

平成19年1月

神戸貴雅 学位論文審査要旨

主査 井藤久雄
副査 村脇義和
同 汐田剛史

主論文

Naked gene therapy of hepatocyte growth factor for dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

(硫酸デキストラン誘発腸炎マウスに対するベクターを介さない肝細胞増殖因子遺伝子治療)

(著者:神戸貴雅、村井理絵、向山智之、村脇義之、橋口浩一、吉田陽子、土谷博之、栗政明弘、原田賢一、八島一夫、西向栄治、謝花典子、岸本幸広、古城治彦、三浦邦彦、村脇義和、川崎寛中、汐田剛史)

平成18年 5月 Biochemical and Biophysical Research Communications
345巻 1517頁～1525頁

学 位 論 文 要 旨

Naked gene therapy of hepatocyte growth factor for dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

(硫酸デキストラン誘発腸炎マウスに対するベクターを介さない肝細胞増殖因子遺伝子治療)

近年、クローン病への抗Tumor necrosis factor (TNF)- α 抗体投与の有効性が報告され、TNF- α は炎症性腸疾患治療の標的分子となりうることが示唆されている。本学位論文申請者らはHepatocyte growth factor (HGF)遺伝子導入により、TNF- α のアポトーシス促進作用がHGFの抗アポトーシス作用により抑制され、TNF- α による細胞死抑制にHGF遺伝子導入が有効であることを見出した。また、HGFはAKTやERK1/2を介して、抗アポトーシス作用のみならず細胞増殖のシグナルを伝達することが知られている。そこで潰瘍性大腸炎モデルである硫酸デキストラン誘発腸炎に対し、ウイルスベクターを介さない(naked) HGF遺伝子導入による治療効果の検討と、細胞増殖、アポトーシスに関する細胞内シグナルおよび、細胞内分子の発現動態について検討した。

方 法

硫酸デキストラン (DSS) 誘発腸炎は、8週齢の雌性Ba1b/cマウスに精製水に溶解した5% DSSを7日間自由飲水させ作成した。本マウスに対し、HGF発現プラスミドpUC-SR α /HGFを経肛門的に200 μ g投与したものを1群、500 μ g投与したものを2群、対照としてpUC-SR α /GFPを200 μ g投与したものを3群とし、DSS飲水開始後7日後、10日後、17日後にそれぞれ体重計測後屠殺し、大腸組織を採取した。リアルタイムRT-PCR法にて、HGF mRNA発現の変動を3群間で比較した。大腸組織は、ヘマトキシリンエオジン染色後、組織学的スコアにより腸粘膜障害度を、抗PCNA抗体による免疫組織化学染色により腸管粘膜上皮細胞の増殖を、タネル染色によりアポトーシスを3群間で比較した。HGFによる細胞内シグナル伝達は、ウエスタンブロット法にてERK1/2、AKTのリン酸化を解析した。HGF遺伝子導入後の大腸組織より抽出したRNAを使用し、DNAマイクロアレイにて遺伝子発現変動を1群と3群とで比較検討した。

結 果

pUC-SR α /GFPを投与したマウスにおいて、GFPは大腸粘膜、粘膜下層、筋層に発現することを確認した。DSS誘発腸炎マウスに対するnaked HGF遺伝子導入により、3群に比較し、1群、2群で有意な体重増加を認めた ($p < 0.05$)。HGF遺伝子発現量は、3群に比較して1、2群では7日後に有意に高発現し ($p < 0.01$)、10日後、17日後では発現は低下した。組織学的スコア

による検討では、7日目には3群間に大きな差は見られなかった。10日目には3群では糜爛や炎症細胞の浸潤が認められたのに対し、1、2群は、大腸粘膜の腺管に著変は無く、糜爛や炎症細胞浸潤は乏しく、ほぼ正常組織と同程度に回復している部位もあった($p < 0.01$)。腸管上皮細胞のPCNA陽性細胞は、7日後、10日後で3群に比較し、1、2群で有意に増加していた($p < 0.01$)。アポトーシス陽性細胞は、7日後、10日後、17日後で、3群に比較し、1、2群で有意に低下していた($p < 0.01$)。HGFによる細胞内シグナル伝達の解析では、3群に比較し1群でリン酸化c-Metとリン酸化AKTの発現が増加していたが、リン酸化ERK1/2の発現に差はなかった。マイクロアレイ解析では、3群に比較し1群において発現が5倍以上に増加した遺伝子数は1回目は284個、2回目は205個であった。これらの遺伝子はクラスター解析により、アポトーシス、がん、細胞周期、DNA修復、蛋白合成、シグナル伝達、転写関連分子などに分類された。それらの遺伝子のうち、Max、Musashi2、Eef1a1、Caecam1、Muc2についてRT-PCRを行ったところ、いずれも3群に比較し1群で発現が亢進していた。

考 察

ヒト潰瘍性大腸炎モデルとして使用される硫酸デキストラン誘発腸炎に対し、経肛門的なnaked HGF遺伝子導入を試み、組織障害の軽減と体重の増加作用を認めた。さらに大腸粘膜から抽出したRNAを用いたリアルタイムRT-PCR法にて、導入したHGFの発現が亢進していることを確認した。HGFの作用機序を解明する為、細胞増殖とアポトーシスについて解析したところ、大腸粘膜細胞の増殖の亢進が早期からみられると同時にアポトーシスは抑制され、障害された粘膜の修復を早めていると考えられた。HGF投与早期における、細胞内シグナル伝達に関わる細胞内分子の発現をウエスタンブロット法にて解析したところ、c-Metを介しAKTシグナルが活性化されていた。

HGF発現に伴う遺伝子発現変動を網羅的に解析する目的で、DNAマイクロアレイ解析を行ったところ、HGF遺伝子導入により多数の遺伝子の発現が変動した。高発現を示した遺伝子は、アポトーシス、がん、細胞周期、DNA修復、蛋白合成、シグナル伝達、転写関連分子であった。また、幹細胞と関係するRNA結合蛋白であるMusashi2の発現が亢進していたことより、HGF遺伝子導入により幹細胞が活性化する可能性が示唆された。今後これらの分子を詳細に検討することにより、HGF遺伝子導入による再生過程における細胞内遺伝子発現の解明につながると期待される。

結 語

硫酸デキストラン誘発腸炎に対し、naked HGF遺伝子治療は有効であり、潰瘍性大腸炎に対する新たな治療オプションの一つとなりうることが示唆された。