The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	遺伝子治療と細胞移植による新規肝疾患治療法に関する研究
Author(s)	磯田, 勝広
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/45673
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【1】

氏　　名	磯　田　勝　広（いそだ かつひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　19413　号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学系研究科分子薬科学専攻
学　位　論　文　名	**遺伝子治療と細胞移植による新規肝疾患治療法に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　八木　清仁 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　松田　敏夫　　教　授　土井　健史

論文内容の要旨

【背景】

肝臓は、生体の物質代謝において中心的な役割を果たしている臓器であり、恒常性維持に重要な働きをしている。生体の代謝機能を担う肝臓が、機能障害を受けて肝不全に陥ると生体は致命的なダメージを受けることになる。現在、我が国における肝疾患での年間死亡数は4万人以上に達しており、特に肝癌や終末期肝硬変、劇症肝炎においては肝移植以外、有効な治療が確立されておらず、医療関係者から新たなる治療法の確立が求められている。肝移植は、脳死移植法が制定された現在でもドナー不足は深刻な問題である。そこで肝移植に代わる新たな治療法として、肝細胞移植法の開発、遺伝子工学による遺伝子治療が試みられている。

【目的】

細胞移植は、臓器移植より患者の体への負担が少ない、細胞の凍結保存が可能であり利便性が高い、などの利点がある。しかし、門脈および脾臓から肝細胞を移植すると門脈塞栓や虚血肝不全の危険性が生じるため移植する細胞数には限界がある。そこで本研究では多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを用いた肝細胞移植において、肝細胞機能を高く機能維持するために肝細胞と他の細胞との混合培養法に着目した。生体中に多数ある骨髄細胞中に存在する骨髄間質細胞は、多種類の液性因子を放出する。そこで本研究では、骨髄間質細胞から放出される因子に着目し、*in vitro* において肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養をおこない、肝細胞機能を高くし、機能維持を試みた。さらに多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを用い、肝細胞と骨髄間質細胞を肝炎モデルマウスへ移植し、有効性の検討を行った。

遺伝子治療は臓器移植と比較して、遺伝子をウイルスベクターなど用いて体の中で遺伝子導入（*in vivo* gene therapy）を行うことができることから、生体に対して低侵襲性の手術で体に負担が少なく、患者自身の細胞を用いれば免疫拒絶反応が起こらない、などの利点がある。そこで、ウイルスベクターなどを用いて生体内へ目的の遺伝子を導入し、肝細胞に必要な機能を付加することで、肝疾患に対しての効果が期待されている。本研究では、生体内へ導入する遺伝子として、肝細胞に有効に働き、かつ安全性の高い遺伝子に着目した。CCAAT/enhancer binding protein β（C/EBPβ）は肝切除時に発現が誘導される転写因子であり、正常な肝細胞の増殖には必須と考えられている。また、Thioredoxin（TRX）は細胞内 Redox 制御に関与し、抗アポトーシス作用を持ち、ラット初代培養肝細胞のアポトーシスとネクローシスを抑制することが報告されている。そこで本研究では、これらの遺伝子を用いた急性肝傷害

に対する遺伝子治療に関する研究を行った。

【結果・考察】

肝細胞と骨髄間質細胞の細胞移植に関する研究において、*in vitro* における検討として、肝細胞と骨髄間質細胞を孔径 1.0 μm のメンブレンで分離した細胞間接触のない共培養と、細胞間接触のある混合培養を行った。肝細胞と骨髄間質細胞の共培養における肝細胞機能は、Control と比較し高い値を示した。さらに、骨髄間質細胞から調製した Conditioned medium（BCM）を用いた肝細胞単独培養における肝細胞機能は Control と比較し高い値を示した。これらのことより、骨髄間質細胞が放出する因子は、肝細胞機能を高めることが示された。そこで、肝細胞と骨髄間質細胞を混合培養した多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを肝炎モデルマウスへ移植し、血中のアルブミン濃度を測定した。移植後２週後、混合培養ディスクを移植したマウスの血中アルブミン濃度は、肝細胞単独のディスクを移植したマウスと比較し、有意に高くなっていた。このことより、骨髄間質細胞は *in vivo* において肝細胞機能を上昇させ、肝細胞移植において有用な細胞であることが示された。

C/EBPβ遺伝子導入による肝傷害抑制に関する研究においては C/EBPβ組換えアデノウイルス（C/EBPβ-AdV）を作製し、肝傷害における有用性に関する検討を行った。最初に、ラットの初代培養肝細胞へ C/EBPβ-AdV を moi100 で感染させた。C/EBPβ-AdV 導入肝細胞の viability は、非感染肝細胞群と lacZ 組換えアデノウイルス（lacZ-AdV）導入肝細胞群の viability が大きく減少するのに対し、培養 12 日間ほぼ維持されていた。さらに C/EBPβ-AdV 導入肝細胞の viability 維持には、RT-PCR 解析と COX-2 の阻害剤である NS398 を用いた実験より、COX-2 が深く関与していることが示唆された。さらに、*in vivo* の検討においては、急性肝炎モデルマウスを用いて C/EBPβ遺伝子導入の効果を検討した。結果、C/EBPβ-AdV 投与マウス群の ALT、AST 活性は、非投与群及び LacZ-AdV 投与群と比較し、有意に低下していた。このことより、C/EBPβ-AdV が肝傷害に対して治療効果を示すことが明らかとなった。C/EBPβ遺伝子を用いた急性肝疾患に対する遺伝子治療は、有効な治療効果があると考えられる。

TRX 遺伝子導入による肝傷害抑制に関する研究においては、ヒト TRX 組換えアデノウイルス（TRX-AdV）を作製し、肝傷害における有用性に関する検討を行った。急性肝炎モデルマウスを用いて TRX、AdV の *in vivo* での効果を検討した。結果、TRX-AdV 投与マウス群の ALT、AST 活性と血中アンモニア濃度の上昇は、無処置マウス群及び LacZ-AdV 投与群と比較し、有意に低下していた。これらのことより、TRX-AdV は肝傷害を抑制し、その際の肝機能低下を抑制することが明らかとなった。本研究において TRX 遺伝子を用いた遺伝子治療は、肝傷害を抑制し、肝臓を保護する効果があることから、肝疾患の進行を抑制することが期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は組織工学および遺伝子工学的手法を用いて新しい肝疾患治療法を開発することを目的として行われた。多孔性のヒドロキシアパタイトディスクを担体とし肝細胞と骨髄間質細胞を充填して肝障害マウスへ移植を試み、治癒効果を確認した。肝細胞と骨髄間質細胞の共移植はこれまで報告がなく細胞移植に新しい方向性を示したと言える。さらに転写因子である C/EBPβ遺伝子、レドックス制御に中心的な役割を担うチオレドキシン遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み肝障害モデルマウスへ導入し、治癒効果を実証した。これらの研究結果は有効な治療法が現在存在しない急性肝不全および慢性肝炎の治療に応用が可能であり、学位論文として十分な価値を有すると判断する。