

令和 3 年 4 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08724

研究課題名(和文) PAI-1阻害化合物による新たな癒着予防法の探求

研究課題名(英文) A novel adhesion prevention strategy using PAI-1 inhibitor

研究代表者

河津 聡 (Kawatsu, Satoshi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：80633685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心臓血管外科手術後の心臓周囲の癒着は、再手術の危険を上昇させる。本研究ではウサギの心臓周囲に人工的に癒着を作成し、その癒着がPAI-1阻害化合物(TM5441)の投与によって改善することを示した。さらにPAI-1阻害化合物が癒着に対してどのように作用しているかを明らかにするため、PAI-1阻害化合物が癒着に対して効果を示す作用経路に関して仮説を立て、その作用経路を阻害するトラネキサム酸を投与することで癒着の改善効果が減弱することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在心臓血管外科手術後の再手術は増加している。再手術の際には心臓周囲の癒着剥離操作が必要となり、大血管や心臓損傷のリスクが上昇する。しかし未だ確立された癒着予防法は存在しない。現在は心臓損傷予防のためシート状の代用心膜を留置する手法が中心であるが、かえって癒着を増強させるリスクや感染の問題がある。そこで本研究では癒着の形成過程を阻害する薬剤の全身投与という、これまでになかった形での癒着の改善を目指し、動物実験でその効果を示し、今後臨床応用に向けてさらに研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：A postsurgical adhesion reduction strategy remains unestablished. One of the mechanisms of intrapericardial adhesion formation is fibrin accumulation on damaged pericardial layers. Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1), a serine protease inhibitor, is involved in numerous process including fibrin accumulation and fibrosis. In this study we aimed to prove adhesion reduction effect of PAI-1 inhibition using rabbit pericardial adhesion model. PAI-1 antagonist TM5441 was administered to rabbit pericardial adhesion models and adhesions were evaluated four weeks after surgery. TM5441 attenuates adhesions in the inner part of the pericardial sacs in rabbit models. Anterior mediastinum adhesion was not improved by TM5441. There were no adverse events. Combining trans-amino-methyl-cyclohexane-carboxylic acid and TM5441 reduces the adhesion reduction effect of TM5441. This shows plasminogen activation inhibition by tranexamic acid blocks plasminogen activation by t-PA activated by TM5441.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：PAI-1 TM5441 癒着 心臓血管外科 再手術 プラスミン

1. 研究開始当初の背景

心臓大血管疾患に対する再手術は増加傾向にあり、特に弁膜症疾患では2012年に1309例だった再手術が2017年には2116例と増加している^{1,2}。再手術の際には癒着剥離を要するため、手術中の出血量増加と心臓大血管損傷の危険は高く死亡率も初回手術に比べ約2倍となっている¹。そのため術後に生じる癒着を軽減し再手術時の出血量を減少させ、手術死亡率を低下させることは临床上重要な課題である。しかし現在も癒着予防法として確立されたものはない。再開胸時の心血管損傷リスクを低減する方法は、胸骨下に非吸収性シートを留置する方法が主であるが^{3,4,5}、異物としての人工物による周囲組織での慢性炎症の問題により再手術時の操作が困難になる。従って人工物を用いない癒着予防法の開発が望まれる。本研究では癒着の根源的な形成機序に立ち返って癒着改善法を考察し、中皮細胞の障害に伴う癒着形成に着目した。中皮細胞の障害に伴う癒着はフィブリンの蓄積と架橋によって形成されることが分かっていることから⁶、フィブリンの蓄積を阻害することが、癒着の改善につながるのではないかと考えた。また腹腔内癒着において、手術侵襲を受けた中皮細胞より放出される plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) がフィブリン形成を促進することが癒着を形成することが分かっており⁷、この PAI-1 を阻害することで腹腔内と同様に中皮細胞に覆われている心嚢内の癒着改善につながるという仮説を立てた。PAI-1 の経口投与による阻害が心嚢内での癒着改善に有効であることを示した研究はこれまでにない。また癒着形成にはマクロファージが重要な役割を果たしていることが知られており⁸、PAI-1 によりマクロファージの組織への遊走が起こることも過去に示されている^{7,9,10}。

2. 研究の目的

本研究の目的は PAI-1 阻害化合物を投与することにより、癒着が改善されることを動物モデルで実証することである。そのために、(1)安定した心臓周囲癒着モデルの確立、(2)PAI-1 阻害化合物投与により癒着が改善されることを肉眼的、組織学的に示すこと、(3)PAI-1 阻害化合物投与による癒着改善機構を明らかにすること、を目指した。

3. 研究の方法

(1) モデル作成と評価方法

実験動物はウサギを選択し、心臓周囲癒着モデルおよび癒着評価法の確立に着手した。ウサギは New Zealand white、オス、体重 2.0-3.5kg を使用した。より臨床に即した癒着の病像とするため、胸骨正中切開を行い心膜は切開後に縫合閉鎖し、その4週間後に癒着を評価した。癒着強度の評価は両側肋間開胸を行い、心拍動下で心臓左側、右側、心尖部の3領域でそれぞれを0~3点のスケールを用いてスコアリングし、その合計点(0~9点)を評価に用いた。心臓と胸骨を一塊にして摘出した後、心臓と胸骨が接合している境界をマーキングしその内側の面積を ImageJ で測定した。一連の評価の過程は、客観的評価を可能にするためすべて動画として撮影し保存した。

(2) 群分けと使用薬剤

ウサギは以下の4群に分類した。①生理食塩水投与群(S群 n=10)、②carboxymethylcellulose (CMC) 投与群(C群 n=10)、③PAI-1 阻害化合物 1 週間投与群(P1 群 n=10)、④PAI-1 阻害化合物 4 週間投与群(P4 群 n=10)。PAI-1 阻害化合物は TM5441 を使用した。PAI-1 阻害化合物は抗血栓薬として創薬されたものであるが、PAI-1 阻害による効果は抗血栓作用にとどまらず様々な臨床応用が期待されているものである。TM5441 は 1 日 1 回 50mg/kg を基剤となる carboxymethylcellulose (CMC) 50mg/kg に溶解して経口胃管より投与した。手術前には 3 日間の前投薬期間を設けた。

(3) 組織学的検討方法

胸骨下(心嚢内+前縦隔)の癒着組織を組織学的検討に用いた。癒着剥離を行っていないモデルに対して、心臓と胸骨を一塊として取り出し胸骨下の癒着部位(心嚢内+前縦隔)で標本作製し癒着形成にピボットの役割を果たしていると考えられるマクロファージの浸潤や、癒着の無い生体環境保持に必要と考えられる中皮細胞の配列状態、PAI-1 の局在を癒着組織内で確認した。さらに炎症性細胞浸潤、線維化のグレーディング、癒着組織中のマクロファージカウントを TM5441 投与群、非投与群に対して行った。炎症性細胞浸潤及び線維化のグレーディング、癒着組織のマクロファージカウントは術後早期(術後1週間)、慢性期(術後4週間)で以下の群に対して行った。術後早期(術後1週間)：①TM544 投与群(n=3)、②TM5441 非投与群(n=3)、慢性期(術後4週間)：①TM5441 投与群(n=3)、②TM5441 非投与群(n=3)、各個体より1スライドずつ、胸骨下の癒着組織を心嚢内、前縦隔に分けてマクロファージをカウントした。カウントは1スライドにつき心嚢内、前縦隔でそれぞれ5視野ずつ、各群心嚢内、前縦隔に対して3×5=15視野ずつ

つ施行した。また TM5441 の癒着に対する作用経路を証明するため、trans-amino-methyl-cyclohexane-carboxylic acid(tranexamic acid)との同時投与実験も行った。群は tranexamic acid (100mg/kg/日)単独投与群(T群 n=10)と TM5441(50mg/kg/日)に tranexamic acid (100mg/kg/日)を同時投与した群(TP群 n=9)の2群を設定し、評価はS群、C群、P1群、P4群と合わせて行った。3日間の前投薬期間を設け、モデル作成後4週間後に(1)と同様に評価した。tranexamic acid はプラスミノーゲンのプラスミンへの転換を阻害するため¹¹、TM5441 が tranexamic acid の存在下で癒着改善効果を発揮できなければ、TM5441 の癒着に対する作用経路が tissue plasminogen activator(t-PA)活性化を介した抗血栓作用によるものであることの裏付けとなると考えた。

4. 研究成果

(1) 癒着スコアと癒着面積

心嚢内での平均癒着スコアはS群 5.9 ± 0.6 、C群 5.4 ± 0.9 、P1群 1.9 ± 0.6 、P4群 2.1 ± 0.7 で、P1、P4群において有意に低かった ($p < 0.05$)。胸骨下の平均癒着面積はS群 130.8 ± 9.3 、C群 184.8 ± 35.7 、P1群 144.1 ± 25.3 、P4群 120.5 ± 16.2 で各群間に有意差はなかった。tranexamic acid 投与群(T群 n=10)と、tranexamic acid と TM5441 同時投与群(TP群 n=9)の心嚢内の平均癒着スコアはT群 5.5 ± 0.5 、TP群 5.8 ± 0.5 で、この2群をS群、C群、P1群、P4群に加えて検討すると、T群、TP群の癒着スコアはP1、P4群に対して有意に高く ($p < 0.05$)、TM5441 の癒着改善効果が抑制されていた。胸骨下の平均癒着面積はT群 156.4 ± 21.7 、TP群 178.5 ± 23.4 で、P1、P4群に対して有意差はなかった (figure 1, 2)。

(2) 組織学的検討

心嚢内の癒着部では中皮細胞の配列は消失し、PAI-1 は癒着組織中では心筋細胞、炎症性細胞、中皮細胞、フィブリン塊、血腫内に多量に存在していることが分かった。マクロファージは心嚢内、前縦隔の癒着組織内に多数認めた。術後早期(術後1週間)では心嚢内の inflammatory reaction score は、TM5441 投与群で 2.20 ± 0.14 、非投与群で 2.87 ± 0.14 で、TM5441 投与群で有意に低かった。線維化は術後早期(術後1週間)、慢性期(術後4週間)ともにTM5441 投与群、非投与群で有意差はなかった。TM5441 投与群で、術後早期(術後1週間)の心嚢内のマクロファージカウントは 19.7 ± 2.7 、前縦隔のマクロファージカウントは 14.2 ± 1.4 、TM5441 非投与群で術後早期(術後1週間)の心嚢内のマクロファージカウントは 32.3 ± 2.3 、前縦隔のマクロファージカウントは 17.8 ± 1.0 であり、心嚢内、前縦隔ともに TM5441 投与群で有意に低かった ($p < 0.05$) (figure 3)。慢性期(術後4週間)ではTM5441 投与群で心嚢内のマクロファージカウントは 9.8 ± 1.8 、前縦隔のマクロファージカウントは 115.6 ± 14.3 、TM5441 非投与群で心嚢内のマクロファージカウントは 18.7 ± 3.3 、前縦隔のマクロファージカウントは 118.2 ± 12.0 であり、心嚢内のマクロファージカウントはTM5441 投与群で有意に低かったが ($p < 0.05$)、前縦隔では差はなかった (figure 4)。

(3) 結論

TM5441 投与によって、胸骨下の癒着面積に変化はなかったが心嚢内の癒着が改善された。TM5441 の投与期間は1週間でも4週間でも癒着の程度に変化はなく、癒着形成に術後1週間の反応が重要である可能性が示唆された。プラスミノーゲン阻害により癒着軽減効果が阻害された結果からTM5441 投与による癒着の改善は、t-PA を介したフィブリンの溶解促進が関与していることが示された。

figure 1

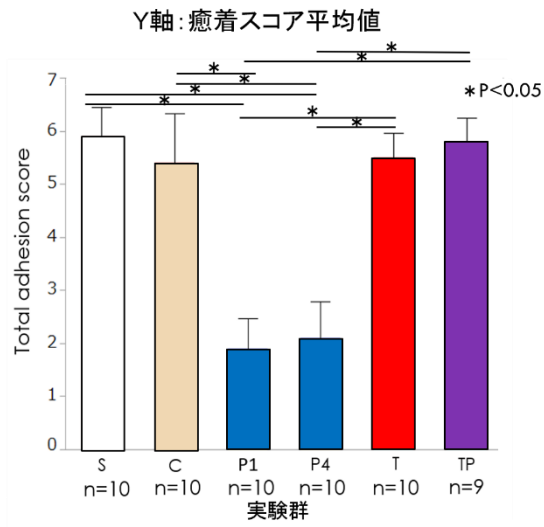


figure 2

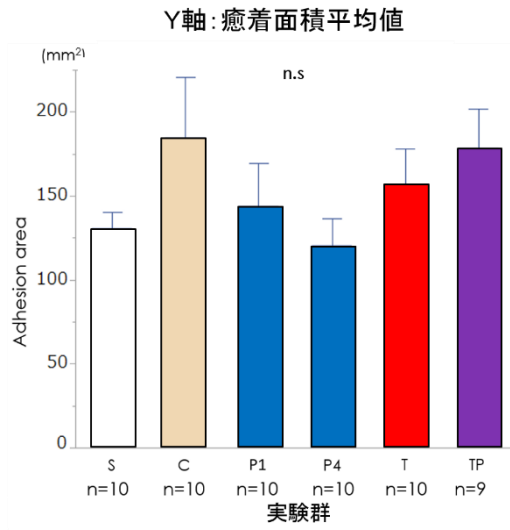


figure 3

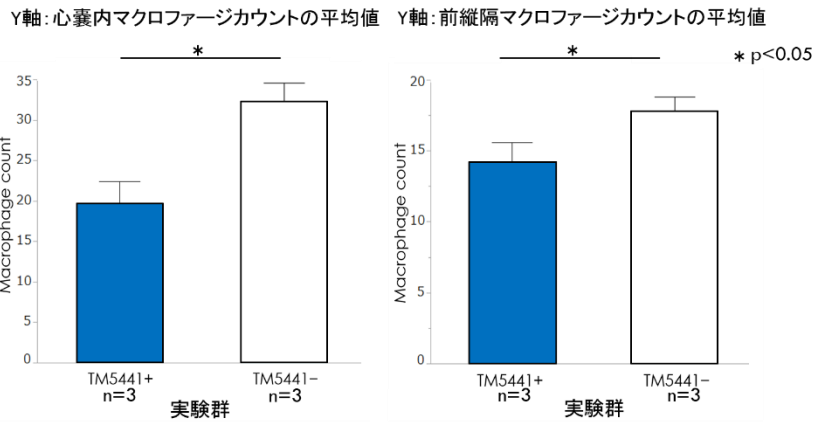
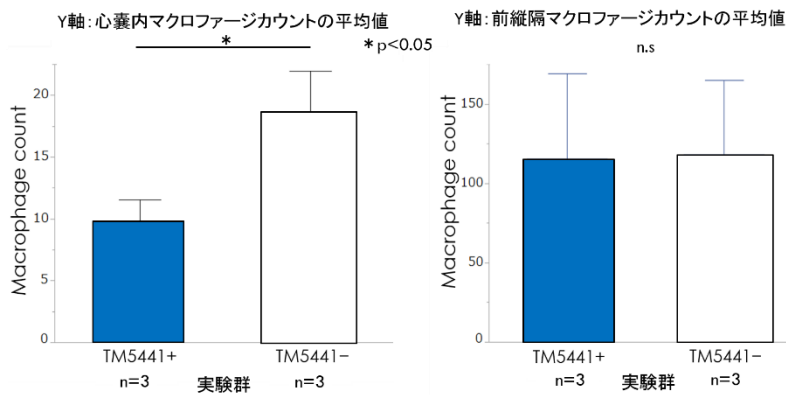


figure 4



References

1. Shimizu H, Okada M, Tangoku A, et al. Thoracic and cardiovascular surgeries in Japan during 2017 : Annual report by the Japanese Association for Thoracic Surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2020;68(4):414-449.
2. Masuda M, Kuwano H, Okumura M, et al. Thoracic and cardiovascular surgery in Japan during 2012 : annual report by The Japanese Association for Thoracic Surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;62(12):734-764.
3. Bhatnagar G, Fremes SE, Christakis GT, Goldman BS. Early results using an ePTFE membrane for pericardial closure following coronary bypass grafting. *J Card Surg.* 1998;13(3):190-193.
4. Jacobs JP, Iyer RS, Weston JS, et al. Expanded PTFE membrane to prevent cardiac injury during re sternotomy for congenital heart disease. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(6):1778-1782.
5. Kajiwara H, Hamada T, Ichikawa Y, Ishi M, Yamazaki I. Experience with expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE Gore-Tex) surgical membrane for coronary artery grafting: does ePTFE surgical membrane predispose to postoperative mediastinitis? *Artif Organs.* 2004;28(9):840-845.
6. Cannata A, Petrella D, Russo CF, et al. Postsurgical intrapericardial adhesions: mechanisms of formation and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2013;95(5):1818-1826.
7. Honjo K, Munakata S, Tashiro Y, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates macrophage-dependent postoperative adhesion by enhancing EGF-HER1 signaling in mice. *Faseb j.* 2017;31(6):2625-2637.
8. Hong GS, Schwandt T, Stein K, et al. Effects of macrophage-dependent peroxisome proliferator-activated receptor γ signalling on adhesion formation after abdominal surgery in an experimental model. *Br J Surg.* 2015;102(12):1506-1516.
9. Sakamoto H, Koma YI, Higashino N, et al. PAI-1 derived from cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma promotes the invasion of cancer cells and the migration of macrophages. *Lab Invest.* 2020.
10. Park HJ, Chi GY, Choi YH, Park SH. Lupeol suppresses plasminogen activator inhibitor-1-mediated macrophage recruitment and attenuates M2 macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;527(4):889-895.
11. 岡本彰祐, 佐藤彰一, 高田由美子, 岡本歌子. *The Keio Journal of Medicine.* 1964;13(4):177-185.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋木 佳克 (Saiki Yoshikatsu) (50372298)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	安達 理 (Adachi Osamu) (30375092)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	秋山 正年 (Akiyama Masatoshi) (80526450)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関