

## 論 文 要 旨

**Hepatocyte growth factor ameliorates mucosal injuries  
leading to inhibition of colon cancer development in mice**

(肝細胞増殖因子 (HGF) は大腸粘膜傷害を改善してマウス大腸発癌を抑制する)

山 路 尚 久

## 【序論および目的】

炎症性腸疾患(IBD)は、若年者に発症する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)は劇症肝炎患者の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、上皮細胞、血管内皮細胞および一部の間葉系細胞に対して、細胞増殖促進作用のみならず、細胞遊走、形態形成促進など多彩な作用を発揮する。傷害消化管粘膜の修復過程においても HGF は重要な役割を果たしており、このような生理作用から我々は IBD に対する組換えヒト HGF の臨床開発に取り組み、HGF が傷害腸管粘膜の再生・修復を促進することを報告した。一方、長期にわたって再燃、寛解を繰り返す IBD 患者では高率に大腸癌が発生するが、HGF の大腸発癌に及ぼす影響はこれまで明らかにされておらず、IBD に対する HGF の臨床応用においても極めて重要な課題である。このような背景から、大腸発癌および大腸炎関連発癌に及ぼす HGF の影響を明らかにすることを目的に本研究を行った。

## 【材料および方法】

## 1. 大腸発癌モデルの作製と HGF 投与

## (1) 化学大腸発癌モデル

A/J マウスにアゾキシメタン (AOM: 5 mg/kg) を週 1 回、6 週間腹腔内投与した。AOM 投与開始日より、組換えヒト HGF (0.1, 0.5, 1.0 mg/kg/日) または vehicle (PBS) を隔日で 14 週間、腹腔内投与した。HGF 投与終了後に大腸を採取し、HE 染色標本で大腸腫瘍の数・発生率・多様性を検討した。

## (2) 大腸炎関連発癌モデル

CBA/J マウスに AOM (12.5 mg/kg) を単回腹腔内投与し、1 週間後より 2.5% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の自由飲水を開始した。週 5 日間の DSS 飲水とその後 2 週間の休薬を 1 サイクルとして計 3 サイクル行った。各々の DSS 開始日より、組換えヒト HGF (0.1, 0.5, 1.0 mg/kg/日) または vehicle (PBS) を週 5 日、2 週間、腹腔内投与した。最終 DSS 飲水より 2 週間後に大腸を採取し、HE 染色標本で大腸腫瘍の数・発生率・多様性を検討した。

## 2. DSS 誘導腸炎の重症度を評価するために下記を検討した。

a) 体重および便性状    b) 臨床学的スコア (DAI)    c) 組織学的スコア

## 3. 大腸粘膜上皮細胞の増殖を検討するために抗 Ki-67 モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

## 【結 果】

### 1. AOM 化学大腸発癌モデルに及ぼす HGF の影響

- (1) 大腸腫瘍数 (number) は HGF 投与群 (0.1, 0.5, 1.0 mg/kg) で有意に抑制された (各群共に  $p=0.02$ )。
- (2) 腫瘍の発生率 (incidence) および多様性 (multiplicity) は HGF 投与群で抑制され、HGF 1.0 mg/kg 群 ( $p=0.04$ ) および 0.1 mg/kg 群 ( $p=0.03$ ) において有意に抑制された。
- (3) 非腫瘍部粘膜における Ki-67 陽性率は、HGF 0.1 mg/kg 群 ( $p=0.001$ ) および 1.0 mg/kg 群 ( $p=0.002$ ) で有意に上昇した。

### 2. 大腸炎関連発癌モデルに及ぼす HGF の影響

- (1) HGF の反復投与は、用量依存性に DSS 誘導腸炎を改善した。HGF 1.0 mg/kg 群で、DSS 投与 7 日後の DAI ( $p=0.02$ ) および組織学的スコア ( $p=0.03$ ) が有意に改善した。また、HGF 0.5 mg/kg 群 ( $p=0.045$ ) と 1.0 mg/kg 群 ( $p=0.03$ ) では DSS 投与 14 日後の組織学的スコアが有意に改善した。
- (2) 大腸腫瘍数、発生率および多様性は HGF 投与によっていずれも用量依存性に抑制され、HGF 1.0 mg/kg 群では腫瘍数 ( $p=0.01$ ) および多様性 ( $p=0.02$ ) が有意に抑制された。
- (3) Ki-67 陽性率は、非腫瘍部粘膜に比して腫瘍部において有意に増加していたが ( $p=0.03$ )、HGF 群と vehicle 群の間には非腫瘍部および腫瘍部粘膜のいずれにも有意差を認めなかった。

## 【結論及び考察】

大腸炎を伴わない AOM 化学大腸発癌マウスでは、HGF 投与によって大腸上皮細胞の増殖が亢進したが、大腸発癌は有意に抑制された。HGF の特異的受容体 c-Met は消化管上皮細胞の basolateral membrane に発現しているが、発癌への関与については一定の見解が得られていない。本研究での HGF の大腸発癌抑制効果からは、HGF/Met を介したシグナルが必ずしも発癌促進に作用しないこと、発癌への関与が臓器や HGF・c-Met の発現レベルにより異なる可能性が考えられた。

一方、大腸炎関連発癌モデルでは複数回の AOM 投与による化学大腸発癌モデルに比して大腸発癌が亢進したが、本モデルに HGF を投与すると用量依存性に大腸炎が軽減し大腸発癌も抑制された。興味深いことに腫瘍部および非腫瘍部(正常粘膜)の細胞増殖には、HGF 投与、非投与群で差はみられなかった。これらの結果から持続あるいは反復する腸炎と発癌が密接に関連していること、上皮細胞の増殖促進とアポトーシス抑制によって傷害粘膜の再生・修復にあずかる HGF はむしろ大腸炎(粘膜傷害)を改善することで大腸炎関連発癌を抑制することが考えられた。

本研究では、HGF が化学大腸発癌モデルのみならず、大腸炎関連発癌モデルにおいても傷害粘膜再生・修復促進作用を介して大腸発癌を抑制することを明らかにした。IBD に対する治療法として、抗炎症・免疫抑制ではなく、傷害粘膜の再生・修復促進に主眼をおいた HGF による新規治療法の可能性が考えられた。

# 論 文 審 査 の 要 旨

報告番号	医論第 <b>1480</b> 号	氏名	山路 尚久
審査委員	主査	小賤 健一郎	
	副査	橋口 照人	夏越 祥次

**Hepatocyte growth factor ameliorates mucosal injuries leading to inhibition of colon cancer development in mice**

(肝細胞増殖因子 (HGF) は大腸粘膜傷害を改善してマウス大腸発癌を抑制する)

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患 (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疾患で、その罹病者数は増加の一途をたどっている。一方、肝細胞増殖因子 (HGF) は劇症肝炎患者の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・修復を促進することが報告されている。IBD に対する HGF の臨床応用が期待されているが、長期罹患の IBD 患者では大腸癌の発生リスクが高いことから、本研究では HGF の大腸発癌に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本研究では、アゾキシメタン (AOM) による化学大腸発癌モデルマウスと AOM + デキストラン硫酸ナトリウムによる大腸炎関連発癌モデルマウスに、組換えヒト HGF を反復腹腔内投与し、大腸腫瘍数・発生率・細胞増殖を検討した。また、大腸炎関連発癌モデルでは臨床学および組織学的スコアを用いて HGF の実験大腸炎に及ぼす影響を評価した。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) 化学大腸発癌マウスでは、HGF 投与群において大腸腫瘍数、発生率が有意に抑制された。
- 2) 化学大腸発癌マウスでは、腫瘍部における Ki-67 陽性率は HGF 非投与群と比較して有意差は認めなかったが、非腫瘍部における Ki-67 陽性率は HGF 投与群で有意に上昇した。
- 3) 大腸炎関連発癌マウスでは、AOM の単回投与にも関わらず、化学大腸発癌マウスに比して大腸腫瘍数が増加した。
- 4) 大腸炎関連発癌マウスに HGF を反復投与すると、大腸腫瘍数、発生率が有意に抑制された。
- 5) 大腸炎関連発癌マウスでの炎症評価では、HGF 投与群において臨床学および組織学的スコアが有意に改善した。
- 6) 大腸炎関連発癌マウスでは、腫瘍部の Ki-67 陽性率は非腫瘍部粘膜に比して有意に増加した。このマウスに対する HGF の反復投与は非腫瘍部および腫瘍部粘膜の Ki-67 陽性率には影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、再燃を繰り返す大腸炎は大腸発癌に深く関与していること、さらに組換えヒト HGF は繰り返す大腸炎における傷害大腸粘膜の再生・修復を促進することで大腸炎関連発癌を抑制することが示唆された。

本研究において、増殖因子である HGF は大腸発癌を促進するより、むしろ発癌を抑制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 <b>1480</b> 号	氏名	山路 尚久
審査委員	主査	小賤 健一郎	
	副査	橋口 照人	夏越 祥次

主査および副査の3名は、平成23年11月29日、学位請求者 山路尚久君に面接し、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) 消化管 stem cell と HGF との関連についての報告はあるか。  
 (回答) HGF は stem cell の分化に重要で、脂肪組織由来幹細胞による傷害大腸粘膜修復において HGF や VEGF が誘導されることが報告されている。

質問 2) 骨髄細胞の遊走活性についての報告はあるか。  
 (回答) 大腸炎において、腸粘膜に集積したリンパ球により骨髄由来幹細胞が腸粘膜上皮へ遊走し、粘膜修復に作用することが報告されている。

質問 3) HGF と消化管粘膜修復に関わる因子との関連についての報告はあるか。  
 (回答) 傷害消化管粘膜の再生・修復には HGF をはじめ IL-1、IL-2、TGF- $\beta$ 、VEGF、EGF、KGF 等の複数の因子が協調して関与している。

質問 4) ヒトとマウスの HGF 相同性は高いのか。  
 (回答) ヒトとマウスの HGF のアミノ酸レベルでの相同性は 90.9% と高い。

質問 5) HGF の全身投与による大腸への HGF 分布はどれくらいか。  
 (回答) ラットに HGF を単回静注すると、70% 以上が肝臓に集積し大腸への分布はわずかである。

質問 6) HGF の腹腔内投与による血中 HGF 濃度はどれくらいか。  
 (回答) HGF の持続的腹腔内投与では、血中 HGF 濃度は 1~3 ng/ml に上昇し、大腸組織における c-Met チロシンリン酸化が誘導されることが確認されている。

質問 7) 本実験に比べ、治験でのプロトコールの相違点は何か。  
 (回答) 治験では、劇症肝炎患者を対象としたため、14 日間の反復静脈内投与とした。

質問 8) HGF の投与方法として遺伝子レベルの投与もあるが、今回 HGF の蛋白製剤投与を行ったのはどうか。  
 (回答) HGF 遺伝子投与は長期的に蛋白発現が可能な利点があるが、今後 HGF の臨床応用を考慮していることから、臨床応用がしやすい蛋白製剤の投与を選択した。

質問 9) 本実験では局所投与は考えなかったのか。  
 (回答) 局所投与(注腸投与)は、下痢のために安定した投与方法とならなかった。

質問 10) 本実験での HGF 腹腔内投与に際し、投与量はどのように決めたのか。  
 (回答) これまでの用量依存性を含めた研究成績から、投与量を決めた。

質問 11) HGF の大腸癌に対する作用についての報告はあるのか。  
 (回答) 大腸癌細胞株 Caco-2 の浸潤が HGF によって促進されることが報告されている。

質問 12) 大腸癌以外の癌への HGF の作用はどうか。  
 (回答) HGF トランスジェニックマウスでは複数の臓器に腫瘍または癌が発生することが報告されているが、肝発癌に関してはむしろ抑制的に作用するという報告もあり、一定の見解は得られていない。

質問 13) HGF と TGF- $\beta$  での発癌に及ぼす作用の相違点は何か。  
 (回答) TGF- $\beta$  は epithelial-mesenchymal transition (EMT) を誘導し、癌の浸潤に関与している。最近、マウス黒色腫モデルで、骨髄細胞が HGF、TGF- $\beta$  などを介して EMT を誘導すること、また大腸癌細胞株において HGF/c-Met pathway を介して EMT が誘導されることが報告されている。

質問 14) 化学大腸発癌モデルと大腸炎関連発癌モデルを用いた理由はなぜか。  
 (回答) 本実験の目的は炎症性大腸発癌に及ぼす HGF の影響を明らかにすることであり、まずは大腸発癌に及ぼす影響を検討するために化学大腸発癌モデルを用い、次に大腸炎関連発癌モデルを用いた。

質問 15) 化学大腸発癌モデルと大腸炎関連発癌モデルではマウスの種が違う理由はなぜか。

(回答) 過去の報告を検索し、それぞれのモデルで実績のある A/J マウス (AOM 誘導大腸発癌) および CBA/J マウス (AOM/DSS 大腸炎関連発癌) を用いた。その理由は、マウスの感受性が異なるためと思われる。

質問 16) 化学大腸発癌モデルと大腸炎関連発癌モデルで HGF の投与方法が違うのはなぜか。

(回答) 化学大腸発癌モデルでは発癌に対する HGF の影響をみるために、AOM 投与後に週 5 回長期投与し、大腸炎関連発癌モデルでは炎症発癌への影響をみるため、大腸炎誘導時に反復腹腔内投与した。

質問 17) 臨床学的スコアはどういうものか。また、HGF 長期投与による臨床学的スコアの悪化はないか。

(回答) 臨床学的スコアは体重減少、便性状、血便の性状で評価している。HGF の長期投与による臨床学的スコアの悪化はない。

質問 18) HGF の炎症抑制には、組織学的スコアのどの項目が最も関係しているか。

(回答) HGF の作用は、腸管上皮傷害の軽減に対する作用が最も強かった。

質問 19) HGF による MPO 活性低下の機序はどのように考えるのか。

(回答) HGF による MPO 活性低下は、傷害粘膜修復によるバリア機能の回復によると考えられる。

質問 20) 腸管の血管新生については評価したのか。

(回答) DSS 腸炎は粘膜上皮の脱落であり、大腸腫瘍も粘膜内癌であることから、血管新生作用は大きく関与していないと考え、評価していない。

質問 21) 解剖時に他の臓器の腫大は認めたのか。

(回答) 犠死時には他の臓器の腫大はみられなかった。

質問 22) 大腸癌では c-Met 発現が亢進していたのか。

(回答) 今回は、c-Met の発現は確認していない。c-Met は、大腸癌を含め多くの悪性腫瘍組織で発現が亢進している。

質問 23) 大腸正常粘膜における Ki-67 陽性率はどれくらいか。

(回答) 正常粘膜の Ki-67 陽性細胞は 10% 台で、HGF 投与によって 20% に増加した。

質問 24) 大腸粘膜に集積する炎症細胞にはどのようなものがあるか。

(回答) DSS 腸炎において傷害大腸粘膜に浸潤する炎症細胞はマクロファージ、樹状細胞、リンパ球などである。

質問 25) HGF の組織修復は、レセプターを介して行われたのか。

(回答) c-Met は大腸上皮細胞の basolateral membrane に発現しており、腹腔内投与で c-Met チロシンリン酸化が誘導されることは既報で確認している。今回の実験では確認していないが、レセプターを介したものと考えている。

質問 26) HGF が大腸癌を抑制するメカニズムは何か。

(回答) HGF が粘膜上皮の炎症や上皮細胞死を抑制し、正常細胞の再生・修復を促進することで、発癌を抑制したと考えられる。

質問 27) HGF の担癌患者への投与は考えているのか。

(回答) 増殖因子である HGF の発癌性を完全に否定することは難しいので、現時点では、考えていない。

質問 28) 炎症性腸疾患患者への臨床応用における HGF 投与時期、除外基準の設定はあるのか。

(回答) 十分検討できていないが、罹病期間の短い難治性患者を選択条件に、罹病期間の長い患者は除外すべきと考えている。

質問 29) 臨床応用における HGF 投与はどのような方法を考えているのか。

(回答) 臨床応用に際しては、全身性の有害事象を減少させることから注腸投与を考えている。

質問 30) HGF と他の大腸炎治療薬との併用について問題点はあるのか。

(回答) HGF の主たる作用は傷害粘膜の再生・修復促進であるため、現在使用されているステロイド、免疫抑制剤、抗 TNF- $\alpha$  製剤との併用は可能で、むしろ相加的、相乗的な作用が期待できる。

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。