

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10041

研究課題名(和文) トロンボモジュリンによる肝虚血再灌流障害の抑制効果の解明

研究課題名(英文) The elucidation for the suppressive effect of thrombomodulin in liver ischemia and reperfusion injury

研究代表者

寺嶋 宏明 (TERAJIMA, Hiroaki)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究主幹

研究者番号：40314215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リコンビナントトロンボモジュリン(rTM)は、播種性血管内凝固異常症の標準治療薬であり、抗炎症作用を持つことが報告されている。肝虚血再灌流障害は活性酸素種やDAMPs (damage-associated molecular patterns)の放出による免疫細胞の活性化が関与する。我々は、DAMPsの一つであるHigh-mobility group box 1とToll-like receptor 4のpathwayを阻害することで、rTMが肝IRIを抑制することを解明し、その成果を国際学会誌(American Journal of Transplantation誌)に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓外科手術において一時的肝血行遮断(プリングル法)は重要な出血軽減法であり、肝移植医療においては臓器保存の観点からも虚血再灌流障害(IRI)の対策は急務な課題である。IRIの回避は、患者負担軽減・肝不全回避・手術成績向上に対して必須の要件である。手術手技向上に伴う血行遮断時間短縮には限界があり、肝IRI対策としての有効な薬剤の開発は必要である。リコンビナントトロンボモジュリン(rTM)は、臨床応用されている薬剤として有力な候補と考えられるが、易出血性など副作用の課題が残されている。我々は現在の研究をさらに進め、出血リスクの少ないrTM分画製剤開発に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：Recombinant Thrombomodulin (rTM) is one of the standard treatment for disseminated intravascular coagulation (DIC), and has an anti-inflammatory effect. Liver ischemia and reperfusion injury (IRI) is caused by the activation of immune cells due to release of reactive oxygen species and damage-associated molecular patterns (DAMPs). We found the remarkable suppressive effect of rTM in Liver IRI through the interference of the interaction between High-mobility group box 1 (HMGB-1), one of DAMPs, and toll-like receptor 4 (TLR-4). The results were reported in American Journal of Transplantation.

研究分野：消化器外科

キーワード：トロンボモジュリン 肝虚血再灌流障害 TLR-4 HMGB-1

1. 研究開始当初の背景

肝切除術/肝移植術は、消化器外科領域の中では高侵襲手術の代表的術式である。術中の一時的肝血行遮断(プリングル法)は重要な出血軽減法であり、血行遮断およびその解除すなわち、虚血再灌流障害(IRI)の回避は、患者負担軽減・肝不全回避・手術成績向上に対して必須の要件となる。手術手技向上に伴う血行遮断時間短縮には限界があり、肝 IRI 対策としての有効な薬剤の開発は必要である。特に脳死移植の分野では、臓器保存の観点からも IRI 対策は急務の課題として現在でも研究が続けられている。

研究分担者である内田洋一郎は IRI のメカニズム及びその克服について一貫して研究続けてきた経緯がある。米国を代表する IRI の研究開発施設であるカリフォルニア大学ロサンゼルス校 (UCLA) Dumont-UCLA Transplant Center において、肝 IRI の第一人者である Dr.Kupiec-Weglinski らと研究に従事し、IRI に関する研究成果を数多く報告している。

そのような背景のもと、肝 IRI 抑制治療薬の候補として、我々はトロンボモジュリンに着目した。生体内分子トロンボモジュリンの遺伝子組換え体であるリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)は made in Japan の DIC 治療薬としてわが国では幅広く使用されており、海外においてもその普及が広がっている。米国でも、DIC を伴う重症敗血症に関する臨床試験 (Safety and Efficacy Study of ART-123 in Subjects With Severe Sepsis and Coagulopathy) の phase3 が進行中(2012 年 8 月~)であり、rTM の有効性が期待されている。一方で、rTM は抗凝固作用に加えて「抗炎症作用」を併せ持つとする報告があり、申請者は rTM が肝 IRI に対する保護効果を有するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

肝 IRI に対する rTM の抑制効果を検証し、リガンドおよびレセプターの双方からアプローチしてその作用機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1)野生型マウスと Toll-like receptor (TLR) -4 ノックアウト (KO)マウスの各々に肝 IR 刺激(70% 部分肝、60 分虚血)を与え、rTM 投与群と非投与群において肝障害度を血清 ALT 値により比較検討する。評価項目として、肝組織像(HE 染色)、炎症性サイトカイン(RT-PCR)、アポトーシス(免疫染色、Western blotting)を比較検討する。

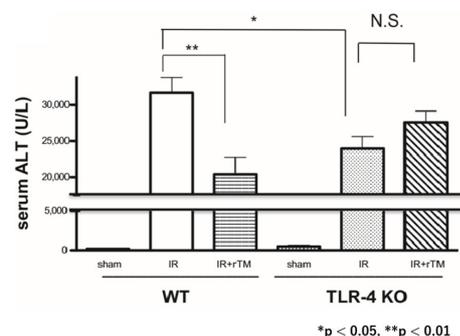
(2)上記結果に基づいて、in vitro 解析を行う。野生型マウスと TLR-4KO マウス由来のマクロファージを抽出し、TLR-4 のリガンドとされる HMGB-1(high mobility group box-1 protein)で刺激した際に産生される TNF- α 量を rTM 投与群と非投与群において評価する。

(3)rTM は D1、D2、D3 の 3 分画より構成されるが、N 末側に存在する D1 分画(レクチン様ドメイン)には抗炎症効果があるとされている。上記(1)について D1 分画単独投与群と非投与群における肝障害度の比較を行う。

4. 研究成果

(1)野生型マウスにおいては、rTM 投与群において有意に血清 ALT 値の低下がみられ、炎症性サイトカイン産生量の低下やアポトーシス細胞の減少がみられた。

一方、TLR-4KO マウスにおいては、野生型マウスに比べて rTM 投与もしくは非投与に関わらず有意な肝障害の抑制がみられた。



(2)野生型マウス由来マクロファージにおいては、HMGB-1 タンパク刺激による著しい TNF- α 産生がみられたが、rTM 投与によりこの産生量は濃度依存性に低下した。一方、TLR-4KO マウス由来マクロファージにおいては、HMGB-1 タンパク刺激による TNF- α 産生がほとんど起こらない結果であった。

(3)野生型マウスに対する肝 IR 刺激実験では、D1 分画単独投与は、rTM 投与とほぼ同等の肝障害の抑制効果を認めた。また、炎症性サイトカイン発現低下やアポトーシス細胞減少についても、D1 分画単独投与で十分な効果がみられることが判明した。

(4) 抗トロンビン作用を持たない D1 部位に HMGB1 阻害効果が見られた。

この一連の研究成果により、肝 IRI が TLR-4 依存性に制御されること、TLR-4 のリガンドである HMGB-1 との相互作用を rTM が阻害すること、D1 分画単独でも同等の効果がみられることを、明らかにした。これらの新しい知見に基づき、肝 IRI における主として rTM に focus を置いた論文として、2017 年に海外雑誌 American Journal of Transplantation へ報告した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1, Miyauchi T, **Uchida Y**, Kadono K, Hirao H, Kawasoe J, Watanabe T, Ueda S, Jobara K, Kaido T, **Okajima H**, **Terajima H**, Uemoto S.

The preventive effect of antioxidative nutrient-rich enteral diet against liver ischemia and reperfusion injury

J Parenter Enteral Nutr. 43:133-144, 2019

2, Kadono K, **Uchida Y**, Hirao H, Miyauchi T, Watanabe T, Iida T, Ueda S, Kanazawa A, Mori A, **Okajima H**, **Terajima H**, Uemoto S.

Thrombomodulin Attenuates Inflammatory Damage Due to Liver Ischemia and Reperfusion Injury in Mice in Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner.

Am J Transplant. 17:69-80, 2017

3, Hirao H, **Uchida Y**, Kadono K, Tanaka H, Niki T, Yamauchi A, Hata K, Watanabe T, **Terajima H**, Uemoto S.

The protective function of galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury in mice.

Liver Transpl. 21:969-81, 2015

〔学会発表〕(計 5 件)

1, Kadono K, **Uchida Y**, Miki A, Ohno R, Miyauchi T, Okamoto T, Kamimura R, Horiguchi M, Fukuda M, Watanabe T, Ueda S, **Terajima H**

Thrombomodulin suppresses inflammatory damage due to liver ischemia and reperfusion injury in mice in TLR-4 dependent manner

The 53rd Congress of the European Society for Surgical Research, Walter Brendel awarded session, Madrid, Spain, 2018/5/30-2018/6/2

2, 門野 賢太郎、**内田 洋一朗**、平尾 浩史、宮内 智之、堀口 雅史、上田 修吾、金澤 旭宣、**寺嶋 宏明**、**岡島 英明**、上本 伸二

トロンボモジュリンによる肝虚血再灌流障害の改善とその作用機序の解明

第 117 回日本外科学会総会 横浜 2017/4/27-4/29

3, **内田 洋一朗**、上田 修吾、森 章、大野 龍、松原 弘侑、後藤 徹、岡本 拓也、山本 健人、金澤 旭宣、**寺嶋 宏明**

消化器外科領域におけるトロンボモジュリン製剤の使用経験

Critical Care DIC Forum in Osaka 大阪 2016/9/10

4, **内田 洋一朗**、上田 修吾、森 章、大野 龍、松原 弘侑、後藤 徹、岡本 拓也、山本 健人、金澤 旭宣、**寺嶋 宏明**

消化器外科領域における rTM の可能性

第 52 回 日本腹部救急医学会総会 シンポジウム 東京 2016/3/3-3/4

5, **内田 洋一朗**、**寺嶋 宏明**、松原 弘侑、後藤 徹、岩村 宣亜、飯田 拓

当科における胆道癌に対する肝臓同時切除の治療成績の検討

第 27 回肝胆膵外科学会 東京 2015/6/11-6/13

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ <https://www.kitano-hp.or.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

研究分担者氏名：寺嶋 宏明
ローマ字氏名：TERAJIMA Hiroaki
所属研究機関名：公益財団法人 田附興風会
部局名：医学研究所 第1研究部
職名：研究主幹
研究者番号(8桁)：40314215

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：内田 洋一郎
ローマ字氏名：UCHIDA Yoichiro
所属研究機関名：公益財団法人 田附興風会
部局名：医学研究所 第1研究部
職名：主任研究員
研究者番号(8桁)：30597745

(3) 研究分担者

研究分担者氏名：岡島 英明
ローマ字氏名：OKAJIMA Hideaki
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：20308604

(4) 研究協力者

研究協力者氏名：門野 賢太郎
ローマ字氏名：KADONO Kentaro
所属研究機関名：公益財団法人 田附興風会
部局名：医学研究所 第1研究部
職名：研究員
研究者番号(8桁)：10816094

(5) 研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 武
ローマ字氏名：WATANABE Takeshi
所属研究機関名：公益財団法人 田附興風会
部局名：医学研究所 第1研究部
職名：研究員
研究者番号(8桁)：40028684

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。