氏名（本籍）	**木　山　　　茂**（岡山県）
学位の種類	博　士（医学）
学位授与番号	甲第　７４７　号
学位授与日付	平成　20　年　3　月　25　日
学位授与要件	学位規則第４条第１項該当
学位論文題目	Reduction of fibrosis in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis cirrhosis by human *HGF* gene transfection using electroporation
審査委員	（主査）教授　竹　村　博　文 （副査）教授　森　脇　久　隆　　教授　高　見　　剛

論文内容の要旨

背景と目的

近年，本邦において肥満とそれに伴う脂肪肝患者は増加しており，今後非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis，以下 NASH）の増加が予測される。NASH は特に線維化を有する場合，肝硬変へ移行し肝不全による死亡が多く，予後不良とされている。様々な治療法が試みられているが，現在のところ治療体系が確立されていない。

human hepatocyte growth factor（以下 HGF）は in vivo で様々なタイプの肝線維症を改善する報告が認められる。我々はこれまでに dimethylnitosamine による肝線維モデルにおいて，electroporation（以下 EP）を用い門脈より肝細胞に HGF 遺伝子を導入し，線維化改善を確認してきた。そこで，今回雄性 Wister rat にコリン欠乏食(choline deficient diet，以下 CDD）を摂取させ，NASH モデルを作成し，EP による HGF 遺伝子導入が NASH 硬変肝モデルでの脂肪化および線維化を改善するか否かを検討した。

対象と方法

①CDD 投与による肉眼的，組織学的変化

5 週齢 Wister 系雄性ラットに CDD を 12 週間投与して NASH 硬変肝を作成し，これを L 群とし，通常食摂取群を N 群とした。Azan 染色と Sudan 染色で組織学的検討を行い，NIH Image で画像処理し，Azan 陽性部位占拠率（Azan positive rate，以下 APR）と Sudan 陽性部位占拠率(Sudan positive rate，以下 SPR)を算出し評価した。

②EP による human HGF 遺伝子発現

5 週齢 Wister 系雄性ラットを用い，生理食塩水に溶解して総量 1ml とした GFP 遺伝子(100μg)あるいは HGF 遺伝子(100μg)を中葉に直接穿刺し，直後に平板型電極ではさみ，EP を施行した。EP 条件は電圧 50V，電流負荷時間 50ms，パルス回数 8 回とした。EP 施行後 2 日目に犠死させ，肝臓を摘出し HGF 発現量を ELISA で測定した（G(+)群，H(+)群）。また EP の増強効果を確認するために，HGF 遺伝子を中葉に直接穿刺したのみで EP を施行しない群を設定した（H(-)群）。HGF 遺伝子投与 EP 施行群には，電極があてられていない右葉を採取し，同様に HGF 発現量を測定した(H(+)non 群)。

③NASH 硬変肝モデルに対する EP による HGF 遺伝子導入

②と同様の実験群を設定し，同様の方法で①で作成した NASH 硬変肝に対して遺伝子導入実験を試行し，Azan 染色と Sudan 染色で組織学的検討を行い，APR と SPR を算出し評価した。

結果

①CDD 投与による肉眼的,組織学的変化

N 群が赤褐色で表面整,弾性軟であるのに対し,U 群は黄土色,表面不整,弾性硬であった。SPR は U 群(50.3±3.1 %) が N 群 (0.3±0.3 %)に比べ有意に高かった。APR も U 群 (11.7±2.1 %)が N 群 (0.2±0.2 %)に比べ有意に高かった。

②EP による HGF 遺伝子発現

H(+)群 における HGF 遺伝子導入後 2 日目の HGF 濃度は 1.47±0.99 ng/ml で,G(+) 群と比べ,有意に高かった。また,H(+) 群 の HGF 濃度は H(-) 群(0.06±0.10 ng/ml)よりも有意に高かった。さらに,H(+)non 群においても,HGF 濃度は 0.48±0.11 ng/ml と高値であった。

③NASH 硬変肝モデルに対する EP による HGF 遺伝子導入

H(-)群, H(+)群の SPR は G(+) 群の SPR と比較して有意な違いは認められなかった。H(+) 群 (3.1±1.7 %)の APR は G(+)群 (12.2±1.7 %)と比較して有意に低く, H(-) 群 (11.5±1.8 %)と比較しても有意に低かった。 さらに H(+) non 群(1.3±0.8 %) の APR も G(+)群より有意に低かった。 しかし,H(-) 群の APR は G(+)群と比較しても同程度であった。

考察

近年, HGF の硬変肝に対する線維化改善効果が多く報告されている。 ウィルスベクターを介した遺伝子導入は効率がよいが,その安全性には不安な要素があり, plasmid DNA による遺伝子導入を試みた。plasmid DNA による遺伝子導入は、単純投与で導入効率が不良であるため、我々は導入効率増強のために EP について研究を進めてきた。

今回,我々は肝実質への直接穿刺による plasmid DNA 投与と EP の併用で HGF 遺伝子導入を行った。EP を併用した群では線維化改善効果が認められたが、EP を併用しなかった群ではその効果は認められなかった。つまり,EP を併用することにより,HGF 遺伝子導入効率が線維化改善効果を得られるまでに増強したと考えられた。また、その効果は導入した局所にのみ確認されると予測していたが,導入部位以外にも効果が確認された。

結論

NASH 硬変肝への EP を併用した HGF 遺伝子導入により,脂肪化は改善しなかったが,線維化は改善した。この結果から, EP を併用した HGF 遺伝子導入により不可逆的 NASH 硬変肝が可逆的脂肪肝へ改善される可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 木山 茂は,NASH 硬変肝に対する電気穿孔法を用いた HGF 遺伝子導入による効果を検討し,不可逆的 NASH 硬変肝が可逆的脂肪肝へ改善される可能性を示唆した。本研究は, 今後増加が予測される NASH 硬変肝の治療体系を確立する上で大きな意義を有し,肝臓外科学の進歩に寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Reduction of fibrosis in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis cirrhosis by human *HGF* gene transfection using electroporation

Journal of Gastroenterology and Hepatology (in press).