



Title	Gene Transfection of Hepatocyte Growth Factor Attenuates Reperfusion Injury in the Heart
Author(s)	上田, 秀樹
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41674">https://hdl.handle.net/11094/41674</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	うえだ しょう 樹
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14517 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Gene Transfection of Hepatocyte Growth Factor Attenuates Reperfusion Injury in the Heart. (肝細胞増殖因子(HGF)の遺伝子導入による心筋虚血再灌流障害の軽減に関する実験的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉  (副査) 教授 堀 正二 教授 中村 敏一

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

近年の心筋保護法の進歩により開心術の成績は格段に向上したが、不全心、肥大心などの病的な心臓においてはいまだ現状では十分とはいえず、その改良工夫が期待される。最近、内因性心筋保護の機序が明らかになりつつあり、特に増殖因子は内因性心筋保護の機序を司る因子として注目されており、その応用が新たな心筋保護法の開発に重要と考えられる。

肝細胞増殖因子(以下、HGF)は肝細胞の強力な増殖促進因子として分離精製された増殖因子であるが、最近、肝のみならず、腎、消化管、肺、内分泌器官、血管などに対して、増殖、生存促進をはじめとする多機能的な作用を有することが報告され、様々な疾患に対する治療薬として応用しうる可能性がある。心臓におけるHGF、c-Met/HGF receptorの存在については、胎生期の心臓原基において一過性に発現を認めるという報告や、血管内皮細胞での発現が報告されているが、成熟心筋細胞での発現に関する報告はない。また肝、腎などにおいてHGFの増殖、再生、維持機能が最近急速に解明されているにも関わらず、心筋梗塞後リモデリングや虚血再灌流時におけるHGFの関与については明らかではない。そこで心臓におけるHGF、c-Metの発現とその役割を明らかにするために、心筋障害時の内因性HGF、c-Met/HGF receptorの心臓での発現の時間的推移と共に、c-Metの局在について検討した。更にin vivo遺伝子導入によってHGFを心臓に高度に発現させ、心筋虚血再灌流障害におけるHGFの心筋保護効果について検討した。

#### 【方法ならびに成績】

##### (1)心筋梗塞モデルにおける内因性HGF、c-Met/HGF receptorの発現

8週令の雄性Wistar ratを用いて、全麻下気管切開後左開胸下に左冠動脈を結紮し、急性心筋梗塞モデルを作成した。所定時間経過後、心臓を摘出し、左室成分のtotal RNAをAGPC法にて回収した。また同ratの心筋細胞、冠動脈血管内皮細胞をcollagenase灌流にて単離し、同細胞のtotal RNAを回収した。

RT-PCR法で確認した心筋梗塞後全心臓におけるHGF mRNAの発現に著明な変化は認められなかったが、c-Met mRNAは24時間後に著明な発現誘導を認め、以後1週間までその発現が持続した。また、正常心から単離した心筋細胞、非心筋細胞においてc-Metの発現は軽度であったが、心筋梗塞後24時間に単離した両細胞ではc-Met

の発現の増加を認めた。

#### (2) 心筋細胞における HGF の産生と HGF による細胞保護効果 (in vitro)

単離心筋細胞の培養液中の HGF 濃度を ELISA 法にて測定したところ、2.3ng/ml の濃度で検出され、これは48時間の低酸素負荷により低下した。正常ラット心より単離した心筋細胞に HGF を添加補充し、低酸素負荷もしくは過酸化水素添加による酸化ストレスに対する保護効果を検討すると、いずれの負荷に対しても HGF は濃度依存性にその viability を改善した。

#### (3) HGF 遺伝子導入による虚血再灌流障害の軽減効果 (in vivo)

HVJ liposome 法を用いて経冠動脈的に全心臓に HGF 遺伝子を導入した (HGF 群)。この心臓を同種同系ラットの腹部に移植し、導入3日後に心臓を摘出し、Langendorff 灌流装置を用いて、晶質液灌流を行った。常温虚血 (37℃, 30分間) 前後の心機能を測定し、虚血前に対する虚血再灌流後の回復率を非導入心 (control 群) と比較検討した。

HGF 群では RT-PCR 法にて mRNA 転写, ELISA 法にて蛋白発現が確認された。HGF 群は control 群に比し、左室発生圧, 左室 dP/dt の回復率は有意に高値であり、再灌流後の冠血管流出液中の CPK 漏出量も有意に低値であった。

#### 【総括】

1. 急性心筋梗塞モデルにおいて、梗塞後24時間に非梗塞部の心筋細胞と非心筋細胞の両方で c-Met/HGF receptor の発現が増加した。
2. 心筋細胞は HGF を産生し、低酸素によりその産生が低下したが、HGF 添加により低酸素負荷ならびに過酸化水素添加による細胞障害が抑制された。
3. HVJ liposome 法により、HGF を高度に発現した心臓は、常温下 global ischemia 後に control 群に比し、左室発生圧の回復率が有意に高値であり、CPK 漏出量が有意に低値であった。
4. 以上より、心筋障害時に心臓での c-Met/HGF receptor の発現は増加し、HGF の心臓での高度な発現により、心筋虚血再灌流障害が軽減されることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

増殖因子は内因性心筋保護の機序を司る因子として注目されており、その応用が新たな心筋保護法の開発に重要と考えられる。増殖因子のひとつである肝細胞増殖因子 (HGF) は肝、腎、骨格筋などにおける増殖、再生、維持機能が最近急速に解明されているにも関わらず、心筋梗塞後リモデリングや虚血再灌流時における HGF, c-Met/HGF receptor の関与については明らかではない。そこで心臓における HGF, c-Met の発現とその役割を明らかにする目的で、心筋障害時の内因性 HGF, c-Met の心臓での発現の時間的推移と共に、c-Met の局在について検討した。更に in vivo 遺伝子導入によって HGF を心臓に高度に発現させ、心筋虚血再灌流障害における HGF の心筋保護効果について検討した。

その結果、ラット急性心筋梗塞モデルにおいて、梗塞後24時間に非梗塞部の心筋細胞と非心筋細胞の両方で c-Met の発現が増加した。さらに細胞培養系において心筋細胞は HGF を産生し、低酸素によりその産生が低下したが、HGF 添加により低酸素負荷による細胞障害が抑制された。HVJ liposome 法を用いた遺伝子導入により HGF を高度に発現した心臓は、常温虚血再灌流後に control に比し、左室発生圧の回復率が有意に高値であり、CPK 漏出量が有意に低値であることを確認した。

これらの結果は、心筋障害時に心臓での c-Met/HGF receptor の発現が増加し、HGF の心臓での高度な発現により、心筋虚血再灌流障害が軽減される可能性を示唆するもので、今後の心筋保護法の発展において貴重な知見であり学位に値すると考えられる。