

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10625

研究課題名(和文) HMGB1制御による心臓血管外科領域における合併症予防に関する研究

研究課題名(英文) Research for prevention of complications in cardiovascular surgeries through regulating HMGB1

研究代表者

上原 京勲 (Uehara, Kyokun)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60462280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1を標的とするヒト遺伝子組換えトロンボモジュリン(TM)をラット人工心肺に使用し、炎症抑制効果を確認したところ、血中HMGB1抑制がみられた。肺組織での炎症サイトカイン・HMGB1mRNA、組織学的肺障害および細胞核外HMGB1流出の抑制を認めた。さらに、抗凝固活性のない抗炎症ドメインTMをラット人工心肺に使用したところ、フルドメイン投与において人工心肺中の活性化凝固時間が過度に延長した一方、フルドメインと抗炎症ドメイン両者において、HMGB1の産生抑制傾向が示された。TMの抗炎症ドメインが、HMGB1抑制による新たな心臓血管外科手術における炎症性合併症予防に有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓血管外科手術において、炎症反応に関わる合併症の発症は致命的である。そういった重篤な病態における標的として現在着目されているのがHMGB1であり、その活性抑制は現在特に注目されている治療法である。本研究成果は致命的な心臓血管外科術後合併症に対する新治療法の開発につながり、学術的および社会的意義に富むものであると思われる。

研究成果の概要(英文)：The administration of human recombinant thrombomodulin (TM) on a rat cardiopulmonary bypass model attenuated blood HMGB1 and lung tissue mRNA level of inflammatory cytokines and HMGB1, as well as histological lung injury and cytoplasmic expression of HMGB1. The administration of anti-inflammatory TM domain without activity of anti-coagulation on a rat cardiopulmonary bypass model showed the attenuation of blood HMGB1 level without prolonged activated coagulation time. Anti-inflammatory domain of TM would be potentially a new effective strategy on prevention of inflammatory complications related to cardiovascular surgeries through the regulation of HMGB1.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：弁膜疾患外科学 人工心肺 全身性炎症反応症候群

1. 研究開始当初の背景

高齢化および食生活の欧米化に伴い心血管病の罹患数は年々増加しており、心臓血管外科手術の対象となる患者も多くの全身合併症を術前から有する症例が増加している。特に術前より高齢・糖尿病・慢性腎障害・低心機能に伴う全身臓器の予備能低下を合併している場合は、人工心肺を用いた手術を行うことにより術後各種臓器障害から多臓器不全に陥る症例や、胸骨への血流量低下や MRSA 感染から重篤な感染症である前縦隔骨髄炎・人工血管感染に陥る症例が少なくない。また急性大動脈解離においては術前よりすでに急性肺障害・臓器還流不全に陥っている率がさらに高く、術後に致命的な合併症を来すことが少なくない。

これらの病態には、各種臓器への虚血再灌流障害と、強い全身性の炎症反応が共通している。虚血再灌流障害や全身性炎症反応へと至る過程においては、好中球や各種サイトカインをはじめとした炎症性メディエーターが複雑に関与している。特に体外循環では、回路表面と血液との接触、虚血再灌流、エンドトキシン血症などにより、補体系の亢進、血球系の活性化、炎症性サイトカイン(TNF, IL-1, 6, 8)やプロスタグランジン E1 など液性因子の産生促進により、更なる組織損傷を来す。この全身性炎症反応を減弱するために、抗サイトカイン療法など様々な方法が試されてきたが、臨床での効果が証明されているものは皆無である。

このような既存の治療に抵抗性の全身炎症反応に対する有効な治療対象として High Mobility Group Box 1 (HMGB1) が挙げられる。HMGB1 は核内 DNA 結合タンパク質であり、様々な炎症性の病態に関わる”炎症誘発性サイトカイン”として近年その存在が知られてきた。その主な働きはクロマチン構造の維持機能や転写活性調節機能、DNA 修復機能であるが、最近になりマクロファージや各種免疫系細胞の活性化に伴う能動的分泌、あるいは虚血や傷害による細胞壊死・アポトーシスに伴う受動的放出などの働きが明らかにされてきた。また細胞外に放出された HMGB1 は TLR4 や RAGE といった細胞表面受容体を介して強力な炎症メディエーターとして作用し、炎症性免疫応答を更に促進することにより種々の重大な疾病の要因となっている。敗血症、ARDS、脳梗塞、心筋梗塞、動脈硬化症、自己免疫疾患(関節リウマチや全身性エリテマトーデスなど)、移植臓器拒絶、GVHD などの病態において、TNF α などの腫瘍壊死因子や各種炎症性サイトカインとは異なる経路による早期および遅延性炎症メディエーターとして働き、それら疾患への治療・予防の標的分子として注目されている(Yanai, Proc Natl Acad Sci U S A 2013 /Crikis, Am J Transplant 2010)。特に心血管領域においても、心筋虚血・再灌流障害や移植グラフトの虚血・拒絶反応に対する治療標的として最近着目され始めた(Zou, Am J Transplant 2014)。

HMGB1 関連疾患に対する治療法や予防法として、抗 HMGB1 モノクローナル抗体(Liu, FASEB J. 2007)、HMGB1 アンタゴニスト(Andersson, Annu Rev Immunol 2011)、HMGB1 分泌阻害化合物(Kanellakis, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011)、アフエレーシスによる吸着・除去など、動物実験による探索研究が近年報告されているものの、ヒトでの抗体や化合物については依然開発段階であり、臨床応用への道のりはまだ遠いのが現状である。一方、DIC 治療薬である遺伝子組み換え型トロンボモジュリン(Abeyama, J Clin Invest 2005)や HIV 治療薬サキナビル(Prbis, MI Med 2015)、抗血小板薬シロスタゾール(Chang, Thromb Res. 2015)などは、各疾患群においてすでに臨床使用されている薬剤であるが、最近では HMGB1 を標的とした抗炎症治療薬として評価され始めている。当科においてもすでに遺伝子組み換え型トロンボモジュリンによる HMGB1 産生抑制を介した急性肺障害抑制効果をラット人工心肺モデルにおいて確認し、今後発表予定である。例えば HMGB1 は慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデスといった自己免疫疾患の病態進展に関わることが知られているが、これらの疾患に対してすでに臨床応用されている薬剤のなかから、あるいは代表的な分子標的治療薬ライブラリ/阻害薬ライブラリのなかから、HMGB1 を標的とする治療薬を、当科で開発したラット人工心肺モデル(Funamoto, Ann Thorac Surg, In press / Taki, AHA abstract #15292, 2012)その他の様々な心臓血管外科領域の小動物疾患モデルを用いて in vivo で検索することは、より安全かつ早期の臨床応用につながり、心臓血管外科合併症予防・治療に関する、有効な研究となりうると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、HMGB1 が標的となる疾患群において臨床利用されている有効な薬剤あるいは分子標的治療薬ライブラリ/阻害薬ライブラリにおける候補薬剤を、人工心肺モデルなどの炎症励起モデルに投与し、その治療効果から HMGB1 を標的とした炎症治療薬を検索する。さらには検索された薬剤および既知の HMGB1 を標的とした薬剤を、心臓血管外科領域において HMGB1 が関与する重篤な炎症モデルに投与し、その有効性・安全性を評価することにより、HMGB1 標的薬剤による合併症予防および治療方法を確立することを研究目的とする。

3. 研究の方法

ラット人工心肺モデルによる全身炎症反応抑制効果および安全性の検討により、HMGB1 標的薬剤の探索を行う。SD ラットを治療群と非治療群の 2 群に分類する。各項目の評価は遺伝子組み

換えリコモジュリンにおける効果と比較する。

- (1) SD ラットをイソフルレンにて麻酔、挿管し人工呼吸器を装着する。
- (2) 対側大腿動脈、頸静脈より cannulation を行い、体外循環を確立する。
- (3) 体外循環開始直前に回路内に各種薬剤 あるいは生理食塩水を投与する。離脱後閉創する。各種薬剤は、既知の HMGB1 対象疾患に対し有効とされる治療薬群および分子標的治療薬ライブラリ/阻害薬ライブラリから選択する。
- (4) 2 時間人工呼吸器による補助を行い、麻酔覚醒させ人工呼吸器より離脱する。体外循環離脱 24 時間後まで、定期的に血清 HMGB1、各種サイトカイン、平均体血圧、心拍数などを測定する。体外循環後 24 時間に犠牲死させ、各臓器組織標本を採取する。
- (5) 各臓器に対して組織学的評価(浮腫の程度、正常細胞構築の損傷程度、炎症細胞浸潤の程度)を行う。
- (6) 各臓器標本に対しタンパク・mRNA 抽出を行い、炎症抑制メカニズムを解析する。

4. 研究成果

HMGB1 を標的とし DIC や肺炎、肝移植などのモデルにおいて、全身炎症抑制・局所臓器障害抑作用を示しているヒト遺伝子組み換えトロンボモジュリンを、われわれがすでに確立しているラット人工心肺に使用し、その全身および各臓器における炎症抑制効果を確認した。非治療群と比較し、血中サイトカイン(TNF- α , IL-6)の抑制、血中 HMGB1 抑制がみられ、全身での炎症が抑えられていた。また、肺組織でのサイトカイン(TNF- α , IL-6, IL-1 β)、HMGB1 のメッセンジャーRNA の抑制、組織学的な肺障害(炎症・鬱血・出血・浮腫)の抑制および細胞核外 HMGB1 流出の抑制を認め、酸素化の維持、肺水分貯留の軽減を認めた。これらの成果について、2016 年ヨーロッパ心臓病学会、アメリカ心臓病学会にて発表し、その後論文発表を行った(Hirao, J Thorac Cardiovasc Surg 2017)。

また、臨床上特に全身炎症による合併症が問題となる、弓部大動脈瘤置換術などの際に使用する、低体温循環停止を伴う人工心肺使用における、HMGB1 を標的とした新たな治療薬剤の探索を目的として、我々のラット人工心肺モデルをさらに研究開発して、ラット低体温循環停止モデルを確立した。

さらに、ヒト遺伝子組み換えトロンボモジュリンには、炎症を抑制するドメインと、抗凝固作用を有するドメインが別途存在することが知られている。そのため、凝固系に影響を及ぼさずことなく抗炎症作用を得るための戦略として、抗炎症ドメインのみの使用で抗炎症作用を同様に得られるかを、ラット人工心肺モデルを使用して検討した。その結果、抗凝固および抗炎症作用の両者を含むフルドメインのトロンボモジュリンの投与において、人工心肺中の活性化凝固時間が過度に延長するのに対し、抗炎症ドメインのみの投与では、その過度の延長が抑えられることが示された。また抗炎症に関しては、フルドメインと抗炎症ドメインの両者において、HMGB1 の産生抑制傾向と肺組織障害抑制が示された。これらの結果から、トロンボモジュリンの抗炎症ドメインみの選択的使用が、凝固系に悪影響を及ぼさない、新たな HMGB1 抑制を介した心臓血管外科手術における炎症性合併症予防法として有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Nishio H, Masumoto H, Sakamoto K, Yamazaki K, Ikeda T, Minatoya K. MicroRNA-145-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles attenuate venous intimal hyperplasia in a rabbit model. J Thorac Cardiovasc Surg. 査読有, In press
2. Ueyama K, Miyahara S, Ide Y, Sakamoto K, Kanemitsu H, Yamazaki K, Ikeda T, Aoyama A, Date H, Minatoya K. On-pump beating CABG concomitant with bilateral living-donor lobar lung transplantation. Heart Lung. 査読有, 48 巻, 2019, 166-168
3. Ishigami M, Masumoto H, Ikuno T, Aoki T, Kawatou M, Minakata K, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK, Minatoya K. Human iPS cell-derived cardiac tissue sheets for functional restoration of infarcted porcine hearts. PLoS One. 査読有, 13 巻, 2018, e0201650
4. Li Z, Masumoto H, Jo JI, Yamazaki K, Ikeda T, Tabata Y, Minatoya K. Sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel improved left ventricular function through the alteration of collagen subtype in a rat chronic myocardial infarction model. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 査読有, 66 巻, 2018, 641-647
5. Kumagai M, Minakata K, Masumoto H, Yamamoto M, Yonezawa A, Ikeda T, Uehara K, Yamazaki K, Ikeda T, Matsubara K, Yokode M, Shimizu A, Tabata Y, Sakata R, Minatoya K. A therapeutic angiogenesis of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel sheets in a canine chronic myocardial infarction model. Heart Vessels. 査読有, 33 巻, 2018, 1251-1257
6. Hirao S, Minakata K, Masumoto H, Yamazaki K, Ikeda T, Minatoya K, Sakata R. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents acute lung injury in a rat cardiopulmonary bypass model. J Thorac Cardiovasc Surg. 査読有, 154 巻, 2017,

1973-1983

7. Hirao S, Masumoto H, Itonaga T, Minatoya K. A Recovery Cardiopulmonary Bypass Model Without Transfusion or Inotropic Agents in Rats. J Vis Exp. 査読有, 2018, 133
8. Uehara K, Minakata K, Watanabe K, Sakaguchi H, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Tricuspid valve repair for severe tricuspid regurgitation due to pacemaker leads. Asian Cardiovascular Thoracic Annals. 査読有, 6 巻, 2016, 541-545

[学会発表] (計 14 件)

1. 山崎 和裕, 上田 遼馬, 竹原 真人, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 金光 ひでお, 南方 謙二, 植山 浩二, 池田 義, 湊谷 謙司. 大動脈弁輪拡張症に対する手術手技の工夫 2 種類のバルサルバグラフトを用いた Reimplantation 法による自己弁温存基部再建術. 第 46 回日本血管外科学会学術総会. 2018 年. 山形市
2. 津丸 真一, 升本 英利, 川東 正英, 幾野 毅, 金光 ひでお, 植山 浩二, 山崎 和裕, 池田 義, 湊谷 謙司. マウス下肢虚血モデルにおけるゼラチンスポンジを用いた iPS 細胞由来血管構成細胞移植による血流改善および血管再生効果の検討. 第 46 回日本血管外科学会学術総会. 2018 年. 山形市
3. 山崎 和裕, 金光 ひでお, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 工藤 雅文, 竹原 真人, 上田 遼馬, 植山 浩二, 池田 義, 湊谷 謙司. 当科における RCA#3 に対する冠動脈バイパス術の成績. 第 23 回日本冠動脈外科学会学術大会. 2018 年. 和歌山市
4. 藤原 靖恵, 平尾 慎吾, 川東 正英, 升本 英利, 金光 ひでお, 山崎 和裕, 池田 義, 湊谷 謙司. ラット皮下移植実験による人工血管生体組織適合性についての検討. 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会. 東京都
5. 西尾 博臣, 升本 英利, 川東 正英, 坂本 和久, 金光 ひでお, 山崎 和裕, 池田 義, 湊谷 謙司. MicroRNA-145 封入ポリ乳酸グリコール酸共重合体ナノ粒子による静脈グラフト内膜肥厚抑制に関するウサギ頸動脈モデルを用いた検討. 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2018 年. 東京都
6. Nishio H, Masumoto H, Yamazaki K, Ikeda T, Minatoya K. Transduction of micro RNA-145 using poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles attenuates venous intimal hyperplasia in a rabbit vein graft disease model. ESC Congress 2018 (国際学会). 2018, Munich, Germany
7. Heima D, Masumoto H, Kawatou M, Osada H, Ikeda T, Tabata Y, Minatoya K, Yamashita J. K. Human iPS Cell-Derived Cardiac Tissue Transplantation to a Rat Unloaded Ischemic Heart Model Mimicking Left Ventricular Assist Device Implantation. AHA American Heart Association 2018 (国際学会). 2018, Chicago, USA
8. 坂本 和久, 山崎 和裕, 上田 遼馬, 竹原 真人, 矢次 遥, 中津 太郎, 井出 雄二郎, 升本 英利, 金光 ひでお, 植山 浩二, 池田 義, 湊谷 謙司. 慢性 B 型解離に対する超低体温循環停止、SIRC (Straight incision with rib-cross) アプローチによる胸部下行、胸腹部大動脈置換術. 第 70 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2017 年. 札幌市
9. 山下 剛生, 湊谷 謙司, 山崎 和裕, 金光 ひでお, 中津 太郎, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 植山 浩二, 池田 義. 胸腹部大動脈瘤人工血管置換術における Critical segmental artery の確実な術中同定法. 第 70 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2017 年. 札幌市
10. 平尾 慎吾, 南方 謙二, 升本 英利, 船本 成輝, 瀬戸崎 修司, 坂本 和久, 中津 太郎, 上原 京勲, 山崎 和裕, 池田 義, 坂田 隆造. ラット人工心肺モデルにおける遺伝子組換えトロンボモデュリン投与による急性肺障害抑制効果の検討. 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2016 年. 岡山市
11. Hirao S, Minakata K, Funamoto M, Setozaki S, Yamazaki K, Masumoto H, Ikeda T, Sakata R. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in a rat model. 24th Annual meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (国際学会). 2016, Taipei, Taiwan
12. Uehara K, Minakata K, Saito N, Imai M, Daijo H, Nakatsu T, Sakamoto K, Nakata T, Yamazaki K, Ikeda T, Kimura T. Use of extracorporeal membrane oxygenation in complicated transcatheter aortic valve replacement. 24th Annual meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (国際学会). 2016, Taipei, Taiwan
13. Hirao S, Minakata K, Masumoto H, Setozaki S, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in rats. European Society of Cardiology Congress (国際学会). 2016, Rome, Italy
14. Hirao S, Minakata K, Masumoto H, Setozaki S, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents acute lung injury in a rat cardiopulmonary bypass model. AHA Scientific session 2016 (国際学会). 2016, New Orleans, USA

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：池田 義

ローマ字氏名：TADASHI IKEDA

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40281092

研究分担者氏名：山崎 和裕

ローマ字氏名：KAZUHIRO YAMAZAKI

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：50464227

研究分担者氏名：南方 謙二

ローマ字氏名：KENJI MINAKATA

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：60539675

研究分担者氏名：升本 英利

ローマ字氏名：HIDETOSHI MASUMOTO

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：上級研究員

研究者番号（8桁）：70645754

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。