

論 文 要 旨

Hepatocyte growth factor improve the survival of rats with pulmonary arterial hypertension via the amelioration of pulmonary hemodynamics

Hepatocyte growth factor は、肺高血圧症モデルラットの肺血行動態の改善を介して、生存率を改善させる。

平 峯 聖 久

【序論および目的】

肺高血圧症は、肺動脈の血管内皮および平滑筋細胞の増殖によって肺血管抵抗および肺動脈圧が上昇し、心不全に進展する予後不良の難治性疾患である。現在、プロスタサイクリンやエンドセリン受容体拮抗薬を用いた治療法が行われているが、肺動脈の血管抵抗を軽減させる根本的な治療法はいまだ確立されていない。肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) は劇症肝炎患者血漿から単離された強力な肝再生促進因子で、種々の上皮細胞および一部の間葉系細胞に対して、細胞増殖、細胞分散、抗アポトーシス、抗線維化など多彩な作用を発揮する傷害組織の重要な再生・修復因子である。本研究では、肺高血圧症モデルにおいて組換えヒト HGF (recombinant human HGF : rh-HGF) の肺動脈圧やその病態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

6 週齢のウィスターラット(雄)にモノクロタリンを単回腹腔内投与して肺高血圧モデルラットを製作し、以下の検討を行った。

1. HGF 単回静注投与の体血圧および肺動脈圧に及ぼす影響

23G カニューラを腹部大動脈または肺動脈へ直視下で留置し、トランスデューサーを用いて、rh-HGF 単回投与後 5 分間の体血圧、肺動脈圧を測定した。

2. HGF 持続静注投与の肺動脈圧に及ぼす影響

肺高血圧ラットに生食 (n=17) または rh-HGF (n=7) (0.12 mg/日) を 14 日間持続静注し、(1) 肺動脈圧、(2) 組織学的所見および肺動脈の血管内腔比 (%) (血管内腔面積/血管 (外周) 面積) を検討した。

3. HGF 持続静注投与の生存期間に及ぼす影響

浸透圧ポンプを内頸静脈に留置し、コントロール群 (n=10) には生食を、HGF 群 (n=10) には rh-HGF (0.12 mg/日) を 14 日間持続静注し、生存期間を検討した。

4. 血清高感度 CRP (hs-CRP)、6-keto PGF1 α および肺組織における TNF α 、IL-6、IL-12、MIF、FGF、PDGF、PDGFR の発現の検討

肺高血圧ラットに生食 (n=17) または rh-HGF (n=7) (0.12 mg/日) を 7 日間持続静注し、(1) 血清 hs-CRP および 6-keto PGF1 α を測定し、(2) 肺組織における TNF α 、IL-6、IL-12、MIF、FGF、PDGF、PDGFR の発現を real-time RT-PCR にて検討した。

【結 果】

1. HGF には血圧低下作用があるため、まず rh-HGF 単回静注投与の体血圧および肺動脈圧に及ぼす影響を検討した。rh-HGF 単回静注投与によって、収縮期血圧は 18.6 ± 6.7 mmHg 低下したが、肺動脈の低下はみられなかった。
2. 次に HGF 持続静注投与の肺動脈に影響を検討したところ、コントロール群に比して、HGF 投与群では有意に収縮期肺動脈圧が低下した (コントロール群 vs. HGF 群 : 53.1 ± 12.9 vs. 37.9 ± 8.1 mmHg, $p=0.04$)。組織学的には、コントロール群では肺動脈壁に炎症細胞浸潤および中膜肥厚によって肺動脈の狭窄がみられたが、HGF 投与群では炎症細胞浸潤および中膜肥厚が軽減し、結果的に血管内腔比 (%) が有意に増加した (コントロール群 vs. HGF 群 : 15.5 ± 8.5 vs. 23.9 ± 11.7 mmHg, $p=0.0001$)。
3. コントロール群および HGF 投与群における生存率は、それぞれ投与開始 28 日後 50%、100%、36 日後 0%、80% で、HGF 投与ラットでは 36 日以降 45 日まで死亡ラットはいなかった ($p=0.003$)。
4. hs-CRP、6-ketoPGF1 α の血清レベルは、両群間で有意差を認めなかった。また、HGF 投与群において肺組織の PDGF 発現が有意に抑制されていた ($p=0.026$)。

【結論及び考察】

本研究では、実験的肺高血圧モデルを用いて rh-HGF の効果を検討した。HGF には一酸化窒素 (NO) を介した血圧低下作用が報告されているが、rh-HGF 単回静注投与では肺動脈圧には影響を及ぼさなかった。一方、rh-HGF 持続静注投与によって組織学的に肺動脈壁の肥厚が軽減して肺動脈圧が低下し、生存率が有意に向上した。肺高血圧症の病態には血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、炎症細胞および血小板など多くの細胞が重要な役割を果たし、炎症性サイトカインの産生過剰や複数の増殖因子が平滑筋細胞の増殖などに関与していることが報告されている。そこで HGF の肺動脈狭窄軽減作用に関わる因子を検討したところ、肺組織における PDGF 発現が低下していた。PDGF は肺動脈の血管平滑筋細胞の増殖を促進し、一方、PDGF 受容体拮抗剤 (imatinib mesylate) が肺高血圧モデルにおいて肺動脈の再構築を回復させることが報告されている。さらに imatinib mesylate の第二相臨床試験では肺高血圧症における有効性が報告されている。

本研究により、rh-HGF は肺高血圧症モデル動物の肺動脈肥厚を組織学的に改善して肺動脈圧を低下させるだけでなく、生存率をも改善させることが明らかになった。rh-HGF は、すでに劇症肝炎を対象とした第 VII 相臨床試験が行われており、今後、肺高血圧症に対する治療薬としての開発が期待される。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 181 号	学位申請者	平峯 聖久
審査委員	主査	井本 浩 教授	学位
	副査	垣花 泰之 教授	副査
	副査	濱崎 秀一 准教授	副査
			博士 (医学・歯学・学術)
			宮田 篤郎 教授
			東元 一晃 講師

Hepatocyte growth factor improves the survival of rats with pulmonary arterial hypertension via the amelioration of pulmonary hemodynamics

Hepatocyte growth factor は、肺高血圧症モデルラットの肺血行動態の改善を介して、生存率を改善させる。

肺高血圧症は、肺血管抵抗および肺動脈圧が上昇し、心不全に進展する予後不良の難治性疾患である。肺血管抵抗を低下させる薬剤が使用されているが、根本的な治療法は肺移植しかない。肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) は劇症肝炎患者血漿から単離された強力な肝再生促進因子で、多彩な作用を発揮する傷害組織の重要な再生・修復因子である。本研究では、肺高血圧症モデルにおいて組換えヒト HGF (recombinant human HGF : rh-HGF) の肺動脈圧やその病態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

1. HGF 単回静注投与の体血圧および肺動脈圧に及ぼす影響を検討した。rh-HGF 単回静注投与によって、収縮期血圧は 18.6 ± 6.7 mmHg 低下したが、肺動脈の低下はみられなかった。
2. 次に HGF 持続静注投与の肺動脈に影響を検討したところ、コントロール群に比して、HGF 投与群では有意に収縮期肺動脈圧が低下した。血管内腔比 (%) が有意に増加し、また、組織学的には、コントロール群では肺動脈壁に炎症細胞浸潤および中膜肥厚によって肺動脈の狭窄がみられたが、HGF 投与群では炎症細胞浸潤および中膜肥厚が軽減し、器質的に改善した。
3. コントロール群および HGF 投与群における生存率は、それぞれ投与開始 28 日後 50%、100%、36 日後 0%、80% で、HGF 投与ラットでは 36 日以降 45 日まで死亡ラットは認めず、有意に生存率を改善した。
4. hs-CRP、6-ketoPGF1 α の血清レベルは、両群間で有意差を認めなかった。また種々の炎症性サイトカイン、増殖因子の発現を検討したところ、HGF 投与群において肺組織の PDGF 発現有意に抑制されていた。

本研究では、実験的肺高血圧モデルを用いて rh-HGF の効果を検討した。HGF 単回静注投与では肺動脈圧には影響を及ぼさなかったが、一方で、rh-HGF 持続静注投与によって組織学的に肺動脈壁の肥厚が軽減して肺動脈圧が低下し、生存率が有意に向上した。この肺高血圧改善は、HGF により肺組織が器質的に改善したためと考えられた。肺高血圧症の病態には血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、炎症細胞および血小板など多くの細胞が関与していることが報告されている。そこで HGF の肺動脈狭窄軽減作用に関わる因子を検討したところ、肺組織における PDGF 発現が低下していた。PDGF は肺動脈の血管平滑筋細胞の増殖を促進し、一方、PDGF 受容体拮抗剤 (imatinib mesylate) が肺高血圧モデルにおいて肺動脈の再構築を回復させることが報告されている。本研究により、HGF は肺高血圧症モデル動物の肺動脈肥厚を組織学的に改善して肺動脈圧を低下させ、また生存率をも改善させた。rh-HGF は、すでに劇症肝炎を対象とした第 I/II 相臨床試験が行われており、今後、肺高血圧症に対する治療薬としても開発が期待される。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 181号	学位申請者	平峯 聖久
審査委員	主査	井本 浩 教授	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	垣花 泰之 教授	副査 宮田 篤郎 教授
	副査	濱崎 秀一 准教授	副査 東元 一晃 講師
<p>主査および副査の5名は、平成24年2月2日、学位申請者 平峯 聖久 君に面接し、学位申請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。</p> <p>質問1)モノクロタリン誘導肺高血圧ラットは、ヒトではどの病型になるか。 (回答)モノクロタリンは肺動脈中膜、内膜増殖、間質炎症を誘導し、組織学的に肺動脈性肺高血圧症になる。</p> <p>質問2)モノクロタリンは、全身の血管でなく、肺動脈にのみ作用するのか。 (回答)モノクロタリンは肺動脈の炎症から肺高血圧を誘導する。その他の臓器に対する直接的な影響は報告されていない。</p> <p>質問3)モノクロタリン投与と同時にHGFを投与したらどのような結果になるのか。 (回答)モノクロタリンとHGFを同時投与する実験は行っていない。本研究は、モノクロタリンを投与し、肺高血圧が完成した3-4週後にHGFを投与する、既に確立された肺高血圧に対するHGF治療実験である。</p> <p>質問4)HGF2週間以上投与した際の、肺動脈の変化について、HGF投与群で45日生存したラット組織は検討したか。 (回答)生存したラットの組織の検討は行っていないが、少なくとも器質的な変化は改善していると推測される。</p> <p>質問5)HGF投与を2週間とした理由はなぜか。また、それより短期間でも肺高血圧は改善したか。 (回答)既報の肝硬変モデルに対するHGF投与を参考とし、浸透圧ポンプの大きさから2週間に設定した。HGFは単回静注でも、致死性肝不全マウスモデルの生存率を向上させるため、2週間の投与でその効果を評価できると考えた。</p> <p>質問6)HGFによって、肺高血圧は正常ラット肺と比較してどの程度改善したか。 (回答)組織学的に、肺間質の線維化・炎症細胞浸潤の程度が顕著に減少し、また肺動脈中膜・内膜増殖も抑制されており、正常ラットの肺組織とほぼ同等まで改善した。</p> <p>質問7)検討したサイトカインは、肺高血圧の状態では全て上昇するのか (回答)本研究で発現を検討したサイトカイン、増殖因子は、肺高血圧での上昇が報告されているものである。</p> <p>質問8)増殖因子であるHGFがPDGFなど、他の増殖因子を抑制するのはなぜか。 (回答)傷害組織の修復過程では種々の増殖因子、サイトカインが各々の修復過程でその役割を果たしていることが考えられる。従って、すべての増殖因子が同期して発現誘導されるわけではない。HGFの傷害組織の再生・修復因子としての多彩な生理作用の一つにPDGF発現抑制があるものと理解している。</p> <p>質問9)なぜ、肺高血圧患者が増加してきているのか。また、なぜ女性に多いのか。 (回答)検査の進歩によって早期診断が可能になったことが患者数増加の一因と考えられる。女性に多い理由は明らかになっていないが、肺動脈性肺高血圧症に報告されている遺伝子異常が関与している可能性も考えられる。</p> <p>質問10)HGF単回静注では、NOを介した血圧低下作用があるが、今回の検討でもNOを介しているのか。 (回答)今回、結果は提示しなかったが、HGFと同時にNO阻害剤を経口投与した実験では、HGFの肺高血圧改善作用には影響を与えなかった。従って、肺高血圧症に対するHGFの効果は、むしろNOを介したものではないと考えられる。</p> <p>質問11)HGF作用はPDGF抑制剤(Imatinib)と同じメカニズムか。Imatinibと比べHGFの優位性はあるか。</p>			

(回答)今回は HGF の薬理作用のメカニズムの一つとして PDGF の発現抑制が明らかとなったが、HGF は抗アポトーシス、細胞増殖促進作用など、組織修復因子として多彩な作用を有しており、そこに優位性があると考えられる。

質問 12) HGF は TGF- β などを抑制するが、検討していないのはなぜか。

(回答)肺高血圧モデルに対する HGF 遺伝子治療の報告では TGF- β 、Endothelin-1 が抑制されている。今回は、第二相臨床試験で報告されている Imatinib の PDGF 発現抑制に着目し、TGF- β の検討は行わなかった。

質問 13) HGF の臨床応用ではどのような投与方法を考えているか。

(回答)HGF を全身投与すると肺への暴露は数%と報告されている。従って、右心系から投与したいと考えているが、経気道的、すなわち吸入も簡便な投与方法として実用化が期待される。

質問 14) HGF の単回静注において、血圧、LVEDV も低下しているが、LVEF も低下しているのはなぜか

(回答)ミニプタにおいて、HGF 単回静注による血圧低下では、同時に EF、HR も低下しているが、全身麻酔下で HR が上昇しなかったことが考えられる。また、不整脈も発現せず、心エコーによる壁運動にも問題はなかった。

質問 15) 組み換え蛋白は半減期が短い、どのような投与方法を考えるか。

(回答)HGF の半減期は数分と短いため、肺動脈への選択的投与には右心経路での持続投与が効果的と考えられる

質問 16) HGF 蛋白という形での投与形態が最適と考えるか。

(回答)HGF 遺伝子導入による肺高血圧ラットの治療成績が報告されているが、安全で高効率な遺伝子導入法は確立されていないため、組み換え蛋白での臨床応用の方が、より実現可能性が高いと考える。

質問 17) 肺高血圧組織において、HGF、c-Met の発現はどのようになっているか

(回答)肺高血圧での血清 HGF 濃度は増加しているが、肺組織における HGF 発現は抑制されているとの報告がある。一方、肺組織内での c-Met 発現は増加していると報告されている。

質問 18) HGF 発現が十分に発揮できないことが、肺高血圧の病態の一つとなっているか。

(回答)肺高血圧症の進行は、TGF- β による HGF 産生の抑制が一因であるとする報告がある。

質問 19) HGF の体内動態、失活はどのようになっているか

(回答)単回静注された HGF の大部分は肝臓に移行し、HGF の最大の代謝臓器は肝臓とされる。従って、肝硬変や部分肝切除モデルでは HGF の血中濃度が上昇し、半減期が遅延する。

質問 20) HGF による肺動脈圧の低下は NO を介した血管拡張によるものか。

(回答)今回の検討では、NO を介した血管拡張によるものではなく、肺動脈、間質の器質的な改善によるものと考えられる。

質問 21) HGF の肺高血圧への作用ポイントはどこか。内膜・中膜の増殖を改善したのか、または最初から増殖抑制したのか。

(回答)今回の検討は、肺高血圧症を完成させた後に HGF を投与しており、既に増殖、肥厚していた内膜・中膜の増殖を改善したものと考える。

質問 22) 肺組織における c-Met の発現はどこに認められるか。

(回答)主に肺動脈上皮、及び中膜平滑筋細胞に発現しているとの報告がある。

質問 23) モノクローリンは肺にのみ作用するのか。コントロール群でのラットは、肺高血圧で死亡したのか、

(回答)モノクローリンは、肺動脈に炎症を起こす。死亡したラットの死因は肺高血圧症と考えられる。

質問 24) HGF の肺高血圧改善は、抗炎症作用によるものではないのか。

(回答)HGF には抗アポトーシス作用があり、血管内皮細胞傷害を抑制して、結果的に抗炎症につながったことも考えられる。

質問 25) HGF を投与していた 2 週間、ラットの状態は安定していたか。

(回答)HGF の全身投与では重篤な有害事象は報告されておらず、HGF 投与中、肺高血圧症ラットの状態は安定していた。

質問 26) HGF を投与したチューブはどの部位まで挿入したか。

(回答)内頸静脈から挿入し、先端は右心室で留置した。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・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。