第17回 日本臨床薬理学会 1996年11月1～2日 東京・京王プラザホテル

D-ガラクトサミン急性肝障害に対する HGFの効果

汐田 剛 史* 岡野 淳 一*
川崎 寛 中*

目的

Hepatocyte growth factor (HGF)は、肝細胞の強力な増殖因子であり、生体内で肝再生を有意に促進することが報告されている。また、HGFは肝細胞以外のある種の上皮細胞のミトゲンであり、ある種の細胞の運動を促進するスキッターファクターであり、形態形成を促すモルフォゲンである。最近、HGFが α -naphthylisothyanate(ANIT)による急性肝障害を軽減することが報告されている。また、HGFがプロスタグランジン産生を促進する作用を有すると報告されている。われわれは、肝細胞にHGFが恒常的に発現するトランスジェニックマウスを用いて、D-ガラクトサミンによる急性肝障害に及ぼすHGFの効果を検討したので報告する。

方法

- 1、HGFのトランスジェニックマウス (TG) はアルブミンプロモーターにヒトHGF cDNAを接続し、さらにSV40イントロンポリ-Aを付加したDNAをマウス受精卵にマイクロインジェクションし、作製した。
- 2、D-ガラクトサミン (D-GALN) 3 g/Kg体重をTG、野生型マウス (WT) の腹腔内に投与し、投与後0、12、24、48時間後に血清ALTを測定した。さらに、D-GaLN 3 g/Kg体重投与後0、12時間、24時間で血清ALT、肝組織像、肝HGF量、肝プロスタグランジンE2(PGE2)量を測定した。
- 3、肝PGE2量は100 mg肝臓を15%メタノール含有0、1Mリン酸中でホモジネートし、これ

をC18 Sep-Pak (Millipore Co) に吸着させたのち、エタノールにて溶出し、EIAキット(Neogen Co.)を用いて測定した。

4、肝HGF量は300 mg肝臓を2 M NaCl, 0.1% Tween80, 1mMPMSF, 1mMEDTAを含む20mM Tris-HCl, pH7.5中でホモジネートし、さらにHi Trapアフィニティヘパリンカラムに吸着させたのち、2 Mの塩濃度勾配にて溶出し、EIAキット(特免研)を用いて測定した。HGF量はマウス及ヒトにそれぞれ特異的なモノクローナル抗体を用いて、内因性のマウスHGFとトランスジェン由来のヒトHGFをそれぞれ測定し、その和を総HGF量とした。

5、WTに経脾静脈的に0.5 μ gの抗HGF抗体を投与し、同時にD-GaLN 3 g/kg体重を投与し、6時間後のPGE2量を測定した。

6、D-GaLN 6 g/Kg体重をTGとWTに投与し、生存率を8時間毎に投与72時間まで検討した。

結果

1、(実験1) 血清ALTの平均はWT、TGで投与前にはそれぞれ40IU/L, 42IU/Lであったが、投与12時間後にはWTで252IU/Lに対し、TGで178IU/Lと有意に減少し、24時間後にはWTで330IU/Lに対しTGでは193IU/Lと有意に低下した ($p < 0.05$)。 (実験2) 血清ALTの平均は投与前、WTで39IU/Lであり、TGで40IU/Lであるが、12時間後にはWTで320IU/Lに対し、TGで250IU/Lと有意に減少した。24時間後にはWTで223IU/Lであり、TGでは137IU/Lと有意に低下した ($p < 0.05$)。2、肝組織像をヘマトキシリンエオジンにて染色し、肝壊死の程度を検討した。両群で肝細胞壊死は小葉中心部に強く認められたが、TG群ではWT群に比較し、肝細胞壊死果が減少していた。したがって、HGFがD-GaLNによる急性肝障害を軽減していることが示唆された。

3、HGFの急性肝障害軽減効果の機序を明らかに

* 鳥取大学医学部第二内科
〒683 米子市西町 36-1

するため、肝HGF量と肝PGE2量を測定した。ヒトHGF量の平均は投与前40.0ng/g肝であるが、12時間後、24時間後にはそれぞれ6.8ng/g肝、9.4ng/g肝と減少した。マウスHGF量は投与前はほとんど検出されないが、投与12時間後に増加し、24時間後には減少し、各時間で両群間に差を認めなかった。総HGF量の平均は、WT群では投与0時間、12時間、24時間でそれぞれ12ng/g肝、60ng/g肝、35ng/g肝であったが、TG群ではそれぞれ51ng/g肝、75ng/g肝、45ng/g肝であり、WT群に比較し、有意に増加した ($p < 0.01$)。

4、肝PGE2量は投与0時間ではほとんど検出されないが、投与12時間ではWT群で平均7.1ng/g肝に対し、35ng/gと4倍以上に有意に増加した ($p < 0.01$)。24時間後には両群で減少するが、TG群でWT群に比較し、有意に増加していた ($p < 0.05$)。さらに、投与12時間、24時間後の総HGF量と肝PGE2量の関係を検討すると、12時間後には $r = 0.62$ 、 $p < 0.004$ (図1、A)で、24時間後では $r = 0.72$ 、 $p < 0.001$ で有意の正の相関を示した (図1、B)。したがって、HGFによりPGE2が誘導され、肝障害を軽減していることが示唆された。

5、さらにHGFとPGE2の直接の関係を明らかにするため、野生型マウスに経脾経門脈的に0、5 μ gの抗HGF抗体を投与し、同時にD-GalN3g/Kg体重を投与し、6時間後の肝PGE2量を測定した。対照群には生食を投与した。肝PGE2量の平均は、対照群では2.21ng/g肝に比し、抗HGF抗体投与群では1.54ng/g肝と有意に減少した。したがって、HGFが直接にPGE2産生を促進していることが示された。

6、亜致死量に相当するD-GalN6g/Kg体重投与後の生存率を検討した。WT群の24時間、48時間、72時間後の生存率はそれぞれ28%、22%、22%であったが、TG群ではそれぞれ100%、97%、56%と有意に生存率が改善した。

結論

HGFはD-GalNによる急性肝障害を軽減し、生存率を有意に改善した。この機序として、HGFによるPGE2の誘導作用が示唆された。

図 総HGF量と肝PGE2
(A)D-GalN投与12時間後
(B)D-GalN投与24時間後

文献

1. Shiota G, Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV. Hepatocyte growth factor in transgenic mice: Effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology*, 19:962-972 (1994)
2. Adachi T, Nakashima S, Saji S, Nakamura T, Nozawa Y. Roles of prostaglandin and mitogen-activated protein kinase activation in hepatocyte growth factor-mediated rat hepatocyte proliferation. *Hepatology*, 21:1668-1674 (1995)