

論 文 要 旨

Repeated enemas with hepatocyte growth factor selectively stimulate epithelial cell proliferation of injured mucosa in rats with experimental colitis

〔 肝細胞増殖因子の注腸投与は、実験的腸炎ラットにおける
傷害粘膜上皮細胞の増殖を選択的に促進する 〕

瀬戸山 仁

【序論および目的】

炎症性腸疾患は若年者に発症する難治性の疾患で、これまで抗炎症に主眼をおいた治療がなされてきたが、組織修復が十分でない場合には、結果的に腸管狭窄をきたすことが問題である。肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) は肝再生を強力に促進する増殖因子であるが、消化管上皮細胞の増殖をも促進し、実験腸炎モデル動物においても傷害粘膜の再生・修復を促進する。したがって、難治性の炎症性腸疾患に対する粘膜再生を目的とした HGF の臨床応用が期待されている。その際の HGF の投与経路としては、HGF の副作用を軽減するあるいは効果を高めるために、傷害消化管粘膜に選択的な投与方法の開発が望まれる。

今回、我々は二つの実験腸炎ラットに組換えヒト HGF を注腸投与し、血中ヒト HGF 濃度の推移、正常および傷害大腸粘膜に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】

7 週齢の Wistar ラット (150~170g) を用いて、下記の検討を行った。

1. 組換えヒト HGF (rh-HGF) 注腸投与における血中暴露： (a) rh-HGF 注腸投与による血中動態を調べるために、rh-HGF (0, 0.1, 0.1, 1.0, 5.0 mg/ml) を正常ラットに 0.5ml 注腸投与した後、血中ヒト HGF 濃度を経時的に測定して非血中暴露至適濃度を設定した。(b) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 腸炎モデルを作成し、rh-HGF (0.1, 1.0 mg/ml) を 0.5ml 注腸投与し血中ヒト HGF 濃度を経時的に測定した。
2. 実験腸炎モデルにおける rh-HGF 反復注腸投与の影響： (a) 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 腸炎および (b) DSS 腸炎モデルを作成し、PBS または rh-HGF (0.1 mg/ml) を 7 日間 1 日 1 回注腸投与した後に屠殺し、大腸重量、大腸長、大腸潰瘍またはびらん面積、組織学的評価、ki67 免疫染色による腸管粘膜上皮細胞増殖を測定した。

【結 果】

1. rh-HGF 注腸投与における血中暴露： (a) 正常腸管粘膜への HGF 注腸投与では、0.01, 0.1 mg/ml 濃度において、血中ヒト HGF は検出されなかったが、1.0, 5.0 mg/ml 濃度においては微量ながら血中ヒト HGF が検出された。(b) DSS で誘導された傷害粘膜大腸への rh-HGF 注腸投与では、0.1, 1.0 mg/ml 濃度のいずれにおいても血中ヒト HGF は検出されなかった。このことから、0.1 mg/ml 以下の HGF 濃度では血中暴露は認められないと考えられたため、実験腸炎モデルにおける rh-HGF 注腸投与濃度は 0.1 mg/ml とした。

2. (a) TNBS 腸炎モデルにおける HGF 注腸投与では、HGF 投与群 (0.1 mg/ml) において、有意に潰瘍面積が縮小し ($17.6 \pm 5.7 \text{ mm}^2$ vs. $46.9 \pm 5.7 \text{ mm}^2$; $p=0.008$)、組織学的スコアも改善した (2.86 ± 0.63 vs. 4.37 ± 0.48 ; $p=0.008$)。Ki-67 免疫染色による傷害粘膜周囲の上皮細胞増殖は、rh-HGF 0.01、0.1 mg/ml のいずれの投与量においても、コントロール群にくらべ有意に促進したが ($51.5 \pm 9.2\%$ and $51.1 \pm 5.4\%$ vs. $31.6 \pm 8.7\%$; $p=0.041$ and $p=0.037$)、非傷害粘膜では両群間に差を認めなかった。(b) DSS 腸炎モデルでは、大腸長・大腸重量は HGF 投与群 (0.1 mg/ml) とコントロール群の間に差を認めなかったが、HGF 投与群でびらん面積が有意に縮小し ($52.6 \pm 35.7 \text{ mm}^2$ vs. $122.9 \pm 18.0 \text{ mm}^2$; $p=0.037$)、組織学的スコアも改善した (3.1 ± 0.7 vs. 5.2 ± 0.4 ; $p=0.027$)。Ki-67 免疫染色による傷害粘膜周囲の上皮細胞増殖は、HGF 投与群でコントロール群に比べ有意に促進したが ($73.4 \pm 6.2\%$ vs. $56.3 \pm 6.1\%$; $p=0.027$)、非傷害粘膜では両群間に差を認めなかった。

【結論及び考察】

HGF は種々の上皮系細胞、内皮細胞および一部の間葉系細胞に対して細胞増殖促進、細胞遊走促進、形態形成、抗アポトーシスなどの多彩な作用を発揮する。最近、腸炎をはじめとした種々の疾患動物モデルにおける有効性から、多くの難治性疾患への臨床応用が期待されている。しかし、組換えヒト HGF (rh-HGF) の静脈内投与による副作用の軽減や傷害粘膜に対する効果の増強の観点から、炎症性腸疾患への臨床応用では腸管選択的な投与方法の確立が望まれる。

本研究では、まず rh-HGF の注腸投与による血中暴露の有無について検討した。正常大腸への rh-HGF 注腸投与では 1.0 mg/ml 濃度で血中ヒト HGF がわずかに検出されたが、傷害粘膜大腸への rh-HGF 注腸投与では 1.0 mg/ml 濃度でも血中ヒト HGF は検出されなかった。従って、その 1/10 濃度の rh-HGF (0.1 mg/ml) を用いて注腸投与による薬効を検討したところ、二つの異なった実験大腸炎モデルにおいて rh-HGF の反復注腸投与は有意に腸炎を改善した。rh-HGF の静脈内投与では大腸への移行は数%に過ぎず、rh-HGF 反復注腸投与は炎症性腸疾患に対する HGF の臨床応用においてより安全性の高い局所投与方法となる可能性が考えられた。

rh-HGF 反復注腸投与は腸管粘膜上皮細胞の増殖を促進したが、TNBS 腸炎モデルを用いた検討では、HGF による細胞増殖促進は傷害粘膜周囲の上皮細胞においてのみ認められ、非傷害 (正常) 粘膜の上皮細胞にはみられなかった。腸管上皮細胞において、HGF の特異的受容体 c-Met はその basolateral membrane に発現している。したがって、大腸の管腔内に投与された rh-HGF は、正常大腸粘膜の上皮細胞ではその basolateral membrane に発現する c-Met に結合しないこと、そして、傷害粘膜周囲の上皮細胞では粘膜剥離面または細胞間隙を通して c-Met に結合し、作用を発揮したことが考えられた。以上のことから、rh-HGF 注腸投与は傷害粘膜周囲に存在し、その再生・修復にあずかる腸管上皮細胞に選択的に作用することが考えられた。

rh-HGF はすでに劇症肝炎に対する第 I/II 相臨床試験が医師主導治験として実施され、その安全性がほぼ確立されている。血中暴露のみられない低濃度の rh-HGF 反復注腸投与が傷害大腸粘膜周囲の上皮細胞に選択的に作用して、大腸炎を軽減するという本研究の成果は、難治性疾患である炎症性腸疾患において傷害粘膜の再生・修復に主眼をおいた HGF による新たな治療法開発に大きく貢献すると考えられる。

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1484 号	氏名	瀬戸山 仁
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	古川 龍彦	夏越 祥次

Repeated enemas with hepatocyte growth factor selectively stimulate epithelial cell proliferation of injured mucosa in rats with experimental colitis

(肝細胞増殖因子の注腸投与は、実験的腸炎ラットにおける傷害粘膜上皮細胞の増殖を選択的に促進する)

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患(IBD)は若年者に発症し、消化管に慢性的な炎症を繰り返す難治性の疾患で、その罹病者数は増加の一途をたどっている。肝細胞増殖因子(HGF)は劇症肝炎患者血漿から単離された肝再生を強力に促進する増殖因子で、傷害消化管粘膜の再生・修復も促進することが報告されている。したがって、難治性の炎症性腸疾患に対する粘膜再生を目的としたHGFの臨床応用が期待されている。その際のHGFの投与経路としては、HGFの副作用の軽減あるいは効果の増強のために、傷害消化管粘膜に選択的な投与方法の開発が望まれる。本研究はIBDに対するHGFの臨床応用を目指し、HGFの局所投与である注腸投与を検討することとし、その際の血中暴露の有無、ならびに正常及び傷害大腸粘膜に及ぼす薬理作用を明らかにすることを目的とした。

本研究ではまず、正常ラットと3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)で誘導した潰瘍性大腸炎モデルラットに、HGFを単回注腸投与し、血中暴露について検討した。次に、クローン病モデルのトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)腸炎ラットと、DSS腸炎ラットの2つの薬剤誘発性実験腸炎モデルに対し、血中暴露のないHGF濃度で反復注腸投与を行い、薬理効果を検討した。なお、HGFは組み換えヒトHGFを用いた。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

1) 正常ラットへの低用量(0.005, 0.05 mg)のHGF注腸投与では、血液中にヒトHGFは検出されなかったが、高用量(0.5, 2.5mg)では微量ながら血中にヒトHGFが検出された。

2) DSS腸炎ラットへの注腸投与では、0.1, 1.0 mg/mlのHGF用量のいずれにおいても血中にヒトHGFは検出されなかった。

以上の結果から、0.05 mg以下のHGF用量では血中暴露は認められないと考えられたため、実験腸炎モデルにおけるHGF注腸投与用量を0.005または0.05 mgとして、その薬理効果を検討した。

3) TNBS腸炎ラットでは、HGF 0.05 mg投与群において潰瘍面積が有意に縮小し、また組織学的スコアも有意に改善した。さらに、0.005, 0.05 mgいずれのHGF投与群でも、Ki-67免疫組織化学染色により観察した傷害粘膜の粘膜上皮細胞増殖は、対照群に比べて有意に増加した。一方、非傷害粘膜の粘膜上皮細胞増殖は両群間に差を認めなかった。すなわち、HGFは選択的に傷害粘膜における上皮細胞増殖を促進した。

4) DSS腸炎ラットでは、HGF 0.05 mg注腸投与群で有意にびらん面積が縮小し、組織学的スコアも有意に改善した。さらに、HGF投与群では1層の上皮細胞が粘膜傷害部位を覆っており、epithelial restitutionと呼ばれる現象が誘導されていた。また、HGF投与群では傷害粘膜における上皮細胞増殖は有意に促進したが、非傷害粘膜では両群間に差を認められなかった。DSS腸炎ラットにおいても、HGF注腸投与は傷害粘膜の細胞増殖を選択的に促進した。

以上の結果から、血中暴露のない、また正常粘膜上皮細胞には作用しないHGFの注腸投与は、傷害性大腸粘膜上皮細胞を標的とした選択的な投与方法となりうることを示唆された。

本研究において、血中暴露のない濃度での組換えヒトHGF注腸投与が、傷害性大腸粘膜選択的に大腸炎を改善することを明らかにしたことは、組換えヒトHGFを用いたIBDに対する臨床応用を今後進める上で極めて重要な知見である。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1484 号	氏名	瀬戸山 仁
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	古川 龍彦	夏越 祥次

主査および副査の3名は、平成24年1月5日、学位請求者 瀬戸山 仁 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のよう
な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 2つの薬剤誘発実験的腸炎モデルを作成しているが、HGFの粘膜修復作用機序は同じか。
(回答) 以前に我々が報告したDSS腸炎モデルとTNBS腸炎モデルのいずれにおいても、HGFの特異的受容体であるc-Metを介した粘膜修復作用機序であり、本研究でも同様の機序であると考えている。

質問2) 傷害粘膜選択的にHGFの効果が発現しているが、その理由はなぜか。
(回答) 通常、c-Metは腸管上皮細胞の腸管粘膜基底側(basolateral membrane)に多く発現しているが、傷害粘膜においては、粘膜の脱落・欠損、あるいは細胞間隙の開大により腸管粘膜基底側のc-Metに作用しやすい状況になり、選択的に効果を発現すると考えている。

質問3) 炎症性腸疾患(IBC)に関連する宿主遺伝子についての最近の知見と、それらの遺伝子とHGFとの関連はどうか。
(回答) ゲノムワイド関連解析(genomewide association study: GWAS)をもとにしたメタ解析によると、2010年2月の時点で、99領域のIBC感受性領域が同定されているが、現在までこれらの遺伝子とHGFとの関連性は報告されていない。

質問4) 臨床応用に際し、IBCにおける深部大腸病変や小腸病変に対する投与方法として、注腸投与以外の方法はどうか。
(回答) HGFを内視鏡的に病変に噴霧する方法、さらに薬剤をゼラチンハイドロゲルに含浸させて長時間腸管に薬剤を留ませ浸透させる方法などのdrug delivery systemを考えている。

質問5) HGFの注腸投与による副作用はどのようなものがあるか。
(回答) 全身投与においては、血圧低下や尿中微量アルブミンの出現などの副作用が確認されているが、血中暴露を認めない注腸投与ではそのような副作用は生じないと思われる。発癌については、注腸投与の報告はないが、腹腔内投与ではむしろ炎症の改善により発癌を抑制する。ただし、臨床応用に際しては、発癌の可能性を完全には否定できないため、投与規準を検討する必要があると考えている。

質問6) 将来的に実用化するにあたり投与時期についてはどのように考えているか。
(回答) 罹病早期に免疫抑制薬による抗炎症療法とHGFを併用することにより、線維化や発癌を予防できると考えている。

質問7) 組織修復・改善作用においては腸幹細胞(intestinal stem cell: ISC)の関与があると思われるが、HGFとISCとの関連について最近の知見はどうか。
(回答) 最近2種類のISC(Lgr5, Bmi1)が同定されたが、これらのISCとHGFとの関連性については今のところ報告はない。肝幹細胞に関しては、HGFが肝幹細胞の増殖および肝細胞の分化を促進することから、HGFがISCの分化や増殖に関与する可能性が十分考えられる。

質問8) HGFの抗線維化作用の機序は、どこまで解明されているか。
(回答) HGFの抗線維化作用の機序としては、間質細胞に働きコラゲナーゼやマトリックスメタロプロテアーゼなどの様々なプロテアーゼを活性化することにより間質に蓄積した細胞外基質を分解・除去し、さらに線維化のKey CytokineであるTransforming Growth Factor-beta(TGF-β)の発現

を抑制して、線維化を抑制すると考えられている。

質問 9) DSS 腸炎モデルの組織学的評価において、組織傷害のスコア以外に炎症細胞浸潤のスコアを加えているがその理由はなぜか。

(回答) DSS 腸炎モデルは粘膜表層の炎症モデルであり、一般的に組織傷害(粘膜欠損)だけでなく、炎症細胞浸潤の評価を加えて評価されている。

質問 10) HGF 投与群では組織学的に炎症も抑えられているが、その機序はどうか。

(回答) HGF の抗アポトーシス作用を有するので、それにより炎症が抑制されている可能性が考えられる。また、HGF の再生・修復作用により mucosal バリアーが回復することもその機序の一つとして考えられる。

質問 11) 傷害粘膜における HGF 注腸投与で血中暴露を認めないという結果は、傷害粘膜において 2.5mg 用量の投与を行っておらず、このデータのみでは断定できないのではないか。

(回答) 傷害粘膜において血中暴露を認めない理由として、正常粘膜に比べ粘液や血液の付着が多量で、血中移行が妨げられている可能性がある。一方、正常粘膜では 0.5mg 用量の投与でわずかに血中暴露を認めており、この 0.5mg がボーダーラインではないかと考えている。確かに、傷害粘膜では 2.5mg 用量では血中暴露が生ずる可能性がある。本研究では、0.5mg 用量をボーダーラインとして、その 1/10 量である 0.05mg 用量以下を安全域と設定し薬理作用を検討した。

質問 12) TNBS 腸炎モデルにおいて、0.005mg 用量投与群で組織学的な効果には有意差がないのに、細胞増殖能において有意差が出た理由はなぜか。

(回答) 0.005mg 用量投与群においても、有意差はなかったものの、潰瘍縮小・組織改善傾向を認め、濃度依存性に効果を発現していると考えられる。細胞増殖能による粘膜再生・修復効果を発現するには観察期間が短く、今回の実験では有意差が出なかったと考えられる。

質問 13) 腸炎によりサイトカインが上昇し、それによりラット内因性の HGF が増加し、影響している可能性はどうか。

(回答) 確かに、傷害がおこると内因性の HGF の発現が亢進する可能性がある。肝炎モデルでは、そのような状況でも外因性の HGF の効果が見られている。

質問 14) c-Met の発現は病態や病変部位により違いはないか。

(回答) 以前行った DSS 腸炎に対する HGF 腹腔内投与の実験では、大腸傷害粘膜における c-Met のリン酸化が確認されており、傷害粘膜選択的に c-Met を活性化し、作用を発現したと考えている。今回の実験では c-Met に関する検討は行っていないが、病態や病変部位により c-Met の発現に違いがあると考えている。

質問 15) 通常 HGF の半減期はどうか。

(回答) 正常ラットへの単回静注投与では、通常半減期は約 20 分であるが、HGF の主な代謝臓器は肝臓であり肝障害があると半減期が延長する。

質問 16) 正常粘膜の場合わずかながら HGF の血中暴露があるが、この程度の暴露量でも全身的な影響、例えば心血管系への影響などがあるか。もし、わずかな血中暴露で全身的な影響がないのであれば、投与濃度・投与量を増やすことにより、より強い効果が得られるのではないか。

(回答) 静注投与では数 ng/ml の HGF 血中濃度で血圧低下作用が認められている。したがって、わずかな血中暴露でも全身的な影響がでる可能性がある。本研究では、血中暴露を認めない投与濃度・投与量での粘膜傷害改善作用を明らかにすることを目的としたが、投与濃度・投与量を増やせば、効果も増強する可能性はある。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。