

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	小林 雄司
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 730 号
学位授与の日付	平成 29 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	Effects of Fibrotic Tissue on Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery. (肝臓選択的ハイドロダイナミック遺伝子導入法において、線維組織が導入効率に与える影響)
論文審査委員	主査 教授 小松 雅明 副査 講師 川合 弘一 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

【背景・目的】

さまざまな慢性肝疾患の進行に伴い、肝臓内に線維組織が徐々に蓄積し、最終的には肝硬変の状態に至る。現在、ウイルス性肝炎等の原疾患に対する治療は進歩しているが、肝線維化に対する治療法・予防法は、エビデンスが確立されておらず、臨床応用には至っていない。遺伝子治療による肝線維化治療については、これまでに多くの基礎研究がなされ、細胞外マトリックスの産生と蓄積および肝星細胞の機能の調節を介して、抗線維化効果を発現させられることが示唆されている。

申請者らはこれまで、安全に効率よく様々な臓器へ選択的に遺伝子導入を行う方法論としてハイドロダイナミック遺伝子導入法 (Hydrodynamic Gene Delivery, HGD) について研究してきた。この手法はウイルスベクター等の遺伝子運搬物質を用いず、DNA 溶液を水圧によって細胞に遺伝子導入する方法で、生物学的な長期安全性が高い。さらに血管内カテーテル操作を融合することにより、臓器選択的な遺伝子導入が可能であり、申請者らは肝疾患の遺伝子治療への応用に向けて、肝臓選択的な遺伝子導入法を研究してきた。一方で、線維組織が蓄積した肝組織では HGD の遺伝子導入効率が低下することが示唆されてきた。そこで、本研究では、肝線維化モデルラットを用いて、慢性肝障害による線維組織の蓄積が HGD の遺伝子導入効率に与える影響を検証することを目的とした。また、HGD による肝臓への導入によって肝線維化予防効果を報告した、matrix metalloproteinase13 (MMP13) 遺伝子を導入し、肝線維化の治療を行ったのちに、HGD の遺伝子導入効率が改善するかどうか、検証を行った。

【方法・結果】

肝線維化モデルラットは胆管結紮法により作製した。胆管結紮後、経時的に肝組織を採取し、Sirius red 染色画像の解析により肝線維組織量を定量的に評価し線維化の進行を検証した結果、胆管結紮群では線維組織量は正常ラット群と比して有意に高く、肝臓の各葉間で線維化の程度に差は認めなかった。

肝線維化が HGD 効率に与える影響を検証するため、胆管結紮の 9 週後のラットに pCMV-Luc DNA 溶液 (5 ug / ml, 体重の 5%量) を HGD にて導入した。導入の 4 時間後にラットを犠牲死させ、肝組織を採取した。遺

伝子発現量は luciferase assay により定量的に評価し、線維組織量は Sirius red 染色画像の解析により評価した。個体ごとの遺伝子発現量と肝線維組織量を解析した結果、それらには負の相関が認められ、線維組織の蓄積は直接的に HGD 効率を低下させることが示された。

胆管結紮後の線維組織量と遺伝子導入効率の経時的変化を、胆管結紮群と、胆管結紮に加えて MMP13 導入を行った群で比較した。胆管結紮群では経時的に線維組織量が増加し、遺伝子導入効率も同様に低下した。一方で、MMP13 導入群では、線維組織量の増加が制御され同時に遺伝子導入効率も回復した。

MMP13 導入による抗線維化効果を検証するため、血液生化学検査を胆管結紮から 10 週に渡り施行した。10 週後の生化学検査結果では、ヒアルロン酸とタイプ IV コラーゲン濃度が MMP13 導入群では胆管結紮群に比して有意に低値であった。またアルブミン濃度が MMP13 導入群では非治療群に比して有意に高値で、肝機能の改善が示唆された。

【考察】

今回の申請者らの研究で、肝線維化の進展により HGD の効率が低下することが、学術的に証明された。同時に、MMP13 遺伝子導入による抗線維化治療を行う事で、線維化の進行を抑制することが可能であり、HGD の遺伝子導入効率は改善することが示された。血液生化学検査の結果からは、治療によるアルブミン合成能の改善が認められ、MMP13 導入による線維組織の分解は、同時に蛋白合成能の改善をもたらすことが示唆された。臨床的には、線維化の進展する可能性のある肝疾患において、早期に抗線維化治療を開始すべきであることが示唆された。すでに線維化が進行した肝臓に発生した肝癌などの遺伝子治療を念頭に置いた場合、HGD 効率をさらに改善するための、線維組織量に応じた流量・流速・注入圧などの最適なパラメータの決定や線維組織量を減らすための薬物療法との融合などが、さらなる研究課題である。

審査結果の要旨

慢性肝疾患の進行に伴い、肝臓内に線維組織が徐々に蓄積し、最終的には肝硬変の状態に至る。現在、ウイルス性肝炎等の原疾患に対する治療は進歩しているが、肝線維化に対する治療法・予防法は、エビデンスが確立されておらず、臨床応用には至っていない。

申請者らはこれまで、安全に効率よく様々な臓器へ選択的に遺伝子導入を行う方法論としてハイドロダイナミック遺伝子導入法 (Hydrodynamic Gene Delivery, HGD) について研究してきた。今回、申請者は肝線維化モデルラットを用いて慢性肝障害による線維組織の蓄積が HGD の遺伝子導入効率に与える影響を検証した。次に、ラット胆管結紮後、線維化が起こる前に HGD により matrix metalloproteinase13 (MMP13) 遺伝子を導入し、MMP13 による肝線維化抑制効果を検証した。さらに、ラット胆管結紮後 MMP13 導入群において、HGD の遺伝子導入効率が改善するかどうかの検証を行った。その結果、肝線維化の進展により HGD の効率が低下すること、MMP13 遺伝子導入により線維化の進行が抑制されること、そして MMP13 遺伝子導入による抗線維化治療により HGD の遺伝子導入効率が改善されることを明らかにした。

本論文は、基礎的知見として MMP13 導入による線維組織の分解は同時に蛋白合成能の改善をもたらすことを、臨床的には線維化の進展する可能性のある肝疾患において早期に抗線維化治療を開始すべきであることを示唆しており、博士論文としての価値を認める。