

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10092

研究課題名(和文)術後感染性合併症に対するRAGE活性化機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Novel strategies targeting RAGE for postoperative infectious complications

研究代表者

深谷 昌秀 (FUKAYA, MASAHIDE)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：10420382

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)：ラット胆管結紮への肝虚血再灌流の付加により、肝障害が重篤化し、肝組織でのRAGEの発現が亢進していたが、有意差は認めなかった。胆管結紮7日後/肝虚血再灌流モデルにTLR4阻害剤TAK242の投与を行ない、血清ALT、ASTの上昇の軽減、肝壊死面積の減少、IL-1、IL-6の発現低下、血清HMGB1の低下を認め、肝障害が改善した。しかし、RAGEの発現減弱が認められず、ピサボロールの投与においてもRAGEの有意な発現の低下は認めなかった。更なる研究は必要であるが、TAK242を用いた肝障害に対する新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Severe liver damage was identified in rats with bile duct ligation and liver ischemia re-perfusion. RAGE (Receptor for advanced glycation end products) was highly expressed in these rats. TAK242, a TLR4 inhibitor, suppressed the elevation of serum ALT and AST in the rats with bile duct ligation and liver ischemia re-perfusion. In addition, TAK242 treatment decreased the area of hepatic necrosis and suppressed the expression of IL-1, IL-6 and HMGB1. TAK242 significantly improved the severity of the liver damage caused by bile duct ligation and liver ischemia re-perfusion. However, the compound was not able to significantly suppress RAGE expression. In addition, bisabolol did not demonstrate an inhibitory effect against RAGE in rats with bile duct ligation and liver ischemia re-perfusion. Further investigations will be required for clinical applications. However, this study suggests that novel therapies using TAK242 for treating severe liver damage could be efficacious.

研究分野：消化器外科

キーワード：RAGE 術後感染症

1. 研究開始当初の背景

高度な侵襲を伴う消化器外科手術では、術中に誘発されたバクテリアルトランスロケーションから発症する術後敗血症が手術関連死亡の原因の1つである (Mizuno T, et al., Ann Surg. 2010 ;252 : 1013-9, Nishigaki E, et al, Ann Surg. 2014;259:477-84)。高度侵襲外科手術の周術期管理においては、バクテリアルトランスロケーションによる敗血症の制御が手術成績向上のために極めて重要である。しかしその詳細な作用機序はいまだ解明されていない、われわれはこれらの作用機序に関連する分子として RAGE(Receptor for advanced glycation end products)に注目した。RAGE は、血管構成細胞やマクロファージなどの細胞表面に存在するイムノグロブリンスーパーファミリー分子の受容体タンパク質の一つである。RAGE は多様なリガンドと結合し、NF- B や MAP キナーゼを介して VCAM- 1、ICAM- 1 などの接着因子や炎症性サイトカインである TNF- や IL-1 の発現誘導に関与すると報告されている (Basta G, et al., Circulation. 2002;105:816-22)。RAGE のリガンドとしては、HMGB1(High mobility group B-1)、AGE(advanced glycation end-products)などが報告されている (Rouhiainen A, et al. Methods Mol Biol. 2013;963:239-6)。HMGB1 は敗血症における晩期炎症性サイトカインの1つであり、RAGE との結合により炎症反応を増強させ、細胞死を誘導するため「死のメディエーター」とも呼ばれている。このように RAGE はマルチリガンド受容体として、Toll like receptor などと同様にパターン認識受容体として様々な病態に関与しており (Ibrahim ZA, et al , Mol Immunol. 2013;56(4):739-44)、バクテリアルトランスロケーションおよび敗血症の病態にも深く関わっていると考えられる。RAGE 活性化の抑制は、周術期におけるバクテリアルトランスロケーションおよび敗血症

の発症阻止に有効である可能性が高いと考えられる。しかし生体内において、RAGE の活性化の抑制に効果のある物質はいまだ確認されていない。我々は、RAGE の活性化に対する阻害物質としてピサボロールに注目した。ピサボロールは天然に存在する単環式セスキテルペノイドの一種であり、カモミールやニューカレドニア産の灌木である「Myoporum grassifolium」より抽出され、RAGE のリガンドである AGE の生成阻害作用を有している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ピサボロールによる RAGE 活性化の抑制効果の検討、その制御に関するメカニズムの解明、特に RAGE 活性化のシグナル伝達機構の解明による安全な周術期管理法を確立することである。

3. 研究の方法

【ラット胆管結紮モデルの作成】

ラットの肝障害モデルとして総胆管結紮による胆管結紮モデルがある。ラットに対してセボフルレンによる吸入麻酔下での開腹後、胆管結紮を1日間および7日間行ない、胆管結紮1日モデルと胆管結紮7日モデルを作成した。

【ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルの作成】

ラットに対してセボフルレンによる吸入麻酔下での開腹後、肝十二指腸間膜の肝動脈及び門脈の血流遮断による全肝虚血を20分間行なう。その後、遮断解除により再灌流を行ない、全肝虚血/再灌流モデルを作成した。また胆管結紮1日モデルと胆管結紮7日モデルに対して全肝虚血/再灌流を行ない、ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルを作成した。

【ラット胆管空腸モデルの作成】

ラットに対してセボフルレンによる吸入麻酔下での開腹後、肝臓の70%切除によるラッ

ト肝切除モデルを作成した。また炎症モデルとして胆管炎の動物モデルであるラット胆管空腸モデルがあり、ラット肝切除モデルの総胆管と空腸を吻合したラット肝切除/胆管空腸モデルを作成した。

【血液生化学検査】

ラット胆管結紮モデル、ラット胆管空腸モデルより採血を行ない、ラット血清の肝逸脱酵素 ALT(Alanine transaminase)、AST(Aspartate transaminase)の測定により肝機能を検討した。また HMGB1(High mobility group B-1)、AGE(advanced glycation end-products)を測定した。ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルでは、再灌流の6時間後に肝機能を検討した。

【リアルタイム PCR】

ラット胆管結紮モデル、ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデル、ラット胆管空腸モデルより切除した肝組織から cDNA を作成し、リアルタイム PCR にて RAGE(Receptor for advanced glycation end products)、IL-1、IL-6 の発現を検討した。

【病理学的検査】

ラット胆管結紮モデル、ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデル、ラット胆管空腸モデルより切除した肝組織のホルマリン固定後、HE 染色にて肝壊死面積の検討を行った。

【ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルにおける TLR4 阻害剤の効果の検討】

TLR4 阻害剤 TAK242 の肝障害に対する効果を明らかにするために、ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルに対して TLR4 阻害剤 TAK242 の経静脈的投与を行なった。

【ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルにおけるピサボロールの効果の検討】

ピサボロールの肝障害に対する効果および RAGE の活性抑制効果を明らかにするために、ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルに対してピサボロールの経口投与を行なった。また、研究過程でピサボロールの投与による

異なる薬理作用を認めため、投与方法の検討を行なった。マウスの腹腔内に徐放性カプセルを留置し、ピサボロールの投与を行なった。

4. 研究成果

【ラット胆管結紮モデルにおける RAGE 発現解析】

胆管結紮モデルは胆管結紮を行なわないマウスと比較して血清 ALT、AST が上昇しており、肝障害を認めた。またリアルタイム PCR にて肝組織での RAGE(Receptor for advanced glycation end products)の発現は亢進していた。しかし胆管結紮モデルと胆管結紮を行なわないマウスにおいて RAGE の発現に有意差を認めなかった。

胆管結紮 1 日モデルと胆管結紮 7 日モデルでは、胆管結紮 1 日モデルのほうが血清 ALT、AST が上昇しており、肝障害は重篤であった。リアルタイム PCR にて胆管結紮 1 日モデルと胆管結紮 7 日モデルのいずれにおいても肝組織での RAGE の発現が亢進していた。しかし胆管結紮 1 日モデルと胆管結紮 7 日モデルにおいて RAGE の発現に有意差を認めなかった。

【ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルにおける RAGE 発現解析】

胆管結紮 1 日モデルと胆管結紮 7 日モデルに全肝虚血/再灌流を行い、6 時間後の肝機能について検討した。胆管結紮後/肝虚血再灌流モデルと胆管結紮のみの比較では胆管結紮後/肝虚血再灌流モデルにおいて血清 ALT、AST が上昇しており肝障害が重篤化していた。また、胆管結紮のみでは肝障害が軽度であった胆管結紮 7 日モデルのほうが肝虚血再灌流により肝障害が重篤化していた。リアルタイム PCR にて胆管結紮 7 日後/肝虚血再灌流モデルにおいても肝組織での RAGE の発現が亢進していたが、胆管結紮のみの場合と比較して有意差はなかった。

【ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデル

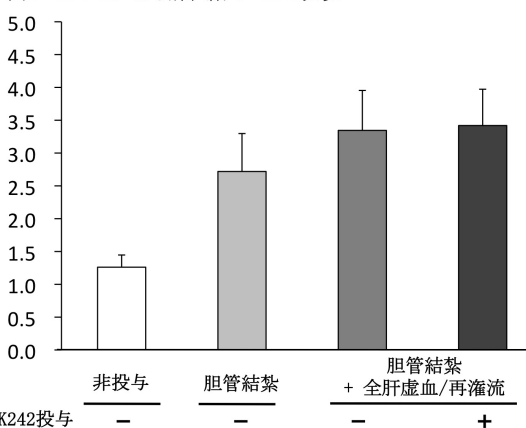
に対する TLR4 阻害剤投与】

胆管結紮 7 日後/肝虚血再灌流モデルに TLR4 阻害剤 TAK242 の投与を行ない、胆管結紮後/肝虚血再灌流モデルにおいて TLR4 阻害剤 TAK242 により血清肝逸脱酵素 ALT、AST の上昇の軽減、肝壊死面積の減少を認めた。リアルタイム PCR にて肝内炎症関連遺伝子 IL-1、IL-6 の発現の低下を認めた。

また血清 HMGB1 の低下も認めた。胆管結紮後/肝虚血再灌流モデルにおいて TLR4 阻害剤 TAK242 が重度の肝障害を改善が可能であることを明らかになった。

しかし、非投与と比較して胆管結紮後/肝虚血再灌流モデルに TLR4 阻害剤 TAK242 の投与をおこなった肝組織での RAGE の発現減弱をリアルタイム PCR にて認めることができなかった (図 1)。

図1 RT-PCRによる肝組織でのRAGE発現



TAK242投与

【ラット胆管結紮+全肝虚血/再灌流モデルに対するピサボロール投与】

胆管結紮後/肝虚血再灌流モデルと胆管結紮に対してピサボロールの経口投与を行なった結果、ピサボロールの投与により異なる薬理作用を認めた。胆管結紮後/肝虚血再灌流モデルに対してラットの腹腔内に徐放性カプセルを留置し、ピサボロールの投与を行なった。リアルタイム PCR にてピサボロールの投与による肝組織での RAGE の有意な発現の低下は認められなかった。

【ラット胆管空腸モデルにおける検討】

ラット肝切除モデルとラット肝切除/胆管空

腸モデルにおいて、ラット肝切除/胆管空腸モデルの肝切除後 4 日、7 日目の肝組織で炎症関連因子である IL (Interleukin) -6, TNF (Tumor necrosis factor)- α の発現亢進をリアルタイム PCR にて認めた。

ラット胆管結紮後/肝虚血再灌流モデルでの研究結果より TLR4 阻害剤 TAK242 は肝障害、特に肝虚血再灌流後肝障害の軽減に有効であった。本研究により TAK242 を用いた肝虚血再灌流後肝障害に対する新規治療法開発の可能性が示唆された。しかし肝組織での TAK242 およびピサボロールによる RAGE の発現の減弱をリアルタイム PCR にて認めることができず、さらなる検討が必要と考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Yokoi T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Yamaguchi J, Nagino M. Inhibition of Toll-like receptor 4 ameliorates experimental postischemic injury in the cholestatic liver through inhibition of high-mobility group box protein b1 (HMGB1) signaling. *Surgery*. 2018 Feb;163(2):270-276. doi: 10.1016/j.surg.2017.08.025. (査読有)
2. Murata Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Yamaguchi J, Miwa T, Shibuya M, Yamamoto Y, Nagino M. The Anticancer Effects of Novel α -Bisabolol Derivatives Against Pancreatic Cancer. *Anticancer Res*. 2017 Feb;37(2):589-598. (査読有)
3. Takagi T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Ebata T, Ando M, Nagino M. A Clear Difference Between the Outcomes After a Major Hepatectomy With and Without an Extrahepatic Bile Duct Resection. *World J Surg*. 2017

Feb;41(2):508-515. doi:

10.1007/s00268-016-3744-2. (査読有)

4. Takagi T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Yamaguchi J, Nagino M. Liver regeneration following experimental major hepatectomy with choledochojejunostomy. Br J Surg. 2015 Oct;102(11):1410-7. doi: 10.1002/bjs.9908. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

Yokoi T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Yamaguchi J, Nagino M. Inhibition of toll-like receptor 4 ameliorates experimental post-ischemic injury in the cholestatic liver through inhibition of high-mobility group box protein b1 (hmgb1) signaling. American Association For The Study of Liver diseases the Liver meeting. 2017

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

深谷 昌秀 (FUKAYA, MASAHIDE)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号 : 10420382

(2) 研究分担者

棚野 正人 (NAGINO, MASATO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 20237564

横山 幸浩 (YOKOYAMA, YUKIHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 80378091

國料 俊男 (KOKURYO, TOSHIO)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号 : 60378023

山口 淳平 (YAMAGUCHI, JUNPEI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 00566987

(3) 連携協力者

なし

(4) 研究協力者

北川 智美 (KITAGAWA, TOMOMI)

