

氏名	むこうやま ともゆき 向山 智之
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第464号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ヒトクローン病モデルマウスに対する HGF 遺伝子治療効果の検討
学位論文審査委員	(主査) 村脇 義和 (副査) 汐田 剛史 貝原 信明

学位論文の内容の要旨

クローン病などの炎症性腸疾患では、炎症性サイトカインである $\text{TNF-}\alpha$ の産生増加が病因に深く関与しており、その治療に抗 $\text{TNF-}\alpha$ 抗体の有用性が知られている。本研究では、 $\text{TNF-}\alpha$ によるアポトーシス促進作用を HGF の抗アポトーシス作用により抑制し、炎症性腸疾患の治療を行うというコンセプトで、ヒトクローン病モデルであるマウス TNBS 腸炎に対するアデノウイルス HGF 遺伝子治療の有効性を検討した。

方法

9 週齢の雌性 Balb/c マウスを 4 群に分け、1 群、2 群、3 群には 0.5mg TNBS(hapten reagent 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid)を経肛門的に投与し、無処置のマウスを 4 群とした。投与 5 日後に、1 群には生理食塩水、2 群には pAxCAHGF 1×10^8 pfu/マウス、3 群には pAxCALacZ 1×10^8 pfu/マウスをそれぞれ経肛門的に投与した。ウイルスベクターは EIA、EIB、E3、を欠如した非増殖性アデノウイルスベクターに CAG プロモーター制御下に HGFcDNA を挿入したものを使用した。本ウイルスベクターによる発現細胞を明らかにするために TNBS 腸炎の作成 5 日後にアデノウイルスベクター pAxCALacZ 1×10^8 pfu/マウスを経肛門的に投与し lacZ 染色を行った。投与 3 日後、8 日後、14 日後にそれぞれの体重を測定し、組織学的に炎症の程度を評価した。大腸粘膜上皮のアポトーシスをタネル法により、細胞増殖を PCNA 染色で評価した。また、HGF、c-met の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で検討した。

結果

lacZ 染色では主として大腸粘膜上皮細胞の細胞質が染色され、アデノウイルスベクターが大腸粘膜上皮細胞で発現することを確認した。導入した HGF 遺伝子の発現は、2 群では投与 3 日後に増加していた。以後、発現は減少するが、14 日後においても強い HGF の発現を認めた。c-met の発現は 3 日後には 4 群間で大きな差を認めなかったが、2 群では 3 日後、8 日後、14 日後と経時的に発現の増加が見られた。

体重は1群、2群、3群のすべてで3日後に著しく減少したが、2群では投与後8日後に体重が前値の96.3 ± 2.3 %に回復し、14日後には更に増加し、1群、3群に比べて体重の回復が顕著であった。

組織学的には1群、3群では各々炎症スコアの改善が全く見られないのに対し、2群では、8日目、14日目の大腸粘膜の炎症が有意に改善していた。PCNA陽性細胞数は3日後、8日後、14日後で1群、3群に比べ、2群では有意に増加した。タネル陽性細胞数は、3日後、8日後、14日後で1群、3群に比べ、2群では有意に減少した。

考 察

クローン病においては局所でのTNF- α の発現が亢進しており、抗TNF- α 抗体投与による病態の改善が報告され、抗TNF- α 抗体療法がヒトクローン病の治療に応用されている。本研究ではヒトクローン病モデルであるマウスTNBS腸炎に対し、TNF- α により惹起されるアポトーシスをHGFの抗アポトーシス作用により抑制し、治療するというコンセプトで、HGF遺伝子導入を行った。その結果、大腸粘膜上皮細胞の増殖が亢進し、アポトーシスが抑制され、大腸粘膜障害が軽減し、有意に体重減少を回復させることができた。

HGFは、消化管粘膜障害後の修復、再生に重要な役割を担っている。事実、我々は以前にヒト胃潰瘍のHGF/c-met系が胃粘膜修復に重要な因子であることを報告しており、今回の検討でもHGF遺伝子導入によりHGFの発現が亢進し、同時にc-metの発現上昇がみられることから、大腸障害粘膜の修復、細胞増殖の促進にHGF発現が重要と考えられる。つまり、HGFを発現させることにより投与群で有意にアポトーシスが抑制され、PCNA陽性細胞数の増加がみられたことから、HGFによる局所での抗アポトーシス作用と粘膜上皮細胞に対する増殖促進作用により有効な結果が得られたものと考えられる。

今回我々は非増殖性アデノウイルスベクターによる大腸への遺伝子導入を試みた。本法は、直接大腸内へ投与することで全身投与に比較し、高用量を必要としないことより、全身投与に比較し副作用を軽減しうる投与方法と考えられる。

結 論

マウスTNBS腸炎に対しHGFcDNAを搭載した非増殖性アデノウイルスベクターを用いてHGF遺伝子導入を行い、腸炎の改善が得られた。HGF遺伝子治療は、炎症性腸疾患に対して臨床応用の可能性のある治療法であることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はヒトクローン病モデルであるマウスTNBS腸炎に対し、HGFの治療効果を明らかにする目的で、HGF遺伝子導入アデノウイルスを用いてその治療効果を検討したものである。その結果、HGF遺伝子導入群では、大腸粘膜上皮細胞のアポトーシスが著明に抑制されるとともに、上皮細胞の増殖が亢進し、組織学的にも大腸粘膜障害が軽減されることが判明した。本論文はクローン病などの炎症性腸疾患に対してHGFが有効であることを明らかにしたもので、HGFの臨床応用の面からも明らかに学術水準を高めたものと認める。