うその他の合併症や生命予後を改善することが報告されており、アルブミンの長期投与が推奨されている (Lancet 2018)。医薬品としての血漿由来ヒト血清アルブミンは医療の現場で広く用いられており、その有用性も確立されているが、供給量が限られていることなどが問題となっている。その他の治療法として分岐鎖アミノ酸製剤による栄養療法が行われるが、その治療効果は限定的である。新たなアルブミン補充の方法が待たれる状況であり、アルブミン産生細胞系統の樹立はその有力な解決策となり得た。

脂肪細胞へのアルブミン高産生プラスミド導入に関しては、脂肪細胞環境へ適合した血清の確立まで到達しており、今後、ウイルス感染につなげることができるよう研究を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takayuki Kondo, Soichiro Kiyono, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Impact of acute decompensation on the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0261619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0261619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	近藤 孝行 (Kondo Takayuki) (80845090)	千葉大学・消化器内科学・助教 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関