

称号及び氏名	博士（獣医学）山下 保志
学位授与の日付	平成 17 年 2 月 20 日
論文名	「各種ラット疾患モデルの生体内における肝細胞増殖因子産生に関する研究」
論文審査委員	主査 畑 文明 副査 澤田 勉 副査 松尾 三郎

## 論文要旨

### 緒論

肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor；HGF）は，肝細胞，腎尿細管上皮細胞，気管支上皮細胞，血管内皮細胞，神経細胞等，多くの細胞を標的とし，細胞増殖の促進，細胞運動の促進，器官の形態形成誘導のような様々な作用を有する増殖因子である．

HGF は間葉系細胞内で一本鎖前駆体として合成され，細胞外分泌された後にプロテアーゼによるプロセッシングを受け， $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖とのジスルフィド結合により成る二本鎖ヘテロダイマーとなる．一本鎖 HGF は生物活性を有さないことから，二本鎖への変換は活性発現には必須である．また，HGF 遺伝子から，mRNA のスプライシングの違いにより 5 アミノ酸残基が欠損したバリエーションが，欠損型肝細胞増殖因子（deletion variant of HGF; dHGF）として単離されている．

HGF は障害臓器における細胞増殖および組織再生に関与していると考えられている．疾患と生体内 HGF との関連については，肝障害では，劇症肝炎，慢性肝炎，肝硬変等においてヒトおよび実験動物で報告がなされている．しかし，肝中心静脈閉塞症では詳細な報告はない．更に，肝障害以外の疾患においては，全身性炎症である重症熱傷における生体内の HGF 産生に関する研究は少ない．

肝中心静脈閉塞症は，中心静脈や小葉下肝静脈等の肝静脈末梢枝に非血栓性の閉塞が生じる疾患で，肝静脈血の環流障害をきたし，小葉中心性の出血，壊死により進行性の肝障害・肝不全を示す病態を特徴とする．主に骨髄移植や肝移植後の急性期にみられる重篤な合併症のひとつとして注目されており，原因としては，移植時に使われる放射線や免疫抑制剤が示唆されている．

また，重度の熱傷は全身性の炎症反応を引き起こし，その機序は，炎症のメディエータ

であるヒスタミンやプロスタグランジンの作用により微小血管の透過性が亢進することにより全身の循環血液量が減少し、それによりキサンチン・オキシダーゼ経路によるスーパーオキシド・ラジカルの産生が亢進するためと考えられている。

本研究では、肝中心静脈閉塞症および熱傷における障害後の生体内 HGF 産生を調べるため、ラットによる検討を行った。肝中心静脈閉塞症モデルは、クロタラリア属の植物に存在するピロリジン系アルカロイドであるモノクロタリン (monocrotaline; MCT) をラットに投与することにより作製し、肝臓における HGF 産生を四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘発肝障害ラットと比較した。熱傷ラットにおいては、熱傷後の諸臓器における HGF 産生を調べ、臓器障害の程度と HGF の活性化との関連を検討した。

更に、ヒト組換え dHGF の *in vitro* および *in vivo* における効果を検討した。まず、dHGF のラット初代培養肝細胞に対する増殖促進効果を HGF と比較し、次に dHGF 投与の正常および 70% 肝切除ラットの肝重量における効果を検討した。最後に、MCT 誘発肝障害ラットでは血漿 HGF 濃度および肝臓 HGF 量が減少していたことから、MCT 誘発肝障害ラットに対する dHGF 投与の効果を評価した。

## 第 1 章 ラット疾患モデルにおける生体内 HGF 産生

### 第 1 節 MCT 誘発肝障害ラット - CCl<sub>4</sub> 誘発肝障害ラットとの比較

MCT 誘発肝障害ラットの病態的特徴、ならびに血漿 HGF 濃度および肝臓 HGF 量を検討し、CCl<sub>4</sub> 誘発肝障害ラットと比較した。MCT は 100 mg/kg, CCl<sub>4</sub> は 1 mL/kg を単回経口投与した。

肝細胞障害の指標である血清アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の上昇およびヘパラスチン時間の延長は、MCT 投与ラットよりも CCl<sub>4</sub> 投与ラットにおいてより顕著であった。一方、肝臓類洞内皮細胞の障害の指標である血清ヒアルロン酸濃度は、MCT 投与ラットでより上昇した。肝臓の病理組織学的解析では、MCT 投与ラットでは類洞内皮細胞の脱落、CCl<sub>4</sub> 投与ラットでは肝細胞の障害が認められた。血漿 HGF 濃度および肝臓 HGF 量は、CCl<sub>4</sub> 投与により上昇し、投与後 24 時間および 48 時間でそれぞれピークに達した。一方、MCT 投与後ではこれらは経時的に減少した。

以上より、主として肝細胞が障害される CCl<sub>4</sub> 誘発肝障害では肝臓の HGF 産生は上昇し、一方、類洞内皮細胞が障害を受ける MCT 誘発肝障害では、肝臓の HGF 産生は低下する事が明らかとなった。

### 第 2 節 熱傷ラット

ラットを用い、熱傷後の諸臓器における HGF 量、および臓器の障害程度と HGF の活性化との関連を検討した。ラットは麻酔下にて熱湯に浸漬し、体表面積 60% の熱傷を施した。

エンザイムイムノアッセイによる測定の結果、熱傷後血漿 HGF 濃度は経時的に低下した。一方、肝臓、腎臓、肺、脾臓の HGF 量は熱傷後増加し、12 時間でピークに達し、その後減

少した。イムノブロットィングによる解析では、熱傷 12 時間後の肝臓および肺では、HGF は不活性型である一本鎖 HGF であったが、脾臓および腎臓では不活性型一本鎖に加えて活性型二本鎖 HGF が検出された。組織障害の指標となる組織蛋白量は、脾臓および腎臓で有意な低値を示した。

以上より、熱傷後、HGF は諸臓器で産生され、組織障害の程度に応じて活性型二本鎖に変換されることが示唆された。

## 第 2 章 ヒト組換え dHGF の *in vitro* および *in vivo* における効果

### 第 1 節 ラット培養肝細胞 DNA 合成に対する HGF と dHGF の活性比較

HGF と dHGF の活性を、ラット初代培養肝細胞におけるチミジンの取り込みを指標として比較した。その結果、dHGF は HGF よりも強くチミジン取り込みを促進させ、より強力な細胞増殖促進作用を有することが示された。

### 第 2 節 ラット肝重量に対する dHGF の効果

dHGF 静脈内投与の肝重量に対する影響を、正常ラットおよび 70% 肝切除ラットにおいて検討した。その結果、正常および肝切除ラットいずれにおいても dHGF は肝重量を増加させた。

### 第 3 節 MCT 誘発肝障害ラットにおける dHGF 投与の効果

肝臓 HGF 産生が低下する MCT 誘発肝障害ラットにおいて dHGF 投与の効果を検討した。成熟雄ラットに 100 mg/kg の MCT を 4 日の間隔をおいて 2 回経口投与し、dHGF は MCT 第 1 回投与の 4 日前より、500  $\mu$ g/kg を一日 2 回、11 日間静脈内投与した。

MCT 投与により血清総蛋白およびアルブミン濃度の低下、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよびアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の上昇、血清直接ビリルビン濃度の上昇、ならびにヘパラスチン時間の延長が認められたが、dHGF 投与によりこれらの値は改善された。肝臓の病理組織学的解析では、MCT 投与により中心静脈内皮の障害、肝小葉中心性のうっ血、出血、肝細胞壊死、類洞および肝細胞索の破壊、空洞化が見られた。これらは dHGF 投与により軽減された。

以上より、MCT 誘発肝障害ラットに dHGF を投与することにより肝障害が軽減することが示された。

## 総括

肝障害ラットおよび熱傷ラットにおける生体内 HGF 産生に関する検討を行い、以下の結論を得た。

1. 肝障害ラットにおいては、主として肝細胞が障害される  $\text{CCl}_4$  誘発肝障害ラットでは肝臓の HGF 産生は上昇し、類洞内皮細胞が障害を受ける MCT 誘発肝障害ラットでは肝臓の

HGF 産生は低下する．

- 2．熱傷ラットにおいては，熱傷後 HGF は諸臓器で産生されるが，活性型二本鎖 HGF へは組織障害の程度に応じて変換される．
- 3．dHGF は，ラット初代培養肝細胞の DNA 合成を HGF よりも強く促進する．
- 4．dHGF は静脈内投与にて，正常ラットおよび 70% 肝切除ラットの肝重量を増加させる．
- 5．MCT 誘発肝障害ラットに dHGF を投与することにより，肝障害が軽減する．

以上より，これまで報告の無かった，肝中心静脈閉塞症のモデルである MCT 誘発肝障害ラット，および熱傷ラットにおける生体内 HGF 産生およびその活性化を明らかにした．また，MCT 誘発肝障害ラットに dHGF を投与することにより肝障害が軽減されたことから，HGF 産生が低下する疾患において，HGF あるいは dHGF の補充療法的な使用による疾患治療の可能性が示された．

## 審査結果の要旨

肝細胞増殖因子は、培養肝細胞を増殖する因子として単離、クローニングされた増殖因子である。現在では、肝細胞増殖因子は線維芽細胞、内皮細胞、白血球などの間葉系細胞で産生され、肝以外の腎尿細管上皮細胞、気管支上皮細胞、血管内皮細胞、神経等を標的として、細胞増殖、細胞運動、器官の形成等の種種の作用を発揮していることが明らかとなってきた。また、肝細胞増殖因子は生体内において障害を受けた組織の再生に大切な働きをしていることも明らかとなってきた。すなわち、劇症肝炎、慢性肝炎、肝硬変などの肝障害、その他にも肺炎、腎炎、炎症性腸疾患、心筋梗塞、糖尿病において、肝細胞増殖因子の働きが示唆されている。障害部位への肝細胞増殖因子の供給は、障害臓器における産生と、障害を受けていない臓器からの産生によっている。最近、骨髄移植や肝移植直後に見られる重篤な合併症のひとつとして、注目されている肝中心静脈閉塞症は、中心静脈や小葉下肝静脈等の肝静脈末梢枝に非血栓性の閉塞が生じる疾患である。肝静脈血の環流障害を起こし、小葉中心性の出血、壊死により進行性の肝障害、肝不全を生じる。一方、重度の熱傷は熱刺激と、それにより産生される炎症のケミカルメディエーターのヒスタミンやプロスタグランディンの作用により、微小血管の透過性が高まり血液の水様成分が血管外に移行して、全身の循環血液量が減少する。循環血液量の減少はスーパーオキシドラジカルを産生させ、組織障害を誘発する。そして、心、肺、肝、腎等に障害をもたらすことが生理学的、病理学的に示されている。本研究では、現在までに詳細な検討が充分ではなかった肝細胞増殖因子の、中心静脈閉塞症と重度の熱傷後の生体内での産生について検討している。また、肝中心静脈閉塞症に対する効果を検討し、臨床における肝細胞増殖因子の補充療法としての効果に言及している。本研究で得られた成果を要約すると、

- 一、モノクロタリン投与により惹起した肝障害ラットでは、肝小葉中心部に類同構造の破壊が認められ、血漿での肝細胞増殖因子の濃度、肝での肝細胞増殖因子量が経時的に減少していた。
- 二、ラット熱傷モデルでは、血漿肝細胞増殖因子の濃度は経時的に減少した。肝、肺、腎、脾の肝細胞増殖因子量は12時間後に増加し、その後減少した。組織障害の指標となる組織蛋白量は脾、腎で減少し、活性型の二本鎖肝細胞増殖因子の濃度が減少していた。
- 三、ラット初代培養細胞を用いて、肝細胞増殖因子のDNA合成に対する効果を検討した。肝細胞増殖因子はDNA合成を促進したが、肝細胞増殖因子の鎖から5個のアミノ酸が欠損した“欠損型肝細胞増殖因子”がより強い効果を持つことを認めた。
- 四、正常ラットおよび70%肝切除ラットを用い、肝細胞増殖因子の肝重量増加効果を検討した。肝細胞増殖因子および“欠損型肝細胞増殖因子”ともに、両ラットにおいて肝重量を増加させた。
- 五、モノクロタリン誘発肝障害に対する“欠損型肝細胞増殖因子”の効果を検討した。モ

ノクロタリン投与による血液性状の異常、および肝中心静脈の障害、肝細胞壊死、空洞化等の病理学的異常が軽減された。

以上のように、本研究は肝中心静脈閉塞症と熱傷における生体内の肝細胞増殖因子の動態を検索し、本因子が低下する障害や疾患において、とくに“欠損型肝細胞増殖因子”の補充療法的な使用が有効であることを示した。これらの成果は、医学、動物医学に貢献するところが大きく、本論文の審査および学力確認の結果から博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。