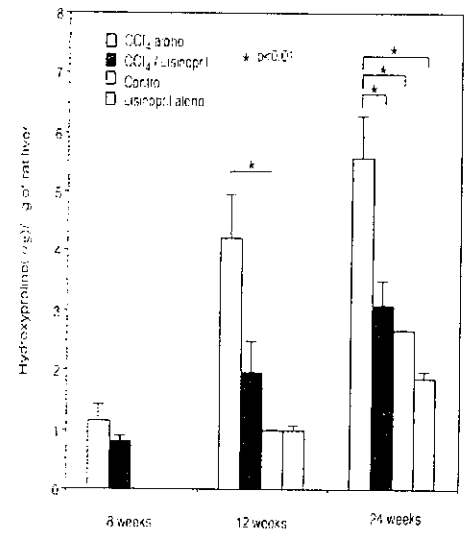
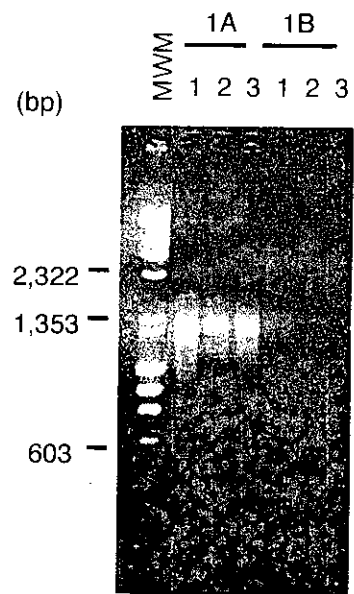


☒ 1

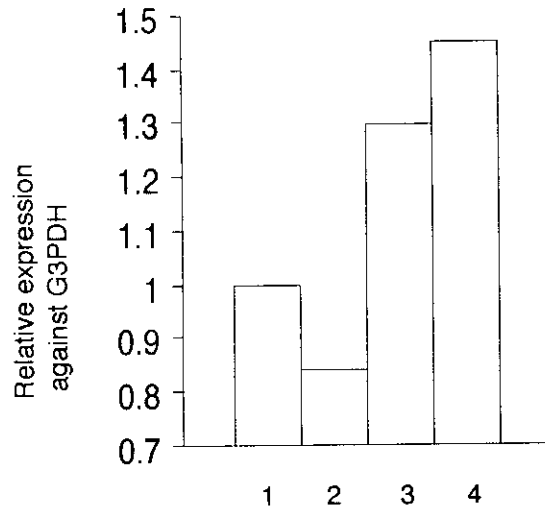


☒ 2

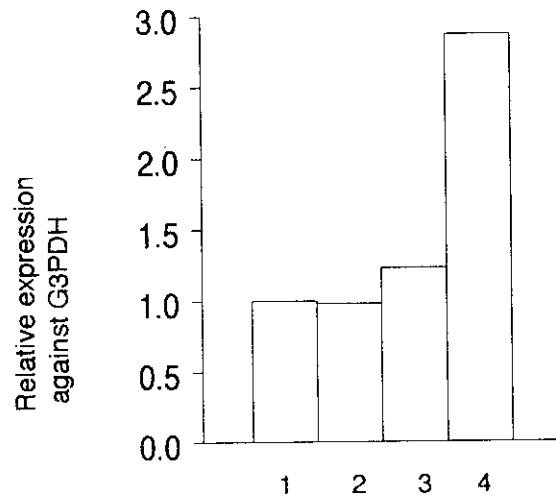


☒ 3

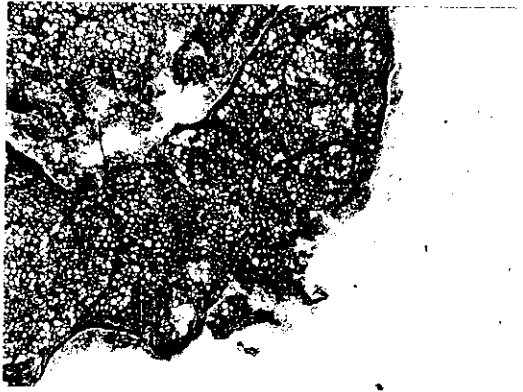
pro- $\alpha$  1(I) collagen mRNA



TGF- $\beta$  1 mRNA



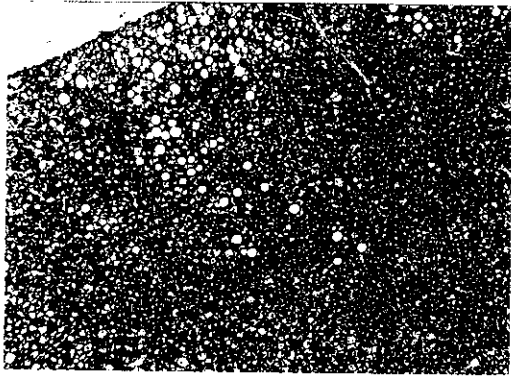
☒ 4



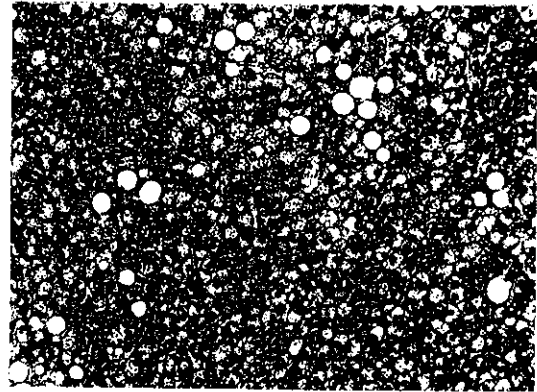
a



b



c



d

图 5

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1) 鈴木秀和、石井裕正 肝硬変に合併した胃・十二指腸潰瘍 肝臓 43 2002 70-76

2) Ohishi T, Saito H, Tsusaka K, Toda K, Inagaki H, Hamada Y, Kumagai N, Atsukawa K, Ishii H. Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatol Res* 2001;21:147-158

3) Horie Y, Yamagishi Y, Kato S, Kajihara M, Kimura H, Ishii H. Low-dose ethanol attenuates gut ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats via nitric oxide production. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:211-217.

4) Horie Y, Ishii H. [Severe alcoholic hepatitis in Japan] *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2002;99:1326-33. Review. Japanese.

5) Yamagishi Y, Saito H, Shimadu M, Hoshino K, Kobayashi H, Nakamoto N, Horie Y, Kato S, Morikawa Y, Kitajima M, Ishii H. [Intensive therapy for fulminant

hepatic failure: importance of co-operation between physicians of internal medicine and transplantation surgery] *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2002 ;99:1205-12. Japanese.

6) Tamai H, Horie Y, Kato S, Yokoyama H, Ishii H. Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26:75S-80S.

7) Horie Y, Yamagishi Y, Kato S, Kajihara M, Tamai H, Granger DN, Ishii H. Role of ICAM-1 in chronic ethanol consumption-enhanced liver injury after gut ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283:G537-43.

8) Saito H, Tada S, Wakabayashi K, Nakamoto N, Takahashi M, Nakamura M, Ebinuma H, Ishii H. The detection of IRF-1 promoter polymorphisms and their possible contribution to T helper 1 response in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22:693-700.

9) Adachi M, Ishii H. Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free Radic Biol Med*. 2002;32:487-91. Review.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許取得	なし
実用新案登録	なし
その他	なし

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）  
末期肝硬変に対する治療に関する研究  
平成14年度分担研究報告書

肝線維化改善における神経幹細胞の関与

分担研究者 渡辺 哲 東海大学医学部環境保健学

研究要旨 四塩化炭素 12 週間投与にてラットに作成した肝硬変モデルの回復過程で、神経幹細胞のマーカーである Musashi-1 陽性細胞が血管周囲や線維束にみられた。これらの細胞は、一部 c-kit 陽性であることより、骨髄由来の幹細胞と考えられた。また、MMP-13 陽性細胞もみられたことより、骨髄由来幹細胞が肝線維化の改善に関与していると考えられた。

研究協力者 東海大学医学部地域保健学 稲垣 豊

A. 研究目的

ある条件下で、一旦形成された肝線維化が改善し、時には正常肝に近い状態に改善することは、実験的にまた臨床例でも観察されることは広く知られるようになった。肝臓における蓄積した細胞外マトリックスからなる線維化がどのような機序で崩壊し、消失するのかは、古くから興味を持たれ研究されてきた。肝線維化改善に向けて細胞外マトリックス分解酵素の遺伝子発現と遺伝子治療を

はじめとする新しい治療方法開発の可能性について、平成14年度厚生労働科学研究費を受けて行なった私どもの研究の成果を報告する。

私どもは、8週間あるいは12週間にわたり週2回の慢性に四塩化炭素を投与して実験的肝線維化を作成する。最終投与後2日および3日に屠殺して肝臓を観察したときが最も線維化が高度であり、5日後には線維化の減少が見られることを多年の実験から知っていた。

ラットでは、ヒトのMMP-1に全く相同する遺伝子は報告がなく、ヒトのMMP-13と90%ホモロジーを有するcDNAをフランスの故Basset

教授から供与された。ラットの慢性四塩化炭素により作成した肝線維化実験モデルでの線維化過程におけるMMP-13の遺伝子発現をRT-PCR法で観察しても感度が悪いために、増幅后感度特異性を高めるためにサザン・ブロッティングを行なった。この方法で観察すると、四塩化炭素投与中止後5日後にRT-PCRでMMP-13の遺伝子発現が最も強く見られ、中止後7日後には最終投与後2日および3日のレベルと同程度であった。すなわち、Iredaleらは投与中止5日後を観察しなかったためコラゲナーゼの発現増強を観察できなかったといえる。

これを *in situ* hybridization で観察すると、5日後および7日後に強いMMP-13 mRNAの陽性シグナルが見られた。すなわち、崩壊した末梢の線維化部の肝星細胞と推測される細胞にMMP-13 mRNAの発現が多数見られた。比較的幅の狭い線維性隔壁で、肝細胞に接するともいえる末梢部分が特に細く線維化の改善が見られ、そこにみられる細胞にMMP-13mRNAの発現が見られた。肝星細胞と推測した根拠は、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)抗体陽性細胞が連続切片で同部位に観察されたことによる。さらにこのことを鏡面像の連続切片による観察で確認した。新生線維性隔壁に接してい

て、そこから線維の崩壊が生じたのではと推測するような部位の、または近傍の肝星細胞に強いMMP-13mRNAの発現が見られた

MMP-13を発現していた細胞が全て肝星細胞でなく、肝細胞と推測される所見もあり、またKupffer細胞なども否定できず、発現細胞について肝細胞も否定できないと考え検討を行なっている。従来、肝線維化の改善過程で関与するMMPsの分子種はMMP-2およびMT1-MMPとされてきたが、私どもの論文でMMP-13が重要な役割をしていることが示された。

最近肝臓に骨髄由来幹細胞がみられることが種々の病態で報告されている。そこで今回の研究では、ラット肝線維化改善における幹細胞の出現と肝線維化改善との関連について明らかにすることも目的とした。

## B. 研究方法

肝線維化は、Wistar系雄生ラットを用い、オリーブオイルに30%の濃度にした四塩化炭素を週2回腹腔内に注射し作成した。四塩化炭素8週および12週間投与後2日目、5日目、7日目にラットを屠殺し、肝を摘出した。神経幹細胞のマーカーであるMusashi-1の発現をRT-PCRおよび酵素抗体法で検討した。また、骨髄由来幹細胞のマーカーとして *c-kit*

の発現を検討した。その他、 $\alpha$ -SMA、アルブミン、 $\alpha$ -fetoprotein (AFP)、ED2、CK19、MMP-13 の発現についても酵素抗体法、蛍光抗体法で検討した。

### C. 研究結果

四塩化炭素投与8週で肝線維化が、12週で肝硬変が作成された。投与中止後は線維化の改善がみられた。Musashi-1 抗原陽性細胞が四塩化炭素投与12週後の改善過程で血管周囲と線維束にみられた。陽性細胞は小型細胞で、大きさや形態から oval cell に類似していた。RT-PCR による遺伝子発現は、12週投与2日目に最も強くみられ、その後漸減した。蛋白発現は5日目に最も多くみられた。いずれも8週投与群ではわずかにみられるのみであった。蛍光抗体法による二重染色では、Musashi-1 陽性細胞の一部は $\alpha$ -SMA が陽性であった。また、c-kit 陽性細胞もみられた。Musashi-1 と MMP-13 との二重染色では、一部の細胞に両者とも陽性の細胞が観察された。

### D. 考案

ラットの実験的肝線維化モデルでは、特に肝硬変の改善過程で神経系の幹細胞のマーカーである Musashi-1 陽性細胞がみられた。この細胞は c-kit も陽性であることより、骨髄由

来と考えられた。Musashi-1 陽性細胞は、一部が $\alpha$ -SMA 陽性であることより肝星細胞に分化すると考えられた。今回の成績では Musashi-1 とアルブミン、AFP 同時陽性細胞は観察されず、肝細胞への分化ははっきりしなかった。しかし、一部の Musashi-1 陽性細胞が MMP-13 を産生することより、肝硬変の回復過程に出現する骨髄由来幹細胞が肝線維化改善に直接関与していることが示唆された。肝硬変治療への応用を計るためには、いかに骨髄由来幹細胞を肝臓に誘導し、コラゲナーゼ産生に導くかが重要な課題である。次年度では、この課題に対し骨髄由来幹細胞を移植したマウスを用い、研究を進める予定である。

### E. 結論

肝硬変の線維沈着に対する治療として造血幹細胞中の神経系幹細胞が治療に応用できる可能性が考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

学会発表 (2002 年)



- 1) 肝線維化改善過程における間質性コラゲナーゼ発現細胞の検討。渡辺 哲、新岡真希、杉岡良彦、下境佳織、湯浅佐和子、朴沢重成、岡崎 勲、第 27 回日本衛生学会総会、平成 14 年 3 月 27 日 (津)
- 2) ヒト肝癌細胞株における matrix metalloproteinase-1 発現機構の解明。杉岡良彦、渡辺 哲、湯浅佐和子、新岡真希、朴沢重成、岡崎 勲、第 27 回日本衛生学会総会、平成 14 年 3 月 29 日 (津)
- 3) 肝線維化改善における肝幹細胞の役割。新岡真希、渡辺 哲、下境佳織、岡崎 勲、第 34 回日本結合組織学会学術大会、平成 14 年 4 月 4 日 (浜松)
- 4) VDT 作業者アンケートに基づき、個別に行った衛生教育により自覚疲労が軽減した事例。塩崎裕子、相川浩幸、木ノ上高章、渡辺 哲、寺門運雄、井上鉄郎、第 44 回日本産業衛生学会、平成 14 年 4 月 12 日 (神戸)
- 5) 経年健診データ検査値間における相関分析。三廻部肇、渡辺 哲、村田千里、相川浩幸、木ノ上高章、古屋博行、岡崎 勲、第 44 回日本産業衛生学会、平成 14 年 4 月 10 日 (神戸)
- 6) 肝線維化改善過程における MMP-13 発現細胞は神経幹細胞か。渡辺 哲、岡崎 勲、第 38 回日本肝臓学会総会、平成 14 年 6 月 13 日 (大阪)
- 7) 地域における冠動脈疾患予測発症率と飲酒量との関係。古屋博行、渡辺 哲、岡崎 勲、第 37 回日本アルコール・薬物医学会総会、平成 14 年 9 月 6 日 (東京)
- 8) Cancer prevention and screening. Watanabe T. The 8th international symposium on information, education and communication (IEC) activities for the betterment of health in developing and developed countries. September 27 (Tokyo)
- 9) 肝線維化改善における神経幹細胞の関与。渡辺 哲、岡崎 勲、DDW-Japan 2002、第 6 回日本肝臓学会大会シンポジウム (肝線維化治療のストラテジー)、平成 14 年 10 月 24 日 (横浜)
- 10) Neural stem/progenitor cells appear in the recovery from liver fibrosis in the rat. Watanabe T, Niioka M, Sugioka Y, Inagaki Y, Okano H, Okazaki I. The 53rd annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases - 2002, November 3 (Boston).
- 11) 肝線維化改善における肝幹細胞の関与。渡辺 哲、新岡真希、杉

- 岡良彦、稲垣 豊、岡崎 勲、第 16 回肝類洞壁細胞研究会、平成 14 年 12 月 14 日 (東京)
- 12) 渡辺 哲、新岡真希、石川昭子、岡崎 勲：肝線維化の分子生物学—消化器疾患の最新医療、(幕内雅敏、川野淳、千葉勉、中村仁信、森正樹編) pp68-74、2001 年 4 月、先端医療技術研究所
- 13) 石川昭子、渡辺 哲、岡崎 勲：肝線維化の分子機構とそのマーカー。臨床消化器内科、16 (7 号)、2001 年 5 月 25 日増刊号 (消化器疾患の分子医学)、pp899-906、日本メディカルセンター
- 論文発表
- 1) Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. Keio J Medicine, 50: 58-65, 2001
- 2) Watanabe T, Niioka M, Hozawa S, Okazaki I. Cells expressing interstitial collagenase mRNA in the recovery from rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. Cells of the Hepatic Sinusoid (ed. by E. Wisse, D.L. Knook, R.de Zanger, M.J.P. Arthur), vol 8: 277-279, 2001 (August), Kupffer Cell Foundation
- 3) Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. J Hepatology, 35: 465-473, 2001
- 4) 岡崎 勲、渡辺 哲、杉岡良彦：肝線維化マーカーによる発癌予知。内科、88 (4) : 625-629、2001 (南江堂)、10 月号
- 5) Watanabe T, Niioka M, Shimosakia K, Hozawa S, Okano H, Okazaki I: Neural progenitor cells participate in spontaneous resolution of liver fibrosis by expressing MMP-13. Hepatology, 34, No.4, Pt 2: 359A, 2001
- 6) 岡崎 勲、渡辺 哲、稲垣 豊：肝線維化研究の進歩。日本消化器病学会雑誌、99 (4) : 353-364、2002 年
- 7) Miyaguchi S, Watanabe T, Takahashi H, Saito H, Ishii H. Effect of Interferon Therapy in Patients with Hepatitis C Virus Positive Hepatocellular

Carcinoma. Hepato-  
Gastroenterology, 49: 724-729,  
2002 (May-Jun)

Jpn J Alcohol & Drug  
Dependence 37 (5), 513-522,  
2002

- 8) 渡辺 哲、新岡真希、杉岡良彦：  
線維分解系の亢進。肝胆膵、44  
(5)：619-624、2002 (5月号)  
(アークメディア社) (肝硬変は  
治るか)
- 9) 岡崎 勲、渡辺 哲：肝線維化  
の治療戦略、総論。肝胆膵、44(5)：  
589-598、2002 (アークメディア  
社) (肝硬変は治るか)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特に記載することなし。

- 10) 渡辺 哲：肝の線維化。臓器線  
維症—発症機序の解明と対策。医  
学のあゆみ、201 (No 12)：  
891-894、2002 (6月22日) (医  
歯薬出版)

- 11) Watanabe T, Niioka M,  
Sugioka Y, Inagaki Y, Okano H,  
Okazaki I. Neural  
stem/progenitor cells appear in  
the recovery from liver fibrosis  
in the rat. Hepatology, 36, No 4,  
Pt 2: 248A, 2002

- 12) Furuya H, Watanabe T,  
Sugioka Y, Inagaki Y, Okazaki I.  
Effect of ethanol and  
docosahexaenoic acid on nerve  
growth factor-induced neurite  
formation and neuron specific  
growth-associated protein  
gene expression in PC12 cells.

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）  
末期肝硬変に対する治療に関する研究  
平成14年度分担研究報告書

**肝硬変に対する遺伝子治療を目標とした肝への遺伝子導入に関する研究**

分担研究者 栗山茂樹 香川医科大学

研究要旨 肝硬変に対する遺伝子治療を目標とし、マウスおよびラットを用いた肝への遺伝子導入に関する基礎的検討を行い、以下の如き研究成果を得た。

1. アデノウイルスベクターを用いて、外来遺伝子を直接肝内に注入、経門脈的に肝内に注入、あるいは経静脈的に全身投与すれば、投与ルートของ如何に拘わらず、肝における極めて効率の良い外来遺伝子発現を誘導し得た。

2. 傷害肝に対する遺伝子導入の可能性を検討するために、肝硬変および劇症肝炎モデルマウスを作製し、尾静脈より組換えアデノウイルスを投与したところ、正常肝マウスに投与した場合と同程度に有効な外来遺伝子発現を肝において誘導し得た。さらに、正常肝マウスに投与した場合と同様に、傷害肝マウスにおいても重篤な副作用の発現は認めなかった。

3. 大多数のヒトは小児期にアデノウイルス感染を経験しており、アデノウイルスに対する特異的免疫が誘導されているため、ヒトにおけるアデノウイルスを用いた遺伝子治療は、実験動物におけるアデノウイルスの再投与に相当すると考えられる。そこで、より臨床に近似した条件での検討を行うために、アデノウイルスの初回投与時ではなく、再投与時のみにシクロスポリンあるいはFK506による免疫抑制処置を行い、組換えアデノウイルスを経門脈的あるいは経尾静脈的に再投与したところ、アデノウイルス再投与に対する液性ならびに細胞性免疫反応が抑制され、肝における外来遺伝子の再発現を誘導することが可能であった。

4. 以上の研究結果より、肝硬変などの重篤な肝疾患を有する場合にも、組換えアデノウイルスを経静脈的に全身投与すれば、肝における有効かつ安全な外来遺伝子発現の誘導が可能であり、肝硬変患者に対する in vivo 遺伝子治療の可能性が示された。

## A. 研究目的

肝硬変に対する遺伝子治療を目標とし、臨床応用が容易である *in vivo* 遺伝子導入法を用いて、肝への遺伝子導入の有効性と安全性を基礎的に検討した。遺伝子導入ベクターとしては、肝への遺伝子導入効率が良い組換えアデノウイルスを用いて、マウスおよびラット肝への遺伝子導入効率を検討した。さらに、傷害肝への *in vivo* 遺伝子導入の可能性を検討するために、肝硬変モデルおよび劇症肝炎モデルマウスを作製し、組換えアデノウイルスを用いた傷害肝への遺伝子導入の有効性と安全性を評価した。

## B. 研究方法

初期遺伝子領域 1A(E1A)、E1B、E3 を欠損させた 5 型のアデノウイルスを backbone とし、サイトメガロウイルスのエンハンサーと chicken  $\beta$ -actin プロモーターから成る CAG プロモーターの制御下に、大腸菌の  $\beta$ -galactosidase 遺伝子である lacZ 遺伝子を発現する組換えアデノウイルスを作製し、高力価のアデノウイルスを精製した。肝における lacZ 遺伝子発現は、X-gal 染色を用いて免疫組織学的に検討するとともに、肝における大腸菌由来の  $\beta$ -galactosidase 活性を定量的に評価した。

傷害肝モデル動物としては、雌性 BALB/c マウスに lipopolysaccharide と D-galactosamine を腹腔内投与し、劇症肝炎モデルマウスを作製した。肝硬変モデルマウスは、雌性 BALB/c マウスに thioacetamide を腹腔内投与し作製した。

なお、組換え DNA 実験および動物実験のプロトコールは、研究施設の承認を受けたものであり、ガイドラインを遵守して行われた。

## C. 研究結果

1. アデノウイルスの投与ルートの違いによる肝での lacZ 遺伝子発現の変化

マウスおよびラットの腹腔内、門脈内、あるいは尾静脈内に lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを投与し、7 日後に肝における lacZ 遺伝子の発現を X-gal 染色によって評価したところ、投与ルートの如何に拘わらず、40%-60%の細胞において lacZ 遺伝子発現を認め、肝における効率の良い外来遺伝子発現を誘導し得た。

2. 傷害肝における lacZ 遺伝子発現

次に、肝硬変モデルおよび劇症肝炎モデルマウスの尾静脈より lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを投与し、傷害肝においても外来遺伝

子発現を誘導し得るかを検討した。まず、アデノウイルス投与7日後の lacZ 遺伝子発現を X-gal 染色によって検討したところ、劇症肝炎モデルマウスの肝では約 40%程度の細胞が染色され、肝硬変マウスの肝では約 60%の細胞が X-gal 染色陽性であった。正常肝マウスの尾静脈よりアデノウイルスを投与した場合には、約 40%程度の肝内細胞が X-gal 染色陽性であった。さらに、肝における lacZ 遺伝子発現を定量的に評価したところ、正常肝、劇症肝炎肝および硬変肝における  $\beta$ -galactosidase 活性はそれぞれ、 $25.0 \pm 12.7$ 、 $11.8 \pm 3.6$ 、 $66.0 \pm 15.0$  pg of  $\beta$ -galactosidase/ $\mu$ g protein であり、劇症肝炎肝での  $\beta$ -galactosidase 活性は、正常肝に比し有意に低値を示したが、十分な lacZ 遺伝子発現が誘導されており、硬変肝における  $\beta$ -galactosidase 活性は正常肝におけるそれよりも有意に高値を示した。さらに、アデノウイルス投与前後における ALT、AST、LDH などの肝関連血清パラメーターを測定したところ、正常肝マウス同様に、劇症肝炎マウスおよび肝硬変モデルマウスにおいても、軽度の上昇を認めただけであった。以上の結果より、劇症肝炎や肝硬変などの重篤な傷害肝においても、アデノウイルスを経静脈的に全身投与すれば、有効かつ

安全な遺伝子発現を肝において誘導し得ることが判明した。

### 3. アデノウイルスの再投与による肝における外来遺伝子発現

lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを投与すれば、マウスあるいはラット肝における効率の良い遺伝子発現の誘導が可能であったが、遺伝子発現は一過性であり、投与35日後には肝における lacZ 遺伝子発現は消失した。アデノウイルスの初回投与35日後に、経門脈あるいは経尾静脈的にアデノウイルスの再投与を行ったが、肝における lacZ 遺伝子の再発現は誘導されなかった。そこで、アデノウイルスの初回投与より1年の期間を置き再投与を行ったが、やはり肝における lacZ 遺伝子発現は誘導されなかった。アデノウイルス投与を行ったラットにおける免疫誘導の有無を検討したところ、アデノウイルスに対する中和抗体とアデノウイルス特異的 T 細胞の誘導を認めた。さらに、アデノウイルスに対する中和抗体とアデノウイルス特異的 T 細胞は、アデノウイルスの再投与によって著明な上昇を認めた。

大多数のヒトは小児期にアデノウイルスに感作されているため、アデノウイルスに対する液性ならびに細胞性免疫が誘導されていると考えられる。したがって、ヒトにおけるアデノウイルスを用いた遺伝子治療は、

実験動物におけるアデノウイルスの再投与に相当すると考えられる。そこで、より臨床に近似した条件での検討を行うために、アデノウイルスの初回投与時ではなく再投与時のみに、シクロスポリンあるいはFK506による免疫抑制処置を行い、lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを経門脈あるいは経尾静脈的に再投与したところ、アデノウイルス再投与に対する液性ならびに細胞性免疫反応が有意に抑制され、肝における外来遺伝子の再発現を誘導することが可能であった。

#### D. 考察

遺伝子治療のプロトコールとしては、遺伝子導入を行うための標的細胞を体内より採取し、*in vitro*において遺伝子導入を行った後に再び体内に戻す *ex vivo* 遺伝子治療と、体内の標的細胞に直接遺伝子導入を行う *in vivo* 遺伝子治療が存在する。先天性の遺伝子病などに対する遺伝子治療としては、遺伝子導入効率を高めるために、専ら *ex vivo* 遺伝子治療が行われている。しかし、肝硬変に対する遺伝子治療を考えた場合には、肝硬変患者においては肝予備能が著明に低下しているため、標的細胞の採取に外科的手技を要する *ex vivo* 遺伝子治療は実用的とはいえず、肝硬変に対する臨床応用可能な遺伝

子治療は、*in vivo* 遺伝子治療に限られると言っても過言ではない。そこで、本検討においては、肝硬変に対する臨床応用可能な遺伝子治療を目指した基礎的検討として、組換えアデノウイルスを用いた *in vivo* 遺伝子導入によって、肝への効率的かつ安全な遺伝子発現の誘導が可能かを検討した。

組換えアデノウイルスをマウスあるいはラットの肝内に直接注入あるいは開腹後に門脈内に注入すると、肝における強力な外来遺伝子発現の誘導が可能であった。次に、より簡便な投与方法である経静脈的な全身投与を行った場合にも、肝における遺伝子発現を誘導し得るかを検討したところ、肝内注入および門脈内注入に匹敵する遺伝子発現の誘導が可能であり、アデノウイルスを経静脈的に全身投与すれば、肝において非常に効率の良い外来遺伝子発現を誘導し得ることが示された。

さらに、傷害肝においてもアデノウイルスを経静脈的に全身投与すれば、肝における有効な遺伝子発現を誘導し得るかを検討するために、劇症肝炎および肝硬変モデルマウスを作製した。アデノウイルスを尾静脈より投与し、傷害肝における遺伝子発現を評価したところ、正常肝に匹敵する遺伝子発現を誘導し得ることが判明した。さらに、傷害肝にアデ

ノウイルスを投与しても、更なる肝機能の傷害は惹起されず、アデノウイルスを使用すれば、傷害肝においても安全かつ有効に遺伝子発現を誘導し得ることが示された。

アデノウイルスを経静脈的に投与すれば、肝において有効かつ安全な遺伝子発現を誘導し得たが、外来遺伝子の発現が一過性であったため、アデノウイルスの再投与を行ったが、遺伝子の再発現は誘導されなかった。アデノウイルス初回投与より長期間を経たラットにおいても遺伝子の再発現は誘導されず、アデノウイルスに感作された動物では、アデノウイルスに対する液性ならびに細胞性免疫が誘導されていた。

アデノウイルスの初回投与時に免疫抑制剤などによる処置を行っておき、アデノウイルス再投与時にも同様の処置を行えば、遺伝子の再発現を誘導し得ることが報告されている。しかし、大多数のヒトは小児期にアデノウイルスに罹患しており、アデノウイルスに対する液性ならびに細胞性免疫が誘導されていると考えられる。したがって、ヒトにおけるアデノウイルスを用いた遺伝子治療は、実験動物におけるアデノウイルスの再投与に相当すると考えられる。そこで、より臨床に近似した条件での検討を行うために、アデノウイルスの初回投与時ではなく、再投与時の

みに免疫抑制剤による処置を行い、アデノウイルスを再投与したところ、経門脈的に投与した場合のみならず、経尾静脈的に全身投与した場合にも、アデノウイルスに対する液性ならびに細胞性免疫反応が有意に抑制され、肝における外来遺伝子の再発現を誘導することが可能であった。したがって、ヒトにアデノウイルスを用いた遺伝子治療を行う際にも、アデノウイルス投与時に免疫抑制的な処置を施しておけば、肝における遺伝子発現を誘導し得ることが示唆された。

## E. 結論

アデノウイルスは、正常肝のみならず肝硬変を含む傷害肝にも安全かつ有効に遺伝子導入を行えるベクターであり、アデノウイルスに対する中和抗体を保有するヒトに対しても、免疫抑制剤の投与を行えば肝における外来遺伝子発現を誘導し得る可能性が示された。以上の結果より、肝硬変に対する遺伝子治療の臨床応用の有用性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。



- G. 研究発表
1. 論文発表
- 1) Kuriyama S, Tsujinoue H, Nakatani T, Yoshiji H, Fukui H. Gene therapy for hepatocellular carcinoma: recent advancements and problems to overcome. In: *Molecular Biology and Immunology in Hepatology*. Tsuji T, Higashi T, Zeniya M, Mayer zum Buschenfelde K-H, eds. Elsevier Science, Amsterdam, pp147-168, 2002.
- 2) 栗山茂樹, 辻之上裕久, 美登路昭, 吉治仁志, 木田裕子, 船越文美, 正木勉, 黒河内和貴, 渡辺精四郎, 福井博. 肝癌に対する免疫遺伝子治療\_多発性肝癌に対するアジュバント療法の可能性\_, 再生・増殖・分化と消化器病(小俣政男編), アークメディア, pp150-156, 2002.
- 3) Yoshida S, Kurokohchi K, Arima K, Masaki T, Hosomi N, Funaki T, Murota M, Kita Y, Watanabe S, Kuriyama S. Clinical significance of lens culinaris agglutinin-reactive fraction of serum  $\alpha$ -fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 20: 305-309, 2002.
- 4) Wu F, Nishioka M, Fujita J, Murota M, Ohtsuki Y, Ishida T, Kuriyama S. Expression of cytokeratin 19 in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 20: 31-37, 2002.
- 5) Nakai S, Masaki T, Shiratori Y, Ohgi T, Morishita A, Kurokohchi K, Watanabe S, Kuriyama S. Expression of p57<sup>KIP2</sup> in hepatocellular carcinoma: relationship between tumor differentiation and patient survival. *Int J Oncol* 20: 769-775, 2002.
- 6) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin D J, Huber J, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Imazu H, Fukui H. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35: 834-842, 2002.
- 7) Deguchi A, Arima K, Masaki T, Yachida M, Nakai S, Ito T, Kita Y, Kurokohchi K, Watanabe S, Kuriyama S. Enhanced expression of bcl-2 in lymphocytes infiltrating into the liver of patients with primary biliary cirrhosis. *Int J Mol Med* 9: 571-577, 2002.
- 8) Akahane M, Kuriyama S, Ohgushi H, Akahane T, Kawamura K, Watanabe S, Funakoshi F, Yoshiji H, Ikenaka K, Takakura Y.

- Enhancing and suppressing effects of dexamethasone on transgene expression in vitro. *Int J Mol Med* 10: 107-112, 2002.
- 9) Kurokohchi K, Watanabe S, Masaki T, Hosomi N, Funaki T, Arima K, Yoshida S, Nakai S, Murota M, Miyauchi Y, Kuriyama S. Combination therapy of percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation against hepatocellular carcinomas difficult to treat. *Int J Oncol* 21: 611-615, 2002.
- 10) Wu F, Fujita J, Murota M, Li J-Q, Ishida T, Nishioka M, Imaida Y, Kuriyama S. CYFRA 21-1 is released in TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7. *Int J Oncol* 21: 441-445, 2002.
- 11) Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Imazu H, Yanase K, Kuriyama S, Fukui H. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats. *J Hepatol* 37: 22-30, 2002.
- 12) Kurokohchi K, Watanabe S, Masaki T, Hosomi N, Funaki T, Arima K, Yoshida S, Miyauchi T, Kuriyama S. Combined use of percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation for the effective treatment of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 21: 841-846, 2002.
- 13) Ishizaka S, Shiroi A, Kanda S, Yoshikawa M, Tsujinoue H, Kuriyama S, Hasuma T, Nakatani K, Takahashi K. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3 $\beta$  gene. *FASEB J* 16: 1444-1446, 2002.
- 14) Ohgi T, Masaki T, Nakai S, Morishita A, Yukimasa S, Nagai M, Miyauchi Y, Funaki T, Kurokohchi K, Watanabe S, Kuriyama S. Expression of p33<sup>ING1</sup> in hepatocellular carcinoma: relationships to tumor differentiation and cyclin E kinase activity. *Scand J Gastroenterol* 12: 1440-1448, 2002.
- 15) Wu F, Li J, Miki H, Nishioka M, Fujita J, Ohmori M, Imaida K, Kuriyama S. p107 Expression in colorectal tumours rises during carcinogenesis and falls during invasion. *Eur J Cancer* 38: 1838-1848, 2002.
- 16) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T,

- Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 36: 850-860, 2002.
- 17) Morishita A, Murota M, Fujita J, Wu F, Kurokohchi K, Masaki T, Arima K, Watanabe S, Kuriyama S. Autoreactive helper T cells specific for cytokeratin 19 in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology Res* (in press).
- 18) Murota M, Watanabe S, Fujita J, Ohtsuki Y, Wu F, Yoshida S, Kita Y, Funakoshi F, Masaki T, Kurokohchi K, Uchida N, Ishida T, Kuriyama S. Aberrant cytokeratin expression and high susceptibility to apoptosis in autoimmune hepatitis. *Hepatology Res* (in press).
- 19) Kobara H, Uchida N, Tsutsui K, Kurokohchi K, Fukuma H, Ezaki T, Kuriyama S. Abnormal bile flow in patients with achalasia. *J Gastroenterol* (in press).
- 20) Uchida N, Ezaki T, Fukuma H, Tsutsui K, Kobara H, Matsuoka M, Masaki T, Watanabe S, Yoshida M, Maeta T, Koi F, Nakatsu T, Kuriyama S. Concomitant colitis associated with primary sclerosing cholangitis. *J Gastroenterol* (in press).
2. 学会発表
- 1) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Tsujinoue H, Fukui H. Inhibition of vascular endothelial growth factor and receptor, KDR/FLK-1 interaction attenuates the murine liver fibrosis development. 53rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2002, 11, 1-5, Boston, USA.
- 2) Noguchi R, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Tsujinoue H, Fukui H. Synergistic inhibitory effect of interferon and ACE inhibitor in murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis. 53rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2002, 11, 1-5, Boston, USA.
- 3) Ikenaka Y, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Tsujinoue H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (Timp-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the liver-targeted timp-1 transgenic mouse model. 53rd Annual Meeting of the

American Association for the Study of Liver Diseases. 2002, 11, 1-5, Boston, USA.

4) 辻之上裕久, 福井博, 栗山茂樹.  
ワークショップ 12: 「進行肝臓癌に対する治療の工夫」. 多中心性肝臓癌に対する IL-2 を用いた免疫遺伝子療法の基礎的検討. 第 6 回日本肝臓学会大会(DDW-Japan). 2002, 10, 24-25, 横浜.

5) 黒河内和貴, 正木勉, 栗山茂樹.  
ワークショップ 14: 「HCV の virology と免疫」. C 型慢性肝炎における肝細胞死を惹起エフェクター細胞の解析. 第 6 回日本肝臓学会大会(DDW-Japan). 2002, 10, 24-25, 横浜.

6) 黒河内和貴, 渡辺精四郎, 正木勉, 宮内嘉明, 舟木利治, 細見直樹, 吉田周平, 小原英幹, 行政聡子, 金玉姫, 栗山茂樹. DDW 合同プレナリーセッション 1. 肝臓癌に対する治療戦略: エタノール注入併用ラジオ波治療 (PEI-RFA) を用いて. 第 6 回日本肝臓学会大会(DDW-Japan). 2002, 10, 24-25, 横浜.

7) 栗山茂樹, 辻之上裕久, 中谷敏也, 吉治仁志, 舟木利治, 宮内嘉明, 細見直樹, 正木勉, 黒河内和貴, 渡辺精四郎, 福井博. 肝臓癌に対する自殺遺伝子治療-チミジンキナーゼ遺伝子とシトシンデアミナーゼ遺伝子の比較検討.

第 88 回日本消化器病学会総会. 2002, 4, 24-26, 旭川.

8) 栗山茂樹, 正木勉, 木田裕子, 室田将之, 舟木利治, 宮内嘉明, 黒河内和貴, 渡辺精四郎, 辻之上裕久, 吉治仁志, 福井博. Housekeeping 遺伝子プロモーターと AFP 遺伝子エンハンサーから成るキメラ制御因子を用いた肝臓癌細胞特異的自殺遺伝子発現の誘導. 第 38 回日本肝臓学会総会. 2002, 6, 13-14, 大阪.

9) 吉治仁志, 吉井純一, 池中康英, 野口隆一, 築瀬公嗣, 浪崎正, 辻之上裕久, 栗山茂樹, 福井博. Retro-Tet system による VEGF 腫瘍増大効果に対する flt-1 受容体阻害効果の検討. 第 61 回日本癌学会総会. 2002, 10, 1-3, 東京.

10) 野口隆一, 吉治仁志, 吉井純一, 池中康英, 築瀬公嗣, 浪崎正, 辻之上裕久, 栗山茂樹, 福井博. インターフェロンと ACE 阻害剤の VEGF 阻害作用に基づく肝臓癌発育抑制に対するアジュバント効果. 第 61 回日本癌学会総会. 2002, 10, 1-3, 東京.

11) 築瀬公嗣, 吉治仁志, 吉井純一, 池中康英, 野口隆一, 浪崎正, 辻之上裕久, 栗山茂樹, 福井博. レニンアンジオテンシン系抑制による肝臓癌抑制の試み. 第 61 回日本癌学会総会. 2002, 10, 1-3, 東京.

12) 辻之上裕久, 吉治仁志, 吉井純一, 池中康英, 野口隆一, 栗山茂樹, 福井