

論文の内容の要旨

論文題目 ラット部分肝移植モデルを用いたグラフトへの
ex vivo HGF 遺伝子導入の検討

指導教官 橋都浩平教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名 田中秀明

肝臓移植は末期肝不全に対する治療法として定着している。しかし脳死ドナーからの臓器提供数が十分でない本邦においては、生体部分肝移植が主体となっている。当初レシピエントは小児中心であったが、近年成人症例が急増している。この成人間生体部分肝移植においては、ドナーからのグラフト切除量に限界があるため、グラフトサイズのミスマッチが問題となる。過小グラフトは術後に増大することは知られているが、術後の肝機能の回復や生存率に悪影響を及ぼす。本研究では、強力な肝細胞増殖因子の一つである hepatocyte growth factor (HGF) に着目した。HGF は肝切除ラットへの投与で肝細胞の DNA 合成が促進されるだけでなく、いくつかの肝障害モデルでも肝保護作用が示されている。第一に、肝臓に特に遺伝子導入効率の高いアデノウイルスベクターを用い、ラット部分肝移植モデルを使って、冷保存中のグラフトに遺伝子を導入する手技 (ex vivo 遺伝子導入) を確立した。次いで、この方法により HGF 遺伝子の導入を行い、移植後の部分肝グラフトの増大と機能回復に与える影響を検討した。

ex vivo 遺伝子導入の手技は以下のように行った。syngeneic ラットの組み合わせで、ドナー肝の中葉、左葉および尾状葉を切除した後、右葉をグラフトとして摘出した。バクテールにて 1×10^9 plaque forming unit (pfu) のアデノウイルスベクターを門脈から灌流し、グラフト内に trap させた状態で cold bath 内で incubate した。その間にレシピエントの手術を始め、全肝摘出前の準備を行った。グラフトを 30 分間 incubate した後に、門脈より生理食塩水で残存したベクターを flush out した。レシピエントの全肝摘出後、グラフト上部下大静脈は 7-0 PROLENE を用いた連続縫合、門脈とグラフト下部下大静脈は各々カフ法にて吻合した。胆管はステントチューブにて再建した。術後のグラフトの増大に伴って、門脈のカフ柄が門脈を圧迫し血栓症を起こし、また下大静脈のカフ柄もグラフトに食い込むことが明らかとなったため、いずれも切離を行った。また胆管にも胃十二指腸の右方への偏位、癒着に伴うねじれや、グラフトの増大による圧迫を受けるため、胆管ステント部を門脈のカフ体部に固定するという独自に考案した手技を追加することで、安定した実験モデルを確立することができた。作製した部分肝グラフトの重量は、全肝の 22.9% に相当した。ベクターの代わりに生理食塩水を用いた群(生食群)ではグラフト重量は、術後 1 週間目で全肝の 85%、2 週間目には全肝の 96% に相当し、良好な回復を示したが、血漿アルブミン値は約 3.3g/dl と低値が続いた。 β -galactosidase 遺伝子を挿入したベクター(AxCALacZ)を用いて、ex vivo 遺伝子導入した群(LacZ ex vivo 群)で、グラフトへの導入効率を X-gal 染色にて検討した。比較のため ex vivo では導入を行わず、等量のベクターを手術直後にレシピエントに静脈注射した群(LacZ iv 群)も検討した。グラフトでの X-gal 陽性率は、LacZ iv 群が術後 1 日目、3 日目にそれぞれ 11%、38%であったのに対し、LacZ ex vivo 群はそれぞれ 36%、69% と有意に高値を示した。また LacZ ex vivo 群では他臓器での発現が殆ど認められなかったが、LacZ iv 群では特に脾臓での発現が顕著であった。また LacZ iv 群は LacZ ex vivo 群と比較して抗アデノウイルス抗体価の上昇が早期から認められた。静注法に比べ ex vivo での導入は、ウイルスベクターが全身のリンパ組織に暴露されにくく、したがって

ベクターに対する宿主の免疫反応が起きにくいと思われた。LacZ ex vivo 群もグラフトは早期に増大したが、血漿中アルブミン値は NS 群よりも低い値を示した。ラット HGFcDNA を組み込んだベクター(AxCAHGF) 1×10^9 pfu を導入した群(HGF ex vivo 群)で、ウエスタン・ブロット法によって HGF 蛋白が増加していることが認められた。HGF ex vivo 群は LacZ ex vivo 群と比較してグラフト重量の増加は認められなかったが、BrdU 染色では陽性率が他群を上回っていた。血漿中アルブミン値は術後 1, 3, 7 日目の全てにおいて LacZ ex vivo 群より有意に高値を示し、術後 7 日目には生食群と比較しても有意に高値を示し、HGF 遺伝子導入によりアルブミン合成能の著明な促進効果が得られることが明らかにされた。

本研究で確立した部分肝移植モデルは、拒絶反応や虚血再灌流障害を検討する実験への応用が可能である。また、HGF は抗アポトーシス効果を持つとも言われ、肝障害の治療に役立つ可能性は高い。アデノウイルスベクターを用いた ex vivo での遺伝子導入法によりレシピエント全身へのベクターの流入を最小限に抑えるとともに、術後早期に目的蛋白を高発現させることを可能とした。以上より、本モデルは移植後に起こり得る様々な肝障害を検討する目的での応用が期待できる。