



## Beneficial effect of deletion variant of hepatocyte growth factor for impaired hepatic regeneration in the ischemically damaged liver

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岡本, 和哉 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1660">http://hdl.handle.net/10271/1660</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 383号	学位授与年月日	平成16年 2月20日
氏 名	岡 本 和 哉		
論文題目	Beneficial effect of deletion variant of hepatocyte growth factor for impaired hepatic regeneration in the ischemically damaged liver (温阻血傷害肝における肝細胞増殖因子欠失変異体の肝再生に及ぼす効果)		

## 論文題目

Beneficial effect of deletion variant of hepatocyte growth factor for impaired hepatic regeneration in the ischemically damaged liver

(温阻血傷害肝における肝細胞増殖因子欠失変異体の肝再生に及ぼす効果)

## 論文の内容の要旨

## [はじめに]

移植医療における重大な問題の1つに臓器不足がある。肝移植の領域ではこの問題を解消する手段として、non-heart beating donorからのグラフト利用や温阻血肝を用いた split liver transplantation が考えられる。現在までに肝虚血・再灌流傷害に関する研究は多く行われているが、温阻血傷害肝の肝再生についての研究はほとんどない。

肝臓の機能的な組織構築や再生過程において中心的な役割を担う因子が肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) である。このサイトカインの第1 kringle に存在する5つの連続するアミノ酸が欠如したものが HGF の欠失変異体 (dHGF) であり、本来の HGF より強い細胞増殖促進活性を有している。本研究の目的は、温阻血傷害肝の肝切除後の肝再生における dHGF の効果を検討することである。

## [材料ならびに方法]

SD 系雄性ラット (250-280g) を用いた。全肝虚血による腸管の鬱血を回避するため、門脈・頸静脈間に外シャントを造設した後、肝門部において肝動脈、門脈、胆管を60分間遮断した。虚血終了時に70%肝切除を行い、肝流入血行遮断を解除した。再灌流直後と6時間目に dHGF (1 mg/kg) を投与した HGF 群、vehicle buffer を投与した vehicle control 群に加え、肝虚血を行わずに70%肝切除を行い、vehicle buffer を投与した non-ischemic control 群の3群を作成した。7日間生存率に加え、血漿 AST、albumin および HGF 値、残肝重量/体重比、BrdU labeling index (BrdU LI)、組織学的所見を3群間で比較した。7日間生存率は vehicle control 群10匹、HGF 群11匹を用いて算出した。生化学的検査の比較は各群5匹の結果を用いて行った。

## [結果]

- 1) 肝切除後8時間目の血漿 HGF 値は non-ischemic control 群では  $0.41 \pm 0.13$  ng/ml であったが、vehicle control 群では  $0.14 \pm 0.05$  ng/ml と有意に低下していた。
- 2) 血漿 AST 値は non-ischemic control 群では  $634 \pm 183$  IU/l であった。vehicle control 群では  $3462 \pm 1039$  IU/l まで上昇したが、dHGF 投与により、その上昇は有意に抑えられた ( $1849 \pm 605$  IU/l) ( $P < 0.01$ )。血漿 albumin 値には3群間で差はなかった。
- 3) 肝切除後8時間目の残肝重量/体重比は HGF 群の  $1.08 \pm 0.08\%$  に比べ、vehicle control 群では  $1.34 \pm 0.05\%$  と有意に増加していた ( $P < 0.01$ )。
- 4) vehicle control 群では、肝類洞内の血栓形成やうっ血に加え、好中球浸潤を伴う広範な肝壊死を示したが、このような組織所見は dHGF 投与により軽減した。
- 5) 肝切除後24時間目の残肝重量/体重比は、vehicle control 群に比し、non-ischemic control 群と HGF 群で有意に増加していた。同時期の BrdU LI は non-ischemic control

群の  $18.5 \pm 1.6\%$  に対し、HGF 群は  $22.8 \pm 0.4\%$  であった。

6) non-ischemic control 群では 100% であった 7 日間生存率は、vehicle control 群では 40% まで低下したが、dHGF 投与により 82% に改善した ( $P < 0.05$ )。

#### [考察]

我々は以前の研究で 60 分間の肝虚血を受けた正常ラットは再灌流傷害を受けるものの、全例肝不全に陥ることなく回復することを示した。本研究では、温阻血肝の split liver transplantation の graft としての可能性を検討するため、60 分温阻血傷害肝に対する 70% 肝切除後の肝再生に注目した。その結果、温阻血傷害肝では肝切除後 8 時間目には HGF 産生の低下と血漿 AST 値の上昇がみられ、組織学的には肝類洞微小循環障害による肝うつ血や肝壊死が観察された。このような傷害肝に dHGF を投与することにより、肝類洞微小循環障害は軽減し、24 時間目には non-ischemic control 群とほぼ同等の肝再生が得られ、7 日間生存率も改善することを確認した。本研究は肝切除後の肝再生の遅延から肝不全の発生が危惧される温阻血傷害肝に対する虚血・再灌流傷害の軽減とその後の肝再生に対して dHGF が有効であることを明らかにした。

HGF は肝再生を促進させる重要な因子であるが、我々が示したように温阻血傷害肝では肝切除後には HGF 産生が期待できない。細胞増殖促進作用以外にも HGF は多彩な生物活性を有する。冷保存肝での研究では、肝類洞内皮細胞に対する HGF の保護効果が示されている。本研究では肝類洞内皮細胞の機能は測定していないが、組織学的変化を考慮すると、dHGF による温阻血傷害肝の肝再生率と生存率の改善には肝虚血・再灌流後早期からの肝類洞内皮細胞に対する保護効果が関与したものと考えられる。

#### [結論]

温阻血傷害肝の 70% 肝切除後の HGF 産生は低下し、肝再生は障害された。dHGF は肝虚血・再灌流後の肝微小循環障害を軽減し、その後の肝再生を促進した。温阻血肝を移植グラフトとして応用する際には dHGF は有効な補助療法となりうる。

### 論文審査の結果の要旨

Non-heart beating donor からの肝移植に際して温阻血に伴う移植肝機能不全が問題となる。申請者らは肝切除後の残存肝再生評価モデルを用い、肝再生に及ぼす温阻血の影響を検討するとともに、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF) による肝再生促進効果を検討した。

#### [方法]

SD 系雄性ラット (250-280 g) を用いた。肝門部において肝動脈、門脈、胆管を 60 分間遮断した後 70% 肝切除を行い、肝流入血行遮断を解除した。残肝重量/体重比、BrdU labeling index より肝再生を評価するとともに、7 日間生存率、血漿 AST、albumin および HGF 値、組織学的所見を検討した。再灌流直後と 6 時間目に HGF (1 mg/kg) を投与した HGF 群、vehicle buffer のみを投与した vehicle control 群に加え、肝虚血を行わずに 70% 肝切除を行い、vehicle buffer を投与した non-ischemic control 群の 3 群を作成した。全肝虚血による腸管の鬱血を回避するため、門脈・頸静脈間に外シャントを造設した。7 日間生存率は vehicle control 群 10 匹、HGF 群 11 匹を用いて算出した。生化学的検査の比較は各群 5 匹の結果

を用いて行った。実験に用いた human HGF は 1<sup>st</sup> kringle の 5 個のアミノ酸を欠失する欠失変異体 (dHGF) であり、wild type HGF よりラット肝細胞に対して強い細胞増殖促進活性を有している。

### 【結果】

- (1) 7日間生存率は non-ischemic control 群では 100%で、阻血を加えた vehicle control 群で 40%、HGF 投与群では 82%であった ( $P<0.05$ )。
- (2) 肝切除後 8 時間目の血漿 HGF 値は non-ischemic control 群では  $0.41 \pm 0.13$  ng/ml であったが、vehicle control 群では  $0.14 \pm 0.05$  ng/ml と有意に低下していた。
- (3) 切除 24 時間後の残肝重量/体重比は non-ischemic control 群 ( $1.65 \pm 0.15$ ) に比し阻血を加えた vehicle control 群で有意 ( $p<0.05$ ) に低値を示した ( $1.37 \pm 0.08$ ) が、HGF 投与群では改善していた ( $1.63 \pm 0.09$ )。
- (4) 切除 24 時間後の BrdU labeling index は non-ischemic control 群の  $18.5 \pm 1.6\%$  に対し、HGF 群は  $22.8 \pm 0.4\%$  であった。
- (5) vehicle control 群では、肝類洞内の血栓形成やうっ血と好中球浸潤を伴う広範な肝壊死を示したが、non-ischemic control 群及び HGF 投与群ではこのような組織所見は軽微であった。
- (6) 血漿 AST 値は non-ischemic control 群 ( $634 \pm 183$  IU/l) に比し、vehicle control 群では高値 ( $3462 \pm 1039$  IU/l) を示したが、dHGF 投与により有意に抑えられた ( $1849 \pm 605$  IU/l) ( $P<0.01$ )。血漿 albumin 値には 3 群間で差はなかった。

これらの結果より申請者らは、温阻血では肝切除後の残存肝での HGF の産生が抑制されることにより肝再生が障害されるとし、HGF 投与によりこれを改善する事が出来るとしている。

本学位論文は、肝切除後の残存肝の再生能を指標として温阻血による肝再生抑制機構を明らかにするとともに、HGF 投与によりこれを改善しうる事実を証明したことにより、温阻血肝による肝移植の成績を向上させうる可能性を示した点が、審査委員会で高く評価された。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) コントロールの妥当性
- 2) HGF の投与量及び投与方法を決めた根拠
- 3) HGF の半減期
- 4) 欠失変異体 HGF を使用した理由
- 5) 肝切除後の血中 HGF 濃度の経時的変動
- 6) HGF 測定 ELISA の特異性
- 7) 阻血を加えた肝切除群の動物の死因
- 8) 切除肝組織の中で中間帯に壊死が起こりやすい理由
- 9) 阻血を加えた肝切除群における肝再生の特徴
- 10) アルブミン値に 3 群間で差が認められない理由
- 11) 肝炎や肝再生時における Ito 細胞の機能
- 12) HGF と dHGF でラット肝細胞増殖能に対する効果が異なる理由
- 13) 実験にオスラットのみを使用した理由

## 1 4) 統計学的検討方法の妥当性

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 浦 野 哲 盟

副査 金 山 尚 裕 副査 三 浦 克 敏