

論 文 要 旨

HB-EGF and HGF Gene Therapy Inhibit Bile Duct Ligated Cholestatic Liver Injury in Mice by Different Actions

HB-EGF 及び HGF による遺伝子治療は胆管結紮によるマウス胆汁うっ滞性肝障害を異なった機序で改善する

坂 本 浩 一

【序論および目的】

胆道閉鎖症をはじめ、胆汁うっ滞性疾患は一般的に難治性で進行期には肝線維化・肝硬変を来し、現在のところ肝移植以外に有効な治療法がなく新しい治療法が望まれている。hepatocyte growth factor (HGF) は慢性疾患に対する治療効果も含めよく研究された肝再生因子であるが、新規増殖因子の Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) は、障害肝において HGF よりも早期に mRNA が上昇することが知られているが、肝障害モデル、特に慢性肝障害モデルに対する治療効果の報告はほとんどない。我々は以前に HB-EGF による遺伝子治療及び組換え蛋白投与が Fas 誘導急性劇症肝炎モデルの肝障害を著明に改善することを明らかにしているが、今回、胆管結紮 (bile duct ligation, BDL) による胆汁うっ滞性肝障害モデルに対する HB-EGF/HGF の急性期および慢性期の治療効果を検討した。

【材料および方法】

5-6 週令の C57BL/6J 雄マウスに 1×10^{11} particle のアデノウイルスベクター (Ad.LacZ (LacZ 群、コントロール), Ad.HB-EGF (HB-EGF 群), Ad.HGF (HGF 群)) 及び Ad.HB-EGF と Ad.HGF の両者 (Combination 群, 2×10^{11} particle) を尾静注し胆管結紮 (BDL) を行った。術後 3 日目 (急性期)、14 日目 (慢性期) に犠死させ肝・血液採取を行い分析に供した。また術後 5 日目 (亜急性期) で採血を行ない、肝細胞障害、肝線維化、肝再生の評価を行った。

【結 果】

治療因子は肝においては急性期には強く発現していたが、慢性期においても発現を認めた。HB-EGF、HGF、及び両者の combination により肝細胞への抗 Oncosis (抗 Necrosis) 効果、抗 Apoptosis 効果、肝再生効果、減黄効果を認めたが、急性期には HB-EGF 群は血液生化学所見で HGF 群を上回る AST/ALT 上昇抑制効果、肝細胞保護効果を認めた。一方慢性期には HGF 群及び Combination 群で抗線維化効果、減黄効果を認めた。慢性期の肝再生効果、減黄効果については、HB-EGF、HGF 単独よりも両者の

combination にて作用増強を認めた。

【結論及び考察】

BDL による胆汁うっ滞性肝障害モデルに対しては、HB-EGF は主に急性期に肝保護作用により肝細胞障害を軽減する一方で、HGF は慢性期の肝線維化抑制効果を認めた。両治療因子は BDL による胆汁うっ滞性肝障害を異なる時期、異なる作用で改善したが、両者の combination は協調的な治療作用を示した。これらの結果により HB-EGF/HGF が難治性肝疾患に対して臨床的に有効な治療因子となり得ることが期待された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 139号	学位申請者	坂本 浩一
審査委員	主査	河野 嘉文	学位
	副査	宮田 篤郎	副査
	副査	谷本 昭英	副査
			博士 (医学)
			三井 薫
			下野 隆一

HB-EGF and HGF Gene Therapy Inhibit Bile Duct Ligated Cholestatic Liver Injury in Mice by Different Actions

(HB-EGF および HGF の遺伝子治療は胆管結紮によるマウス胆汁うっ滞性肝障害モデルを異なった作用で改善する)

胆道閉鎖症をはじめとする胆汁うっ滞性肝疾患は進行期には肝線維化・肝硬変を来し、肝移植以外に有効な治療法がなく革新的な治療法が望まれている。Hepatocyte growth factor(HGF)が各種肝疾患でよく研究された肝再生因子であるのに対し、新規増殖因子の Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)の肝障害モデルへの治療効果の報告はほとんどない。学位申請者らのグループは以前に HB-EGF の遺伝子治療(Khai NC, Kosai K et al. J Hepatol. 2006;44:1046-1054)及び組換え蛋白投与(Khai NC, Sakamoto K, Kosai K et al. Hepatol Res. 2011;41:594-596)が急性劇症肝炎モデルを著明に改善することを明らかにしており、今回、胆管結紮(bile duct ligation, BDL)による慢性胆汁うっ滞性肝障害モデルを使って HB-EGF と HGF の治療効果を比較検討した。

マウスに HB-EGF、HGF を発現するアデノウイルスベクター(ADV)および両者を、コントロール群として LacZ を発現する ADV を尾静注し直後に BDL を行い、術後 3 日目(急性期)、14 日目(慢性期)に犠死させ肝・血液採取を行い、また術後 5 日目(亜急性期)で採血を行ない、肝細胞障害、肝線維化、肝再生の評価を行った。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1)治療各因子の蛋白は標的臓器の肝において急性期には強く発現していたが、慢性期においても発現を認めた。
- 2)血液生化学所見では、HB-EGF は主に急性期の AST/ALT 低下作用、減黄作用を、HGF 及び両者併用では慢性期の減黄作用を認めた。
- 3)組織学的には HB-EGF、HGF、および両者併用により肝細胞の急性期・慢性期のネクロシス、オンコーシスが著明に抑制された。
- 4)慢性期には HB-EGF、HGF、および両者併用によりアポトーシスも抑制された。
- 5)慢性期の線維化は HB-EGF では著変を認めなかったが、HGF および両者併用で抑制された。
- 6)肝再生誘導作用に関し、急性期にはどの治療群も Ki67 陽性細胞が著明に増加し肝再生誘導効果を認めたが、慢性期には両者併用でのみ再生誘導亢進を認めた。

BDL モデルに対しては、HB-EGF は主に急性期に強い肝保護効果を、HGF は慢性期に強い肝線維化抑制効果、減黄効果を認めた。肝再生誘導効果、減黄効果については、HB-EGF、HGF 単独よりも両者併用で作用増強を認めた。HB-EGF と HGF は BDL による肝障害を異なる時期に異なる作用で改善し、両者の併用投与は協調的な治療効果を発揮することが判明した。

慢性肝疾患モデルに対する HB-EGF の治療実験は検討されておらず、本研究により HB-EGF/HGF が胆汁うっ滞性肝障害をはじめ、おそらくは種々の難治性肝疾患に対しても有効な治療因子となり得ることが示唆され、今後の臨床応用も含めた研究の発展が期待された。よって本研究は、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 139 号		学位申請者	坂本 浩一
審査委員	主査	河野 嘉文	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	三井 薫
	副査	谷本 昭英	副査	下野 隆一

主査および副査の5名は、平成23年9月5日、学位申請者 坂本 浩一 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 実験モデルとしてマウスを選んだ理由は？

(回答) 過去に、今回の実験で用いた C57BL/6 マウスの胆管結紮 (BDL) 後の経日的な臨床病理的解析を詳細に行った報告があり、今回の目的である各病変時期 (急性、亜急性、慢性) の解析日程 (ポイント) が明確であったため。

質問2) BDL の実験で遺伝子導入の方法にアデノウイルスベクター(ADV)を用いた理由は？

(回答) 今回の主目的は、heparin-binding EGF-like growth factor(HB-EGF)の慢性肝疾患 (胆汁うっ滞性肝疾患を含む) に対する治療作用、さらに hepatocyte growth factor(HGF)との作用機序・効果の違いをはじめて検証することである。よって、ADV は in vivo で遺伝子導入効率が高い (肝臓ではほぼ 100%) 等の利点より、この命題に明確に結果を出すために有用と考えて選んだ。今後は臨床応用化という観点から、投与形態 (組換え蛋白) やベクターの改良なども検討していきたい。

質問3) BDL の実験で採血データの14日目胆道閉塞が持続しているのに HGF 群、Combination 群で T-Bil が低下しているのは何故か？

(回答) 肝保護作用で肝細胞障害が軽減する結果、壊れて放出されるビリルビンが減少するためではないかと考えている。

質問4) HB-EGF の治験などは他でなされているのか？

(回答) 肝疾患への医薬として十分な研究から臨床試験まで進められている HGF とは全く異なり、HB-EGF は動物実験として治療薬としての応用の可能性を検証したのは我々の研究グループの 2006 年の遺伝子治療の報告が最初であり、今回の組換え蛋白の治療効果、慢性肝疾患への治療効果の研究は世界から 2、3 報目の報告という位置づけである。よって治験の報告はない。

質問5) 劇症肝炎モデルの実験で、以前に同モデルを ADV で治療実験を行っていたがこれを組換え蛋白で実験しようとしたのは何故か？

(回答) 臨床的には遺伝子治療よりも蛋白投与の方が有用と思われる。つまり臨床的観点からの応用のしやすさというだけでなく、治療効果という点でも、ADV の細胞毒性を排除し、より効果的に治療出来るのではないかと推察したからである。HB-EGF は膜結合型の増殖因子であるため、proHB-EGF 遺伝子導入と、可溶性 HB-EGF 組換え蛋白の治療作用・効果は異なる可能性もあるため、臨床化を考えるためには、実際に検証する必要性があった。

質問6) BDL の実験では肝障害モデル作成前の治療因子投与を行っているが、後投与をやった場合はどのような結果になるか？

(回答) 今回は、「HB-EGF が慢性肝疾患に治療作用・効果を示すのか？HGF との違いは？」の初検証が最大の目的であり、その答えがクリアーにできる確実な手技ということで前投与した。後投与でも同様の治療効果はあると考えられるが、この点は今回の結果が得られたので、その特徴を踏まえた両因子の最適な投与時期にも焦点を当てて実際に今後検討していきたい。

質問7) 線維化が起こってしまったからの投与でも効果はあるのか？

(回答) 過去の実験より HGF は BDL 後の細胞外マトリックスを分解する Matrix metallo proteinase(MMP)産生亢進を促すことが示されており、線維化が起きてしまったからの投与でも効果はあると考える。

質問8) BDL の実験で ADV を使わない場合と、ADV を使った場合は3日目の採血 data はどう違ってくるか？

(回答) 今回は BDL モデルに対する HB-EGF の効果を初めて検討するのが主目的なので、全ての群で ADV を使用しコントロール群は LacZ を発現する ADV を用いた。予備実験では、検討数は十分ではないが生食投与群では AST/ALT

最終試験の結果の要旨

はコントロール ADV を使った場合よりも低下した。一方 T-Bil については、大きな変化はなくコントロール ADV 投与群同様に上昇を認めた。

質問 9) BDL の実験で 3 日目の採血データで HB-EGF が AST/ALT 低下作用を認めるのは、ウイルス毒性に対する効果を見ている要素はないか？

(回答) LacZ 群と HB-EGF 群は投与 ADV の粒子数を同じにしてあり、ウイルス毒性の治療効果を見るのが目的ではないが、ウイルス毒性を HB-EGF が軽減している可能性はあると考える。

質問 10) ADV を用いた BDL の実験では劇症肝炎モデル実験と同等の治療因子の発現量があったか？発現量のモニタリング、例えば血中レベルなどでの定量化はしたか？

(回答) BDL モデルでの ADV 投与では肝に治療因子を発現させるので、血中濃度は direct には局所の発現量は反映しない。また、肝組織中の定量ではある程度効果を推測出来ると考えられるが、pro-HB-EGF と、活性を持つ可溶性 HB-EGF を detect することになり、組換え蛋白を投与した場合との比較は正確にはできないと考えている。3 日目には Western Blotting と免疫染色で、治療標的臓器の肝で両治療因子が高レベルで発現していることは確認している。

質問 11) BDL 実験の採血データは 5 日目と 14 日目は同一個体由来だが、どの個体も同じような傾向を示していたか？

(回答) 本来 3 日目、5 日目、14 日目と全部同じマウスで実験するのが望ましいが、今回は、3 日目は sacrifice を行わなければならなかったこと等の理由で別の個体で検討しており、あえて、5 日目と 14 日目の相関関係は検討してはいない。しかし各個体間でほぼ同一の傾向が認められる傾向にはあった。全体の傾向では 5 日目の採血結果は 3 日目と 14 日目の中間的な値であり、AST/ALT は全体的にレベルが下がってきているため各群間で差がなくなり、T-Bil はコントロール群ではさらに上昇していたが治療群で効果を認めた。

質問 12) 尾静脈から ADV を注射した場合、門脈注と同様に全て肝臓で発現するのか？

(回答) ADV の場合は尾静脈注でも大部分が肝臓で trap され、肝臓で発現する。

質問 13) 'Oncosis' とは何か？

(回答) Necrosis の一形態で、血行障害による梗塞、毒性化学物質の刺激等で、細胞が融解していくような形で細胞が死滅していく形式を指す。

質問 14) BDL の実験で治療群でビリルビンが低下しているのは、ビリルビンの排泄が下がっている可能性はあるか？あるいはビリルビン産生自体が低下している可能性はないか？

(回答) 減黄効果については、肝保護作用により毒性を持つ一次胆汁酸などによる肝細胞障害が軽減する結果、肝細胞破壊で血中に放出されるビリルビンが減少するのが主な原因ではないかと考えている。

質問 15) 線維化の評価で α -SMA の活性の他、コラーゲン、MMP 等の評価はしなかったのか？

(回答) 線維化の評価では、組織の線維化の染色での評価を行っており、蛋白発現としては α -SMA が最も代表的であったので今回は α -SMA を選んだ。今後、コラーゲン、MMP 等も評価したい。

質問 16) BDL の実験での総胆管の閉塞と、他の疾患でみられる肝細胞から細胆管への輸送障害が病態が同じとは思えないがどう考えるか？

(回答) 今回の主目的は、HB-EGF の線維化まで伴う慢性肝疾患への HB-EGF の治療作用の初めての検証であり、そのモデルとして効果的な薬物のない胆汁うっ滞性肝障害を選び、最も代表的な動物モデルの BDL モデルを選んだ。全ての胆汁うっ滞は共通病態として肝細胞から類洞の排出障害を伴っており、肝内胆管閉塞による肝疾患などに対しても本モデルによりその病態をある程度再現できていると思われる。しかし今後は、今回の結果を踏まえ、個々の疾患モデルの病態により近い実験モデル（例えば胆道閉鎖症の場合は原因としてウイルス感染説があり、マウス新生児へのレオウイルス投与でモデル作成も報告されている）での実証研究が有意義であると考えられる。

質問 17) HB-EGF と HGF の産生細胞は？

主に間葉系細胞。両因子とも、肝臓では非実質細胞、つまりクッパー細胞や、血管内皮細胞で産生されて、近隣肝細胞に paracrine 作用する。

質問 18) HB-EGF と HGF を臨床的に投与した場合の違いを推測できるか？

(回答) 今回の実験結果から、1) 両因子とも肝細胞死抑制作用、減黄作用、肝再生作用などの基本的な治療作用・効果を持つこと、2) HB-EGF は急性期の肝障害抑制作用が強力で、一方 HGF は慢性期の減黄作用、抗線維化作用が強力であること、そして 3) 両因子のコンビネーションはさらに相加的治療効果がみられること、が分かった。よって今後の研究で、これらの特徴を生かした各因子の投与法を各肝疾患に最適化すれば、各因子単独あるいはコンビネーションで、臨床的に有効な薬物になると思われる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。