

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 阿部 寛幸
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 664 号
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Effective Prevention of Liver Fibrosis by Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery of Matrix Metalloproteinase-13 in a Rat Liver Fibrosis Model
(ハイドロダイナミック法によるマトリックスメタロプロテアーゼ-13 遺伝子の肝特異的遺伝子導入はラット肝硬変モデルにおける肝線維化予防に有用である。)

論文審査委員 主査 教授 若井 俊文
副査 教授 寺井 崇二
副査 教授 山際 訓

博士論文の要旨

[背景と目的]

肝線維化は慢性肝疾患により引き起こされ、その進行により黄疸や腹水、静脈瘤、肝性脳症などの種々の肝不全症状を来し、肝硬変においては年間 3-5%の確率で肝細胞癌を発症する。慢性肝疾患の原因は多彩であり、それらの診断方法は確立しているが、肝線維化に対する治療は確立しておらず、近年では細胞治療や遺伝子治療が開発されている。

肝線維化は線維性コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンを含む細胞外マトリックスが肝組織内で置換されることによって引き起こされる。これらの線維組織は持続する肝障害により活性化された肝星細胞によって産生される。一方、肝星細胞は Matrix Metalloproteinases (MMPs) のような酵素を産生することで線維化を溶解するという反対の作用も持ち合わせている。肝の線維化進展は産生放出される MMPs と MMPs を阻害する Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP) のバランスにより引き起こされる。そのため、治療のターゲットとして、MMPs または TIMPs の制御が治療戦略として考えられる。様々な MMPs の中で MMP13 は主要なコラーゲナーゼであり、ラットにおける肝線維化の改善の際には MMP13 の上昇を認め、肝硬変では発現が抑制されていると報告もあり、肝線維化における細胞外マトリックス溶解のキーファクターとなり得る。そのため、MMP13 遺伝子の発現を増幅させることはコラーゲナーゼを増加させ、肝線維化を予防することが期待される。

そこで申請者らは MMP13 遺伝子をラット肝硬変モデルに対して naked DNA を選択的に肝臓へ遺伝子導入可能なハイドロダイナミック遺伝子導入法 (Hydrodynamic Gene Delivery: HGD) を用いて導入し、肝線維化を予防できるかを検討した。

[方法]

胆管結紮によりラット肝硬変モデルを作成し、HGD は麻酔下で開腹し、下大静脈および上大静脈を一時的に遮断し、下大静脈より体重の 5%のプラスミド溶解液 (5 μ g/ml) を 1ml/秒で注入して行った。プラスミ

ドは chicken β -actin をプロモーターとし、長期発現を期待するプラスミドを作成使用した。これらの処置を施行し、ラットモデルを HGD のみ施行群 (MMP13 群)、胆管結紮のみを施行した群 (LF 群)、両方施行した群 (LF-MMP13 群) の 3 群に分けて、70 日間観察し、経過中に採血を行い血清の線維化マーカーであるヒアルロン酸、他肝胆道系酵素を測定し、70 日後に肝組織を回収、組織学的に線維化を評価した。

[結果]

導入した MMP13 遺伝子の発現は、血清 ELISA および肝組織における MMP13 の免疫染色、ウェスタンブロット等で確認した。ELISA では MMP 群、LF-MMP 群では遺伝子導入前に 5-6 pg/ml であった血清 MMP13 濃度が 14 日目でそれぞれ 56.1 ± 10.3 pg/ml と 71.7 ± 52.5 pg/ml とピークを迎え、これらの上昇は 70 日間持続した。一方、対象の LF 群は 14 日目で 9.24 ± 3.47 pg/ml と軽度上昇したが、術後の影響と考えられ再度基準値まで低下し、MMP 群、LF-MMP 群が有意に高い状況であった。また、MMP13 の免疫染色、ウェスタンブロットでも遺伝子導入群で肝組織内での MMP13 発現の上昇を認めた。HGD による肝組織への影響を評価するために行った血清肝胆道系酵素の推移では、MMP 群で遺伝子導入直後に一時的な上昇を認めたが、2-3 日後には改善し、遺伝子導入の安全性が示唆された。肝線維化の評価において、血清マーカーであるヒアルロン酸を測定したところ、LF 群では 7 日目に 635.2 ± 54 ng/ml まで上昇しその後 14 日目には 208.6 ± 118.8 ng/ml まで下降した。7 日目の上昇は処置による一時的な上昇と考えられ、その後軽度低下もヒアルロン酸は高値持続し線維化の影響と考えられた。一方、LF-MMP 群では 7 日目には 802 ± 75.6 ng/ml まで上昇するも 14 日目には 50.8 ± 17.0 ng/ml まで低下しその後も有意に低い値が維持された。組織学的な線維化評価は 70 日目で採取した肝組織をシリウス・レッドで染色し、顕微鏡像より線維化エリアを定量分析すると LF 群では 32.3 ± 10.8 % に対して、MMP 群では 9.63 ± 5.20 %、LF-MMP 群では 15.3 ± 3.67 % と有意に LF 群が高い結果となった。これらの結果より HGD による MMP13 遺伝子導入は抗線維化作用を示すことが証明された。

[考察]

分子学的メカニズムから肝線維化予防のため細胞外マトリックスを減少させる方法を考察すると、肝線維化における細胞外マトリックスの増加は MMP が減少し、TIMP が増加するという不均衡によるとされており、肝内の MMP を強発現させる手法は細胞外マトリックスの減少させる手段となりうる。事実、MMP1、MMP8、MMP13 をラットまたはマウスの肝硬変モデルにアデノウイルスまたは化学物質を用いて遺伝子導入することにより肝線維化の減少を引き起こす結果が報告されている。今回、申請者ら齧歯類における主要なコラゲナーゼである MMP13 遺伝子を HGD により遺伝子導入し、ラット肝硬変モデルにおける抗線維化作用を有する結果を得た。HGD は、化学物質やウイルスベクターを使用せず、水圧によって効率よくかつ選択的に遺伝子導入が可能な方法であり、その安全性も大動物実験で報告されている。化学物質やウイルスベクターを用いないため、同使用による発癌性のリスクもなく、HGD を用いた MMP13 遺伝子導入は、今後肝線維化治療の一手段となり得ることが期待される。

審査結果の要旨

MMP13 遺伝子をラット肝硬変モデルに対して naked DNA を選択的に肝臓へ遺伝子導入可能なハイドロダイナミック遺伝子導入法 (Hydrodynamic Gene Delivery: HGD) を用いて導入し、肝線維化を予防できるかを検証した。胆管結紮によりラット肝硬変モデルを作成し、HGD は麻酔下で開腹し、下大静脈および上大静脈を一時的に遮断し、下大静脈より体重の 5% のプラスミド溶解液 (5 μ g/ml) を 1ml/秒で注入して行った。プラスミドは chicken β -actin をプロモーターとし、長期発現を期待するプラスミドを作成使用した。こ

これらの処置を施行し、ラットモデルをHGDのみ施行群 (MMP13 群)、胆管結紮のみを施行した群 (LF 群)、両方施行した群 (LF-MMP13 群) の3群に分けて、70日間観察し、経過中に採血を行い血清の線維化マーカーであるヒアルロン酸、他肝胆道系酵素を測定し、70日後に肝組織を回収、組織学的に線維化を評価した。導入したMMP13遺伝子の発現は、血清ELISAおよび肝組織におけるMMP13の免疫染色、ウェスタンブロット等で確認した。ELISAではMMP群、LF-MMP群では遺伝子導入前に5-6 pg/mlであった血清MMP13濃度が14日目でそれぞれ 56.1 ± 10.3 pg/mlと 71.7 ± 52.5 pg/mlとピークを迎え、これらの上昇は70日間持続した。一方、対象のLF群は14日目で 9.24 ± 3.47 pg/mlと軽度上昇したが、術後の影響と考えられ再度基準値まで低下し、MMP群、LF-MMP群が有意に高い状況であった。また、MMP13の免疫染色、ウェスタンブロットでも遺伝子導入群で肝組織内でのMMP13発現の上昇を認めた。組織学的な線維化評価は70日目で採取した肝組織をシリウス・レッドで染色し、顕微鏡像より線維化エリアを定量分析するとLF群では 32.3 ± 10.8 %に対して、MMP群では 9.63 ± 5.20 %、LF-MMP群では 15.3 ± 3.67 %と有意にLF群が高い結果となった。これらの結果よりHGDによるMMP13遺伝子導入は抗線維化作用を示すことが証明された。

HGDによるMMP13遺伝子導入は抗線維化作用の効果についてMol Ther Nucleic Acidsに誌上発表しており、学位論文として価値のある研究成果であると判断しました。