



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | The loss of local HGF, an endogenous gastrotrophic factor, leads to mucosal injuries in the stomach of mice                                                                                                                                                          |
| Author(s)    | 中平, 理恵                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 2006, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/46222">https://hdl.handle.net/11094/46222</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"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</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           | 中 平 理 恵                                                                                                                                              |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                            |
| 学 位 記 番 号     | 第 20146 号                                                                                                                                            |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 18 年 3 月 24 日                                                                                                                                     |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学系研究科臓器制御医学専攻                                                                                                                   |
| 学 位 論 文 名     | The loss of local HGF, an endogenous gastrotrophic factor, leads to mucosal injuries in the stomach of mice<br>(内因性胃修復因子である HGF の産生不良が胃粘膜傷害の悪化をもたらす) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 吉 峰 俊 樹<br><br>(副査)<br>教 授 中 村 敏 一    教 授 門 田 守 人                                                                                        |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

肝細胞増殖因子 (HGF) は肝臓や腎臓、肺などの様々な臓器・器官において細胞の増殖、遊走、形態形成、抗アポトーシス作用などの多様な生物活性をもち、自然治癒を導く修復因子の実体であることが近年明らかとなっている。一方、胃は機械的、化学的ストレスに常時さらされており、容易に傷害を受けるが粘膜上皮の再生を介して速やかに治癒に導く機構が備わっている。HGF は初代培養した胃粘膜上皮細胞に対して増殖を促すことが報告されているが、生体における機能、とりわけ胃粘膜傷害時の修復における HGF の生理的意義についてはいまだ明らかにされていない。そこで今回、マウスにシスプラチンを注射して胃粘膜傷害を誘発し、このモデルに HGF 中和抗体またはリコンビナント HGF を投与することにより粘膜治癒における HGF の機能を検証した。

#### 【方法】

健康な 6 週齢 ICR マウスにシスプラチン (9 mg/kg) を腹腔内に投与し、経時的に動物を解剖し、胃組織を採取した。ヘマトキシリンエオジン染色および von-Willbrand 因子染色により粘膜傷害の程度をスコア化した。さらに胃粘膜の再生を評価すべく、PCNA の免疫染色により増殖期にある上皮細胞をカウントした。シスプラチン投与後の傷害および修復過程における HGF の発現は ELISA 法ならびに免疫組織化学的手法を用いて評価した。次いで HGF 受容体 (c-Met) の発現とその活性化はウェスタンブロット、免疫沈降法ならびに免疫組織化学的手法により解析した。さらに内因性 HGF の発現意義を明らかにすべく HGF 中和抗体またはリコンビナント HGF を投与し、粘膜傷害に及ぼす影響を von-Willbrand 因子による粘膜 mucosal cap の連続性を指標に評価した。再生に及ぼす HGF 中和抗体の影響を明らかにすべく、PCNA、サイクリン D1、 $\beta$  カテニンなどの細胞周期に関連する核蛋白の発現を指標に免疫組織化学的手法により解析した。

#### 【成績】

シスプラチン投与後 24 時間目までに胃粘膜傷害は中等度の進展を示した。逆に 48 時間目以降は PCNA で見た粘

膜上皮の再生に一致して粘膜傷害部位は小さくなる傾向を示した。胃組織中の HGF 濃度は傷害が進展する 24 時間目までに有意な減少を示したのに対し、PCNA で見た再生が高まる 48 時間以降は上昇を示した。これに一致して Met 発現も回復期で亢進する傾向を示した。

そこで HGF 中和抗体をシスプラチン投与直後と 24 時間後に投与したところ、c-Met チロシン磷酸化の抑制に一致して粘膜上皮の再生が損なわれ、結果的に HGF 中和群では 48 時間後も mucosal cap の脱落像が広範囲に観察された。Normal IgG を投与した対照群では基底層における  $\beta$  カテニンの発現が観察され、G1/S 期進展を示すサイクリン D1 発現が高まっていた。一方、HGF 中和群では  $\beta$  カテニンの発現低下に一致してサイクリン D1 の発現も抑制された。

最後に HGF 蛋白の治療薬としての可能性を検討すべく、シスプラチン投与後傷害進展期にリコンビナント HGF を補充すると、生食を投与した対照群と比較して c-Met チロシン磷酸化が明らかに高まった。これに一致して HGF 補充群では PCNA で見た粘膜上皮細胞の増殖が有意に高まっており、von-Willbrand 因子で見た mucosal cap の連続性が保たれていることも判明した。

#### 【総括】

今回の結果から、胃粘膜間質からパラクリン的に供給される HGF が上皮細胞の増殖、粘膜再被覆に必須であることが明らかとなった。HGF は粘膜基底層の上皮細胞を標的として  $\beta$  カテニンの核内移行を高めることにより G1/S 進展を促し、上皮再生を促進すると考えられる。このように HGF は必須の胃粘膜修復因子として機能する一方、HGF による修復システムの破綻が胃粘膜傷害の増悪に結びつくと考えられる。したがって HGF 補充療法は糜爛や潰瘍を始めとする様々な胃粘膜変性疾患に対して病態に基づいた合理的な治療戦略になることが期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

胃は容易に傷害を受けるが、速やかに治癒に導く機構が備わっている。一方、肝再生因子として発見された HGF は肺、腎等多くの臓器において内在性修復因子であることが分かってきたが、胃組織における HGF の機能は今だ不明である。

そこでマウスにシスプラチンを投与し、胃粘膜の治癒における HGF の機能を検証した。正常の胃では間質に HGF の発現が認められるが、シスプラチン投与後 24 時間以内に HGF の発現が低下し、これに一致して傷害が進行した。投与後 36 時間以降、HGF 発現の回復とともに胃粘膜は修復に向かった。そこで HGF 中和抗体を投与すると、粘膜上皮の増殖が抑制され、修復が遅延した。次にリコンビナント HGF を投与すると、粘膜上皮の増殖に一致して修復が促進された。

以上の結果より胃間質からパラクリン的に供給される HGF が粘膜の修復に必須である一方、その破綻が傷害の増悪に結びつくと考えられた。したがって HGF 補充は様々な胃疾患に対して治療戦略になりうると考えられた。

本論文は胃粘膜修復機構における HGF の機能を解明し、今後の臨床的応用に結びつく意義深い研究であり、学位の授与に値すると考えられる。