

厚生省特定疾患調査研究事業

特定疾患の分子病態の解明に関する研究

(H11-特定-40)

平成11年度 研究報告書

平成12年3月

班長 永井 良三

厚生科学研究費補助金総括研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

特定疾患の分子病態の解明に関する研究

総括研究者 永井良三 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科

研究要旨

特定疾患の基本病態として、原因不明の炎症、間質細胞の活性化、線維化、血管障害などが大きく関与する。本研究は特定疾患の病態解明と新しい治療法の開発を目指し、（１）神経、血球、心血管細胞の分化機構と幹細胞による再生療法の開発、（２）炎症のメカニズムと間質細胞の活性化および線維化の分子機構、（３）血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的とする。

永井良三

東京大学大学院医学研究科・循環器内科、教授

西川伸一

京都大学医学研究科分子遺伝学部門・免疫学、
発生学、教授

中福雅人

東京大学大学院医学系研究科神経生物学・分子神
経生物学、助教授

千葉 滋

東京大学大学院医学系研究科・血液内科学、助手
宮園浩平

癌研究会癌研究所・生化学部、部長

中村敏一

大阪大学大学院医学系研究科附属バイオメディカ
ル教育研究センター腫瘍医学部門分子細胞生物
学、教授

上野 光

九州大学医学部附属病院冠動脈疾患治療部・循環
器内科、講師

門脇 孝

東京大学大学院医学研究科糖尿病・代謝内科、
講師

小室一成

東京大学大学院医学研究科・循環器内科、講師

森下竜一

大阪大学大学院医学系研究科・遺伝子治療学、
助教授

(研究協力者)

長田道夫

筑波大学臨床医学系・病理部、助教授

津田丈秀

東北大学医学部・神経内科、助手

たな治療戦略の構築が可能となる。

本研究は特定疾患の病態解明と新しい治療法の開発を目指し、（１）神経、血球、心血管細胞の分化機構と幹細胞による再生療法の開発、（２）炎症のメカニズムと間質細胞の活性化および線維化の分子機構、（３）血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的とする。

本研究は再生医学や血管医学の視点から、特定疾患の病態を解明すると共に、新しい治療法の開発を目指している。同時に、間質細胞の活性化や線維化、炎症の分子機構に基づいた治療法の開発も重要な目的とする。

B. 研究方法

・西川は、試験管内血管構築形成について検討する。血管内皮、血管平滑筋、血液細胞に焦点を絞り、ES細胞からそれぞれの細胞系列への分化を人為的に誘導するための基礎技術を確立する。

・中福は、神経幹細胞を用いた神経組織の再生・修復のための新規治療の開発について検討する。神経幹細胞の単離・培養法を確立し、その増殖と分化の分子機構を解明する。また幹細胞の脳内移植によって損傷・変性神経組織を再生・修復する新規治療法を開発する。

・千葉は、Notchリガンドによる造血制御について検討する。骨髄幹細胞の増殖分化シグナルを解析し、幹細胞を大量に増幅するシステムを確立する。
・宮園は、増殖因子を介する臓器繊維化のメカニズムとその制御について検討する。TGF- β の細胞内シグナル伝達を司るSmadによるシグナルのメカニズムを明らかにし、臓器の線維化のシグナルを特異的に制御する方法を探る。

・中村は、器官再生と治療への応用について検討する。生体の修復因子と考えられるHGFを用いて、臓器傷害や組織破壊によって起こるさまざまな疾患に有効な治療薬となりうる可能性を検討する。

・上野は、炎症と繊維化のメカニズムと防止について検討する。炎症の遷延化や炎症に引き続く臓器線維化に重要と考えられる分子群、とくにTGF- β を始めとする増殖因子をアデノウイルスに組み込んでin vivo投与し、その動的役割の解明と臓器線維化に対する治療法を検討する。

A. 研究目的

特定疾患の基本病態として、原因不明の炎症、間質細胞の活性化、線維化、血管障害などが大きく関与する。したがって線維化や血行障害、さらに細胞分化の分子機構を明かにし、これらの分子病態に基づいた治療法を開発することにより、特定疾患の新

・門脇は、PPAR γ アゴニストを用いた炎症性腸疾患の新しい治療法の確立について検討する。炎症性腸疾患（IBD）における炎症の分子機構を解析する。とくに大腸特異的に高発現し抗炎症的に働きうるPPAR γ の合成アゴニストを、化学物質によるIBDモデルマウスに投与することにより、新しい治療法の確立を目的とする。

・小室は、心筋細胞分化と細胞移植について検討する。P19CL6細胞を用いて、心筋細胞への分化の分子機構を検討する。またP19CL6細胞を分化、もしくは未分化のままマウスの心臓に注入し、その細胞が*in vivo*の心臓の環境下において心筋細胞に分化するか否かを検討する。

・森下は、動脈硬化形成における炎症の関与を解明し、治療法への応用を検討する。

・永井は、老化関連遺伝子klothoの病態生理学的意義について検討する。血管内皮の保護作用をもつklotho蛋白の分子機構の解明を行なうと共に、klotho蛋白もしくはklotho遺伝子の投与が臓器の血行を改善し、特定疾患の新しい治療法として確立しうるかについて検討する。

C・D. 結果と考察

・西川は、試験管内血管構築形成について検討した。血管構築のリモデリングを探る目的でFlt4に対する機能阻害抗体を樹立し、この抗体を用いて癌による血管新生のどの段階でこの分子が機能しているのかを明らかにした。また、網脈血管新生モデルを用いて、血管リモデリングにおける内皮と周囲細胞の相互作用について検討した。さらに、血管内皮細胞とその周囲細胞をES細胞から分化させるための実験系を確立した。組織における血管リモデリングの過程を明らかにしたとともに、リモデリングの細胞生物学を推進するための材料調製のためのES細胞分化実験系を確立した。

・中福は、神経幹細胞を用いた神経組織の再生・修復のための新規治療の開発について検討した。脳内細胞移植における神経幹細胞を用いるための基礎技術として、神経組織より幹細胞を選択的に単離し、試験管内で培養・維持する技術を確立した。また、神経幹細胞の自己複製能の維持に関わるNotchシグナル伝達系において、新規シグナル分子Deltex-1の機能を明らかにした。この知見は、幹細胞の大量培養法へ応用可能と考えられる。

・千葉は、Notchリガンドによる造血制御について検討した。Notchによる造血細胞におけるシグナルについて検討した。Notchは造血細胞上のNotch2を受容体とし、Notch2を活性化してシグナルを伝える。その結果、造血細胞の複製の系統への分化を抑制することを明らかにした。Notchを用いた造血肝細胞の対外増幅に応用可能と考えられる。

・宮園は、増殖因子を介する臓器繊維化のメカニズムとその制御について検討した。TGF- β によるSmadの転写活性化の選択性のメカニズムについて検討し、また抑制型SmadによるBMPシグナルの選択性のメカニズムについて検討した。さらに、プレオマ

イシン肺繊維化モデルにSmad7を投与した結果、*in vivo*での繊維化が著明に抑制された。Smadの作用を調節することによって繊維化を抑制できることを明らかにした。

・中村は、器官再生と治療への応用について検討した。HGFからみた慢性腎不全の発症と治療と肝硬変の治療法について検討した結果、1) HGF投与が慢性腎不全に対して、強力な治療効果を有した。また2) HGF遺伝子治療によりラット肝硬変を治療することに成功した。HGF蛋白質の投与あるいは遺伝子治療が慢性腎不全、肝硬変に対して強力な治療効果を有することを明らかにした。

・上野は炎症と繊維化のメカニズムと防止について検討した。TGF- β による信号伝達が遮断される、細胞内キナーゼ部分を欠失した変異型II型TGF- β 受容体を組み込んだアデノウイルスベクターを用い、TGF- β が臓器繊維化の発症・進展に必須であることを示した。繊維化の抑制は臓器機能保全に働くことを示すとともに、抗TGF- β 療法の臨床応用の可能性が示された。

・門脇は、PPAR γ アゴニストを用いた炎症性腸疾患の新しい治療法の確立について検討した。PPAR γ リガンドはマウス虚血再灌流腸管傷害を強力かつ早期に抑制した。PPAR γ が虚血再灌流臓器傷害に有効であることを示すとともに、短時間で転写調節することを明らかにした。

・小室は、心筋細胞分化と細胞移植について検討した。P19CL6細胞を用いて、BMPはTAK1, Smadを活性化し、さらに転写因子CsxとGATA4を活性化することにより、心筋細胞の分化を誘導することを示した。心筋の分化誘導およびその制御に関わるパスウェイを明らかにした。

・森下は、動脈硬化形成における炎症の関与を解明し、治療法への応用を検討した。NFkBデコイ導入は、バルーン傷害後再狭窄抑制をもたらした。動脈硬化の新しい治療戦略として重要であることが示唆された。

・永井は、老化関連遺伝子klothoの病態生理学的意義について検討した。klotho欠損マウスにみられる肺気腫について検討した。分子レベルでの検討から、細胞外マトリックスの修復・再生機能低下やII型肺胞上皮細胞の機能異常が推察された。klotho欠損マウスは単一遺伝子の機能異常により肺気腫を自然発症する極めて特異なマウスであり、ヒトでみられる肺気腫の病態を分子レベルで解析する上で貴重な動物モデルと考えられる。

E. 結論

特定疾患の病態解明と新しい治療法の開発を目指し、(1) 神経、血球、心血管細胞の分化機構と幹細胞による再生療法の開発、(2) 炎症のメカニズムと間質細胞の活性化および線維化の分子機構、(3) 血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的とした研究を行った。

本年度は、上記3プロジェクト全てについて成果をあげた。1) 神経、血球、心血管細胞の分化機構

と幹細胞による再生療法の開発の場合、西川による血管の再構築系の確立、中福による神経幹細胞の試験管内での培養・維持、さらに小室による心筋分化パスウェイの解明等が主な成果である。2) 炎症のメカニズムと間質細胞の活性化および線維化の分子機構の場合、宮園のSmadの調節を通じた繊維化の抑制、中村によるHGF投与による腎不全、肝不全の治療、さらに上野による抗TGF- β 療法による繊維化の抑制などが主な成果である。門脇による炎症性腸疾患に対するPPAR γ を用いた新しい治療法の開発も重要である。3) 血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的とした研究の場合、森下による転写因子NFkBに対するデコイ導入によるバルーン傷害後再狭窄抑制などが主な成果である。以上のように、本年度は、特定疾患の分子病態の解明および治療の開発に関わる成果をあげることができた。

厚生科学研究費補助金分担研究報告

研究要旨

Klotho遺伝子は、マウスでの挿入変異解析を通して明らかになった早期老化に関わる新規遺伝子である。Klotho遺伝子の欠損マウスは、成長障害、動脈硬化、骨粗鬆症、不妊症、皮膚萎縮、歩行障害、肺気腫等の多彩な早期老化の症状を呈する。本研究は、個体老化を抑制する新規遺伝子klothoの病態生理学的意義を明らかにする。本年度は肺気腫におけるklothoの機能解析を行った。最終的にはklotho蛋白の治療薬として有用性を持つか否かを明らかにする。

A. 研究目的

急速に高齢化が進む我が国において、老化性疾患に対する対策は医療上の最重要課題である。老化性疾患の発症機序や成因を解明し、治療法を開発すれば、医学のみならず社会全体に大きく貢献する。

Klotho遺伝子は、マウスでの挿入変異解析を通して明らかになった早期老化に関わる新規遺伝子である。Klotho遺伝子の欠損マウスは、成長障害、動脈硬化、骨粗鬆症、不妊症、皮膚萎縮、歩行障害、肺気腫等の多彩な早期老化の症状を呈する。Klothoの機能解析を通して、老化の病態機序・制御機構の一面を解明することが可能である。

本研究は、申請者が単離した老化抑制因子Klothoに焦点を当てて老化のメカニズムを解明し、制御・治療法を開発することを目的としている。

B. 研究方法

本年は肺気腫におけるklothoの機能解析を行った。

Klotho欠損マウス（ホモ接合体）は、生後4週より肺気腫を認める。肺気腫におけるklothoの役割を明らかにするために、野生マウスとの比較検討を行い、次の項目について検討した。

1. 病理組織
2. 呼吸機能
3. 遺伝子発現（ノザンブロット解析、ディファレンシャル・スクリーニング）

本研究は、ヒトを対象とした者ではなく、倫理的な問題はないと考えられる。

D. 研究結果

1. 病理組織

Klotho欠損マウス（ホモ接合体）は生後4週より肺気腫を呈した。所見としては、炎症細胞の浸潤、間質の繊維化を伴わない肺胞の拡大を認めた。週齢とともに病態は進行し、生後10週では肺胞の石灰化を認めた。Klotho欠損マウス（ヘテロ接合体）は生後120週でホモ接合体と同様に、肺気腫を呈した。

2. 呼吸機能

Klotho欠損マウス（ホモ接合体）は、体重に比し肺容量が大きく、過膨張の所見を示した。また、呼吸時間の延長、dynamic complianceの高値等肺気腫の所見を示した。

3. 遺伝子発現

ノザンブロット解析：肺気腫で遺伝子発現が変化することが知られている遺伝子の発現を検討した。Klotho欠損マウス（ホモ接合体）では、コラーゲンIV型、SP-A等の遺伝子発現が亢進していた。一方、MnSOD、TGF- β 1、EGR-1、 β -actin等の遺伝子の発現はklotho欠損マウスと野生マウス間で変わらなかった。

ディファレンシャル・スクリーニング：Klotho欠損マウスでは、ATP合成に関わるミトコンドリア遺伝子の発現が亢進していた。

D. 考察

・Klotho欠損マウス（ホモ接合体）は生後4週より肺気腫を呈し、進行性の病態を示した。構造・機能両面から肺気腫の所見と合致した。病理組織的な観察から、細胞外マトリックスやII型肺胞上皮細胞の傷害が肺気腫形成の原因と考えられた。生後に肺気腫を示すが、発生異常を示さないことから、klotho遺伝子は、肺胞の構造・機能の維持に必要であることが示された。

・遺伝子発現の解析の結果、klotho欠損マウス（ホモ接合体）では、コラーゲンIV型、SP-A等の遺伝子発現が亢進していた。コラーゲンIV型は細胞外マトリックスの重要な成分であり、またSP-Aはエラストラーゼによる肺気腫形成に対して保護作用を示すことから、これらの遺伝子の発現の亢進は傷害に対する代償作用を反映すると考えられる。

ATP合成に関わるミトコンドリア遺伝子の発現も亢進していた。ATP合成の低下は細胞死につながるため、ATP合成遺伝子の発現亢進も代償的な作用を反映するものと考えられる。

E. 結論

klotho欠損マウス（ホモ接合体）では、生後4週より肺気腫を認め、細胞外マトリックスやII型肺胞上皮細胞の傷害が肺気腫形成の原因と考えられた。また分子レベルでの検討から、細胞外マトリックスの修復・再生機能低下やII型肺胞上皮細胞の機能異常が推察された。ホモ接合体は単一遺伝子の機能異常により肺気腫を自然発症する極めて特異なマウスであり、ヒトでみられる肺気腫の病態を分子レベルで

解析する上で貴重な動物モデルと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suga T et al., Am J Respir Cell Mol Biol 22:26-33, 2000.

2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

試験管内血管構築形成に関する研究
分担研究者 西川 伸一 京都大学医学研究科

研究要旨

血管構築のリモデリングのプロセスを明らかにし、試験管内での組織化された血管構築の再現を目指し、1) ガン血管新生、2) 網膜血管新生をモデルにリモデリングプロセスの現象論的解析を行った。同時に、ES 細胞から血管内皮、周囲細胞を試験管内で

西川伸一・京都大学医学研究科教授

A.研究目的

血管はあらゆる組織に必須の、しかし独立した組織である。従って、再生医学やガンの治療等は、血管構築についての理解無しに構想できない。組織自体は内皮と周囲細胞（平滑筋も含む）より構成される比較的単純なものであるが、それにより形成される構築には大きなバリエーションが認められ、現在なお試験管内で組織化された血管構築を再現することは困難である。本研究では、血管構築の組織化の原理を明らかにし、その知識に基づき組織化された血管構築を試験管内で再現することを目的とする。

B.研究方法

この班では1) 血管の組織化の過程を様々なモデルで記載し、それぞれの過程に関わる分子を明らかにする、

2) 血管内皮や周囲細胞等の血管構成細胞をES細胞から分化させ、それを用いて試験管内での血管構築を試みる。

この目的のため、1) ではガン組織での血管新生、網膜血管形成、末梢リンパ組織の特殊血管網形成をモデルとして、そこで生起しているプロセスを、先ず現象論的に記載することをを行った。2) ではES細胞から血管構成成分を試験管内で生産する可能性を検討した。これらは全てマウスを用いた研究であり、現在医療倫理的な側面を考慮する段階ではない。

C.研究結果

血管構築のリモデリングにはこれまでTie2, PDGFR β , VEGFR3等の分子が関わることが知

られているが、リモデリングがどのような細胞学的プロセスにより調節されているかはほとんど明らかになっていない。

我々は、Flt4について先ず機能阻害抗体を樹立し、この抗体を用いてガンによる血管新生のどの段階でこの分子が機能しているのか、現象論的に研究を行った。その結果、血管新生時に内皮の integrity が維持される必要があるが、この分子の機能が阻害されるとこの維持機構が傷害され最終的にその部位で出血が起こることが明らかになった。

一方、新生児時期に始まる網膜血管新生は、様々な操作を加えることが可能である点でユニークな実験対象である。一方、血管のリモデリングにおいて内皮と周囲細胞の相互作用が重要な役割を演じていることが予想されている。この点を詳細な現象論的解析が可能な網膜血管新生をモデルに検討した。

網膜血管新生においては、既存の血管の周りにランダムな vascular plexus が形成され、次にこの plexus の中から動脈が選択される（多分血流によるストカスティックな過程を基盤とする）。次のプロセスをトリガーしている分子については現在の所明らかではないが、この結果動脈のみに 1A4 陽性周囲細胞が migrate する事で、組織的にも動脈としての性格が付与されるという組織学的プロセスを明らかにした。この過程で、PDGFR β 分子の機能を抑制すると、周囲細胞の成長とともに動脈としての組織構築が阻害され、結果として血管系は vascular plexus のままで終わってしまうことが明らかになった。

これら現象論的記載は、それをもう一度試験管内で再現するための方策を着想するために行っているが、これと平行して、血管内皮細胞と、その周囲細胞をES細胞より分化させるための実験系について研究し、内皮と周囲細胞が同じ側板中胚葉に由来すること、またVEGF, PDGF-BBを加えることで、それぞれの系列への分化が促進されることを明らかにした。

現在それぞれの細胞集団が相互に作用し血管構築へと発展する試験管内実験系について試行錯誤を繰り返しているが、ようやく管腔と共に周囲細胞が内皮基底部分で相互作用できる実験系を確立することができた。

D. 考察

細胞を集めて組織化された構築を作ること、次世代の生物学の最も重要な課題である。この目的には血管はそれ自身の組織構成の単純さと、それがとりうる構築の複雑さで格好の材料である。また、多くの疾患に血管が関わっていることを考えると、この研究の将来に新たな再生医学の萌芽が存在することも明らかである。

我々はこの信念のもとで研究を始めてきたが、血管のリモデリングのプロセスについて現象論的な研究すら詳細に行われていないことに気づいた。従って、本研究班では現象論的な記述にも力を注いだ研究を行い、いくつかの成果が未発表ではあるが出てきた。

次の課題として、この組織レベルでの様々な知見を内皮や周囲細胞の細胞学へと分解していくことで、この点についてはまだまだスタートラインに立ったところである。ただ、ES細胞から内皮と周囲細胞を調整することが可能になったことで、正常細胞を用いた細胞生物学を推進するための基礎がようやく整ったと言える。

E. 結論

組織における血管リモデリングの過程を独自の視点で現象論的に整理し直すことができた。また、リモデリングの細胞生物学を推進するための材料調整のためのES細胞分化実験系を確立し、純化した血管細胞成分を調整することを可能にした。

F. 研究発表

本研究助成により行った研究は現在投稿中であり、論文発表としては1999年の発表論文を挙げておく。

- 1) Yokota Y et al., *Nature* 397, 702-706, 1999
- 2) Hirashima M et al. *Blood* 93, 1253-1263, 1999
- 3) Ogawa M et al, *Blood* 93, 1168-1177, 1999
- 4) Murayama T et al, *Circulation*, 99:1740-1746
- 5) Yoshida H et al *Int. Immunol.* 11:643-655
- 7) Mori S et al, *Mol. Brain. Res.*, 64, 199-210, 1999
- 8) Niida S et al, *J. Exp. Med.* 190, 293-298, 1999
- 9) Ito M et al, *J. Inv. Dermatol.* 112, 796-801, 1999.
- 10) Ikeda W et al, *J. Cell Biol.* 146, 1117-1131, 1999
- 11) Nishimura E. et al, *Dev. Biol.* 215, 155-166, 1999
- 12) Togawa A et al, *Oncogene*, 18, 5373-5380, 1999
- 13) Narumi O et al, *J Biol Chem*, 275: 3510-3521, 2000
- 14) Kataoka H et al, *Nucl. Acid Res.* 28: 626-633, 2000
- 15) Nishikawa SI et al, in "Hematopoiesis, developmental approach" ed. Zon LA, Oxford University Press. in press
- 16) Nishikawa SI et al, *Immunol Rev* in press
- 17) Nishikawa SI et al, *Curr Opin Immunol* in press.

G. 知的所有権の取得状況

なし。

神経幹細胞を用いた神経組織の再生・修復のための新規治療法の開発

分担研究者 中福雅人 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：齧歯類胎児および成熟個体神経組織より、脳内細胞移植法の材料となる神経幹細胞を単離し、試験管内で培養する技術確立した。また、神経幹細胞の自己複製能の維持に関わるNotchシグナル伝達系において、新規シグナル分子Deltex1の機能を明らかにした。

A. 研究目的

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患に対する治療法として脳内細胞移植法は極めて有効な手法として期待されており、欧米を中心に精力的な研究が進められている。しかしながら、従来移植に用いられてきた胎児由来神経細胞、脳腫瘍由来細胞、非神経系細胞などの細胞種は、倫理的な問題の他、技術的にも充分な量の移植細胞が得られない、移植後の脳内生着率・生存率が低いなどの様々な問題点が指摘されている。本研究ではこの問題を解決するため、移植ドナーとしてニューロン、グリアの共通の前駆細胞である神経幹細胞を用いる新しい治療法の開発の可能性を追及している。本年度は、移植療法への応用の基盤として必須である、神経幹細胞を長期にわたり継代維持し、分化させる技術を開発することを目的とした。また神経幹細胞の操作のための基礎となる、自己複製と分化の分子機構について解析した。

B. 研究方法

神経変性疾患や脳虚血疾患のモデル動物として最も良く用いられているラットを用いた。胎児および成熟個体より神経幹細胞を分離・同定し、既に当研究室で確立したNeurosphere法を用いて試験管内培養した。この際、種々のペプチド性因子の効果を検討した。また神経幹細胞の性質をより詳細に解析するために、神経幹細胞に由来した不死化細胞株を多数樹立した。不死化幹細胞に遺伝子導入によって種々の制御遺伝子を導入し、その生理機能を解析した。以上の研究における実験動物の使用にあたっては、全て学内実験動物取り扱い規定を遵守して行った。

C/D. 研究結果と考察

胎児および成熟個体の神経組織の初代培養系を用いて、神経幹細胞の増殖、生存を試験管内において効率よく再現する培養条件を確立した。種々の増殖・分化因子の効果を検討し、線維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子が神経幹細胞の自己複製能を強く促進することを見出した。この成果により、試験管内において神経幹細胞を数カ月にとわって継代・維持することが可能となった。また、培養幹細胞を増殖因子非存在下に分化誘導し、ニューロン、グリアへと分化させることが出来た。従来文献的に報告されている条件では、成熟個体由来の幹細胞の分化効率は数%と低かったのに対して、今回確立した培養条件では、長期培養した幹細胞よりニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを、それぞれ20-50%の高い効率で分化させることが可能となった。

また神経幹細胞の増殖・分化の分子機構を解析し、

細胞膜受容体であるNotchを介したシグナル伝達系が幹細胞の自己複製能の維持に重要な機能を果たしていることを明らかにした。特に、Notch受容体の下流で働く新規シグナル分子Deltex1が、核内で転写因子のcoactivatorとして働くp300と直接相互作用しその機能を抑制することを見出した。Deltex1は、p300への作用を介して幹細胞の分化の開始に働くMash1などのbHLH型転写因子の機能を抑制し、結果的に幹細胞の未分化状態の維持に働くものと考えられた。

E. 結論

脳内細胞移植に神経幹細胞を用いるための基礎的技術として、神経組織より幹細胞を選択的に単離し、試験管内で培養・維持する技術確立した。また、神経幹細胞の自己複製能の維持に関わるNotchシグナル伝達系において、新規シグナル分子Deltex-1の機能を明らかにした。今後はこの知見を、幹細胞の大量培養法のさらなる改良に応用していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M. Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126, 443-456 (1999).
- 2) Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* 274, 8143-8152 (1999).
- 3) Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C-C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126, 3915-3924 (1999).
- 4) Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C-C. Mouse suppressor of fused is a negative regulator of Shh signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr. Biol.* 9, 1119-1122 (1999).
- 5) 神経幹細胞の分子生物学. 中福雅人 神経研究の進歩 43巻, 863-870 (1999).

2. 学会発表

- 1) 脳の発生から再生へ：神経幹細胞の分子生物学 第22回日本分子生物学会ワークショップ (1999).
- 2) 神経幹細胞の分子生物学 第14回神経組織の成長・再生・移植研究会ワークショップ (1999).

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

Notch リガンドによる造血制御に関する研究

分担研究者 千葉 滋 東京大学医学部附属病院無菌治療部助手

研究要旨：Notch 受容体は細胞内に分化抑制シグナルを伝達する。このため、体外で造血幹細胞を分化させずに増幅する技術への応用が期待される。まず造血細胞分化抑制のモデル系として、32D 細胞の好中球分化やフレンド赤白血病細胞の赤芽球分化を用いた。これらの細胞のそれぞれの系統への分化が、活性型 Notch 導入によって抑制されることを確認した。一方、3種類のマウス Notch リガンドが造血細胞上の Notch2 を受容体とすることを、結合、細胞内へのシグナル伝達の面から証明した。造血幹細胞の体外増幅には、全長型の Notch リガンドを用いることが重要であることがわかり、今後の研究の土台が築かれた。

千葉 滋・東京大学医学部附属病院無菌治療部・助手

A. 研究目的

Notch リガンドによる造血細胞上の Notch 受容体を介するシグナルを理解する。次のステップとして、その知識を造血幹細胞を分化させずに体外で増幅する技術に応用する。

B. 研究方法

マウス Notch1 の細胞内領域だけを発現するコンストラクトを作成し、IL-3 依存性マウス骨髓系細胞株 32D、およびマウス赤白血病細胞株 F5-5 に導入した。薬剤耐性化したクローンの中から、導入した遺伝子を発現する複数のクローンを選択し、コントロールプラスミドを導入して薬剤耐性化した複数のクローンと、分化誘導による形態の変化あるいはヘモグロビン合成能の変化を観察した。32D の分化誘導には 10 ng/ml の G-CSF を、F5-5 の分化誘導には 5 ng/ml の ActivinA を用いた。

DSL 領域の混合プローブでマウス cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、新規配列を有するクローンが得られた。これは Jagged1 のマウスホモログであることがわかった。このクローンおよびこれ以外に得られた Jagged2 クローンについて、全長をクローニングし、供与を受けたマウ

ス Delta1 と合わせて実験に用いた。それぞれについて、免疫グロブリン Fc 部分と融合させた可溶性蛋白質、および全長蛋白質を発現させた CHO 細胞を作成した。可溶性については培養上清から Fc 融合蛋白質を純化して、結合実験や細胞刺激実験に用いた。結合実験は野生型マウス B 細胞系未熟細胞株 BaF3 を用い、可溶性では FACS を用いて、全長型では発現 CHO 細胞への接着を指標として解析した。刺激による Notch2 蛋白質の切断などの生化学的解析にも野生型 BaF3 細胞を用いた。転写活性化の解析には、BaF3 の他、全長型 Notch2 を発現させた CHO 細胞を用いて野生型 CHO 細胞と比較した。転写活性化実験に用いたレポーターは、RBP-Jk 結合配列を繰り返すプロモーターまたは RBP-Jk の標的遺伝子と考えられている HES1 および HES5 のプロモーターで、これにルシフェラーゼ遺伝子をつないだものである。

なお、これまでの研究はすべて直接臨床材料を使用したりせず、患者の関与する部分は全くなかったため、特に倫理面への配慮を必要としなかった。

C. 研究結果

G-CSF 刺激により好中球に分化可能な細胞株 32D、およびアクチビン A 刺激によりヘモグロビン産生細胞に分化可能な細胞株 F5-5 に、活性型 Notch を導入する

ことにより、それぞれの刺激下における分化はどちらの細胞株においても著明に抑制された。これらの細胞における Notch 活性化による分化抑制の機構として、GATA-2 の発現制御が関与していることが示された。一方、Notch のリガンドと予想されるマウス Delta1、Jagged1、Jagged2 が、造血細胞上では主に Notch2 に結合した。全長型リガンドは Notch2 の細胞内切断・核への移行・切断断片のリン酸化を誘導し、最終的に核内で RBP-Jk の標的遺伝子の転写を活性化した。可溶型リガンドは結合後のシグナルが不完全で、転写活性可能は極めて弱かった。

D. 考察

Delta1、Jagged1、Jagged2 はいずれも Notch2 の生理的なりガンドである可能性がある。これらが造血細胞上の Notch2 あるいは他の Notch 受容体に結合することにより、Notch シグナルを ON として、最終的に造血細胞の種々の系統において、分化を制御していることが示唆される。造血細胞の体外増幅において、Delta1、Jagged1、Jagged2 が有用な材料になることが期待される。

E. 結論

3 種類のマウス Notch リガンドは造血細胞上の Notch2 を受容体とし、リガンドの結合後 Notch2 を活性化してシグナルを伝える。活性化 Notch は、造血細胞の複数の系統への分化を抑制する。Notch 系は造血組織における造血幹細胞の自己複製に重要と考えられ、全長型 Notch リガンドを用いた造血幹細胞の体外増幅に応用可能である。

F. 研究発表

(論文)

Shimizu K, Chiba S, Kumano K, Hosoya N, Takahashi T, Kanda Y, Hamada Y, Yazaki Y, Hirai H.
Mouse Jagged1 physically interacts

with Notch2 and other Notch receptors: assessment by quantitative methods. J. Biol. Chem. 274:32961-32969, 1999.

(学会)

第 61 回日本血液学会

Notch シグナルの造血における役割

熊野恵城, 千葉滋, 細谷紀子, 矢崎義雄, 平井久丸

東大病院無菌治療部, 血液・腫瘍内科

第 19 回血液幹細胞シンポジウム

Notch シグナルによる血球分化抑制作用における GATA-2 の関与について

熊野恵城, 千葉滋, 清水清, 細谷紀子, 平井久丸

東京大学大学院医学系研究科

血液・腫瘍内科

第 41 回日本臨床血液学会総会

Notch シグナルによる系統特異的な転写因子の発現に関する解析

熊野恵城, 千葉滋, 細谷紀子, 平井久丸
東大病院無菌治療部, 血液・腫瘍内科

G. 知的所有権の取得状況

*GenBank に登録、ID 番号 : AF171092

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

増殖因子を介する臓器線維化のメカニズムとその制御

分担研究者 宮園 浩平 （財）癌研究会癌研究所生化学部 部長

研究要旨 TGF- β は組織の線維化を強力に促進する因子である。TGF- β はSmadを介してシグナルを伝える。本研究ではSmadによるシグナルのメカニズムを明らかにし、抑制型Smadなどを使って臓器の線維化を制御することを目的として研究を行った。その結果、抑制型SmadであるSmad6とSmad7のうち、BMPシグナルの抑制には両者はほぼ等しい作用を持つが、TGF- β シグナルの抑制はSmad7の方が強力であった。骨芽細胞への分化はSmad6、Smad7の両者によって抑制できた。一方、Smad7はブレオマイシンによる肺の線維化モデルで線維化を著明に抑制し、今後の臨床応用などへの可能性を示すことができた。

A. 研究目的

TGF- β は増殖抑制因子であると同時に組織の線維化を強力に促進する因子であることが知られている。TGF- β はセリン-スレオニンキナーゼ型レセプターに結合し、Smadを介してシグナルを伝える。Smadは核内で転写因子として働き、プラスミノーゲンアクティベーターインヒビターなどの発現を促進する。本研究ではSmadによるシグナルのメカニズムを明らかにし、臓器の線維化のシグナルを特異的に制御する方法を探ることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

Smadの転写活性はp3TP-LuxやARE-Luxなどを用いて行った。SmadのDNAへの結合はgel shift assayやDNA affinity purification assay (DNAP) を用いた。また抑制型Smadの作用はアデノウイルスベクターに組み込んだSmadを用いて行った。骨芽細胞への分化はC2C12細胞でのアルカリフォスファターゼを染色することによって調べた。さらにマウスにブレオマイシンで肺の線維化を誘導し、アデノウイルスに組み込んだSmadを経気管的に投与して調べた。本研究で

は当該施設での実験動物に関するガイドラインを遵守して実験を行った。

C. 研究結果

- 1) Smad2とSmad3はともにTGF- β のシグナルを伝えるが、転写活性はSmad3の方がはるかに強力である。これはSmad3のみがDNAに直接結合することができることによるものである。一方、Smad2はSmad4を介してはじめてDNAと結合することができた。
- 2) 抑制型SmadであるSmad6とSmad7のうち、BMPシグナルの抑制には両者はほぼ等しい作用を持つが、TGF- β シグナルの抑制はSmad7の方が強力である。骨芽細胞への分化はSmad6、Smad7の両者によって抑制できた。
- 3) ブレオマイシンによる肺の線維化モデルではTGF- β の関与が知られている。アデノウイルスに組み込んだSmad7を経気管的に投与して調べた結果、in vivoでの線維化を著明に抑制した。

D. 考察

Smad2はSmad3にくらべてその作用が弱いことが知られているが、本研究でSmad2が直接DNAに結合しないことがその一因であることが示唆された。

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入は効率よく遺伝子を導入できることから、目的とする遺伝子の生物学的作用を明らかにするうえで有用であると思われる。本研究で、Smad6とSmad7の作用の違いを明らかにするとともに、*in vivo*でのSmad7の線維化抑制を明らかにできた点は、今後の臨床応用に極めて重要であると思われる。

F. 結論

SmadはTGF- β のシグナルに中心的な役割を果たしている。Smadの作用を調節することによって線維化を*in vivo*で抑制できることが明らかとなった。線維化にTGF- β シグナルがSmadを介してどのように作用しているかについては、Smadと結合する転写因子の検索などがさらに必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M. and Miyazono, K. (1999) Alternatively-spliced variant of Smad2 lacking exon 3: Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J. Biol. Chem.* 274 (2), 703-709
- 2) Das, P., Inoue, H., Baker, J.C., Beppu, H., Kawabata, M., Harland, R.M., Miyazono, K., and Padgett, R.W. (1999) *Drosophila* dSmad2 and Atr-I transmit activin/TGF β signals. *Genes Cells* 4 (2), 123-134.
- 3) Nakao, A., Fujii, M., Matsumura, R., Kumano, K., Saito, Y., Miyazono, K., and Iwamoto, I. (1999) Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 104 (1), 5-11.
- 4) Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., Miyazono, K. (1999) Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblastic and chondroblastic differentiation. *Mol. Biol. Cell* 10 (11), 3801-3813.

- 5) Miyazono, K., ten Dijke, P., and Heldin, C.-H. (2000) TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* in press.
- 6) Miyazono, K. (2000) TGF- β signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* in press.

厚生科学研究費補助金（特定疾患調査研究事業） 分担研究報告書

器官再生と治療への応用

分担研究者 中村敏一 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

肝硬変、慢性腎不全は慢性的な組織の傷害・炎症によって引き起こされ、組織の線維化と相反する臓器機能の低下・破綻を特徴とする難治性疾患である。本研究において、TGF- β の発現上昇と相反的に、内因性再生・修復因子である HGF が枯渇することが慢性腎不全や肝硬変といった慢性線維性疾患の発症につながる一方、HGF 投与ならびに HGF 遺伝子治療法によって HGF を外因的に補うことが慢性腎不全ならびに肝硬変に対する有効な治療法となることを明らかにした。これらの成果は再生医学に根ざした難病の根本治療の具体例・先駆例であり、今後、前臨床相実験を行うとともに、できるだけ早期に、世界に先駆けて HGF による肝硬変、慢性腎不全治療が実践されるよう準備をする必要があると思われる。

A. 研究目的

肝硬変、慢性腎不全、心筋症、糖尿病などの臓器疾患は代表的難治性疾患であり、これら慢性進行性疾患の治療を目的として、再生医学に根ざした根本的治療法を確立することこそ厚生科学のはたすべき医療課題といえる。申請者は HGF（肝細胞増殖因子）を長らく不明であった肝再生因子の実体として発見・単離・クローニングするとともに、HGF が肝再生に留まらず各種臓器・組織において再生・修復因子として機能することを明らかにした。本研究は各種難治性疾患モデル動物を用いて、これら疾患に対する HGF 投与あるいは HGF 遺伝子を gene drug とする遺伝子治療の有効性を実証し、根本的治療法がなかった疾患に対する治療法を確立することを目的とした。平成 11 年度においては、(1) HGF からみた慢性腎不全（腎硬化症）の発症機構と HGF による慢性腎不全の治療、ならびに (2) HGF 遺伝子治療による肝硬変の治療について研究成果を得た。

B. 研究方法

(1) HGF からみた慢性腎不全の発症と治療

慢性腎不全を自然発症する ICGN マウスを用いて慢性腎不全の発症と治療における HGF の機能を解析した。ICGN マウスにおける慢性腎不全（腎硬化）の進行にともなう HGF ならびに TGF- β 、尿細管の再生、線維成分の蓄積、アポトーシスなど

を免疫組織学的解析ならびに ELISA 等により解析した。また、内因性 IIGF を中和するため、14 週齢（明らかな腎不全ならびに腎線維化が認められた段階）の ICGN マウスに抗 HGF 抗体を 250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の用量で隔日に計 4 回投与し 10 日目に解析した。一方、HGF の治療効果を解析するため、ヒトリコンビナント HGF を 14 週齢の ICGN マウスに 500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の用量にて 28 日間連日腹腔内に投与し 28 日目に解析を行った。

(2) HGF 遺伝子治療による肝硬変の治療

ラットに dimethylnitrosamine (DMN) を 10 mg/kg 体重の用量にて 3 日間連日投与する処理を 6-7 週間にわたり継続し、肝硬変モデルを作製した。DMN 投与肝硬変ラットに DMN 処理を継続しながら、HGF 遺伝子発現ベクターを含む HVJ リボソームを、1 週間に 1 回、計 4 回ラット腎筋組織に注射し、42 日後あるいは 49 日後のラット肝臓を各種解析に用いた。肝硬変に対する HGF の効果ならびに作用機作を調べるため、ラット肝臓における TGF- β の発現、肝細胞の増殖・再生、アポトーシス、線維化、ならびに生存に対する HGF 遺伝子治療の効果を調べた。

C. 研究結果

(1) HGF からみた慢性腎不全の発症と治療

ICGN マウスでは生後約 10 週目から徐々に腎機

能の低下が認められ、約 18 週目には腎機能は著しく低下し腎不全の末期となる。このような慢性腎不全の発症・進行に伴い、腎臓の線維化をもたらす主因子である TGF- β の発現が著しく増加したが、この TGF- β の発現上昇は、コラーゲンレベルの増加（腎線維化の進行）、尿細管細胞のアポトーシスの増加とよく相関し増加した。これに対して、HGF の発現は TGF- β と相反的に減少の一途をたどり、HGF の発現低下は、尿細管細胞の増殖・再生能の低下とよく相関した。この結果は、内因性 HGF の低下が慢性腎不全の発症・進行の要因となることを示唆していた。そこで、内因性 HGF レベルが減少することが慢性腎不全の発症・進行において重要な意義をもつかどうかを調べるため、内因性 HGF をブロックすべく、生後 14 週目から HGF に対する中和抗体を投与した。その結果、抗 HGF 抗体を投与した場合、腎臓における TGF- β レベルは増加し、これと相関して、コラーゲンの蓄積、尿細管細胞のアポトーシスが増加する一方、増殖・再生する尿細管細胞の数は強く抑制された。この結果は内因性 HGF をブロックすることにより、約 4 週間の間に起こる線維化、腎不全の進行がたった 8 日間の間にいっきに増悪したことを示している。したがって内因性 HGF は TGF- β と拮抗し慢性腎不全の進行を抑制するように機能していると考えられる。

上記の結果は慢性的に起こる腎傷害が引き金になり、TGF- β の発現が増加すると相反的に内因性修復因子としての HGF が徐々に枯渇していくことが慢性腎不全の進行をもたらすことを示している。したがって、HGF の低下を補うべくリコンビナント HGF を外因的に補ってやることが病態の進行を食い止めるとともに病態の改善をもたらす可能性が考えられた。そこで ICGN マウスを用いて腎線維化が進行し腎機能の低下が認められた時期（生後 14 週）から 4 週間、HGF を連日投与した。HGF を投与したマウス腎臓では TGF- β の発現、コラーゲンなど細胞外マトリックスの蓄積、ならびに尿細管細胞のアポトーシスが強く抑制される一方、尿細管細胞の増殖・再生が促進された。これらの結果は HGF の作用は単に線維化の進行を食い止めるのではなく、積極的に組織の改変（remodeling）を促すことを示唆しているが、実際に HGF を投与したマウス腎臓は投与前に比べ明らかに改善されており、これと一致して腎機能

の改善が認められた。

(2) HGF 遺伝子治療による肝硬変の治療

ラットに肝臓毒の一つであるジメチルニトロサミン（DMN）を 4 週間以上にわたり長期的に投与すると、肝臓にはコラーゲンなど細胞外マトリックス成分が著しく蓄積するとともに、肝機能が徐々に低下し、典型的な肝硬変を発症した。ラットは 4 週間を過ぎると肝硬変による肝不全が原因で死亡し、6 週後には 10 匹中たった 1 匹が生存し、7 週後にはすべてのラットが肝不全により死亡した。6 週後のラット肝臓では線維組織が著しく蓄積されており、もはや肝小葉構造は認められない。これに対して、DMN 投与開始後 4 週目から HGF 遺伝子治療を施すと、線維組織が急激に減少するとともに肝機能は HGF 遺伝子の用量に依存して改善され、高用量（40 $\mu\text{g}/\text{rat}$ ）においては全てのラットが肝不全に陥ることなく生存した。また、コントロールのラットでは肝細胞の著明なアポトーシスが認められたのに対して、HGF 遺伝子治療により、肝細胞アポトーシスが減少する一方、肝細胞の増殖・再生が促進された。さらに、慢性腎不全と同様に、肝硬変の発症過程では TGF- β の発現上昇と相反的に HGF の発現が低下したのに対して、HGF 遺伝子治療により TGF- β の発現は強く抑制された。

D. 考察

(1) 慢性腎不全は腎組織の著しい線維化と相反して腎機能が低下する疾患であり、現在その根本的治療法はなく、血液透析による代替的治療がなされている。しかしながら、血液透析による日常生活の苦痛はもとより、血液透析にかかる医療費は国内だけで約 1 兆円に達しており、大きな社会問題でもある。今回、慢性腎不全を自然発症するマウスを用いて、慢性腎不全の発症と治療を HGF を中心に解析した。これまで、臓器の慢性傷害・慢性炎症によって引き起こされる TGF- β の過剰発現が、慢性腎不全や肝硬変に代表される線維性疾患の発症につながる事が明らかにされていた。一方、今回の研究から、本来修復・再生因子として機能するべき HGF が枯渇してしまうことが、TGF- β の過剰発現と同等に、腎組織の線維化、腎機能の低下をもたらすことが初めて明らかになった。さらに、今回、HGF を外因的に投与すること

が、これまで不治の疾患、不可逆的な疾患と信じられてきた慢性腎不全に対して、強力な治癒作用をもつことを明らかにした。HGFによる強力な治療効果には、HGF投与によってTGF- β の発現が低下することも一つのメカニズムであるけれども、これに加え、HGFがもつ組織再生・改変促進活性が関与していると考えられる。すなわち、HGFは1) 尿細管の再生を促す一方尿細管のアポトーシスを抑制する、2) 細胞外マトリックスを融解するマトリックスメタロプロテアーゼを誘導・活性化する、3) 尿細管細胞の管腔構造を誘導する、4) 血管新生を促進する、といったHGFの多面的な活性によって、積極的に組織のremodelingを促し、強力な慢性腎不全に対する治癒をもたらされたものと思われる。すなわち、TGF- β の発現上昇と相反的にHGF発現が低下すること（TGF- β 優位になること）が慢性腎不全の発症・進行につながる一方、HGFを外因的に補いHGF優位のバランスにすることが、慢性腎不全の治癒につながっている。

(2) 今回HGF遺伝子治療によってラット肝硬変を治癒させることに成功した。これまで、肝硬変の発症においてもTGF- β の過剰発現が決定的な役割をもつことが示されてきたが、私達の解析から、肝硬変の発症と治療は、上記慢性腎不全と同様に、TGF- β とHGFの相反的バランスが、肝硬変の発症と治療をコントロールすることが明らかにされた。肝硬変も慢性腎不全と同様に、今なお不治の疾患であり、HGFによる肝硬変の治療はまさに画期的なものといえる。また、これまで遺伝子治療の大半は先天性酵素欠損症や癌を対象としたものであったが、今回の成果は慢性疾患を対象とした遺伝子治療実験の成功例であり、この点でも画期的な成果といえる。

(3) 今回の研究成果において最も重要な点は、HGF蛋白質の投与あるいはHGF遺伝子治療が、慢性腎不全、肝硬変といういずれの難病に対して強力な治療効果をもつことを示した点である。これらの成果は、まさに再生医学に根ざした難病の根本治療の具体例・先駆例であり、今後、前臨床相実験を行うとともに、できるだけ早期に、世界に先駆けてHGFによる肝硬変、慢性腎不全治療が実践されるよう準備をする必要があると思われる。

E. 結論

慢性腎不全や肝硬変といった慢性線維性疾患においては、TGF- β の発現上昇と相反的に、内因性再生・修復因子であるHGFが枯渇することがこれら疾患の発症につながる一方、HGF投与ならびにHGF遺伝子治療は、慢性腎不全ならびに肝硬変に対する有効な治療法となることを明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

- 1) T. Ueki, Y. Kaneda, H. Tsutsui, K. Nakanishi, Y. Sawa, R. Morishita, K. Matsumoto, T. Nakamura, H. Takahashi, E. Okamoto and J. Fujimoto (1999) Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nature Medicine*, 5, 226-230
- 2) Y. Liu, E.M. Tolbert, L. Lin, A. M. Sun, T. Nakamura and L. D. Dworkin (1999) Upregulation of hepatocyte growth factor receptor: an amplification and targeting mechanism for hepatocyte growth factor action in acute renal failure. *Kidney Intern.*, 55, 442-453
- 3) M. Tahara, K. Matsumoto, T. Nukiwa and T. Nakamura (1999) Hepatocyte growth factor leads to recovery from alcohol-induced fatty liver in rats. *J. Clin. Invest.*, 103, 313-320
- 4) J. Wojta, C. Kaun, J. M. Breuss, Y. Koshelnick, R. Beckmann, E. Hattey, M. Mildner, W. Weninger, T. Nakamura, E. Tschachler and B. R. Binder (1999) Hepatocyte growth factor increases expression of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human keratinocytes and the vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in human endothelial cells. Evidence for a paracrine loop in wound healing. *Lab. Invest*, 79, 427-438
- 5) Z. Jiao, T. Ohnishi, Y. Bando, Y. Chone, K. Kitaura, H. Uehara, Y. Suzuki, T. Nakamura and K. Izumi (1999) Effect of D-galactosamine hydrochloride and partial hepatectomy on spontaneous hepatic injury and hepatocarcinogenesis in Long Evans Cinamon rats. *Jp. J. Cancer Res.*, 90, 496-504
- 6) H. Azuma, S. Takahara, M. Kitamura, J.-D. Wang, A. Waga, S. Suzuki, K. Matsumoto, T. Nakamura, A. Okuyama and Y. Katsuoaka (1999) Effect of hepatocyte growth factor on chronic rejection in rat renal allografts. *Transplat. Proc.*, 31, 854-855
- 7) S. Takada, S. Takahara, K. Nishimura, N. Ichimaru, J. Hongosi, Y. Kokado, M. Kitamura, K. Matsumiya, K. Matsumoto, T. Nakamura and A. Okuyama (1999) Effect of hepatocyte growth factor on tacrolimus - induced nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats. *Transpl. Int.*, 12, 27-32
- 8) H. Ueda, Y. Sawa, K. Matsumoto, S. Kitagawa-Sakaida, Y. Kawahira, T. Nakamura, Y. Kaneda and H. Matsuda (1999) Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates reperfusion injury in the heart. *Annals. Thoracic Surg.*, 67, 1726-1731
- 9) K. Kosai, K. Matsumoto and T. Nakamura (1999) Hepatocyte growth factor prevents endotoxin - induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology*, 30, 151-159
- 10) R. Hasina, K. Matsumoto, N. Matsumoto-Taniura, I. Kato, M. Sakuda and T. Nakamura (1999) Autocrine and paracrine motility factors and their involvement in invasiveness in a human oral carcinoma cell line. *Brit. J. Cancer*, 80, 1708-1717
- 11) K. Kitajima, U. Koshimizu and T. Nakamura (1999) Expression of a novel type of classic cadherin, PB-cadherin in developing brain and limb buds. *Develop. Dyn.*, 215, 206-214
- 12) N. Taniura-Matsumoto, K. Matsumoto and T. Nakamura (1999) Prostaglandin production in mouse mammary carcinoma cells confers invasive growth potential by

- inducing hepatocyte growth factor in fibroblasts. *Brit. J. Cancer*, 81, 194-202
- 13) M. Kato, Y. Kato, T. Nakamura and Y. Sugiyama (1999) Efficient extraction by the liver governs the overall elimination of hepatocyte growth factor in rats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 290, 373-379
 - 14) R. Morishita, S. Nakamura, S. Hayashi, Y. Taniyama, A. Moriguchi, S. Takeshita, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (1999) Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as a cytokine supplement therapy. *Hypertension* 33, 1379-1384
 - 15) W. G. Jiang, T. A. Martin, K. Matsumoto, T. Nakamura and R. E. Mansel (1999) Hepatocyte growth factor/scatter factor decreases the expression of occludin and transendothelial resistance (TER) and increased paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 181, 319-329
 - 16) C.C. Fehlner-Gardiner, H. Cao, L. Jackson-Boeters, T. Nakamura, B.E. Elliot, S. Uniyal and M.C. Chan (1999) Characterization of a functional relationship between hepatocyte growth factor and mouse bone marrow-derived mast cells. *Differentiation* 65, 27-42
 - 17) S. Deleu, I. Pirson, F. Clermont, T. Nakamura, J.E. Dumont and C. Maenhaut (1999) Immediate early gene expression in dog thyrocytes in response to growth proliferation and differentiation stimuli. *J. Cell. Physiol.* 181, 342-354.
 - 18) S. Deleu, I. Pirson, K. Coulonval, A. Drouin, M. Taton, F. Clermont, P.P. Roger, T. Nakamura, J.E. Dumont, C. Maenhaut (1999) IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Mole. Cell. Endocrin.* 149, 41-51.
 - 19) S. Hayashi, R. Morishita, S. Nakamura, K. Yamamoto, A. Moriguchi, T. Nagano, M. Taiji, H. Noguchi, K. Nakamura, T. Nakamura, J. Higaki, and T. Ogihara (1999) Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor in peripheral arterial disease: Downregulation of HGF in response to hypoxia in vascular cells. *Circulation* 100 II-301-308.
 - 20) T. Nagahori, M. Dohi, K. Matsumoto, K. Saitoh, ZI. Honda, T. Nakamura and K.Yamamoto (1999) Interferon-gamma upregulates the c-Met/HGF receptor expression in alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 490-497.
 - 21) O.Amano, U. Koshimizu, T. Nakamura and S. Iseki (1999) Enhancement by hepatocyte growth factor (HGF) of bone and cartilage formation during embryonic mouse mandibular development in vitro. *Arch. Oral Biol.* 44, 935-946.
 - 22) K. Nishimura, M. Kitamura, H. Miura, N. Nonomura, S. Takada, S. Takahara, K. Matsumoto, T. Nakamura and K. Matsumiya (1999) Prostate stromal cell-derived hepatocyte growth factor induces invasion of prostate cancer cells DU 145 through Tumor-stromal interaction. *Prostate*, 41, 145-153.
 - 23) W. Sun, H. Funakoshi and T. Nakamura (1999) Differential expression of hepatocyte growth factor and its receptor, c-Met in the rat retina during development. *Brain Res.* 851, 46-53.
 - 24) A. Uchiyama, T. Morisaki, K. Beppu, M. Kojima, Y. Matsunari, A. Nakatsuka, K. Mizumoto, K. Matsumoto, T. Nakamura and M. Tanaka (1999) Hepatocyte growth factor and invasion-stimulatory activity are induced in pleural fluid by surgery in lung cancer patients. *Brit. J. Cancer.* 81, 721-726.
 - 25) K. Matsumoto, R. Morishita, A. Moriguchi, N. Tomita, Y. Yo, T. Nishii, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (1999) Prevention of renal damage by Angiotensin II blockade, accompanied by increased renal hepatocyte growth factor in experimental hypertensive rats. *Hypertension.* 34, 279-284.
 - 26) Y. Okura, H. Arimoto, N. Tanuma, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Yamashima, T. Miyazawa and Y. Matsumoto (1999) Analysis of neurotrophic factor of hepatocyte growth factor (HGF) in the adult hypoglossal nerve axotomy model. *Eur. J. Neurosci.* 11, 4139-4144.
 - 27) T. Sumi, K. Matsumoto, Y. Takai and T. Nakamura (1999) Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by Rho- and Cdc42-activated LIM-kinase2. *J. Cell Biol.* 147, 1519-1532.
 - 28) M. K. Jones, E. Sasaki, F. Halter, R. Pai, T. Nakamura, T. Arakawa, T. Kuroki and A. S. Tarnawski (1999) HGF triggers activation of Cox-2 gene in rat gastric epithelial cells: Action mediated through the ERK2 signalling pathway. *FASEB J.*, 13, 2186-2194.
 - 29) Y. Kawano, Y. Fukata, N. Oshiro, M. Amano, T. Nakamura, M. Ito, F. Matsumura, M. Inagaki and K. Kaibuchi (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell Biol.* 147, 1023-1037.
 - 30) F. Tamura, M. Masuhara, I. Sakajida, K. Okita, T. Fukumoto and T. Nakamura (1999) FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. *J. Gastroenterol. and Hepatol.*, in press.
 - 31) A. Uchiyama, T. Morisaki, M. Katoh, M. Kojima, Y. Matsunari, K. Beppu, A. Nakatsuka, M. Okido, H. Ichimiya, M. Nakagaki, H. Shimura, K. Matsumoto, T. Nakamura and M. Tanaka (1999) Significance of locally-secreted hepatocyte growth factor after thoracic cancer surgery as a stimulator for postoperative cancer invasion. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, in press
 - 32) W. G. Jiang, S. E. Hiscox, C. Parr, T. A. Martin, K. Matsumoto, T. Nakamura and R. E. Mansel (1999) Antagonistic effect of NK4, a novel HGF variant, on in vitro angiogenesis of human vascular endothelial cells. *Clin. Cancer Res.*, in press
 - 33) S. Hiscox, C. Parr, T. Nakamura, K. Matsumoto, R. E. Mansel and W. G. Jiang (1999) Inhibition of HGF/SF-induced breast cancer cell motility and invasion by the HGF/SF variant, NK4. *Breast Cancer Res. & Treat.*, in press
 - 34) M. Nakano, Y. Yasunami, T. Maki, S. Kodama, Y. Ikehara, T. Nakamura, M. Tanaka and S. Ikeda (2000) Hepatocyte growth factor is essential for amelioration of hyperglycemia in strepto zotocin-induced diabetic mice receiving a marginal mass of intrahepatic islet grafts. *Transplantation*, in press
 - 35) T. Yamada, M. Hisanaga, Y. Nakajima, S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Nakamura and H. Nakano (2000) Enhanced expression of hepatocyte growth factor by pulmonary ischemia reperfusion injury in the rat. *Am. J. Resp. Crit Care Med.* in press
 - 36) S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Kurosawa, Y. Mizuno-Horikawa and T. Nakamura (2000) Reciprocal balance between HGF and TGF- β a key determinant for pathological phenotypes in chronic renal disease. *Kidney Intern.* in press.
 - 37) C. Parr, S. Hiscox, T. Nakamura, K. Matsumoto, and W.G. Jiang (1999) NK4, a new HGF/SF variant, is an antagonist to the influence of HGF/SF on the motility and invasion of colon cancer cells. *Intern. J. Cancer*, in press
 - 38) W. G. Jiang, S. Hiscox, K. Matsumoto and T. Nakamura (1999) Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical impacts in cancer. *Crit. Rev. in Oncogenesis/Hematology*, 29, 209-248.
 - 39) K. Matsumoto and T. Nakamura (2000) Hepatocyte growth factor and met in tumor invasion-metastasis: Mechanisms related to cancer prevention. "Cancer metastasis, molecular and cellular biology and clinical aspects" eds by WG Jiang and RE Mancel, Chapter 6. pp145-194.
 - 40) K. Matsumoto, S. Mizuno, and T. Nakamura (2000) Hepatocyte growth factor in renal regeneration, renal disease, and potential therapeutics. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 8 (No. 4) in press

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業・分子病態班）
分担研究報告書

線維性病変における TGF- β の役割と抗 TGF- β 療法の有用性

分担研究者 上野 光 九州大学附属病院講師

研究要旨

炎症の遷延化や炎症に引き続く臓器線維化に重要と考えられる分子群およびそれらの機能を抑制する分子群を組換えアデノウイルスを用いて各疾患の動物モデル生体内に導入し、疾患の分子病態の解析と新しい治療法（遺伝子治療を含む）の開発をめざした。TGF- β の作用を特異的に抑制できる変異型 TGF- β 受容体を肝臓線維症モデルに遺伝子導入したところ、線維化の著明な抑制と肝機能保持が達成され、線維性病変形成における TGF- β の中心的な役割が明確になると共に、抗 TGF- β 療法の有用性が期待される。

A. 研究目的

臓器線維症は進行性の臓器機能低下を招来し患者の生活の質を著しく損ねるため臨床的にはすでに悪性疾患と言えるが、さらに悪性腫瘍の合併も多い。腎硬化症末期では透析が必要となり医療費の高騰も危惧される。従って病態の分子レベルでの解明と有効な治療法の開発は重要な課題である。本研究では臓器線維化に重要と考えられる分子群やそれらの機能を抑制する分子群（Dominant-negative 受容体など）を、ウイルスベクターを用いて各疾患の動物モデル生体内に導入し、線維症発症・進展の分子機構の解析と有効な治療法（遺伝子治療を含む）の開発をめざす。

B. 研究方法

各臓器の慢性炎症・線維症のモデル動物を準備し、組換えアデノウイルスを用いて変異型増殖因子受容体（細胞内キナーゼ部分を欠失）遺伝子や抗炎症分子を導入し、組織学的、生化学的、分子生物学的解析を加える。関節炎、肝臓線維症、肺線維症、腎硬化症、動脈硬化、

皮膚硬化症（強皮症）などを研究対象とする予定であるが、本年度は肝臓線維症および腎硬化症で解析を進めた。

（倫理面への配慮）

本研究計画は九州大学組換え DNA 審査委員会の承認を受けている。動物実験は国内法に定められた方法に準拠し九州大学動物実験委員会の承認を受けている。なお組換えアデノウイルスは米国では臨床治験の承認を受けている。

C. 研究結果

1. 細胞内キナーゼ部分を欠失した変異型 I 型 TGF- β 受容体 cDNA を作成しアデノウイルスベクターに組み込んだ（AdT β -TR）。同ウイルス感染細胞では TGF- β による信号伝達がすべて遮断された。
2. Dimethylnitrosamine (DMN) を週 3 回 3 週間ラット腹腔内に投与した。DMN 投与開始日に 1 度だけ AdT β -TR, AdLacZ (β -galactosidase を発現するコントロールウイルス)、あるいは生食水を門脈より注入した。