

Title	Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF
Author(s)	仲村, 輝也
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43678">https://hdl.handle.net/11094/43678</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>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	なかむらてるや 仲村輝也
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16887 号
学位授与年月日	平成14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	Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF (肝細胞増殖因子 HGF の心筋保護作用と虚血再灌流障害に対する治療効果)
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】

虚血再灌流障害は心筋梗塞や開心術後の心筋再灌流に伴う重要な病態であり、心機能に大きな影響を与える。再灌流により炎症性サイトカイン、接着因子、補体など多くの因子が活性化され、病理学的には心筋細胞のアポトーシスが引き起こされる。アポトーシスは梗塞巣の拡大、心筋リモデリングの進行ひいては心機能低下の原因となる事が報告されている。また、様々な分子生物学的手法がアポトーシスを抑制し、心筋障害の軽減、心機能改善をもたらすことが知られつつある。

HGF (hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子) は培養肝細胞に対する増殖促進活性を指標に発見・単離およびクローニングされた蛋白であるが、HGF は肝細胞のみならず c-Met/HGF レセプターを発現した多くの細胞に対して増殖促進、運動性促進、上皮組織の管腔形成に代表される形態形成誘導、抗アポトーシス、血管新生など多様な生物活性を発揮することが知られている。さらに HGF は多くの臓器障害モデルにおいて治癒・再生を促進することも報告されている。一方、心臓における HGF の生理的意義、機能についてはいまだ不明な点が多い。

本論文においてはラット心筋虚血/再灌流モデルを用いて HGF の内因性心筋保護因子としての機能と、虚血再灌流障害予防・治療への応用の可能性を検討した。

#### 【方法】

##### 1) 虚血/再灌流モデルと内因性 HGF および c-Met/HGF レセプター発現解析

4週齢 SD ラットを用いペントバルビタール麻酔、気管内挿管下に左冠動脈を20分間結紮し再灌流するモデルを作成した。再灌流後の経時的血中 HGF レベルを ELISA 法により定量した。左室心筋における c-Met 蛋白および mRNA の発現を免疫組織染色および定量的 RT-PCR 法により観察した。

##### 2) HGF 中和抗体投与による虚血/再灌流障害の病態変化の解析

中和活性を持つ抗ラット HGF 家兎抗体 500  $\mu$ g を再灌流20分前および再灌流後12、24、36時間後の計4回腹腔内投与した (n=10) (コントロール群; 正常家兎 IgG 投与、n=10)。48時間後における心筋細胞のアポトーシスを TUNEL 法により観察した。 $\alpha$ -sarcomeric actin 免疫染色像により梗塞サイズの定量を行った。

##### 3) リコンビナント HGF 投与による虚血/再灌流障害の病態変化、Bcl-xL の発現解析

リコンビナントヒト HGF 160  $\mu$ g を再灌流直後に経尾静脈投与し、さらに同量を12、24、36時間後の計4回投

与した (n=8) (コントロール群; 生食投与, n=8)。再灌流 3、48時間後に TUNEL 法、左室心筋における Bcl-xL の発現を免疫染色および Western blot により観察した。48時間後に経頸動脈カテーテルによる心機能 (LV SP、LVEDP、max.dP/dt) 測定および梗塞サイズの定量を行った。

#### 【成績】

ラット虚血/再灌流モデルにおける血中 HGF レベルは 3 時間後にシャム手術群の約 6 倍、24 時間後に約 12 倍と 2 相性の増加を示した。また心筋における c-Met mRNA の発現は、非虚血領域である左室自由壁において有意な増加を示し、12 時間後にピークとなったが、非虚血領域である心室中隔部においては c-Met mRNA の有意な変化は認められなかった。免疫染色の結果、c-Met の発現部位は主として梗塞領域に接する部位 (risk area) の心筋細胞であった。

内因性 HGF の機能を検討するため HGF 中和抗体を投与したところ、コントロール群に比べて TUNEL 陽性の心筋細胞が著しく増加し、48 時間後における梗塞領域の有意な拡大が認められた。コントロール群においては 48 時間以内の心不全による志望は認められなかったが、抗体投与により内因性 HGF を中和すると 48 時間以内に 50% のラットが死亡した。

一方、リコンビナント HGF を投与すると、左室自由壁心筋における Bcl-xL の発現がコントロールに比べて有意に増加した。免疫染色の結果、Bcl-xL 陽性心筋細胞はコントロール群に比べて約 4 倍の増加を示した。一方 TUNEL 陽性心筋細胞は約 1/4 に抑制された。48 時間後の梗塞サイズはコントロール群に比べて有意に縮小した。また心機能に関しては LVEDP および max.dP/dt の有意な改善を認めた。

#### 【総括】

虚血再灌流後急性期に増加する内因性 HGF は重要な生理的心筋保護因子として機能する。またリコンビナント HGF の速やかな投与は、心筋細胞における Bcl-xL の発現を高め、アポトーシスの進行を抑制した。アポトーシスの抑制は二次的なネクローシスの抑制へとつながり結果的に梗塞サイズの縮小をもたらすと考えられる。

以上のことから HGF は虚血再灌流障害の病態生理に基づいた合理的な予防、治療となり得ると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

心筋虚血/再灌流障害は循環器領域において最も重要な研究課題の一つである。この病態は心筋梗塞、心臓手術など様々な場面においてみられ、重篤な心筋障害、機能低下を来し生命予後にも関わる。その病態には多くの因子が関与するが、早期の共通の病理学的現象として心筋細胞に著明なアポトーシスを来す事が知られている。一方アポトーシスを抑制する手法として、これまでにいくつかの増殖因子による研究が進んでいるが、内因性保護因子としての意義が明らかにされているものはない。本論文では、ラット虚血/再灌流モデルにおいて再灌流後早期に肝細胞増殖因子 (HGF) およびその特異的レセプターの発現が亢進すること、中和抗体を用いた実験から、内因性 HGF は心筋細胞のアポトーシスを抑制し虚血/再灌流障害を軽減する重要な心筋保護因子として機能することが明らかにされた。さらに本論文では外的 HGF 投与は内因性 HGF の機能に基づいた虚血/再灌流障害に対する合理的な治療法であることも明らかにされた。本論文は虚血/再灌流障害における増殖因子の生理的意義を世界に先駆けて明らかにした論文であり、これにより HGF の臨床応用への可能性をさらに高めた非常に意義深い研究である。よって本論文は学位に値するものと考えられる。