

## 論文の内容の要旨

論文題目 雄性 Mini ラットの thioacetamide 誘発肝傷害と修復の過程に関する毒性病理学的研究

氏名 谷 吉 朗

肝硬変は、病理組織学的に、線維性組織の異常な増生と肝細胞の異常な再生が複合的に認められることを特徴とする病変で、ヒトではウイルス性あるいはアルコール性肝炎が進行した場合などに観察される。現在、肝硬変に対するよい治療薬はなく、治療薬の開発が切望される疾患領域のひとつであり、その基礎として有用な病態モデルの開発とそれを用いた病変形成過程の詳細な解析が必須である。また、肝硬変患者あるいは肝硬変モデルでの成長ホルモン（GH）濃度についての研究はあるが、肝硬変の病変形成への GH の関与についてはほとんど知られていない。

Nts:Mini ラット（正式名称 Jcl:Wistar-TgN(ARGHGEN)1Nts ラット：以下 Mini ラット）は、Jcl:Wistar ラット（以下 Wistar ラット）を親系統にもつ遺伝子導入動物で、ラット GH mRNA に対するアンチセンス遺伝子が cDNA として導入されており、mRNA レベルで GH 遺伝子発現を抑制する。Mini ラットに galactosamine を投与すると、細胞外基質の増加および肝星細胞の活性化とともに、長期にわたり oval 細胞の増殖が観察された。したがって、Mini ラットでは、慢性的な薬物性肝傷害の結果として誘発される肝硬変の病理も通常のラットとは異なることが予想される。

本研究では、肝硬変誘発薬物として thioacetamide (TAA) を選択した。TAA は、肝薬物代謝酵素によって活性代謝物になることで肝毒性を発揮し、長期投与によって肝硬変を誘発する。また、TAA 誘発肝硬変モデルは、肝線維症あるいは再生性肝細胞結節が明確であり、病理学的にヒトの肝硬変に類似点が多いという特徴をもっている。

本研究は3章から構成され、第1章（血中 GH 濃度）および第2章（肝薬物代謝酵素）では雄性 Mini ラットの基本的性質について検討し、第3章で TAA 誘発肝硬変の病変形成過程、すなわち、肝傷害と修復の過程での GH の役割に関して、Mini ラットを用いて毒性病理学的に検討を加えた。得られた結果は以下の通りである。

#### 雄性 Mini ラットの血中 GH 濃度（第1章）

12 週齢の雄性 Mini ラットの血中 GH 濃度を同性同週齢の Wistar ラットと比較したところ、ピーク付近で約 1/4、全体的にも約 2/5 の有意な低値を示すことを実証し、Mini ラットが GH 欠乏モデル動物であることを確認した。

#### 雄性無処置 Mini ラットの肝薬物代謝酵素（第2章第1節）

6 週齢から 6 箇月齢までの無処置雄性 Mini ラットの肝ミクロソーム cytochrome P450 (CYP) および flavin-containing monooxygenase (FMO) について、経時的な酵素活性およびタンパクの発現について検討したところ、同性同週齢の Wistar ラットとの比較において、CYP 総含有量ならびに CYP2C11 および CYP3A2 活性の有意な低下と、CYP2E1 活性の軽度な上昇が認められた。これらの傾向は、すでに報告されている種々の GH 欠乏モデルラットと一致したことから、GH によって発現が制御されていることが示唆された。これに対し、原因は不明であるが、CYP2B 分子種の動態は下垂体除去ラットあるいは dwarf ラットとは異なった。FMO 活性には系統差はなかった。

#### 雄性 Mini ラットの肝薬物代謝酵素誘導能（第2章第2節）

代表的な肝薬物代謝酵素誘導剤である 3-methylcholanthrene (3-MC) および phenobarbital (PB) を雄性 Mini ラットおよび Wistar ラットに 3 日間反復投与したところ、それぞれ CYP1A1 および CYP2B1、特に CYP1A1 の有意な誘導が認められた。その原因については、GH の影響、相対肝臓重量の低値、薬物動態学的影響などが考えられた。

#### 雄性 Mini ラットにおける TAA 誘発肝硬変（第3章第1節）

TAA 飲水投与 2 週間目から、Mini ラットでのみ肝線維化が認められ、4 週間目には肝線維症、8 週間目には肝硬変に進行した。門脈域を中心に増生した結合組織に一致して胆管上皮細胞が増殖し、これを囲むように肝星細胞が増殖していた。一方、Wistar ラットは同じ条件下でも病変進行が遅く、投与 8 週間目でも軽度の線維化がみられるにとどまり、Mini ラットで認められた所見はほとんど認められなかった。このことから、GH の欠乏は肝硬変の進行を促進することが示された。

#### 雄性 Mini ラットにおける TAA 単回経口投与による肝傷害後の細胞動態（第3章第2節）

肝臓を構成する各細胞が TAA 単回経口投与後にどのような動態を示すかを検討した。肝細胞壊死に対して、主に肝細胞自身の再生により組織再生が行われた Wistar ラットに比べると、Mini ラット

では肝細胞壊死がより広範囲に及び、かつ肝細胞増殖が抑制された。この抑制に対する代償性反応として oval 細胞が増殖したが、その一部が胆管上皮へと分化し、残りは肝細胞へ分化したものと推測された。Mini ラットの肝臓での insulin-like growth factor-I (IGF-I) 遺伝子発現は Wistar ラットの半分以下であった。Mini ラットでは TAA 投与後に減少した IGF-I 発現が 7 日後でも回復せず、oval 細胞増殖との関連性が示唆された。Hepatocyte growth factor (HGF) および transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) の関与は明らかではなかった。

雄性 Mini ラットにおける TAA 単回経口投与による肝傷害後の組織修復に対する GH 投与の影響（第 3 章第 3 節）

GH 投与により TAA 誘発肝傷害を修飾できるかどうかについて検討したところ、ブタ下垂体より抽出した GH (pGH) は TAA 誘発肝傷害に対して抑制的効果を示した。また、pGH は、恐らく肝細胞再生を促進することで TAA 誘発肝傷害後の oval 細胞の増殖を抑制した。さらに、Mini ラットの IGF-I 発現が低い原因が GH 欠乏によることが明らかとなった。

雄性 Mini ラットにおける TAA 反復経口投与による肝傷害後の細胞動態（第 3 章第 4 節）

1 日目 200 mg/kg, 2 日目以降 50 mg/kg の用量で雄性 Mini ラットに反復経口投与した結果、胆管上皮細胞の著明な増殖と、oval 細胞の持続的な増殖が認められたことから、Mini ラットでは TAA の持続投与によって胆汁排泄系の継続的傷害および肝細胞再生の抑制が生じることが示唆された。これら上皮細胞および肝星細胞の増殖が、TAA 投与により Mini ラットで早期に発症する肝線維症および肝硬変の病変形成過程に重要であることが示唆された。

以上の結果から、本研究によって、GH アンチセンス遺伝子の導入により GH 欠乏状態を呈する雄性 Mini ラットの肝薬物代謝酵素の詳細が、発現および誘導を含めて初めて明らかにされた。また、Mini ラットは TAA 投与によって早期に肝硬変が誘発される系統であることが明らかとなった。Mini ラットでは、TAA 投与による肝傷害後に oval 細胞が増殖するが、GH は TAA 肝傷害後の肝細胞の再生を促進することにより oval 細胞の増殖を抑制することが示唆された。加えて、肝傷害後に増殖する oval 細胞は、肝傷害が一過性（単回投与）か持続性（反復投与）かによって、その後の分化方向が影響を受ける可能性が示された。さらに、肝硬変病変の形成には、胆管上皮細胞およびそれを囲むように増殖する肝星細胞が重要であることが示唆された。

このように、Mini ラットは特別な処置を必要とせずに、GH 以外の下垂体ホルモンの欠乏や、それに随伴するホルモンの変化の影響を回避でき、GH 欠乏が肝薬物代謝酵素や薬物性肝傷害あるいはその後の組織修復に及ぼす影響について研究する上で、優れた GH 単独欠損モデルとなり得ることが明らかにされた。