

学位論文題名

LEC ラット自然発症肝炎,
肝癌各病期における HGF の発現

学位論文内容の要旨

I. 緒言

LEC(Long-Evans Cinnamon)ラットは、約4カ月齢でヒト劇症肝炎類似の急性肝炎を自然発症し、その半数は死亡する。生存例は慢性肝炎に移行して、やがて肝に過形成結節、胆管線維症が出現し、1年以上を経過するとほぼ全例に肝癌が発生する。LECラットの急性肝炎は常染色体劣性遺伝様式で起こり、肝への銅異常蓄積が発症原因として確認され、Wilson病との類似が論議されてきた。最近クローニングされたWilson病原因遺伝子(ATP7B)をプローブとした解析で、これに対応するラット遺伝子(Atp7b)はLECラット肝炎原因遺伝子(hts)と同一であることが分かり、LECラットはヒト肝炎肝癌、とりわけWilson病のモデル動物として広く認知されるに至った。一方、hepatocyte growth factor (HGF)は肝再生因子の本体と考えられる増殖因子であり、細胞運動性促進、形態形成誘導等の多様な生物活性を有することが知られている。今回、LECラットにおけるHGF発現を、血中濃度測定、免疫組織染色、ノーザンブロットにより検討し、各病期とHGFのかかわりを考察した。さらにこれら自然発症肝病変と対比する意味で部分肝切除後のサンプルも用いた。

II. 材料と方法

1. 動物

8週より約2年齢の雌雄LECラットを用いた(北海道大学医学部付属動物実験施設より供給)。

2. 部分肝切除

8週から10週令雌LECラットに対しエーテル麻酔下に肝中、左葉をHiggins and Anderson法により約70%切除した。

3. 免疫組織染色

1) 一次抗体には、家兎抗リコンビナントラットHGF抗体、IgG分画(以下抗HGF抗体と略す)を用いた。

2) LECラットを屠殺直後、摘出した肝の凍結切片を作成し、一次抗体を室温にて1時間反応させた。二次抗体にはビオチン化抗家兎IgG抗体を用いたアルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジンの反応後、new Fuchsinで発色

させた。

4. ノーザンブロットによるHGF mRNAの解析

各病期および部分肝切除後の肝、腎、肺組織よりtotal RNAを抽出した。各サンプルのtotal RNAを30 μ gずつグリオキサル法にて変性後、1.0%のアガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜フィルターにトランスファーした。rat HGF cDNA のEcoRI fragmentを [α - 32 P] dCTPでラベルし、フィルターとハイブリダイズさせた。その後、型のごとく洗浄し、フィルム上にオートラジオグラフィーさせ、現像、写真撮影した。

5. 血漿HGF濃度測定

LECラットの頸静脈より採血した末梢血液にEDTA-2Kを加え、遠心して得た血漿をサンプルとした。抗HGF抗体を一次抗体とし、これをビオチン化したものを二次抗体としたサンドイッチEIA法で測定し、検出にはHRP標識化ストレプトアビジンを用いた。

Ⅲ. 結果

1. 血漿HGF値の変動

肝炎発症前10週ではいずれもが測定感度以下であった。劇症肝炎期の20週前後では、血漿HGF値は著明な上昇を示した。40週前後では高値のものもあったが、全体として劇症肝炎期より低値となり、慢性肝炎、胆管線維症期の70週前後では測定感度以下のものが多かった。80週をこえた肝癌期では、個体差があり、測定感度以下のものがある一方で、劇症肝炎期と同程度の高値を示す例も認められた。

2. 肝、腎、肺組織におけるHGF mRNA発現量の変動

肝におけるHGF mRNAの発現は、肝炎発症前に比べ劇症肝炎期には著明に増加した。しかし慢性肝炎期になると再び発現量は減少し、ほぼ一定のレベルで推移した。また胆管線維症部にもHGF mRNAは発現していた。肝癌組織でもHGF mRNAは発現していた。100週をこえた肝癌期では非癌部の慢性肝炎組織でHGF mRNAの発現が高い傾向にあった。肺、腎臓におけるHGF mRNAの発現は肝のHGF mRNAほど変動せず、全経過を通じほぼ一定のレベルで発現していた。

3. 免疫組織染色

肝炎発症前には、HGF陽性細胞は散在性に疎に観察された。これら陽性細胞はクッパー細胞、類洞内皮細胞といった肝非実質細胞が考えられた。劇症肝炎期では、HGF陽性細胞が多数出現し、特に門脈周囲において顕著であった。劇症肝炎期の陽性細胞も、その形態より非実質細胞と思われた。慢性肝炎組織ではHGF陽性細胞の数は減少し、散在性に分布していた。胆管線維症組織ではHGF陽性細胞は認められなかった。肝癌組織は、中ないし高分化型肝癌であったが、肝癌細胞集団の周囲の間質あるいは膜面、類洞内皮細胞にHGF陽性部分が認められた。また、肝癌細胞の胞体の一部がHGF陽性に染色された。8週齢のLECラットに部分肝切除を施した24時間後の残余肝組織ではHGF陽性細胞が増加し、かつ濃染しているのが観察された。しかし、劇症肝炎期とは異なり、陽性細胞は局在せず瀰漫性に増加していた。

4. 部分肝切除後の肝、腎、肺組織におけるHGF mRNA発現量の変動

肝臓では肝切除後、6時間、12時間まではHGF mRNAには変化がなかったが、

24時間後に著明に増加した。腎では6時間後にわずかに増加し、24時間後まで持続した。肺における肝切除後のHGF mRNAは6時間から12時間でピークに達し、肝臓での24時間後の発現量を上回っていたが、24時間では再び肝切除前のレベルに戻った。

IV. 考察

各病期でHGF発現に明らかな違いが認められた。血漿HGF値は、免疫組織染色の結果および肝臓におけるHGF mRNAレベルとほぼ一致する変動を示し、劇症肝炎期や肝癌期に増加した血中HGFは主に肝臓に由来することが示唆された。

免疫組織染色の結果、自然発症LEC劇症肝炎と部分肝切除後ではHGF陽性細胞の分布に違いが見られたことから、両者の肝再生過程で、HGF産生機構が異なると推測された。さらに部分肝切除後、肺、腎では術後早期にHGF mRNAの発現が高まり、特に肺では高い発現量が認められた。一方、肝臓では24時間後によりややくHGF mRNAの発現が上昇した。これまでにラットの部分肝切除後、早期に血中HGF値が上昇し、HGF mRNAは肺で特に高まることが報告されている。以上の事実と今回の結果から、LECラットの劇症肝炎では主として肝局所で産生されたHGFがパラクライン機構で働き、一方、部分肝切除後では肝臓以外の臓器で産生されたHGFがエンドクライン機構で働き、さらに肝局所由来のHGFがパラクライン機構で肝細胞に作用していると考えられた。胆管線維症組織でHGF陽性細胞は認められなかったが、HGF mRNA発現が確認された。この違いは、HGF遺伝子の転写以後の調節に原因があると思われた。肝癌期の血中HGF濃度にばらつきを認めたが、肝癌組織のHGF発現量に差があることや、担癌状態では全身に炎症を合併し得るため、個体によっては多量のHGFが産生誘導されていること等が推測された。

肝癌期で血中HGF高値のものが存在し、肝非癌部、肝癌組織に明らかなHGF mRNA発現が認められ、免疫染色で肝癌細胞周囲、間質にHGF陽性の部分があったことから、HGFが肝癌の発生、増殖を促進している可能性がある。

V. 結語

本研究では、LECラット肝炎、肝癌の自然経過におけるHGF発現の変化を検討した。その結果、

- 1) 肝におけるHGF発現は劇症肝炎期、肝癌期において増強しており、慢性肝炎期、胆管線維症期においては減弱していた。
- 2) 劇症肝炎期のHGFは肝再生に、肝癌期のHGFは肝細胞の癌化、増殖に関与していると推測された。

以上より、各病期でHGF発現に明らかな違いが認められ、LECラット自然発症肝炎、肝癌の自然経過にHGFが深く関わっていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳

学 位 論 文 題 名

LEC ラット自然発症肝炎、 肝癌各病期における HGF の発現

LEC(Long-Evans Cinnamon)ラットは、約4カ月齢でヒト劇症肝炎類似の急性肝炎を自然発症し、その半数は死亡する。生存例は慢性肝炎に移行して、やがて肝に過形成結節、胆管線維症が出現し、1年以上を経過するとほぼ全例に肝癌が発生する。LECラットの急性肝炎は常染色体劣性遺伝様式で起こり、肝への銅異常蓄積が発症原因として確認され、Wilson病との類似が論議されてきた。最近クローニングされたWilson病原因遺伝子 (ATP7B)をプローブとした解析で、これに対応するラット遺伝子(Atp7b)はLECラット肝炎原因遺伝子(hts)と同一であることが分かり、LECラットはヒト肝炎肝癌、とりわけWilson病のモデル動物として広く認知されるに至った。一方、hepatocyte growth factor (HGF)は肝再生因子の本体と考えられる増殖因子であり、細胞運動性促進、形態形成誘導等の多様な生物活性を有することが知られている。そこで申請者はLECラット自然発症肝炎、肝癌におけるHGFの役割を解明するため、LECラットでのHGF発現を、血中濃度測定、免疫組織染色、ノーザンブロットにより検討した。

その結果、以下の事実が明らかとなった。

1.血漿HGF値の変動

肝炎発症前10週ではいずれもが測定感度以下であった。劇症肝炎期の20週前後では、血漿HGF値は著明な上昇を示した。40週前後では高値のものもあったが、全体として劇症肝炎期より低値となり、慢性肝炎、胆管線維症期の70週前後では測定感度以下のものが多かった。80週をこえた肝癌期では、個体差があり、測定感度以下のものがある一方で、劇症肝炎期と同程度の高値を示す例も認められた。

2.肝、腎、肺組織におけるHGF mRNA発現量の変動

肝におけるHGF mRNAの発現は、肝炎発症前に比べ劇症肝炎期には著明に増加した。しかし慢性肝炎期になると再び発現量は減少し、ほぼ一定のレベルで推移した。また胆管線維症部にもHGF mRNAは発現していた。肝癌組織でもHGF mRNAは発現していた。100週をこえた肝癌期では非癌部の慢性肝炎組織

でHGF mRNAの発現が高い傾向にあった。肺、腎臓におけるHGF mRNAの発現は肝のHGF mRNAほど変動せず、全経過を通じほぼ一定のレベルで発現していた。

3.免疫組織染色

肝炎発症前には、HGF陽性細胞は散在性に疎に観察された。これら陽性細胞はクッパー細胞、類洞内皮細胞といった肝非実質細胞が考えられた。劇症肝炎期では、HGF陽性細胞が多数出現し、特に門脈周囲において顕著であった。劇症肝炎期の陽性細胞も、その形態より非実質細胞と思われた。慢性肝炎組織ではHGF陽性細胞の数は減少し、散在性に分布していた。胆管線維症組織ではHGF陽性細胞は認められなかった。肝癌組織は、中ないし高分化型肝癌であったが、肝癌細胞集団の周囲の間質あるいは膜面、類洞内皮細胞にHGF陽性部分が認められた。また、肝癌細胞の胞体の一部がHGF陽性に染色された。

以上の事実より、各病期でHGF発現に明らかな違いが認められ、LECラット自然発症肝炎、肝癌の自然経過にHGFが深く関わっていることが示唆された。

劇症肝炎期のHGFは肝再生に、肝癌期のHGFは肝細胞の癌化、悪性化、増殖に関与していると推測された。

試問に際し、浅香教授より、四塩化炭素誘発のラット肝炎モデルにおける検討との比較、肝炎の程度とHGF発現が相関するか否か、HGFが前癌病変に作用して肝癌へと至る過程、肝癌細胞の増殖に対するHGFの影響など、宮崎教授より、LECラットの加齢と肝への銅蓄積量の変化、銅キレート剤のD-penicillamine投与時のHGF発現などの質問がなされた。これらの質問に対し、申請者は概ね適切な回答をした。

さらに浅香教授、宮崎教授には個別の面接の上、本研究に関する審査を受け、合格と判定された。

本研究はLECラット自然発症肝炎、肝癌とHGFの密接な関係を示唆するもので、肝臓病学研究として意義ある内容と考えられる。よって、本論文は学位授与に値するものと判定した。