

学 位 論 文 題 名

欠損型肝細胞増殖因子（dHGF）の熱傷治療への応用

学位論文内容の要旨

肝細胞増殖因子（HGF）は *c-met* プロトオンコジーン産物のリガンドであり、増殖促進、細胞運動の促進、形態形成の誘導のような様々な生物活性を有する増殖因子である。HGF は分子内に 4 個のクリングル構造を持つが、その第 1 クリングル構造の 5 残基欠損型が欠損型肝細胞増殖因子（dHGF）である。dHGF は分子量 76,000～80,000 のヘパリン親和性を持つ蛋白質で、分子量 52,000～56,000 の重鎖と分子量 30,000～34,000 の軽鎖から構成されている。dHGF はラット初代培養肝細胞や上皮細胞に対して HGF より強い増殖促進作用を持ち、dHGF と HGF は標的細胞に対する増殖刺激特異性とその 3 次構造により区別される。本研究は、欠損型肝細胞増殖因子（dHGF）の熱傷に対する救命救急効果およびその作用機序を検討し、肝臓機能を増強することによる、熱傷治療薬として可能性を明らかにする目的で実施した。

第 1 実験では、ラットの重症熱傷モデルを用い、dHGF の後処置による薬理効果について検討した。麻酔下で、ラットに体表面積の 40%に相当するⅢ度（deep burn）熱傷を加えたあと dHGF 処置群と対照群に分けた。対照群の熱傷ラットでは、熱傷後 23 日目での生存率は 27%であった。血清アルブミン値は熱傷処理後に減少し、熱傷後 23 日目においても回復しなかった。血清 α_2 -グロブリン分画は増加する一方、血清トランスフェリン、総蛋白、高密度リポ蛋白（HDL）-コレステロール量は減少した。熱傷ラットに dHGF 1 mg/kg を 1 日 3 回 3 日間静脈内投与すると、熱傷後 23 日目での生存率は 64%まで上昇した。熱傷ラットに dHGF 1 mg/kg を 1 日 3 回 3 日間あるいは 6 日間静脈内投与すると、血清 α_1 -、 α_2 -、 β -グロブリン分画は増加した。血清アルブミン、トランスフェリン、総蛋白および HDL-コレステロール値は正常レベルあるいはそれ以上まで増加した。これらの結果から、dHGF による適度な肝蛋白質合成のアップレギュレーションが、急性期反応性蛋白だけではなく、アルブミンやトランスフェリン等の他の肝由来蛋白質の合成を促進することで熱傷後の生理的な回復過程を加速させ、熱傷による致死率の改善に貢献する可能性が示された。

第2実験では、ラットの循環血液量減少モデルを用い、dHGFの前処置による薬理効果について検討した。ラットにdHGF 1 mg/kg 又は溶媒を1日2回5-6日間静脈内投与した後、体表面積の25%に相当するⅢ度 (deep burn) 熱傷あるいはトリプシン処理による急性膵炎の病態を作製した。溶媒処置したラットでは、熱傷後7日目および膵炎誘発7日目での生存率はそれぞれ12%および5%であった。両病態モデルにおいて、モデル作製6時間後におけるヘマトクリット値は顕著に上昇し、循環血漿量は減少した。dHGF前処置したラットでは、熱傷後7日目および膵炎誘発7日目での生存率はそれぞれ40%および29%であった。dHGFを健常ラットに投与すると、ヘマトクリット値は低下し、循環血漿量は増加したが、dHGFを病態動物に投与してもヘマトクリット値の低下傾向と、循環血漿量の増加傾向は変わらなかった。これらの結果から、dHGFは、循環血漿量を増加させることで熱傷あるいは急性膵炎における血漿喪失性ショックの進行を予防し、両モデルにおける致死率の改善に寄与する可能性が示された。

第3実験では、中心静脈栄養 (TPN) を施行したラットにおける、dHGFの蛋白質代謝に及ぼす影響を、熱傷モデルを用いて検討した。麻酔下で、ラットに20%熱傷+TPN施行手術を行った。術後、dHGF 0.5 mg/kg 又は溶媒を1日2回7日間静脈内投与した。試験期間中、いずれの投与群にも、同カロリー (240 kcal/kg/日) を供給し、24時間毎に採尿・採糞を実施した。熱傷+TPN処置したdHGF投与群と溶媒投与群を比較すると、dHGFの7日間投与で、血清蛋白・血清脂質及び肝重量の増加が認められた。蛋白質代謝に関しては、溶媒投与群と比較し、dHGF投与群で、TPN施行3日目以降、窒素増加量は高値を示し、TPN施行後6日間の総窒素出納の増加が認められたが、体重変動及び前脛骨筋の蛋白質含量は両群で差はみられなかった。以上のことから、dHGFによる肝蛋白質合成の促進が窒素出納を改善し、代謝亢進に伴う敗血症あるいは多臓器不全へのリスクを軽減することによる、熱傷による致死率の改善に寄与する可能性が示された。

以上の成績から、dHGFは重症熱傷に対して救命救急効果を示すと考えられ、その作用機序として、①dHGFによる適度な肝蛋白質合成のアップレギュレーションが、急性期反応性蛋白だけではなく、アルブミンやトランスフェリン等の他の肝由来蛋白質の合成を促進することで熱傷後の生理的な回復過程を加速させる。②dHGFによる肝蛋白質合成の促進が、循環血漿量を増加させることで熱傷における血漿喪失性ショックの進行を予防する。③dHGFによる肝蛋白質合成の促進が窒素出納を改善し、代謝亢進に伴う敗血症あるいは多臓器不全へのリスクを軽減する。以上の可能性を示した。dHGFは重症熱傷において、肝臓機能を増強することで救命救急効果を示すユニークな熱傷治療薬として、今後の応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	桑原幹典
副査	教授	前出吉光
副査	教授	藤永 徹
副査	助教授	稲波 修

学位論文題名

欠損型肝細胞増殖因子（dHGF）の熱傷治療への応用

本研究は、欠損型肝細胞増殖因子（dHGF）の熱傷に対する救命救急効果およびその作用機序を検討し、熱傷治療薬としての可能性を明らかにしたものである。

まず、ラット重症熱傷モデルにおけるdHGFの後処置の薬理効果を検討するため、ラット体表面積にⅢ度の熱傷を加えた後、dHGF投与効果について検討した。非投与群では熱傷後23日目での生存率は27%であったの対し、dHGF 1 mg/kg 1日3回3日間静脈内投与群ではその生存率は64%まで上昇した。血清アルブミン値を調べたところ、対照群では熱傷処理とともに減少し、23日後においても回復はなかったが、dHGF 1 mg/kg 1日3回3日間あるいは6日間静脈内投与群では正常レベルかあるいはそれ以上の増加が観察された。この傾向は血清トランスフェリン、総蛋白、HDL-コレステロール量においても観察された。血清グロブリンについては熱傷処理により増加したが、dHGF投与群ではさらに増加する傾向が見られた。

次いで、ラット循環血液量減少モデルを作成し、それに対するdHGFの前処置による薬理効果について検討した。そのため、ラットにdHGF 1 mg/kg 1日2回5 - 6日間静脈内投与した後、Ⅲ度の熱傷あるいはトリプシン処理による急性膵炎の病態を作成した。対照群では、熱傷後7日目および膵炎誘発7日目での生存率はそれぞれ12%および5%であったが、dHGF前投与群ではそれぞれ40%および29%にまで回復した。本病態モデルにおいては、いずれの方法においても6時間後にヘマトクリット値の顕著な上昇と循環血漿量の減少が観察された。これに対し、dHGF前投与はヘマトクリット値増加ならびに循環血漿量減少に対し、そのいずれにも抑制的に作用した。

最後に、中心静脈栄養(TPN)を施行した熱傷ラットにおけるdHGFの蛋白質代謝に及ぼす影響を検討した。ラットに20%熱傷+TPN施行手術を施した後、dHGFを0.5 mg/kg 1日2回7日間静脈内投与した。試験期間中毎日240 kcal/kg 供給し、24時間毎に採尿・採糞した。その結果、dHGF投与によりTPN施行3日目に総窒素出納の有意な増加が観察され、6日間持続した。その他、dHGF投与7日間で血清蛋白・血清脂質・総鉄結合能及び肝重量の増加が認められたが、体重変動及び前脛骨筋蛋白含量

には差はなかった。

以上の成績から、dHGF後投与による重症熱傷ラット致死率の改善が明らかにされた。その原因として、dHGFによる肝由来蛋白質合成の促進、循環血漿量の増加、窒素出納の改善が考えられた。本研究は、dHGFを用いて肝臓機能増強により重症熱傷を治療するというユニークな治療方法の可能性を示しており、今後の臨床応用を含め大変意義のある成果と言える。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者有沢広彦氏が博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。