

氏名 (本籍)	清水 雅 仁 (長野県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 462 号
学位授与日付	平成 13 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Mechanism of Retarded Liver Regeneration in Plasminogen Activator-Deficient Mice : Impaired Activation of Hepatocyte Growth Factor after Fas-Mediated Massive Hepatic Apoptosis
審査委員	(主査) 教授 森 脇 久 隆 (副査) 教授 森 秀 樹 教授 藤 原 久 義

論 文 内 容 の 要 旨

肝再生は、種々の増殖因子、サイトカインによって複雑に制御されている。その中でもHepatocyte Growth Factor (HGF) は、肝実質細胞に対し強い増殖促進作用を示し、肝臓病治療の臨床応用に向け研究が進められている。また、線溶系因子であるurokinase-type plasminogen activator (uPA) は、プラスミノーゲンをプラスミンに活性化するとともに、肝再生の初期段階において、不活性型HGFを活性型HGFに変換し、その生理活性作用を発現させる。同時にプラスミンは、細胞外基質よりHGFやTransforming Growth Factor- β (TGF- β) などの増殖因子を放出、活性化するが、TGF- β は肝再生の終了にも深く関わっており、uPA/プラスミン系は、肝再生の開始、終了に両極性に関与している可能性が示唆されている。一方Fasは、細胞死 (アポトーシス) 誘導シグナルを細胞内へ直接伝達する細胞表面分子として同定されたが、肝細胞にも非常に多く発現しており、ヒト劇症肝炎においてFasとTumor Necrosis Factor (TNF) レセプターを介した細胞死が、その病態発生に重要な役割を果たすことが明らかになってきている。抗Fas抗体によって惹起される広範なマウス肝細胞死は、ヒト劇症肝炎のモデルとして有用であるが、その後の肝再生におけるuPA/プラスミン系、およびHGFの関与については、未だ十分な検討は行われていない。そこで申請者らは、uPA、およびそのインヒビターであるplasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) のノックアウトマウスに、抗Fas抗体を投与し広範な肝細胞死を誘導し、その後の肝再生の状態について、HGFの動態も含め比較検討した。

研究方法

実験1: uPA、PAI-1のノックアウト (-/-) マウスおよび野生型 (WT) マウスに対し、 $5\mu\text{g}/\text{匹}$ の抗Fas抗体を腹腔内投与し広範な肝細胞死を誘導し、経時的 (0, 3, 6, 12, 24, 48, 96, 168時間後) に犠牲死させ、肝組織を採取した。以下の実験2, 3に対しても、抗Fas抗体による同様の前処置を施行した。肝障害の程度についてはHE染色にて組織学的に検討するとともに、DNAの断片化をhiston-DNAのELISA法測定にて検討した。また、肝再生増殖能を検討するため、Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) の免疫染色を施行し、陽性細胞を測定後、ラベリングインデックスを算出した。HGFタンパクレベルの経時的変動については、既報の方法にてタンパクを抽出後、SDS-PAGEを用いWestern-Blotting法にて比較検討した。

実験2: uPA遺伝子の有無が、直接的に肝再生に果たす役割を確認するために、uPA-/-マウスに対し既報のlipofection法を用いて再びuPA遺伝子を導入し、uPA-/-マウスとuPA-/-マウス+uPA DNAマウスの両者間で、PCNAラベリングインデックスと、HGFタンパクレベル、およびHGFの活性型レセプターであるチロシンリン酸化c-Metのタンパクレベルについて比較検討した。チロシンリン酸化c-Metのタンパクレベルについては免疫沈降Western-Blotting法を用いた。また、uPA遺伝子の導入の成否については、既報の方法にて肝プラスミン活性を測定し、間接的に確認した。

実験3: HGFの上昇が、直接的に肝再生に果たす役割を確認するために、PAI-1-/-マウスに対し、抗HGF抗体を中和抗体として投与し、非投与群との間で、PCNAラベリングインデックスとチロシンリン酸化c-Metのタンパクレベルについて比較検討した。

研究結果

1. 組織学的所見では、アポトーシスによる広範な肝細胞死、肝組織の出血性変化は、各群 (uPA-/-, PAI-1-/-,

WTマウス)とも同様に、抗Fas抗体投与後6-12時間にて強く認められるようになり、各群とも約20%のマウスが24時間以内に死亡した。histon DNAのELISA法測定では、組織学的所見と同様に、各群とも6-12時間にて上昇を認めたが、各群の間に有意差は認められず、肝細胞死は抗Fas抗体によって、各群とも同程度惹起されているものと考えられた。また、WT、PAI-1-/-マウスでは、抗Fas抗体投与後96時間で組織学的に正常像を示したのに対し、uPA-/-マウスでは、同時間では肝組織の破壊像が残存しており、肝再生はWT、PAI-1-/-マウスと比較し遷延していた。

2. PCNAラベリングインデックスによる肝再生増殖能の検討では、WTマウスでは抗Fas抗体投与後24時間までインデックスの増加がみられず、その後急激に上昇し48時間で最大値を示した。それに対しuPA-/-マウスでは、抗Fas抗体投与後48時間で増加傾向を示したもののその上昇は緩徐であった。また、インデックスが最大値を示した時間も抗Fas抗体投与後96時間であり、WTマウスと比較し時間的に遷延するとともに、インデックスの最大値も低下していた。一方、PAI-1-/-マウスでは、インデックスは24時間より上昇し始め、WT、uPA-/-マウスと比較し、肝再生の促進傾向が認められた。

3. 活性型HGFタンパクの発現は、各群とも正常肝では認められなかったが、WTマウスでは抗Fas抗体投与後6時間にて強発現し、その後徐々に減少したのに対し、uPA-/-マウスでは6時間での発現は非常に弱く、発現のピークも48時間であり、WTマウスと比較し著明に遷延していた。一方、PAI-1-/-マウスでは、活性型HGFタンパクは、抗Fas抗体投与後3時間にて強発現し、WT、uPA-/-マウスと比較し、その発現は促進していた。

4. uPA-/-マウスにuPA DNAをlipofectionしたところ、抗Fas抗体投与後6時間における肝プラスミン活性、活性型HGFタンパク、およびチロシンリン酸化c-Metのタンパクの発現は、uPA-/-マウス非uPA DNA lipofection群と比較し、有意に増加した。また、抗Fas抗体投与後48時間におけるPCNAラベリングインデックスも増加した。

5. PAI-1-/-マウスに抗HGF抗体を中和抗体として投与したところ、抗Fas抗体投与後6時間におけるチロシンリン酸化c-Metのタンパクの発現と、抗Fas抗体投与後24時間におけるPCNAラベリングインデックスは、PAI-1-/-マウス非抗HGF抗体投与群と比較し、抑制された。

考察、結語

今回の研究にて、抗Fas抗体によって誘導された広範な肝細胞死後の肝再生増殖は、uPA遺伝子のノックアウトによって遷延し、PAI-1遺伝子のノックアウトによって促進された。uPAは、特に肝再生の初期段階において、プラスミンを介して、細胞外基質より不活性型HGFを放出するとともに、それをさらに活性型に変換することが報告されている。*in vitro*において、uPAによるHGFの活性化作用は、HGFアクチベーターなど他のセリンプロテアーゼと比べ、比較的弱いとされていたが、今回の研究では、uPA遺伝子の導入により活性型HGFの上昇、およびそのレセプターであるc-Metの活性化を介して、肝再生増殖能が回復することが示されたことより、uPAは*in vivo*において、HGFの強い活性化作用を持つことが示唆された。一方、PAI-1はuPAのインヒビターであり、PAI-1-/-マウスでは、uPAに対する抑制作用が減弱し、その結果uPA活性が亢進することにより、HGFの活性化を介して肝再生増殖能が促進している可能性が考えられた。これらの現象がヒト劇症肝炎のモデルにて観察されたことより、HGFとともに、uPAやPAI-1など線溶系因子のコントロールが、劇症肝炎の予防や治療に関連していく可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 清水雅仁は、Fasを介した広範肝壊死後の肝再生が、plasminogen activator (PA) による肝細胞増殖因子 (HGF) の活性化と、PA inhibitor-1 (PAI-1) によるnegative feedbackの二重の制御下にあることを、PAノックアウト、PAI-1ノックアウト、ワイルドタイプの3種のマウスを用いて、初めて*in vivo*で証明した。この研究成果は、上記3種の分子を将来臨床応用する可能性を開き、肝臓病学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Mechanism of Retarded Liver Regeneration in Plasminogen Activator-Deficient Mice :
Impaired Activation of Hepatocyte Growth Factor after Fas-Mediated Massive Hepatic Apoptosis
2001年 Hepatology : in press