

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	齊藤 幸裕
学位論文題目			
<p>Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis.</p> <p>(肝細胞増殖因子によるリンパ管新生を介したリンパ浮腫に対する遺伝子治療)</p> <p>共著者名 中神啓徳、森下竜一、鷹見洋一、菊池 康、林 宏樹、西川智之、玉井克人 東 信良、笹嶋唯博、金田安史</p> <p>Circulation; 2006 Sep; 114(11): 1177-84.</p>			
研究目的			
<p>リンパ浮腫はリンパ管の閉塞、途絶により起こる浮腫で、本邦においては癌治療でのリンパ節郭清や放射線治療を原因とすることが多い。これに対し理学療法、薬物療法、手術などが試みられているが、未だ有効かつ標準化する治療法はなく、次世代の治療法が期待されている。リンパ管新生に関する報告は、血管新生分子機構の解明やリンパ管内皮特異マーカーの発見に伴い1990年代後半に入り散見されるようになり、一般的に知られていたリンパ管新生因子であるVEGF-C,Dのみならず、血管新生因子として知られていたFGF-2やアンジオポイエチン1でのリンパ管新生作用についても報告された。また我々は閉塞性動脈疾患に対する肝細胞増殖因子(HGF)を用いた遺伝子治療のクリニカルトライアルに参加しており、Phase I・IIaまで終了している。その効果についてはPhase IIIの結果を待たなければならないが、これまでのところ発癌や浮腫といった遺伝子治療にて問題となってきた副作用はなく、その安全性については確認がされている。以上のことより、将来の臨床応用を念頭に置き、我々は本研究の対象としてHGFに注目した。そこで本研究はHGFのリンパ管新生作用を証明し、さらにリンパ浮腫モデルにおいて遺伝子治療でリンパ管新生を誘導し浮腫が改善するかを検証することを目的に実験を行った。</p>			
材料・方法			
1、細胞			

イヌリンパ管内皮細胞(cLEC)、イヌ大動脈内皮細胞(cAEC)、イヌ大静脈内皮細胞(cVEC)は引用論文1により作製し、培養細胞系を樹立した。ヒトリンパ管内皮細胞(hLEC)を使用した。

2、蛍光免疫染色

血管内皮細胞マーカーとして von Willebrand Factor、PECAM-1 を、リンパ管内皮細胞マーカーとして VEGFR-3、LYVE-1、Podoplanin、Prox1 に対する抗体を使用した。また HGF 受容体 c-Met に対する抗体を使用した。二時抗体は AlexaFluor488 か AlexaFluor546 を使用した。

3、細胞増殖能、遊走能の評価

細胞増殖能の検討は MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] assay (modified MTT assay)もしくは c-fos promoter の下流に luciferase を結合した c-fos promoter assay にて評価した。細胞遊走能は modified Boyden chamber method を使用した。

4、細胞内シグナルの解析、阻害剤による実験

リンパ管内皮細胞での ERK、Akt の評価は phospho-specific or total ERK 、phospho-specific or total Akt に対する抗体を使用した Western Blot にて評価した。また MEK inhibitor として U0126 (50 μ mol/l)と PD98059 (30 μ mol/l)、PI3K inhibitor として LY294002 (50 μ mol/l) と wortmannin (100nmol/l)を使用した。

5、リンパ浮腫ラットモデル

引用論文3のように Rat tail 根部のリンパ管を切除することによりリンパ浮腫モデルを作製した。このモデルに HGF、VEGF165、コントロールとして GFP の各遺伝子を週一回筋注した群、さらに生理食塩水のみを筋注した群、手術のみ施行した群、自然経過を見た群の6群で Rat tail surgical site の太さを5週にわたり計測した。

6、統計処理

データは ANOVA followed by Dunnett's test for pair-wise comparisons against "control" あるいは by Tukey's test for multiple comparisons にて処理した。

成 績

1、イヌリンパ管内皮細胞の樹立と c-Met の発現

イヌ胸管よりリンパ管内皮細胞培養系を確立した。これらの細胞は内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor と PECAM-1 に加えリンパ管内皮特異マーカーである VEGFR3, LYVE1, Prox1, Podoplanin のすべてで染色され、ほぼ全ての細胞が染色陽性であったことから purity は 99%以上と判断した。さらに HGF 受容体である c-Met がリンパ管内皮細胞に発現していることを確認した。

2、HGF によるリンパ管内皮細胞の増殖能、遊走能促進

HGF にてリンパ管内皮細胞を刺激したところ濃度依存性に細胞の増殖がみられた。また HGF プラスミドの増殖に及ぼす影響を c-fos promoter assay で検討したところコントロールとして

用いたGFPや血管新生作用を有する VEGF165 を導入した群に比べHGFを導入した群で有意に細胞の増殖がみられた。さらに recombinant HGF を用いて遊走能を測定したが、増殖能と同様に濃度依存性に遊走能の上昇を認めた。

3、HGF 刺激によるリンパ管内皮細胞内シグナルの変化

リンパ管内皮細胞の細胞内シグナルを ERK、Akt について検討した。リンパ管内皮細胞を HGF で刺激し、経時的にサンプルを回収しウエスタンブロットを施行したところ ERK、Akt ともに HGF 刺激によりリン酸化され、10 分後にピークとなった。また MEK inhibitor、PI3K inhibitor にて ERK や Akt のシグナルを阻害すると、リンパ管内皮細胞の増殖能や遊走能が抑制された。このことから ERK や Akt がリンパ管内皮細胞の増殖能、遊走能において重要な役割を果たしていることが確認された。

4、ヒトリンパ管内皮細胞での再現性

一般に市販されているヒト微小リンパ管内皮細胞を用いて同様の実験を行った。c-Met の発現、増殖能、遊走能の濃度依存性上昇を確認し、ヒト微小リンパ管内皮細胞でも HGF のリンパ管新生作用が確認された。

5、リンパ浮腫ラットモデルにおける HGF 遺伝子治療効果

導入した HGF のメッセージ発現を RT-PCR 法で測定したが、術後 4 日目にピークとなるヒト HGF の発現を確認した。さらに興味深いことに内在性ラット HGF が、導入した HGF の発現より 1 週間遅れて術後 10 日目にピークとなる上昇を示すことを認めた。リンパ浮腫は HGF 導入群以外では、術後 14 日目よりほぼ横ばいとなっているが、HGF を導入した群のみが経時的に減少しており、術後 14 日目で他の群と有意差をもって浮腫が改善していた。術後 35 日目の組織にて血管、リンパ管新生を免疫組織学的に検討した。内皮細胞のマーカーである PECAM-1 は HGF 群、VEGF165 群ともに発現亢進を認めたが、リンパ管内皮細胞のマーカーである LYVE-1、Prox1 はともに HGF 群のみが有意に発現亢進していた。また c-Met も HGF 群で発現亢進を認めた。この結果から、リンパ浮腫の改善は、リンパ管新生を介したリンパ管の増加によると考えられた。

考 察

リンパ浮腫は癌治療などを原因とするリンパ流の障害の結果発生し、患者の QOL に著しく影響する。今回、リンパ浮腫の遺伝子治療の基礎実験を行った。今までの多くの実験は胎児由来リンパ管内皮細胞を用いたものが多かったが、実際の内皮細胞機能を反映していない可能性が示唆された。そこでまず、成犬胸管からリンパ管内皮細胞培養系を確立したところ、内皮細胞マーカーばかりでなく HGF 受容体である c-Met が証明できた。このことは HGF を用いた遺伝子治療の可能性を示すものである。次に HGF 遺伝子を培養内皮細胞に導入することで増殖能・遊走能の増加がみられたほか、細胞内シグナルの増加が観察された。このことは、HGF 遺伝子導入がリンパ管の増生・伸展に働く可能性を示している。実際、ラットリンパ浮腫モデルを用いた HGF 遺伝子導入による治療実験では症状の改善がみられ、臨床的応用が可能であることが示された。

VEGF-C もリンパ浮腫の遺伝子治療に使用される可能性があるが、浮腫を引き起こす可能性がある。さらに、VEGF ファミリーは癌の転移や増殖に影響することも知られている。我々のこれまでの検討で担癌マウスの局所に HGF プラスミドを導入しても全身の HGF 濃度には影響なく、癌の増殖促進も認めないことが証明されている。以上の実験結果から HGF は VEGF に比べて副作用も少なく理想的な遺伝子治療の対象となりうる。

結 論

本実験により HGF のリンパ管新生作用、およびリンパ浮腫に対する遺伝子治療効果が証明された。HGF によるリンパ浮腫遺伝子治療が次世代の治療法になりうることが示唆された。

引用文献

1. Tan Y. Basic fibroblast growth factor-mediated lymphangiogenesis of lymphatic endothelial cells isolated from dog thoracic ducts: Effects of heparin. *Jpn J Physiol.* 1998; 48:133-141.
2. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Kim S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Anti-apoptotic action of hepatocyte growth factor through mitogen-activated protein kinase on human aortic endothelial cells. *J Hypertens.* 2000; 18:1411-1420.
3. Slavin SA, Van den Abbeele AD, Losken A, Swartz MA, Jain RK. Return of lymphatic function after flap transfer for acute lymphedema. *Ann Surg.* 1999; 229:421-427.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	齊藤 幸裕
<p>審査委員長 <u>藤 枝 憲 二</u> ㊞</p> <p>審査委員 <u>立 野 正 敏</u> ㊞</p> <p>審査委員 <u>笹 嶋 唯 博</u> ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis</p> <p>(肝細胞増殖因子によるリンパ管新生を介したリンパ浮腫に対する遺伝子治療)</p>			
<p>リンパ浮腫はリンパ管の閉塞、途絶により起こる浮腫で、癌治療でのリンパ節郭清や放射線治療を原因とすることが多い。これに対して理学療法、薬物療法、手術などが試みられているが、未だ有効かつ標準化する治療法はなく、次世代の治療法の確立が期待されている。</p> <p>論文提出者はリンパ浮腫モデルにおいてHGFのリンパ管新生作用を利用した遺伝子治療の可能性について検討した。まず、成犬胸管からリンパ管内皮細胞培養系を確立したところ、内皮細胞マーカーばかりでなくHGF受容体であるc-Metの発現が証明できことから、HGFを用いた遺伝子治療の可能性を示した。次にHGF遺伝子を培養内皮細胞に導入すると増殖能・遊走能の増加がみられたほか、細胞内シグナルの増加</p>			

が観察されたことから、HGF 遺伝子導入がリンパ管の増生・進展に働く可能性を示した。さらに、ラットリンパ浮腫モデルを用いた HGF 遺伝子導入による治療実験では、リンパ管新生を介したリンパ管の増加によりもたらされた考えられる浮腫の改善を認めた。これらのことから HGF 遺伝子導入による治療法は臨床的応用が可能であることが示された。本研究から確立された HGF 遺伝子導入治療法は、ヒトにおけるリンパ浮腫への新たな治療法開発の端緒となる極めて意義深い研究であると考えられた。

諮問審査においても、非常に適切で論理的解答がなされ、関連する分野においても十分な知識を有していることが確認された。

以上の結果から、申請者の論文は医学博士の学位に値するものと判定された。