

氏名	ながのともかず 永野智一
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	論農博第2507号
学位授与の日付	平成15年11月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Beneficial effects of hepatocyte growth factor on animal models of acute renal failure (急性腎不全動物モデルに対する肝細胞増殖因子の有効性)

論文調査委員 (主査) 教授 伏木 亨 教授 井上 國世 教授 熊谷 英彦

### 論文内容の要旨

肝細胞増殖因子 (HGF) は、肝実質細胞に対して強力な増殖促進作用を示すとともに、種々の組織・細胞において増殖促進、遊走促進、管腔形成、アポトーシス抑制 (場合によっては促進) など多様な作用を有する。また、種々の臓器における障害修復に関与することから、各種疾患に対する医薬品としての応用が期待されている。そこで、著者は、腎臓、特に尿細管内皮細胞に対する HGF の作用に着目し、急性腎不全動物モデルに対する HGF の有効性について検討した。本論文はその成果を取りまとめたものであり、その内容は以下のように要約できる。

#### 1. ラットグリセロール誘発急性腎不全モデルに対する HGF の有効性

ラットのグリセロール誘発急性腎不全モデルは、ヒト急性腎不全に最も近い病態を示すことから、本腎不全モデルに対する HGF の有効性を検討した。その結果、対照群にくらべ、HGF 投与群では生存率が著明に改善すること、腎機能を反映する尿素窒素 (BUN) およびクレアチニンの濃度上昇、また、クレアチニン・クリアランスが改善されること、尿細管の壊死・拡張といった障害が抑制されることを明らかにした。

さらに、本腎不全モデルにおいては内因性の HGF が腎臓に供給されるものの、HGF レセプターである c-Met はリン酸化されないこと、HGF を投与することにより腎臓の c-Met がリン酸化 (活性化) されることを明らかにし、その結果として、生存率、腎機能、腎組織障害が改善されることを示唆した。

#### 2. ラットグリセロール誘発急性腎不全モデルにおける HGF 投与タイミングの検討

グリセロールによる障害惹起の前に HGF を投与した場合と、惹起後に投与した場合の HGF の効果について検討した。上記 1. の実験はグリセロール投与前と後、両方で HGF を投与したものであるが、前投与のみでもラットの生存率が改善し、BUN やクレアチニン濃度の上昇も抑制されることを明らかにした。次いで、その作用メカニズムを明らかにするため、腎保護作用が報告されているストレスタンパク質 heme oxygenase 1 (HO-1) の発現に対する HGF の影響について検討し、HGF 投与により腎 HO-1 mRNA 量が増加することを明らかにした。また、腎障害惹起後に HGF を投与した場合でも、対照群にくらべ腎機能に改善が見られることを明らかにした。

#### 3. マウス塩化第二水銀誘発急性腎不全モデルに対する HGF の保護効果

塩化水銀による障害の初期に HGF を静脈内に単回投与した場合に、腎機能パラメータが著明に改善し、尿細管壊死や円柱形成といった腎組織障害が抑制されることを見出した。これらの HGF 投与効果についてさらに詳しく検討を加え、溶媒対照群では腎尿細管細胞のアポトーシスを示す組織染色像が得られるが、これは、HGF 投与により著明に抑制されることを見出し、本モデルにおいても HGF の腎保護効果があることを明らかにした。一方、HGF の効率的な投与についても検討を加え、少量 (60  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) の HGF を 3 時間、持続的に静脈内投与することにより、十分な有効性が得られることを明らかにした。

#### 4. ラット虚血性急性腎不全モデルに対する HGF の有効性

両腎動脈の血流の遮断によりラット虚血性急性腎不全モデルを作製し、HGF投与の有効性、特に腎尿細管障害に対する有効性について検討した。溶媒対照群では、虚血再灌流により一過性の腎機能障害、腎組織障害が惹起されたが、HGF投与群では、これらが改善することを確認した。さらに、溶媒対照群では、腎尿細管上皮細胞の障害を反映するN-acetylglucosaminidase, lactate dehydrogenaseなどの酵素を尿中に高濃度漏出するが、HGF投与群ではこれが抑制され、腎尿細管上皮細胞に対するHGFの保護効果を示唆する結果を得た。また腎尿細管機能の1つとしてナトリウムイオン再吸収について、溶媒対照群では尿中に排出されるナトリウムイオンが増加したが、HGF投与群では改善していることを明らかにし、HGFによる腎尿細管細胞保護効果は尿細管機能をも改善することを示唆した。さらに、ブタ腎尿細管上皮由来のLLC-PK1細胞で虚血再灌流障害を惹起し、障害により培地中に漏出したlactate dehydrogenaseの量について検討したところ、100nMのHGF添加によりlactate dehydrogenaseの漏出が抑制され、*in vitro*においても腎尿細管上皮細胞に対するHGFの保護効果があることを示した。

### 論文審査の結果の要旨

肝細胞増殖因子（HGF）は、肝臓以外の種々の組織や細胞に対しても増殖作用や障害修復作用など多様な作用を示すことが知られている。一方、腎臓障害による疾病には、重篤なものも多く、それらについては根本的な治療法が求められている。本論文において著者は、腎障害動物モデルを用いて、HGFが腎機能障害の改善に対しても有効であることを示す一連の研究を行った。評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. ラットグリセロール誘発急性腎不全モデルにおいて、HGF投与により障害腎のHGFレセプターが活性化され、生存率、腎機能、腎組織障害が改善されることを示した。また、HGFは、腎臓に対する保護効果を持つことを明らかにし、そのメカニズムとして腎保護効果が報告されているストレスタンパク質HO-1の発現誘導を確認した。
2. HGF投与は、腎障害惹起前のみでも有効であり、また、腎障害惹起後早期からのHGF投与によっても腎機能改善が見られることを示した。
3. マウス塩化第二水銀誘発急性腎不全モデルに対するHGFの有効性、特に腎臓保護効果を示した。塩化水銀投与後早期にHGFを投与することにより、腎尿細管細胞のアポトーシスが著明に抑制され、その後の腎組織障害が抑制されることを明らかにした。また、HGFの効率的な投与方法として、ごく微量の静脈内持続投与を示した。
4. ラット虚血性急性腎不全モデルを用いて、HGF投与により腎機能や腎組織像が改善するのみならず、腎尿細管細胞に対する障害が抑制されること、腎尿細管によるナトリウムイオン再吸収能が改善することを示した。また、ブタ腎尿細管上皮細胞を用いて、低酸素かつグルコース欠乏状態による細胞障害をHGFが抑制することを示した。

以上のように著者は、急性腎不全動物モデルを用いてHGFの有効性を示すとともに、細胞および分子レベルでその作用メカニズムを明らかにした。これは、動物生理学、細胞生理学、医薬開発の実際に寄与するところが大きい。

よって、本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年10月16日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。