

表1：重症型アルコール性肝炎患者背景、診断時の身体所見と血清ウイルスマーカー

症例数	性別	飲酒量 (五合以上)	発熱	意識障害	黄疸	腹水	頻脈	肝硬変	HBV	HCV
2001	男：女									
生存例	7	5：2	86%	71%	43%	100%	71%	71%	56%	14%
死亡例	15	12：3	87%	60%	67%	100%	87%	72%	53%	12%
計 (1998-2001)										
生存例	24	20：4	83%	71%	54%	83%	67%	54%	42%	8%
死亡例	57	43：13	93%	60%	70%	93%	87%	72%	49%	5%

表2：重症型アルコール性肝炎患者診断時の血液生化学検査結果

症例数	PT (%)	RBC (x10000/ μ l)	WBC (x100/ μ l)	PLT (x10000/ μ l)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	T. Bil (mg/d Cr (mg/dl))
1998-2000	男：女						
生存例	17	39.1±11.6	332±86	111±56	13.7±8.1	1157±2536	1007±2596
死亡例	42	29.2±9.6*	266±70*	213±13*	14.2±9.4	792±3179	262±1002
2001							
生存例	17	33.6±8.7	319±68	106±23	10.2±5.8	1003±1054	582±825
死亡例	42	28.9±10.5	231±759*	231±87*	13.4±5.0	227±182	74±44

* p<0.05 vs生存例

表3：重症型アルコール性肝炎患者の死亡予測率と年齢分布

年齢	死亡予測率 (%)
生存例	40.5±11.5 (23-57)
死亡例	55.7±17.5 (21.9-81.9)
生存例	49.1±10.3 (27-71)
死亡例	90.2±17.1 (50.2-126.4)

表4：重症型アルコール性肝炎の合併症と治療法の予後に対する影響

症例数	合併症	DIC
	消化管出血	感染症
2001		
生存例	7	14%
死亡例	15	67%*
計 (1998-2001)		
生存例	24	17%
死亡例	57	49%*

* p<0.05 vs生存例

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

コンディショナルノックアウトマウスを用いた肝細胞におけるBcl-xLの機能解析

研究協力者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：bcl-x遺伝子のコンディショナルノックアウトを肝細胞で行い、Bcl-xLの機能的な意義について解析した。Bcl-xLがノックダウンされた初代培養肝細胞はDNA断裂を伴う急速な細胞死を引き起こした。また、個体レベルにおけるbcl-xのノックアウトは持続性かつ自発的な肝細胞アポトーシスを引き起こした。肝細胞はBcl-xL以外にもMcl-1、Bcl-wなど複数のアポトーシス抑制性Bcl-2関連蛋白を発現しているが、Bcl-xLの発現は肝細胞の生存維持にとって代替のきかない必須の分子であることを明らかにした。

共同研究者

竹原徹郎 大阪大学大学院医学系 研究科・
助教授

A. 研究目的

肝癌細胞のアポトーシス耐性にはBcl-xLの高発現が重要な役割を持っている (Takehara et al. Hepatology 34:55, 2001)。一方、正常の肝細胞も恒常的にBcl-xLを発現しているが、その意義については、bcl-xノックアウトマウスが脳および造血系の形成不全により胎生致死であることから解明されていない。そこでbcl-x遺伝子のコンディショナルノックアウトを行うことにより、その機能的意義について解析をした。

B. 研究方法

bcl-x遺伝子のプロモーター領域と第2イントロンにlox P配列を挿入したfloxed bcl-xマウスを実験に用いた。肝細胞におけるCre遺伝子の発現は3つの異なる方法で行った：(1) Cre発現アデノウイルスベクター (AdCre)の静注、(2) Mx1プロモーター制御下にCreを発現するトランスジェニックマウス (Mx1 Tg)との交配により得たマウスへのpoly I:C投与、(3) アルブミンプロモーター制御下にCreを発現するトランスジェニックマウス (Alb Tg)との交配。

C. 研究成果

bcl-x fl/flマウスより初代培養した肝細胞は、AdCre (MOI 3) 感染により、24時間後よりbcl-x遺伝子が除去され、36時間後にBcl-xLの発現が低下した。感染2日目より、急速にDNAの断裂を伴ったアポトーシスが出現した。bcl-x fl/+あるいはbcl-x +/-肝細胞ではAdCre感染後のアポトーシスは認められなかった。個体レベルではbcl-x fl/flマウスにAdCreを静注したところ、肝臓でのBcl-xLの発現低下がおり、3日後にはTUNEL陽性肝細胞が小葉内に散在性に観察された。bcl-x +/-マウスへのAdCreの静注では肝障害は観察されなかった。一方、Mx1 Tgとの交配により得られたMx1 bcl-x fl/flマウスでは、poly I:Cの腹腔内投与により肝臓におけるBcl-xLの発現が低下

し、3日目より持続的な肝細胞アポトーシスが出現した。bcl-x fl/flマウスへのpoly I:C投与では肝障害は全く出現しなかった。Alb Tgマウスとの交配では、Alb bcl-x fl/flマウスがメンデルの法則に従って正常に出生したが、これらのマウスでは生後早期より4ヶ月以上にわたってALT異常を伴う自発的な肝細胞アポトーシスが持続的に観察された。

D. 考察

哺乳類におけるアポトーシス抑制性のBcl-2関連蛋白は、現在までにBcl-2、Bcl-xL、Mcl-1、Bcl-w、Bfl-1、Diva/Booの6つの分子が明らかにされている。プロトタイプであるbcl-2のノックアウトは免疫細胞のアポトーシスや嚢胞腎などを起こし出生後数ヶ月で死亡するが肝臓での表現型は報告されていない。bcl-wとbfl-1のノックアウトはそれぞれ男性不妊、白血球のアポトーシス亢進の原因となるが、肝臓を含めその他の異常は示さない。また、Divaのノックアウトはめだつた表現型を示さない。bcl-x遺伝子のノックアウトは胎生13日前後で致死性であり、脳と造血系の形成不全を引き起こす。mcl-1のノックアウトは胚の着床が起こらないと報告されている。このことから、bcl-xとmcl-1については成熟個体レベルでの機能的な意義は未解決となっている。

初代培養肝細胞を用いた我々の検討によると、肝細胞はアポトーシス抑制性Bcl-2関連蛋白としてBcl-xL、Mcl-1、Bcl-wの3つの分子を発現していた。これらは構造的にも機能的にも類似した分子であることから、個々の分子がどの程度の重要性を持っているかが興味を持たれるところである。我々はBcl-xLが肝癌細胞のアポトーシス耐性に重要な意義を持っていることを明らかにした経緯から、トランスフォームしていない正常の肝細胞におけるBcl-xLの意義について興味を持ち、Cre-loxPシステムに基づいたコンディショナルノックアウトマウスを用いて、肝細胞におけるBcl-xLの機能解析を行った。

初代培養肝細胞においてAdCreを用いてBcl-xLのノックダウンを行うと、急速なアポトーシスが出現した。このことから、Bcl-xLは通常培養条件で培養した肝細胞の生存維持にとって必須の分子であると考えら

れた。AdCre静注による個体レベルでのノックダウンでは、散在性の肝細胞アポトーシスが出現した。同様の現象は、Mx-1プロモーターやAlbプロモーターを用いたシステムでも確認されており、Bcl-xLは個体レベルでも肝細胞の自発的なアポトーシスの抑制に極めて重要な役割を持っていることが示された。

Bcl-xLは肝細胞がいわゆるサイトカインストームにさらされる肝切除後の肝再生時に発現が亢進することが知られている。また、Fas抗体やCCl₄、ConAなどにより誘導される重症肝障害時にも発現が亢進する。今回の検討により、Bcl-xLは成熟肝細胞が個体において正常に維持されるために必須の分子であることが示されたが、同分子は肝臓の種々の病態生理においても重要な役割を持っていることが推察される。

E. 結論

肝細胞におけるbcl-x遺伝子のコンディショナルノックアウトにより、自発的かつ持続性の肝細胞アポトーシスが誘導された。肝細胞はBcl-xL以外にもMcl-1、Bcl-wなど複数のアポトーシス抑制性Bcl-2関連蛋白を発現しているが、Bcl-xLの発現は肝細胞の生存維持にとって代替のきかない必須の分子であることが明らかとなった。

F. 研究発表

論文発表

1. Sugimoto Y, Kuzushita N, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Miyagi T, Jinushi M, Ohkawa K, Horimoto M, Kasahara A, Hori M, Sasaki Y, Hayashi N. A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hep* 9:377-384, 2002.
2. Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J Gastro Hepatol* (in press)
3. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* (in press)
4. Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Ishida H, Jinushi M, Miyagi T, Sasaki Y, Hayashi N. Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300:784-788, 2003.
5. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MICA/B expression on interferon α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* (in press)

学会発表

1. Suzuki T, Takehara T, Kanto T, Miyagi T, Jinushi M, Sugimoto Y, Sasaki Y, Hayashi N. Intravenous injection of recombinant hepatitis B virus (HBV) DNA achieves high-level expression of HBV as well as humoral immune response in mice. April, 2002. Madrid (Spain). Biennial Meeting of the International Association for the Study of the Liver.
2. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Sasaki Y, Hayashi N. Retinoic acid enhances susceptibility of human hepatoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity via up-regulation of MICA. April, 2002. Madrid (Spain). Biennial Meeting of the International Association for the Study of the Liver.
3. Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Sato A, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hayashi N. Possible mechanism for HCV core-mediated regulation of Jak-Stat signaling pathway. November, 2002; Boston (USA). The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)
4. Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Takehara T, Sasaki Y, Hayashi N. HCV core-mediated suppression of CDK-activating kinase (CAK) activity. November, 2002; Boston (USA). The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)
5. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Impaired MICA/B induction on dendritic cells recovered from patients with chronic hepatitis C leads to reduced natural killer cell-mediated immune responses. The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)
6. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Jinushi M, Sugimoto Y, Kanto T, Sasaki Y, Hayashi N. CD1d-mediated stimulation of natural killer T cells by α -galactosylceramide specifically activates hepatic natural killer cells and eliminates experimentally disseminated hepatoma cells in murine liver. The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)
7. Takehara T, Suzuki T, Rucker EB, Miyagi T, Jinushi M, Kanto T, Sasaki Y, Hayashi N. Conditional deletion of the bcl-x gene reveals Bcl-xL as a critical apoptosis antagonist in

primary murine hepatocytes. The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)

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

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

微生物由来のCpG DNAによるconcanavalin A誘発肝炎の増悪

研究協力者 佐藤由紀夫 福島県立医科大学医学部第2内科教授

研究要旨：微生物由来のCpGモチーフを有するDNA (CpG DNA) は抗原提示細胞を刺激して多量のinterleukin-12 (IL-12), interferon (IFN)- α/β を産生させ、natural killer細胞を活性化してIFN- γ を産生させることによりTh1タイプの免疫を活性化させる (Sato Y, et al: Science 273, 1996)。種々の自己免疫疾患の病態にはTh1タイプの免疫が関与していることが明らかにされていることより、自己免疫性肝炎 (AIH)のモデルとされるconcanavalin A (Con A) 誘発肝炎に及ぼすCpG DNAの影響を検討した。その結果、微生物由来のCpG DNAは、Th1タイプのサイトカイン産生を介してCon A誘発肝炎を増悪させることが示された。今後、CpG DNAがヒトのAIHの増悪に関与することが証明されれば、CpG DNAの受容体であるToll like receptor 9をターゲットにしたAIHの新しい治療戦略が考えられる。

共同研究者

阿部 和道	福島県立医科大学	第2内科	
横川 順子	福島県立医科大学	第2内科	
滝口 純子	福島県立医科大学	第2内科	
雷 毅	福島県立医科大学	第2内科	
穴戸昌一郎	福島県立医科大学	第2内科	助手
小林 浩子	福島県立医科大学	第2内科	助手
大平 弘正	福島県立医科大学	第2内科	講師

A. 研究目的

DNAは生命の設計図であり、全身性エリテマトーデスなど一部の疾患を除いてDNA自体に免疫原性はないと考えられていた。しかし、微生物由来のDNAによって哺乳類の免疫が活性化されることが次第に明らかになってきた。

哺乳類の免疫系は微生物DNAに含まれるCpG motif (5'-CG-3')を持った塩基配列を認識して活性化されるが、近年、樹状細胞などの抗原提示細胞 (APC) に存在するToll like receptor (TLR) 9が、微生物由来のCpGモチーフを有するDNA (CpG DNA) の受容体であり、微生物由来のCpG DNAはTLR9を介してinnate immunityを活性化し、免疫応答を増強することが明らかにされた (Hemmi H, et al: Nature 408, 2000)。

我々は、微生物由来のCpG DNAはAPCを刺激して多量のinterleukin-12 (IL-12), interferon (IFN)- α/β を産生させ、natural killer (NK) 細胞を活性化してIFN- γ を産生させることによりTh1タイプの免疫を活性化させることを明らかにしてきた (Sato Y, et al: Science 273, 1996. Roman M, et al: Nature Medicine 3, 1997)。

種々の自己免疫疾患の病態にはTh1タイプの免疫が関与していることが明らかにされていることより、CpG DNAと種々の自己免疫疾患との関連が注目されるようになってきているが、我々はCpG DNAが関節リウマチの動物モデルの関節炎を増悪させることを証明している (Miyata M, et al: Arthritis Rheum)。今回、自

己免疫性肝炎 (AIH)のモデルとされるconcanavalin A (Con A) 誘発肝炎に及ぼすCpG DNAの影響を検討した。

B. 研究方法

8週齢のメスBALB/cマウスに10 mg/kg BW のCon Aを1回静注して、肝炎を誘導した。Con A投与48時間前に50 μ gのCpG DNA (5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3') の皮内注射を行い、Con A投与12時間後に血中ALT, IL-5, IFN- γ 値を測定した。また、肝臓を取り出し組織学的検討を行った。disease activity index (DAI) を評価した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、当大学の実験動物取り扱い倫理指針を遵守して実験に使用した。

C. 研究結果

1. Con A肝炎誘発症時におけるTh1/Th2タイプのサイトカインに及ぼすCpG DNAの影響

Con A単独投与群に比して、CpG DNA併用投与群では、血中IL-5の産生が抑制され、IFN- γ の濃度が有意に上昇することが認められた (Fig 1)。この結果より、CpG DNA投与によりTh1タイプの免疫反応がより強く活性化され、Th2タイプの免疫が抑制されたことを反映していることが示唆された。

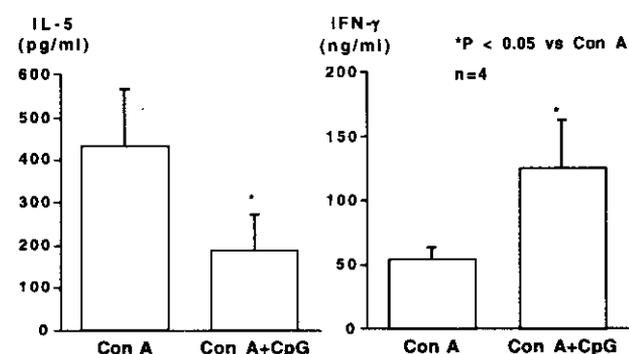


Fig. 1

2. CpG DNAによるCon A誘発肝炎の増悪

Con A単独投与群に比して、CpG DNA併用投与群では、血中ALT値が有意に上昇することが認められた (Fig 2)。また、肝臓の組織学的検討では、Con A単独投与群に比して、CpG DNA併用投与群では肝実質のより広範な壊死を認めた (data not shown)。この結果より、CpG DNAはCon A誘発肝炎を増悪させることが示された。

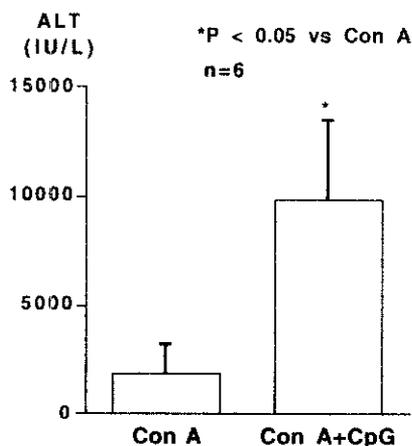


Fig. 2

D. 考察

微生物由来の CpG DNA は AIH のモデルとされる Con A誘発肝炎を増悪させることが示されたことより、AIHの増悪にもCpG DNAが関与している可能性が示唆された。Con A誘発肝炎では、CD4+ T細胞、NKT細胞が産生するTh1タイプのIL-12、IFN- γ などのサイトカイン産生を介して肝障害が惹起されることが示されているが、CpG DNAはこれらのサイトカイン産生をAPCまたはNK細胞より誘導することによりCon A誘発肝炎の増悪に関与する可能性が推定された。

Con A誘発肝炎はCD4+ T細胞、NKT細胞が産生するサイトカインが肝障害に関与する点でAIHの病態と類似するが、Con A自体は自己抗原ではなく、AIHに出現する抗核抗体などの自己抗体産生は認められず、この点ではCon A誘発肝炎はAIHの病態を正確に反映はしていない。しかし、CpG DNAがTh1タイプのサイトカイン産生を誘導してCon A肝炎を増悪させたことは、translocationによって門脈等に存在する微生物由来のCpG DNAが、AIHに認められるサイトカイン介在性肝障害の部分の増悪に関与する可能性はある。よって、この仮説が証明されれば、CpG DNAの受容体であるTLR9をターゲットにしたAIHの新しい治療戦略が考えられる。

今回の検討ではCon A肝炎を用いた急性期のAIHモデルに対するCpG DNAの影響を検討しており、自己抗体の産生は認めていないが、我々はCpG DNAを単独で投与しても軽度の肝障害が誘発できることを観察している (data not shown)。よって、CpG DNAを長期間投与することによりAIHに類似した慢性肝障害をモデルを作成できる可能性があり、さらに検討を続ける予定である。最近、CpG DNAが自己抗体の産生に

関与することが証明されている (Leadbetter AE, et al: Nature 416, 2002)。

よって、CpG DNA投与による慢性肝障害モデルにおいて肝細胞抗原に対する新しい自己抗体が誘導されるかも検討する予定である。

F. 結論

微生物由来のCpG DNAは、Th1タイプのサイトカイン産生を介してAIHのモデルとされるCon A誘発肝炎を増悪させることが示された。今後、CpG DNAがヒトのAIHの増悪に関与することが証明されれば、CpG DNAの受容体であるTLR9をターゲットにしたAIHの新しい治療戦略が考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Yamamoto S, et al: Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. *Jpn J Infect Dis*, 55, 37-44, 2002.
- 2) Katakura K, et al: Appearance of rectal varices in extrahepatic obstruction after treatment for esophago-gastric varices. *Fukushima J Medical Sci*, 48, 51-56, 2002.
- 3) Irisawa A, et al: Collateral vessels around the esophageal wall in patients with portal hypertension: Comparison of EUS imaging and microscopic findings at autopsy. *Gastrointest Endosc*, 56, 249-253, 2002.
- 4) Takiguchi J, et al: Autoimmune hepatitis overlapping with primary sclerosing cholangitis. *Intern Med*, 41, 696-700, 2002.
- 5) Ohira H, et al: Fenofibrate treatment in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, 96, 696-700, 2002.
- 6) Ohira H, et al: HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte activity during interferon beta therapy in patients with chronic hepatitis C. *Fukushima J Med Sci*, 48, 75-83, 2002.
- 7) Shishido S, et al: hydrogen peroxidase overproduction in megamitochondria of troglitazone-treated human hepatocytes. *Hepatology* 37, 136-147, 2003
- 8) Shibukawa G, et al: Variceal recurrence after endoscopic sclerotherapy associated with the perforating veins in lower esophagus independently. *Hepato-Gastroenterology* (in press)
- 9) Ohira H, Takeda J, Rai T, Shishido S, Sato Y. Two cases of primary biliary cirrhosis complicated with syringomyelia. *Am J*

Gastroenterol (in press)

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

急性肝不全時の肝外分泌蛋白の生成調節

研究協力者 与芝 真 昭和大学藤が丘病院 消化器内科 教授

研究要旨：これ迄劇症肝炎の診断においてはプロトロンビン時間 (PT) が重要視されてきた。しかし、劇症肝炎亜急性型やLOHF症例ではPTよりアルブミンやコリンエステラーゼの低下が目立つ症例が存在する。この機序を知る目的で緩徐な急性肝不全モデルを作成し、肝でのアルブミンとフィブリノーゲンのmRNAの発現を比較したところ前者の発現が後者より大幅に減少する事が明らかとなった。生体の生命維持のため代謝調節を表現したものと考えられる。

共同研究者

井上 和明 昭和大学藤が丘病院
消化器内科 助教授
安田 宏 昭和大学藤が丘病院
消化器内科 講師

A. 研究目的

肝は自らを構造する構造蛋白の他に数々の外分泌蛋白を生成している。それらの外分泌蛋白は肝疾患の診断上重要な役割を果たしている。その中でも血中の半減期の短い第Ⅶ因子の活性やそれを含んで測定するヘパラスチン時間 (HPT、第Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ因子の活性をまとめて測定する) や、プロトロンビン時間 (PT、第Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ因子の活性をまとめて測定する)、rapid turnover proteinと言われるプレアルブミン、 α_2 -HS-グリコプロテイン、レチノールバインディングプロテインなどの値は急性肝不全の診断に重要視されてきた。PT40%が我が国の劇症肝炎診断基準の骨子の1つになっている事は周知の事実である。一方相対的に半減期の長いアルブミンやコリンエステラーゼ (ChE) は肝硬変や慢性肝不全時の診断に重視されてきた。

確かに肝の全摘や瞬時に肝が破壊されるようないわゆる「超急性」劇症肝炎の際には全ての外分泌蛋白の生成が停止するので、それらの血中値は半減期に従って低下していく事になる。然し我が国の診断基準による亜急性型の劇症肝炎や英国で言うlate onset hepatic failure (LOHF、遅発性肝不全)のように緩徐に肝が破壊される病態では肝の外分泌蛋白の生成は直ちには停止せず徐々に減少していく事になる。

亜急性劇症肝炎やLOHFを多数例経験するとPTの低下は緩徐だがアルブミンやコリンエステラーゼ (ChE)の低下の方が目立つ症例が存在する事に気付く。事実我々が作成した劇症予知式でも本来半減期の長いはずのChEが予知上に大きなウエイトを占めている。

今回我々はこの点の確認のため緩徐に肝不全が進行するラットモデルにおいて肝でのアルブミンと凝固因子のmRNAの発現の差を検討した。

B. 研究方法

ウィスター系ラット (体重200g) 21匹に四塩化炭素

0.15mlとオリーブ油0.15mlの混合液を週3回合計9回腹腔内に投与し、22日目に屠殺して採血、採肝した。血液検査としてPT、フィブリノーゲン、アルブミン、総ビリルビン、GOT、GPTを測定した。摘除肝の一部を直ちに -80°C に凍結、mRNAの測定に供した。

RNA挿入はpoly Aカラムを用いた自動核酸抽出機 (MAG NA, Roche Diagnostics) で行い、その一部からSuper Script IIを用いてcDNAを合成した。合成したcDNAをTaq Man Universal Mixtureを用いてreal time detection PCR (RTD PCR) を行い、各サンプルごとに目的遺伝子のアルブミン、フィブリノーゲン (α 、 β 、 γ) と house keeping 遺伝子の GA PDH の threshold cycle (Ct) を比較して、各々の相対的遺伝子発現量を求めた。更に、正常ラットの相対的遺伝子発現量を1として肝不全ラットと目的遺伝子の発現量を比較した。

C. 研究結果

正常ラット10匹の肝機能の平均値はPT44%、フィブリノーゲン263mg/dl、アルブミン2.4g/dl、GOT 111U/l、GPT 40U/l、ChE 87U/l、T.Bil 0mg/dlであった。四塩化炭素投与群では3匹が死亡し、残りの18匹について採血、採肝した。18匹の肝機能はPT27 \pm 10% フィブリノーゲン222 \pm 91mg/dl、アルブミン2.2 \pm 0.2g/dl、GOT 4336 \pm 4874U/l、GPT 3380 \pm 3886U/l、ChE 85 \pm 13U/l、T.Bil 0.3 \pm 0.4mg/dlであった。

図1のようにPTとフィブリノーゲンは $r=0.71$ と良好に相関した。図2のようにアルブミンとフィブリノーゲンは $r=0.230$ と相関度が低かった。正常群の位置を考慮するとアルブミン値が相対的に低い傾向が見られた。このうち任意に2匹 (C5、C8) を選んでアルブミンと α 、 β 、 γ の各フィブリノーゲンの肝でのmRNAの発現を正常ラット肝と比較するとC5、C8いずれもアルブミンのmRNAはC5で0.023、C8で0.10と共に極めて低値であるのに対し、 α フィブリノーゲンはそれぞれ1.330と0.60、 β フィブリノーゲンはそれぞれ0.92と0.53、 γ フィブリノーゲンはそれぞれ0.87と0.42とアルブミンほどの低値を示さなかった (図3)。

図1 Prothrombin time (PT) and serum fibrinogen level in rats with acute liver failure

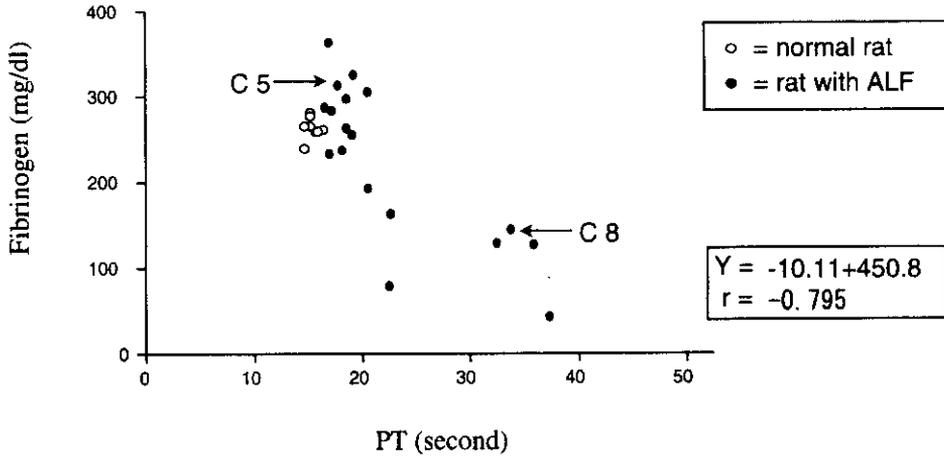


図2 Serum fibrinogen and albumin level in normal rats and rats with acute liver failure (ALF)

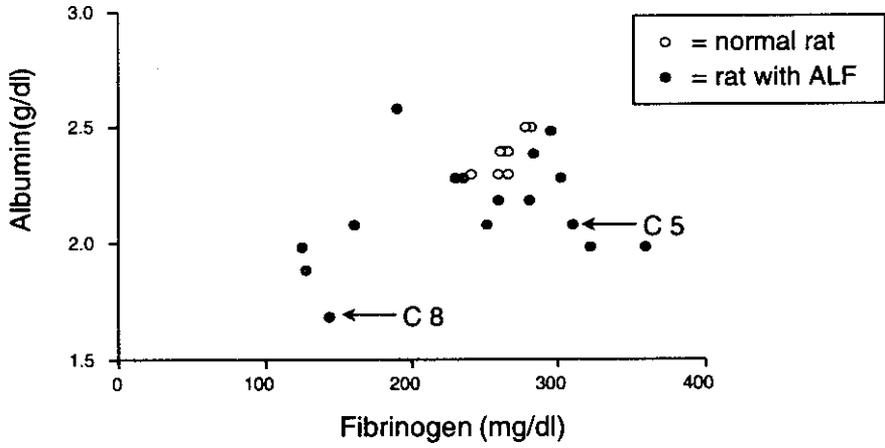
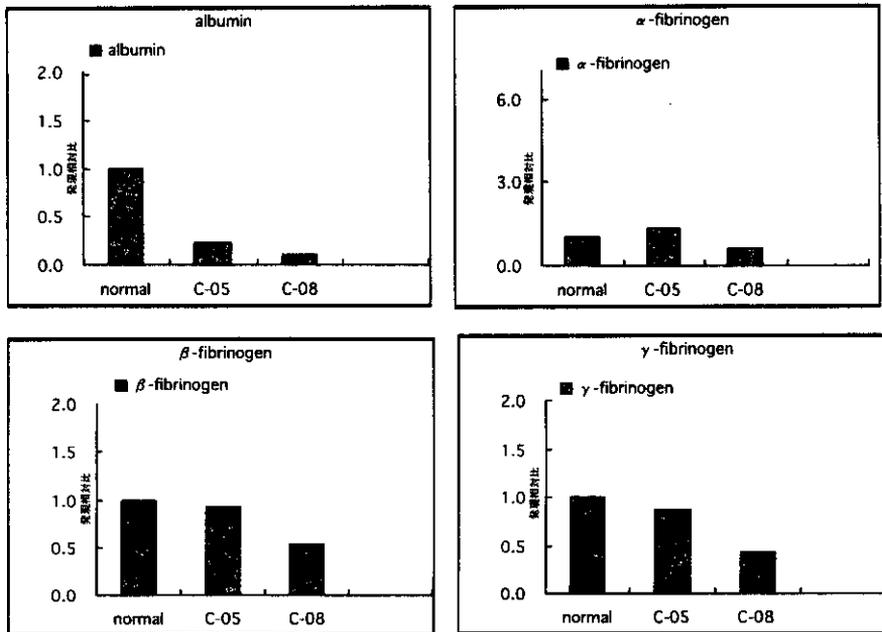


図3 正常肝と比較した急性肝不全肝におけるアルブミンとフィブリノーゲンの mRNA の発現比



D. 考察

予測したように四塩化炭素0.15ml等量のオリーブ油と混和して腹腔内に週3日投与して作成した進行の緩徐な急性肝不全モデルにおいては投与開始3週間後の時点で凝固因子の1つであるフィブリノーゲンのmRNAの発現量に比較してアルブミンのmRNAの発現量は大きく減少する事が明らかとなった。生命維持に重要な凝固因子の生成を、より重要度の低いアルブミンのそれより優先した結果とも考えられる(事実、無アルブミンラットでも生存している)。我国の劇症肝炎の診断基準ではPT40%以下が診断の骨子の1つとなっているが、PT40%という数字に絶対に根拠がある訳ではなく、PTのみを指標にしてアルブミンやChEの動きを無視していると救命の観点からは診断が遅れる場合もある。この点から今回の成績は臨床的に重要な示唆を与えるものと考えられる。

今回はpreliminaryな結果であり、今後肝不全モデル、測定法を再検討しながら今後2年間で急性肝不全における肝外分泌蛋白の生成調節という重要な問題を解明している予定である。

E. 結論

緩徐に進行する急性肝不全モデルラットにおいては、肝のアルブミン合成はフィブリノーゲン合成に比して抑制される可能性が明らかとなった。生命維持のための代謝調節の表現と考えられる。

研究発表

1. 論文発表

与芝 真、井上和明. エビデンスに基づく血漿交換療法の評価. 日本輸血学会雑誌 2002年 第48巻 第1号 p9-26

Yoshihisa M, Sekiyama K, Inoue K, Yamada M, Kako M, Nagai K, Takatori M, Iwabuchi S, Sumino Y, Tanaka K, Hakozaiki Y, Hasegawa K, Shibuya A. Accurate prediction of fulminant hepatic failure in severe acute viral hepatitis: multicenter study. J Gastroenterol 2002; 37: 916-921

Kanamaru C, Yasuda H, Fujita T. Involvement of Smad Proteins in TGF- β and activin A-induced apoptosis and growth inhibition of liver cells. Hepatol Res 2002; 23: 211-219

徳永 晋、安田 宏、山田雅哉、若杉 聡、遠藤 豊、井上和明、与芝 真. ステロイドパルス療法が奏功した中国製やせ薬「減肥膠囊」が原因と考えられる重症肝障害の一例 肝臓 2003年 (印刷中)

Inoue K, Sekiyama K, Yamada M, Watanabe T, Yasuda H, Yoshihisa M. Combined interferon α 2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C - Controlled trial -. J Gastroenterol (in

press)

2. 学会発表

井上和明、山田雅哉、与芝 真. 劇症肝炎治療の最近展開. 第88回日本消化器病学会総会 旭川 2002年4月24~26日

井上和明、山田雅哉、渡邊綱正、与芝 真. 劇症肝炎における肝移植の絶対適応はいかなる症例か. 第28回日本急性肝不全研究会 大阪 2002年6月12日

与芝 真. 劇症肝炎治療の最前線. 第22回日本アフエレス学会学術大会 札幌 2002年6月14日~16日

井上和明、山田雅哉、渡邊綱正、与芝 真. 劇症化予知と早期治療を導入し高率の救命を可能にした内科治療システムにおける血液浄化法の意義. 第22回日本アフエレス学会学術大会 札幌 2002年6月14日~16日

山田雅哉、井上和明、渡邊綱正、船津康裕、遠藤 豊、与芝 真. 肝病変のstagingの進んだHBV carrierの劇症化例における血液浄化の意義について. 第22回日本アフエレス学会学術大会 札幌 2002年6月14日~16日

与芝 真. 劇症肝炎に対するインターフェロン療法. 第67回日本インターフェロン/サイトカイン学会 東京 2002年7月18日~19日

井上和明、山田雅哉、渡邊綱正、安田 宏、若杉 聡、与芝 真. 劇症肝炎超急性型の臨床的ウイルス学的検討. 第6回日本肝臓学会大会 横浜 2002年10月24日~27日

山田雅哉、井上和明、吉田生馬、安田 宏、与芝 真. 劇症化を阻止したと考えられる小児重症肝炎4例. 第34回日本肝臓学会東部会 つくば市 2002年11月29日

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

I：自己骨髄細胞を用いた難治性肝疾患に対する細胞療法の開発

研究協力者 沖田 極 山口大学医学部附属病院長

研究要旨：幹細胞を用いた細胞療法は、新たな臓器再生法として期待できる。肝幹細胞は肝臓のヘリング管および骨髄に存在し、肝、胆管、膵臓、小腸細胞へと分化する。我々は肝不全時の治療として、倫理的にも問題がない『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法（細胞療法）』の臨床開発への基盤研究として、骨髄細胞からの肝細胞への分化・増殖のGFP (Green fluorescent protein) transgenic miceを用いた in vivo 評価モデルの開発に成功し報告してきた。その後の解析により、このモデルにおいて血清アルブミン値が有意に改善し、また生存率も骨髄細胞投与群では、非投与群に比べ有意に生存率の改善を認めた。これらの結果より『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法（細胞療法）』は臨床応用可能な次世代の移植療法のなりえると考えられた。

共同研究者

寺井崇二^{1,2)}、坂井田 功²⁾、仁科博史³⁾

¹⁾ 山口大学医学部消化器病態内科学・助手

²⁾ 山口大学医学部消化器病態内科学講師

³⁾ 東京大学大学院・薬学系研究科・助教授

A. 研究目的

骨髄中に肝幹細胞が存在することが注目されている。骨髄細胞を用いた細胞療法は未開発であり、我々は劇症肝炎の新たな治療法としての「自己骨髄細胞を用いた細胞療法（肝臓再生療法）」の臨床開発への基盤研究として、骨髄細胞からの肝細胞への分化・増殖 in vivo 評価モデルを開発を行った。さらに今回の検討では、肝機能の回復および生存率について検討した。また最近になり組織幹細胞の transdifferentiation は細胞融合であるとの報告もあったことより、細胞融合についての検討も行った。

B. 研究方法

GFPトランスジェニックマウスより全骨髄細胞を採取する。次に同種同系のC57BL/6のマウスに対して、尾静脈より骨髄細胞を、 1×10^6 個ずつ投与する。投与するマウスは、肝障害モデル群 (CCl4 0.2 ml/kg, 週2回4週間投与後) と正常モデル群とし、1週間ごとにGFP陽性細胞の存在の有無を肝臓を摘出し検討した。

また肝細胞特異マーカーを用い、免疫染色、蛍光二重染色にて骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖を評価した。また肝機能の評価として血清アルブミン値の測定、また生存率について骨髄細胞投与群、非投与群で比較解析を行った。また細胞融合についてはコラゲナーゼ処理し分離した肝細胞の核型をFACSで解析することで評価した。

C. 研究結果

正常群では、GFP陽性細胞の肝臓への遊走はほとんどみられず、肝障害モデル群に投与したモデルで投与後1日目より肝臓の門脈周囲を中心にGFP陽性細胞

を認め、4週間後には、さらにその局在は肝小葉内に広がり、画像解析にて一画面あたり25%まで増加していた。また蛍光二重染色にて、GFP陽性細胞の肝、胆管、転写因子群マーカーの発現を確認した。また骨髄細胞投与後4週間目では血清アルブミン値も有意に改善しており、生存率については骨髄細胞投与群では、非投与群に比べ有意に生存率の改善を認めた。また分離した肝細胞の核型であるが、骨髄細胞投与群、非投与群で著変を認めず、我々のモデルでは骨髄細胞の肝細胞への分化過程での細胞融合の関与は少ないと考えられた。

D. 考察

肝障害時に著明に、門脈周囲および小葉内にGFP陽性細胞が増加し肝細胞に分化していたことは、特殊な条件にて、骨髄中に肝幹細胞が肝細胞に分化することを示す。我々の解析において血清アルブミン値が改善し、しかも生存率も骨髄細胞投与群では、非投与群に比べ有意に生存率の改善を認めた。また骨髄細胞の肝細胞への分化において細胞融合が起こる可能性はないと考えられ、これらの結果より、我々が開発を目指す『自己骨髄細胞を用いた難治性肝疾患に対する細胞療法』は臨床応用可能な次世代の移植療法のなりえる可能性を示す。

E. 結論

今回我々はGFPトランスジェニックマウスを用いた骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデルを世界に先駆け開発した。さらに、このモデルを用い、劇症肝炎に対する自己骨髄細胞を用いた細胞療法の開発のために、基盤技術、知見を明らかにしていく。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N., Omori, K., Miyamoto, Shinoda K., Thorgeirsson SS., Okita K. A new in vivo model to monitor the differentiation of bone marrow cells into

hepatocytes

J Gastroenterology 37(S u p p l X I V), 162-163(2002)

- 2) Terai S, Sakaida I, Okita K et al. Development of new regenerative model: transplanted GFP positive bone marrow cell migrated into damaged area and differentiated into hepatocyte.
Hepatology 34:4;235A, 2001
- 3) Terai S., Thorgeirsson SS., Okita K.
HHM: a dominant inhibitory Helix Loop Helix protein which associated with liver stem cell and liver development.
Growth, Proliferation and Apoptosis in Hepatocyte (Springer Verlag) 1-9, 2001
- 4) Terai S., Thorgeirsson SS
Human homologue of maid: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression.
Hepatology;32(2):357-66, 2000

学会発表 (主なもの)

- 1) Terai S, Sakaida I, Okita K et al GFP/CCL4 model: An in vivo model for monitoring the differentiation of bone marrow cell into hepatocyte. 2002 FASEB Summer Resaerch Conference.
Mechanism of liver growth, differentiation and Molecular Pathogenesis of Hepatic dissaese (Invited Speaker)
- 2) Skaida J, Terai S, Okita K. et al.
Transplantation of bone marrow cells reverse CCl4-induced liver fibrosis.
AASLD Annual meeting (Boston) 2002
Presidential Plenary
- 3) Omori K., Terai S., Sakaida I, Okita K et al
Gene expression profile which regulate the differentiation of bone marrow cell into hepatocyte
in GFP/CCl4 model.
AASLD Annual meeting (Boston) 2002
- 4) Terai S., Sakaida I, Okita K et al
The strategy for development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver.
AASLD Annual meeting (Boston) 2002
- 5) Yamamoto N., Terai S., Sakaida I, Okita K et al
Liv8 mAb: A murine monoclonal antibody separate hepatic stem cell population in bone marrow.
AASLD Annual meeting (Boston) 2002

G. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 寺井 崇二, 沖田 極
骨髓細胞の遊走・分化・増殖評価モデル動物およびその利用法
特許出願 特願2001-271240号

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

Ⅱ：劇症肝炎時におけるアポトーシス誘導因子である
チトクロームC血清中濃度の臨床的検討について

研究協力者 沖田 極 山口大学医学部附属病院長

研究要旨：現在、肝障害および脳症の重症化を把握するためのマーカーは少ない。最近、肝・腎機能障害を伴うインフルエンザ脳症の脳症で血清中チトクロームCが治療効果をよく反映するマーカーであると報告された。この事により肝障害の程度とチトクロームCとの間に何らかの関係があるのではないかと考えられた。そこで肝障害の程度と血清チトクロームCとの関係を劇症肝炎（FH）と健常者（C）、急性肝炎（AH）、慢性肝炎（CH）、肝硬変（LC）、肝癌（HCC）患者と比較検討してみた。またFH群において他の血液検査および脳症との関係を検討したので報告する。

共同研究者

木村輝昭¹⁾、坂井田 功²⁾

¹⁾ 山口大学医学部生体防御機能学・助手

²⁾ 山口大学医学部消化器病態内科学・講師

A. 研究目的

肝障害の程度とチトクロームCとの関係を明確にし肝障害のマーカーとして利用できないかを検討するために、劇症肝炎（FH）を中心に血清チトクロームCの測定を行い、慢性肝炎（CH）、肝硬変（LC）、肝癌（HCC）患者と比較検討しさらにFH群において他の血液検査および脳症との関係を検討し、脳症のマーカーとしても利用できないかを検討した。

B. 研究方法

血漿交換が必要であった重症急性肝不全患者n=15（劇症肝炎n=13、急性肝不全n=1、慢性肝炎急性増悪n=1）、健常者（C、n=9）、急性肝炎（AH、n=12）および測定時前後1ヶ月においてトランスアミナーゼが50UI/L以下の状態変化の少ない肝疾患患者（CH、n=12、LC、n=13、HCC、n=12）を対照に血清チトクロームCを測定（エーザイ株式会社）し有意差がないかを比較検討した。また、FH群において生化学検査（AST、ALT、T.Bil、D.Bil、LDH、 γ -GTP、ALP、SP、Alb、ChE、PT%、BS、Cho、NH₃、BUN、AFP、HGF、Fischer比）との相関を検討し、さらに脳症別に血清チトクロームCの量に有意差がないかを比較検討した（0度N=3、I度N=3、II度N=3、IV度N=6）。統計学的な有意差検定はANOVAおよびX²検定を用いた。

C. 研究結果

肝細胞障害のマーカーとして使用しているALT、AST、LDHが有意（有意水準5%）に上昇している劇症肝炎群において同様にチトクロームCは他の群に比べて有意（有意水準5%）に上昇していた。さらに、劇症肝炎群についてはAST、LDH、ALP、HGFと正の相関をし、AFPとは負の相関をした。脳症別の各生化学検査との比較ではAST、ALT、LDH、

BUNは肝障害が高度になってくると逆に減少傾向を示すが、アンモニアと同様にチトクロームCは脳症増悪に伴い増加傾向がみられた。

D. 考察

ウイルス感染時におこる排除機構として、また、障害肝細胞の排除機構としてもアポトーシスが関与している。これらアポトーシスにはチトクロームCが関与している。チトクロームCはこれらの結果より肝障害と相関して上昇し、しかも肝性脳症に伴い増加傾向を示すため、急性肝障害および肝再生不全の指標および肝性脳症の指標として利用できる可能性が示唆された。

E. 結論

以上のように今後の新しい肝炎マーカーとして、チトクロームCは有用であり、脳症との関与をさらに検討し、今後、劇症肝炎時の予後予測や移植適合の規準の一つとなりうるかどうかの検討も必要であると考えられた。

F. 研究発表

論文発表
なし
学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

劇症肝炎に対するHGF治療法の確立

研究協力者 坪内 博仁 宮崎医科大学第二内科 教授

研究要旨：肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は肝細胞に対する増殖促進および抗アポトーシス作用を有しており、劇症肝炎ではHGF投与が肝再生のみならず、抗アポトーシス作用を介した病態進展阻止などの効果をもたらすことが期待される。今回、劇症肝炎患者に対する遺伝子組み換え型ヒトHGF治療法の確立を目的としてHGFの前臨床試験を行った。遺伝子組み換え型ヒトHGF静注投与における半減期は約数分と短い、肝臓へ高い組織移行性がみられた。一般毒性試験では腎臓のメサンギウム細胞が増生し、蛋白尿が出現したが、蛋白尿は可逆性でBUNおよびクレアチニン上昇はみられなかった。一方、HGFには明らかな肝発癌促進作用はみられなかったが、HGFの発癌性に関してはさらなる検討および慎重な判断が必要と考えられた。

A. 研究目的

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は種々の上皮細胞に対する増殖促進作用のみならず、抗アポトーシス作用、抗線維化作用など多くの生理活性を有している。劇症肝炎ではHGF投与が肝再生のみならず、抗アポトーシス作用を介した病態進展阻止などの効果をもたらすことが期待される。我々はこれまでにHGFの医薬品化に取り組み、2004年には人体へ投与可能な遺伝子組み換え型ヒトHGFが供給される。今回、劇症肝炎に対するHGF治療法の確立を目的としてHGFの前臨床試験を行った。

B. 研究方法

- ①薬物動態：遺伝子組み換えヒトHGFの静脈内投与を行い、その血中および組織中濃度を測定した。
- ②一般毒性試験：ラットに遺伝子組み換え型ヒトHGFを4週または13週反復投与し、その一般状態、体重、食餌摂取量、血液学的および血液生化学的検査、尿検査、器官重量、病理検査を行った。
- ③発癌性試験：ラットおよびマウスの肝二段階発癌モデルを用いて遺伝子組み換え型ヒトHGFの肝発癌に及ぼす影響を検討した。

C. 研究結果

- ①薬物動態：遺伝子組み換え型ヒトHGFをone shot 静注するとその半減期は約数分と短い、肝臓への高い組織移行性が認められた。
- ②一般毒性：比較的長期(4週、13週)のHGF投与による最も顕著な変化は腎臓のメサンギウム細胞増生と蛋白尿であった。これらの変化は動物種間で差があり、蛋白病は可逆性であった。最終的にNon-toxic dose (NTD) は0.03~0.1mg/kgと考えられた。
- ③発癌性試験：ラット肝二段階発癌モデル(Salt-Farberモデル応用法)に遺伝子組み換え型ヒトHGF(3mg/kg)を4週間投与したところ、肝前癌病変(GST-陽性P陽性巣)の増大が認められた。一方、マウス肝二段階発癌モデルに対する遺伝子組み換え

ヒトHGF投与では肝細胞腺腫および肝細胞癌の発生は促進されなかった。

D. 考案

遺伝子組み換えヒトHGFの半減期は短いものの、急性肝不全モデルに対するHGFの有効性は静注投与で確認されている。一般毒性試験では遺伝子組み換えヒトHGFの比較的長期投与で腎メサンギウム細胞増生と蛋白尿が認められた。しかし、BUN・クレアチニン上昇はみられず、蛋白尿はHGF投与中止によって改善した。また、腎障害は尿中アルブミンにてモニター可能であった。劇症肝炎における投与期間は1週間前後と考えられ、腎障害は軽減される可能性が考えられる。一方、発癌性試験ではラット肝発癌モデルで遺伝子組み換えヒトHGFが前癌病変を増大させたが、NTD(0.03~0.1 mg/kg)よりも高用量(3 mg/kg)であり臨床応用時の問題点は少ないと考えられる。他の発癌性試験でも遺伝子組み換えヒトHGFが発癌を促進する結果は得られていないが、肝細胞に対して増殖促進作用を示す遺伝子組み換えヒトHGFの発癌性の問題は慎重に判断しなければならない。

E. 結論

遺伝子組み換えヒトHGFの前臨床試験を行った。NTDは0.03~0.1 mg/kgで、一般毒性として腎臓のメサンギウム細胞増生と尿蛋白が認められた。また遺伝子組み換えヒトHGFには明らかな発癌促進作用はみられていないが、その可能性は否定できないため、さらなるデータの積み重ねが必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Moriuchi A, et al. A CRE and the region occupied by a protein induced by growth factors contribute to up-regulation of cyclin D1 expression in

hepatocytes. Biochemical and Biophysical
Research Communications 300: 415-421, 2003.

学会発表

蓮池悟 他. 2-AAF投与後肝切除モデル (Modified
Solt-Farber model)ラットにおけるrecombinant
human HGF (rhHGF) のoval cell増殖促進作用. 第6
回日本肝臓学会大会. 平成14年10月24-25日.

Hasuike S, et al. Hepatocyte growth factor
accelerates proliferation of hepatic oval cells in 2-
acety- oaminofluorene/partial hepatectomy model
in rats. 53rd Annual Meeting of the American
Association for the Study of Liver Disease. Nov 1-
5, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

CTLA4-Ig を用いた免疫抑制による劇症肝炎の治療の試み

研究協力者 渡辺 明治 富山医科薬科大学第三内科 教授

研究要旨：マウスCTLA分子とヒトIgGのFc部分との融合蛋白であるマウスCTLA-4Igは、樹状細胞からリンパ球への補助シグナルをブロックすることにより免疫反応を抑える。ヒトにおけるCTLA-4Igを用いた劇症肝炎治療を目指し、まず各種急性肝不全モデルマウスに対してマウスCTLA-4Igを蛋白・プラスミド・アデノウイルスの形で投与し、その肝炎抑制効果をみた。P.acnes/LPS投与のマウス劇症肝炎モデルに対してCTLA-4Ig蛋白あるいはCTLA-4Igを発現する組換えアデノウイルスを投与したが、多量の組換えアデノウイルスを早期に投与した場合のみ肝炎抑制・生存率上昇に効果を認めた。ヒトのウイルス性劇症肝炎の際には、樹状細胞からT細胞へのウイルス抗原の提示と補助シグナルの伝達による、いわゆる抗原特異的T細胞活性化が最初に起こる反応と考えられ、CTLA-4Igはこの段階をブロックすることにより、肝炎の進展を抑えることが可能と考えられる。今後、マウスでも抗原特異的T細胞活性化から始まる劇症肝炎モデルを作成し、CTLA-4Igの肝炎抑制効果を解析する予定である。

A. 研究目的

マウスCTLA4-Ig分子を用いて急性肝不全モデルマウスを治療する。

B. 研究方法

札幌医科大学分子医学研究部門教授 濱田 洋文先生よりコスミド pAxCAmCTLA-4Igを分譲して頂き、組換えアデノウイルスAxCAmCTLA-4Igを作成した。また hygromycinB 耐性プラスミドpcep4へmCTLA-4Ig遺伝子を組み込み、293EBNA細胞に遺伝子導入することにより大量のmCTLA-4Ig蛋白を得た。P.acnes/LPS投与マウス急性肝不全モデルは、6-8週齢のC57BL/6雌マウスのday 0に1 μ g/bodyのP.acnes死菌凍結乾燥末を、day 7にLPS 1mg/bodyを尾静脈より投与して作成し、以下の実験を行った。実験1. 第1群: day 0、第2群: day 6、第3群: day 7にそれぞれ50 μ gのmCTLA-4Ig蛋白を尾静脈より投与する群と第4群: day 0に10⁻⁸ (pfu)のAxCAmCTLA4-Igを投与する群を作成し、その肝炎抑制効果の有無をLPS投与後の血清ALT活性・生存率についてコントロール群（無治療群）と比較検討した。実験2. P.acnes/LPSモデルに対し、第1群: P.acnes投与7日前にAxCAmCTLA-4Igを実験1よりも大量の10⁻⁹ (pfu) 投与する群と第2群: day 0, day 2, day 4, day 6に50 μ gのmCTLA-4Ig蛋白を尾静脈より投与する群を作成し、その肝炎抑制効果の有無を、LPS投与後の血清ALT活性・生存率についてコントロール群（無治療群、第3群）と比較検討した。

C. 研究結果

実験1

第1群から第4群まで6時間後に血漿中ALT値のピークを認め、すべてのマウスが死亡した。なお、10⁻⁸ (pfu) のAxCAmCTLA4-Ig投与による肝障害は認められなかった。

実験2

第1群において、10⁻⁸ (pfu) のAxCAmCTLA-4Ig投与では認められなかった肝炎が、投与1週間後に一過性に認められた。しかしながら、LPS投与後の血清ALT活性は、第2群、第3群に比して有意に低く、生存率も上昇した。免疫組織学的検討も含めた肝組織の解析は現在行っているところである。なお、第2群と第3群では血清ALT活性・肝組織に差が無く、殆どがLPS投与後に死亡した。

D. 考察

10⁻⁹ (pfu) のAxCAmCTLA-4Igを、P.acnes投与1週間前に投与することにより、一過性の肝炎はみられたものの、LPS投与後の血清ALT活性および生存率は明らかに改善することが明らかとなった。今後、その機序を詳細に調べるとともに、安全で有効な投与方法を検討してゆく予定である。mCTLA-4Ig蛋白では効果が認められていないが、投与経路、投与量を含め、さらなる検討が必要と考えている。

E. 結論

AxCAmCTLA-4Igを用いた治療は、急性肝不全の治療に有効である可能性が示された。

F. 研究発表

なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

ウイルス性肝炎および肝硬変に対する肝移植の検討

分担研究者 川崎 誠治 順天堂大学第二外科

研究要旨：劇症肝炎の約70%は内科的治療のみによる治癒が期待できず、肝移植が唯一の救命手段となりうる。本研究では、劇症肝炎に対する生体および脳死肝移植の適応ならびに治療成績向上について検討した。

A. 研究目的

劇症肝炎に対する生体および脳死肝移植の適応ならびに治療成績について検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象は信州大学第一外科における生体および脳死肝移植症例190例。このうち劇症肝炎は25例であった。これらを対象に適応、術前術後管理、成績を検討した。

C. 研究結果

生体肝移植症例では、急性型が4例、亜急性型が20例で、B型肝炎ウイルスによるもの5例、薬剤性3例、それ以外の16例は原因が明らかでなかった(NANBNC)。急性型のうちの2例はB型肝炎ウイルスによるもので、極めて急速に病態が悪化し、頭蓋内圧モニタリングを行いながらの迅速な対応が求められた。同期間に生体肝移植を検討しながらも断念した非移植例は5例あり、断念した要因としてレシピエント側の要因3例(脳ヘルニア2例、アスペルギルス肺炎1例)、ドナー側の要因2例(提供意思の変化、脂肪肝各1例)であった。肝移植例24例中20例が生存中で、その生存率は劇症肝炎以外におけるものと同等であった。

脳死肝移植については、信州大学における脳死肝移植への登録症例50例のうち、劇症肝炎は6例を占め、移植し得た1例は良好な経過をたどり生存中であるが、移植できなかった5例は待機中に死亡した。

D. 考察

(1) 劇症肝炎症例に対しては、診断後早期より肝移植実施の必要性と可能性について検討を開始する必要がある。(2) 脳死肝移植による救命の機会、国内では極めて限られている。(3) 生体肝移植に向けては、ドナーへの十分な情報提供に基づいた同意が重要である。(4) 肝移植実施例における予後は、他疾患とほぼ同等である。

E. 結論

劇症肝炎に対する生体および脳死肝移植の適応と成績について検討した。

研究発表

1. 論文発表：Hashikura Y, Kawasaki S, et al. Recent advance in living donor liver transplantation. World J Surg 26: 243-246, 2002

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

難治性の肝疾患に関する研究

研究協力者 森脇 久隆 岐阜大学医学部臓器病態学講座消化器病態分野 教授

共同研究者

内木 隆文、永木 正仁

岐阜大学医学部臓器病態学講座消化器 病態分野

A. 研究目的

バイオ人工肝に必要なバイオリアクターの開発を目的として、我々は細胞外マトリックス、特に基底膜成分によって構成されるEHS (Engelbreth-Holm-Swarm)ゲルに注目し、EHSゲル上で培養された肝細胞が長期間、肝細胞特異的遺伝子の発現を維持し、さらにその作用は肝特異的転写制御因子である hepatocyte nuclear factor (HNF)-4並びにHNF-1を介して制御されていることを報告してきた。また、昨年度は肝細胞株にHNF-4遺伝子を導入し、同時に多数の肝細胞特異的遺伝子を亢進させることを報告した。初代ラット培養肝細胞にHNF-4を遺伝子導入することで、より高度の肝細胞特異機能を発現するスーパー肝細胞の確立を目的としている

B. 研究方法

ラットHNF4 cDNAをアデノウイルスに組み込み CAG (cytomegarovirus enhancer+chicken b-actin promotor+rabbit b-globin poly A) プロモーターを持つ非増殖型アデノウイルスベクター (AdCAGHNF4)を作製し、初代ラット培養肝細胞並びに肝癌細胞株HuH-7細胞に感染させ、HNF4を遺伝子導入、強制発現させる系を確立した。また、LacZ 遺伝子を含むウイルスベクターを作製し、導入効率の確認およびコントロールウイルスとした。HNF4の発現はノーザンブロット、ウエスタンブロット法にて遺伝子および蛋白レベルで確認した。以上の実験系を用い、細胞のviability を crystal violet 法にて検討し、さらに $\alpha 1$ -antitrypsin、apolipoprotein、transthyretin、glutamine synthetase 等の肝細胞特異的遺伝子の発現をノーザンブロット、ウエスタンブロット法、RT-PCR法にて遺伝子および蛋白レベルで検討し、さらにglutamine synthetase機能に関してはアンモニア代謝能を培養液中のアンモニア負荷により測定した。さらに、HuH7細胞においてはHNF-4の転写制御機構を明らかにするために、約9000種の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイを用い、HNF4遺伝子導入後の遺伝子発現プロファイルの検討を行った。

C. 研究結果

初代ラット培養肝細胞にアデノウイルスベクターを感染させ、その毒性と感染効率を検討した。アデノウイルスの毒性は10moiではアデノウイルスの毒性を認

めたため、1moiにて検討を行った。またLacZレポーター遺伝子を含んだウイルスAdCAGLacZを用いた検討では、この濃度ではほぼすべての細胞に感染しており、目的とする遺伝子を導入しうることが確認された。ノーザンブロット法にて導入したHNF4 mRNAの発現を確認し、アデノウイルスベクターはHNF-4 遺伝子導入においても良好な遺伝子発現を誘導し得た。

HNF4遺伝子を導入したラット初代培養肝細胞において、肝細胞のviabilityを検討すると、HNF-4遺伝子導入細胞において有意にviabilityが保たれることが示された。(図1)

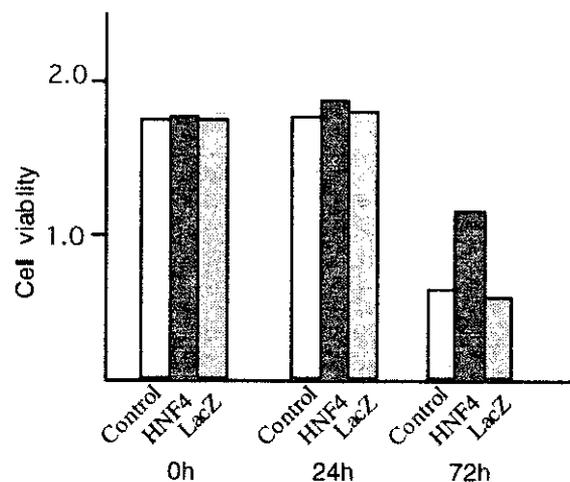


図1 初代ラット培養肝細胞における細胞生存数

通常の培養法では、肝細胞特異的遺伝子である $\alpha 1$ -antitrypsin、apolipoprotein C3、transthyretin mRNAの発現は、培養後経時的に減少していくが、HNF4を強制発現させたラット肝細胞ではこれら遺伝子の発現の増強並びに維持が認められた。また、HNF-4遺伝子導入後のHuH-7細胞を用いたマイクロアレイ解析では、約9000種の遺伝子を検討し2倍以上の発現の変化を有意なものとした。複数回のアレイの検討にて、HNF-4導入により56遺伝子の発現の増強と、6遺伝子の発現の抑制を観察した(図2)。タンパク質の機能がわかっているものについて、Adamsらの分類に従い、今回のHNF-4遺伝子導入による遺伝子発現プロファイルの検討を行った。その結果、脂質、糖、薬物代謝を始めとした多数の代謝関連遺伝子の誘導が観察された。このことは、HNF-4は肝臓における代謝関連遺伝子の制御において中心的役割を果たす事が示唆された。また、今回の発現プロファイル

の検討にて、代謝関連遺伝子以外にも、cyclin-dependent kinase inhibitor 1A、protein kinase Cといった細胞内伝達や細胞分裂制御遺伝子の誘導も認められた。このことは、HNF-4は肝細胞特異的遺伝子を直接、刺激誘導させるのみならず、細胞内シグナルを介して間接的に肝細胞を分化誘導する因子として働く可能性もあることが考えられた。

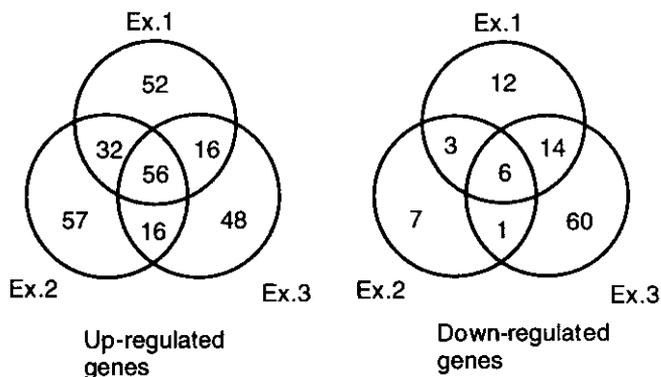


図2 マイクロアレイ解析 遺伝子数

マイクロアレイの発現変化の確認と、今回アレイ上にない肝特異的遺伝子の発現を検討するために、RT-PCR解析を施行した。HNF-4遺伝子導入により、phosphoenolpyruvate carboxykinase, biliverdin reductaseおよびUDP-glucuronidaseなどの誘導が認められ、マイクロアレイの結果と同様であり、マイクロアレイの結果が確認された。さらに今回マイクロアレイでは検討できなかったヒトの肝において薬物代謝で主要な役割を果たすcytochromeP450のサブタイプである1A2、2C9、2C19などの誘導が認められた。肝特異的転写因子の検討では、マイクロアレイと同様にPPARαの誘導が認められたが、逆にHNF3は抑制された。

アンモニア代謝の主要酵素であるグルタミン合成酵素の誘導がHNF-4導入によって認められたため、肝細胞にアンモニアを負荷し、その処理能の検討を行った。HNF-4遺伝子を導入するとHuH7細胞、HepG2細胞ともに培養液中のアンモニア濃度は有意に低下し、培養液中のアンモニアの処理能力の向上が認められた。上記同条件においてラット初代培養肝細胞の検討では、HNF-4遺伝子を導入した細胞では、肝癌細胞株と同様にアンモニア処理能力の向上が認められた(図3)。

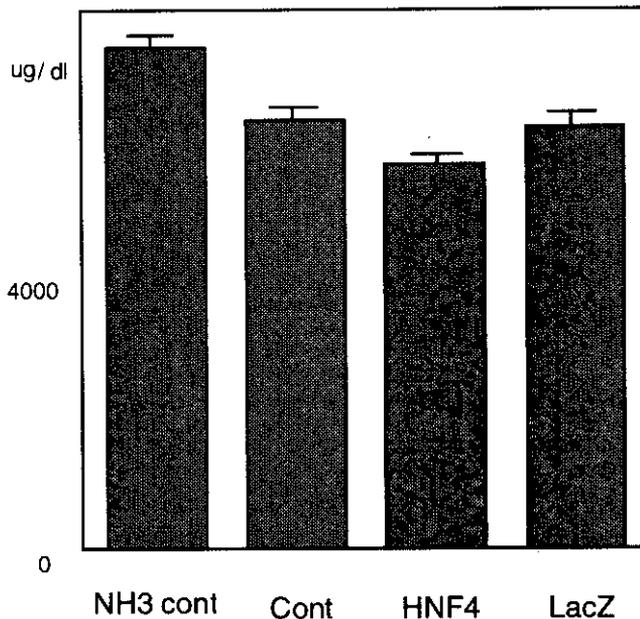


図3 初代ラット培養肝細胞におけるアンモニア代謝

D. 考察

バイオ人工肝の開発では、長期間、高度の肝特異機能を発現したバイオリクターの開発が急務である。我々は、肝特異的転写制御因子、特に遺伝子発現制御におけるヒエラルキーの上位に位置するHNF-4に着目し、それを肝細胞に遺伝子導入することにより、他の肝細胞特異的転写因子と協調して、二次的、三次的に肝細胞特異的遺伝子を誘導させることで、単独の遺伝子導入だけでは得られない複雑かつ多様な肝特異的機能を制御し得るのではないかと考えてきた。今回の実験結果より、HNF-4を遺伝子導入することで高度の肝特異機能を発現する肝細胞を作製し、それをバイオ人工肝に応用する可能性がより現実性を増したといえる。

HNF-4は1990年に同定された、steroids receptor super-family に属する肝臓に特異的な転写因子として、精力的に研究がなされている。現時点ではそのリガンドを初めとした制御機構は未だ明らかにされていないが、ステロイド、レチノイド、脂質を初めとした各種刺激により活性化され、他の肝特異的な転写因子であるHNF1、HNF3等とともに複雑なネットワークを形成し、主に代謝を中心とした各種肝細胞特異的な遺伝子を制御していると考えられている。

我々の検討では、非増殖型アデノウイルスベクターを用い、どの細胞においても効果的にHNF-4遺伝子が誘導されることを確認した。ノーザンブロット、ウエスタンブロット、RT-PCR解析において、HNF-4遺伝子導入の結果、cytochromeP450、glutamine synthetaseを初めとした各種肝特異的遺伝子の誘導が認められ、肝癌由来細胞株並びに初代ラット培養肝細胞において肝特異機能が増強することが認められた。またHNF-4遺伝子導入後の肝特異的遺伝子発現プロファイルの検討を目的としてマイクロアレイ解析を施行したところ、脂質代謝を中心とした広範囲にわ

たる代謝関連遺伝子の高度の誘導が認められ、また HNF-4を遺伝子導入された細胞においては、アンモニアの代謝能の向上が認められた。HNF-4遺伝子導入による肝特異的遺伝子の誘導は、初代ラット培養肝細胞においても確認され、HNF-4の導入は肝細胞分化に有用と考えられた。

E. 結論

以上の結果よりHNF-4遺伝子を導入することにより多くの肝特異的遺伝子を発現させたスーパー肝細胞の確立、ひいては、人工肝への有用性が示唆された。

今後は、HNF-4 遺伝子導入を初代養肝細胞や肝stem細胞に行うことで、より臨床応用可能なスーパー肝細胞の確立を目指す予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naiki T, Nagaki M, Shidoji Y, Kojima H, Imose M, Kato T, Ohishi N, Yagi K, Moriwaki H.
Analysis of gene expression profile induced by hepatocyte nuclear factor 4a in hepatoma cells using an oligonucleotide microarray :
J Biol Chem 2002 277,14011-14019

Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Asano T, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S.
TNF- α -induced IL-8 production via NF- κ B and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes .
Infect Immun 2002, 70: 6294-6301

Nagaki M, Miki Y, Naiki T, Kim Y-I, Ishiyama H, Hirahata I, Takahashi H, Sugiyama A, Muto Y, Moriwaki H. Development and characterization of a hybrid bioartificial liver using primary hepatocytes entrapped in a basement membrane matrix.
Digest Dis Sci 2001, 46:1046-1056

2. 学会発表

第40回日本人工臓器学会総会 2002年10月3日
シンポジウム「重症肝不全に適応される人工肝」
HNF-4遺伝子を応用したによるスーパー肝細胞の確立とバイオ人工肝の開発
内木隆文、永木正仁、森脇久隆

第6回日本肝臓学会大会 2002年10月25日
シンポジウム
Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4遺伝子導入による肝特異的転写因子の発現の制御
内木隆文、永木正仁、森脇久隆

第1回日本再生医療学会総会 2002年4月9日
Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4遺伝子導入による肝特異的転写因子の発現の制御
内木隆文、永木正仁、森脇久隆