

総 説

HGF による肝硬変の遺伝子治療

植 木 孝 浩・藤 元 治 朗

兵庫医科大学第一外科

HGF Gene Therapy for Liver Cirrhosis

Takahiro Ueki and Jiro Fujimoto

1st Department of Surgery, Hyogo College of Medicine

Summary Liver cirrhosis is the irreversible end result of chronic liver disease, characterized by a diffuse disorganization of the normal hepatic structure by fibrous scarring and hepatocellular regeneration. It is a major cause of morbidity and mortality worldwide, with no effective therapy. The ideal strategy for the treatment of liver cirrhosis should include prevention of fibrogenesis, stimulation of hepatocyte mitosis, and reorganization of the liver architecture. We have developed a novel gene therapy approach for rat liver cirrhosis by muscle-directed gene transfer of hepatocyte growth factor (HGF). In rats with lethal liver cirrhosis produced by dimethylnitrosamin, repeated transfection of the HGF gene into skeletal muscle induced a high plasma level of HGF and a tyrosine phosphorylation of the c-Met/HGF receptor. HGF gene transduction inhibited fibrogenesis and hepatocyte apoptosis and also produced a resolution of fibrosis in the cirrhotic liver. Thus HGF gene therapy may be useful in the treatment of patients with liver cirrhosis.

Key words: liver cirrhosis/fibrosis, HGF, TGF- β 1, gene therapy

1. は じ め に

肝疾患の罹患者数はわが国において200万人にもおよび、肝疾患による死亡者数は慢性肝疾患・肝癌をあわせると年間5万人を越え、結核に代わる第2の国民病ともいわれる時代を迎え、この疾病の克服が求められる。

肝臓には古くから旺盛な増殖・再生能力を持つことが知られており、近年分子生物学的手法によりその詳細なメカニズムが解き明かされつつある。しかしながら、慢性的傷害が持続した場合、その再生能力が徐々に失われていく。それゆえ肝硬変は非可逆性で慢性の進行性疾患と位置付けられてきた。この肝臓の旺盛な再生力を取り戻し、自己再生を促すことを目的にさまざまな研究が進められている。この鍵を握るのは肝硬変症の原因となる基礎疾患のコントロールであり、もう一方では肝線維の蓄積の制御と肝臓の再生能力を利用した肝線維化の再生療法である。本稿では肝再生の本体として知られる肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子を用いた肝硬変の治療を通じ、肝硬変からの臓器再生の可能性について言及する。

2. 肝硬変の病態

肝硬変は様々な炎症性肝疾患の終末像であり、一概に論ずることは困難であるが、その病態は原因の如何に関わらず、肝細胞障害が長期に及び肝細胞死と再生の繰り返しの結果、肝線維の蓄積・血管構築の破壊・小葉の再構築が起こる非可逆性の慢性疾患と記載されている¹⁾。近年TGF- β 1が肝の線維化に中心的な役割を担っていることが明らかになった²⁾。肝細胞障害・炎症が持続することでクッパー細胞が活性化され、TGF- β 1の産生が増加する。TGF- β 1は肝星細胞などを刺激し線維組織の蓄積を促進するとともに、マトリックス分解酵素(MMP)の阻害物質であるTIMPの発現を誘導して、線維の分解系も抑制し結果線維組織の蓄積をもたらしようになる。この過程にはTGF- β 1以外にも様々な因子の関与が報告され研究が進む分野である。

3. 肝硬変治療への試み

慢性肝疾患の根治療法が確立していない現状において、肝硬変は非可逆性の進行性疾患と考えられてきた。しかし近年、原疾患の治療により肝線維化が改善する

ことが臨床例で報告され³⁻⁵⁾, 原因疾患がコントロールされれば, 肝硬変は治療可能な可逆性疾患という認識がクローズアップされてきた。

一方で, 肝硬変の病態に関与するサイトカインを制御することによる肝硬変治療が報告されている。先にも述べたがその一つは肝線維化の抑制であり, もう一方は完成した線維組織の改善といえる。これまで報告されているものでは肝星細胞の活性化・増殖抑制による, マトリックスの生成抑制, マトリックス分解系の促進, 線維化促進性サイトカインの生成抑制および不活性化などを制御する薬剤が考えられている⁶⁻¹⁰⁾。本稿では著者らが進めている HGF の肝再生作用を用いた肝硬変への遺伝子治療を紹介する。

4. 肝細胞増殖因子 (HGF)

HGF はわが国において, 分離精製された初代培養肝細胞の強い増殖活性を有する物質で, その全アミノ酸配列が解明された。HGF は 4 つのクリングルドメインを有する α 鎖と, プラスミン様ドメインを持つ β 鎖からなるヘテロダイマーである。HGF は長らく実体の不明であった肝再生因子の本体であり, さらに現在ではさまざまな細胞を標的とし, 多様な生物活性を有する代表的な増殖因子であることが判明している¹¹⁾。肝臓では, 肝傷害に伴い HGF mRNA の発現がクッパー細胞や類洞内皮細胞において速やかに亢進し, 合成活性化された HGF はパラクライン機構により肝細胞表面の HGF 特異的リセプター (c-Met) を介してシグナル伝達を開始する。また肝障害に応答して肺や腎臓といった臓器でも HGF の発現が高まり, 血液を介したエンドクライン機構によっても肝再生が促進されると考えられる。一方, HGF は正常肝臓内にも非活性型として肝内細胞外マトリックスと結合して存在し¹²⁾, 炎症・外傷・手術侵襲などによりマトリックスが破壊されると非活性型 HGF が活性型 HGF に変換され分子生物学的作用を発揮する。

肝臓における生物活性は肝細胞増殖促進のみならず, 胆管の形態形成誘導作用・肝細胞の抗アポトーシス作用・細胞外マトリックスの分解促進作用・TGF- β 1 の発現抑制・蛋白合成の亢進など多彩であり, 肝疾患・肝硬変治療への期待される物質である。

先にも述べたが, TGF- β 1 は最も強力な肝線維化に関与するサイトカインと考えられ, 線維組織の蓄積と分解系の抑制を引き起こすことが知られている。肝硬変組織では TGF- β 1 の過剰発現が認められ, 逆に

HGF の発現は低下している。繰り返す肝障害に対しては, 本来供給されるべき修復因子としての HGF が何らかの理由で低下し, 肝線維が蓄積したものと考えられる。HGF の低下原因として TGF- β 1 には HGF の mRNA 発現の抑制を示唆する論文も報告されている¹³⁾。また一方で, 著者らの研究では HGF が TGF- β 1 の発現を抑制することも確認された。生理的な状況では, HGF と TGF- β 1 は互いに調節しあいながら炎症の抑制と再生を調節していると思われ, 炎症の持続などによりこのバランスが崩れたとき, 線維組織の蓄積に傾くものと思われる。

5. HGF による肝硬変治療の試み

劇症肝炎・急性肝炎さらには肝硬変を実験モデルに再現し, HGF の治療薬としての作用が報告されてきた。HGF による治療の利点は肝線維化の改善とともに肝再生を促すバランスの良い治療が可能であることであり, 肝硬変治療への期待が高まった。1995 年肝硬変に対する HGF の治療効果が相次いで報告された^{14,15)}。この報告によるとリコンビナント HGF の投与により, 肝線維組織の蓄積の予防と線維組織の除去, さらに肝線維組織の蓄積に中心的役割を成す TGF- β 1 の発現を HGF が抑制することも示された。このように HGF の補充療法として, リコンビナント HGF を用いて研究が進められてきたが, 分子医学の発達に伴い HGF の遺伝子導入という形での供給が可能となってきた。著者らは次項に示すごとく HVJ リポソーム法を用いた持続的な HGF の供給を試み, リコンビナント HGF による治療に匹敵する結果を得た¹⁶⁾。

6. 肝硬変への遺伝子治療

生体内における HGF の持続的発現を目的に教室では金田らが開発した HVJ-リポソーム法¹⁷⁾を用いた。本法は混合脂質の二重膜リポソームに DNA と核移行蛋白を包埋し, 紫外線により不活化した HVJ とリポソームを反応させて HVJ のエンベロープをもつリポソームを作成する。本法は HVJ ウイルスの膜融合能を利用したハイブリッド型の導入法であり, 免疫原性が少なく反復導入が可能である¹⁸⁾。

実験モデルとしてはラットに微量のジメチールニトロソアミン (DMN) を腹腔内に連続投与し, 肝線維化・肝硬変モデルを作成した。このモデルでは約 4 週間で著明な線維化・肝小葉構築の破壊と再生結節形成

プロトコールと生存曲線

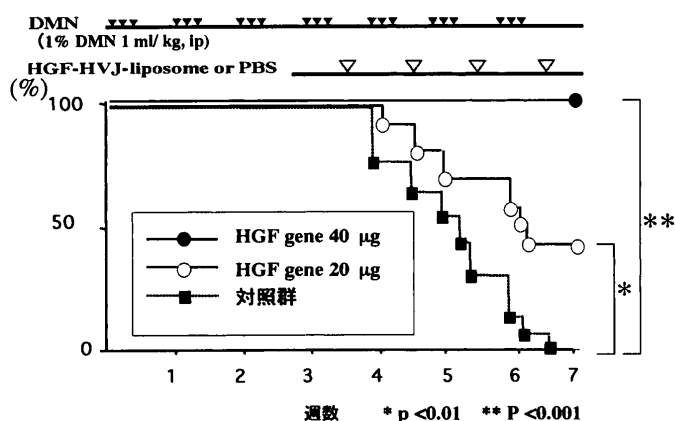


図1 DMN・HGF遺伝子の投与スケジュールと生存曲線 (Ueki T: Nature Med 5: 226-230, 1999 より引用)

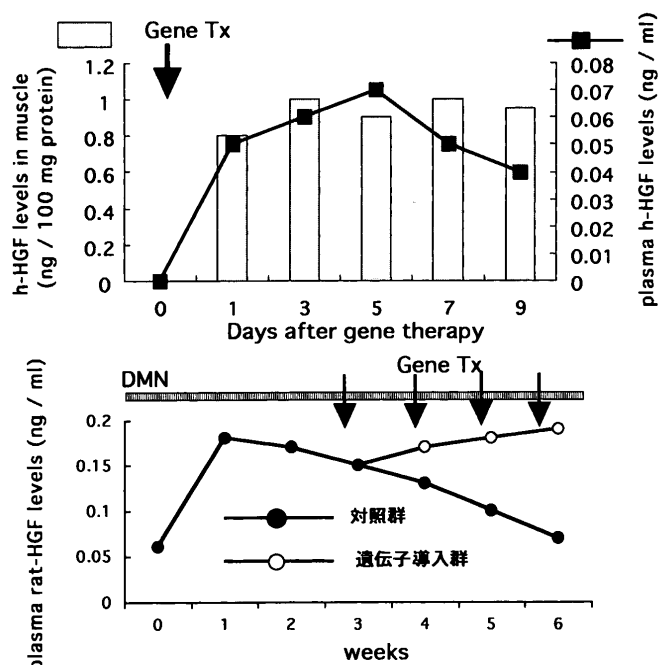


図2 ラット血漿中・筋肉組織中 HGF 蛋白濃度の推移 (Ueki T: Nature Med 5: 226-230, 1999 より引用, 一部改変)

を伴うヒト肝硬変の病理学的特徴を模擬した肝硬変が完成する。この頃より腹水、肝不全例を認めるようになり、初回 DMN 投与より 45 日目にはすべてのラットが肝不全により死亡する (図 1)。治療群には肝硬変完成後の 4 週目以降、HVJ リポソーム法を用い、ヒト HGF 遺伝子 20 μ g または 40 μ g を四肢骨格筋に週一回筋肉内に注射し、反復的な遺伝子導入を行う一方、DMN 投与は継続した。

HVJ リポソームにより導入されたヒト HGF 遺伝子はラット筋肉組織中・血清中に蛋白発現を誘導し、また内因性のラット HGF を測定すると、対照群では



対照群 6 週



HGF 遺伝子 40 μ g 治療群 6 週

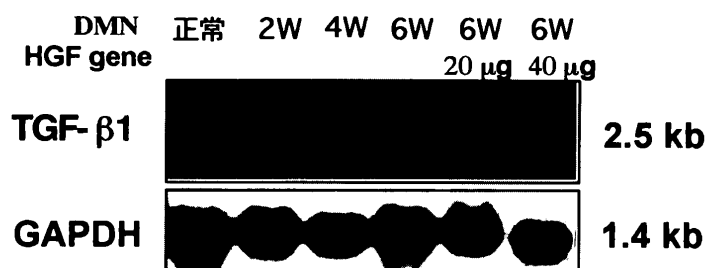
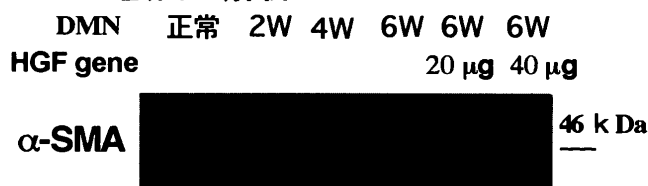
図3 HGF 遺伝子治療による肝組織の変化 アザン・マロリー染色 (Ueki T: Nature Med 5: 226-230, 1999 より引用)

DMN 投与後、一過性に増加した血中 HGF が徐々に減少していくのに対し、HGF 遺伝子導入群では血清中ラット HGF 濃度は高値を維持した (図 2)。

肝の組織学的検討では対照群でヒト肝硬変類似の病理学的変化を認めたのに対し、HGF 遺伝子導入群では、線維成分はほぼ消失し、肝小葉構造の復元を認めた (図 3)。また生存曲線では、対照群ではすべてのラットが死亡したのに対し、20 μ g HGF 遺伝子導入群では 45.5% が生存し、40 μ g HGF 遺伝子導入群ではすべてのラットが生存した (図 1)。

7. HGF の作用機序の解明

DMN 投与後 6 週目の肝組織を免疫組織学的・分子生物学的に検討した。肝臓での TGF- β 1 の発現をノザンプロットにて検討すると、先にも述べたが、肝硬変の進行に伴い TGF- β 1 mRNA の発現は週を追って増加する。ところが HGF 遺伝子導入群では TGF- β 1 mRNA 発現は著明に抑制され、また肝星細胞活性も抑制されていた。また細胞核分裂像を PCNA 染色にて検討すると、遺伝子治療後著明な増加を認め、約 50% 近くの細胞が細胞周期回転に参与していた

TGF- β 1 mRNA 解析 α -SMA 蛋白 解析

PCNA 免疫染色



対照群 6週

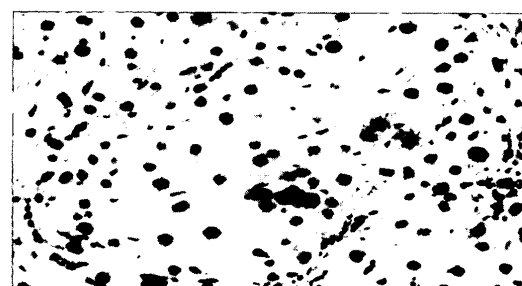
HGF 遺伝子 40 μ g 治療群 6週

図4 HGF 遺伝子治療の作用機序の検討 (Ueki T: Nature Med 5: 226-230, 1999 より引用)

(図4)。

以上の結果より、筋肉で産成された HGF が血中に分泌され、内因性ラット HGF を誘導し、活性化因子により局所で活性型 HGF として肝臓に作用する。HGF は c-Met/HGF レセプターを介し、HGF 本来の働きである肝細胞増殖の促進・アポトーシスの抑制に見られるような肝細胞保護作用を示す。また HGF が TGF- β 1 の発現を何らかの機序で抑制することにより線維の産生を抑制し、さらに線維組織の分解系に作用し線維組織の著明な減少に深く関与しているものと考えられた。

8. 肝硬変に対する HGF 遺伝子治療の展望

これまで述べてきたように、HGF による肝硬変治療は臨床研究の可能性を有する治療法と考えられるが、臨床研究に際しいくつかの問題点が挙げられる。

今回示した遺伝子導入法である HVJ リポソーム法は不活化したウイルスのエンベロープを使っているため、理論的には安全であるが、現時点では臨床応用に向けてより安全な遺伝子導入法を利用することが望まれる。そこで教室ではベクターを用いず、ヒト HGF プラスミッドそのまま (naked plasmid DNA) を投与して遺伝子導入が可能かを検討中である。臨床での投与ルート、投与方法、投与量を考慮してラットおよび

ビーグル犬を用い、naked plasmid DNA の肝動脈からの投与実験を行った。これまでのところ本稿で紹介した結果に相当する効果を示し、臨床研究への手応えを感じている。

次に HGF の癌との関係である。肝硬変症は肝癌の発生母地であることは周知の事実であり、肝硬変症の治療にあたっては癌の発生、癌への影響を考慮しなければならない。そこで HGF と癌との関係を以下の2つの側面より考察を加えたい。

まず発癌性に関してであるが、胚細胞・胎児形成時期より組織において mRNA が 50 倍以上、血中濃度が 100 倍以上という HGF 異常高値のトランスジェニックマウスでは腫瘍が形成されたという報告がある¹⁹⁾。一方では、発癌因子である *c-myc* と HGF のダブルトランスジェニックマウスでは、血中濃度が通常の 5~10 倍の HGF が発現しており、*c-myc* による肝臓癌発生を抑制したという報告もなされた²⁰⁾。即ち発癌性については HGF の濃度、持続時間に依存し、通常の 100 倍を越える様な高濃度の HGF が、胚細胞や胎児形成時期に長期間作用すれば発癌の可能性を有すると考えられる。HGF は生理的に常に体内で産生されている蛋白であり、種々の臓器障害時に血中濃度が上昇することが知られている。しかし、これらの障害後に特異的に癌が多く発生するという報告は見られない。

既に分化した組織、臓器に対しては通常の上昇範囲における血中濃度では、発癌性を示すと考えるのは困難である。

次に、既に形成された癌に対する影響という観点で考えると、肝臓癌の培養細胞に対して、HGFはこれらの細胞分裂増殖を抑制したという報告がなされているが²¹⁾、癌細胞の運動能については亢進させるという報告が一般的である²²⁾。生体内では、HGF以外のサイトカイン・増殖因子などが相互に作用することが考えられ、培養細胞の実験結果が再現されとは限らないが、少なくとも既に癌を有する患者においては転移の誘発の可能性も考える必要があり、慎重に考慮すべきであると考えられる。

9. お わ り に

本稿では、肝硬変・肝線維症に対するHGFの遺伝子治療について解説した。非可逆性疾患と考えられてきた肝硬変症は、原疾患の治療とともに線維化への治療が確立するならば、治療可能な可逆性疾患と考えられる。原疾患の治療には肝細胞傷害の原因となる肝炎ウイルスの駆除や肝細胞毒を取り除くまさにアフレルシスの役割が重要となる。

そして教室ではnaked plasmid DNAによるHGF遺伝子導入法を用いた肝硬変治療へ向けて臨床研究実施計画を学内審査委員会にて審議中である。これらの治療が結びつけば肝硬変が可逆的な疾患と考えられるようになると思われる。

文 献

- 1) Conn HO, Atterbury CE: Diseases of the liver: ed by Schiff L & Schiff ER, Lippencott, Philadelphia, 1993, p. 875
- 2) Kanzler S, Lohse AW, Keil A, et al: TGF-beta 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* **276**: G 1059-1068, 1999
- 3) Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM: Regression of hepatic fibrosis in hepatitis C with long-term interferon treatment. *Dig Dis Sci* **43**: 2573-2576, 1998
- 4) Sobesky R, Mathurin P, Charlotte F, et al: Modeling the impact of interferon alfa treatment on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C: a dynamic view. The Multivirc Group. *Gastroenterology* **116**: 378-386, 1999
- 5) Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, et al: Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* **344**: 418-423, 2001
- 6) Friedman SL: Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* **328**: 1828-1835, 1993
- 7) Friedman SL: Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol* **32**: 424-430, 1997
- 8) Franklin TJ: Therapeutic approaches to organ fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 79-89, 1997
- 9) Mavrier P, Mallat A: Perspectives in the treatment of liver fibrosis. *J Hepatol* **22**: 111-115, 1995
- 10) Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, et al: Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2345-2349, 1999
- 11) Tsubouchi H: Hepatocyte growth factor for liver disease. *Hepatology* **30**: 333-334, 1999
- 12) Schuppan D, Schmid M, Somasundaram R, et al: Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor. *Gastroenterology* **114**: 139-152, 1998
- 13) Matsmoto K, Tajima H, Okazaki H, Nakamura T: Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemia cells by transforming growth factor-beta 1 and glucocorticoids. *J Biol Chem* **267**: 24917-24920, 1992
- 14) Matsuda Y, Matsumoto K, Ichida T, Nakamura T: Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats. *J Biochem* **118**: 643-649, 1995
- 15) Yasuda, Imai E, Shiota A, et al: Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology* **24**: 636-642, 1996
- 16) Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al: Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nature Med* **5**: 226-230, 1999
- 17) Kaneda Y, Iwaki K, Uchida T: Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* **243**: 375-378, 1989
- 18) Hirano T, Fujimoto J, Ueki T, et al: Persistent gene expression in rat liver *in vivo* by repetitive transfections using HVJ-liposome. *Gene Ther* **5**: 459-464, 1998
- 19) Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, et al: Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 701-706, 1997
- 20) Santoni-Rugiu E, Preisegger KH, Kiss A, et al: Inhibition of neoplastic development in the liver by hepatocyte growth factor in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9577-9582, 1996
- 21) Siota G, Rhoads DB, Wang TC, et al: Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 373-377, 1992
- 22) Nakanishi K, Fujimoto J, Ueki T, et al: Hepatocyte growth factor promotes migration of human hepatocellular carcinoma via phosphatidylinositol 3-kinase. *Clin Exp Metastasis* **17**: 507-514, 2000