

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430093

研究課題名(和文) HMGB1の可溶性受容体(sRAGE)に着目した新たな劇症肝不全治療法の開発

研究課題名(英文) Treatment for fulminant hepatitis focusing on soluble receptor for HMGB1 (sRAGE)

研究代表者

篠田 昌宏 (Shinoda, Masahiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：50286499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：核内タンパクHMGB1とその可溶性受容体(sRAGE)に着目し、遺伝子治療などの特殊技術を駆使し本疾患の治療の研究・開発を進めた。sRAGE cDNAを組み込んだPlasmidをHEK293細胞に添加し、sRAGEの発現を確認した。sRAGEタンパクを含有する細胞上清を用いてマクロファージからのHMGB1によるTNF 分泌抑制試験を行い、コントロール群に比しsRAGE添加群において有意にTNF を抑制する結果となり、in vitroでのsRAGEタンパクの生理活性を確認した。sRAGE Plasmid (800 µg) をラット門脈内注射したところ肝逸脱酵素の低下傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：High-mobility group box 1 (HMGB1) has recently been identified as an important mediator of various kinds of acute and chronic inflammation. Acute liver failure is a lethal disease. We constructed plasmid encoding cDNA for sRAGE and performed in vitro and in vivo experiments to test if the plasmid works for acute liver failure. Western blot analysis showed enhanced expressions of sRAGE protein in HeLa cells transfected with plasmid. The culture supernatant of HeLa cells transfected with the plasmid inhibited TNF production from macrophages. Transfected rats showed tendency of decreased hepatic enzymes, It is possible that sRAGE is effective for the treatment for acute liver failure.

研究分野：臓器移植

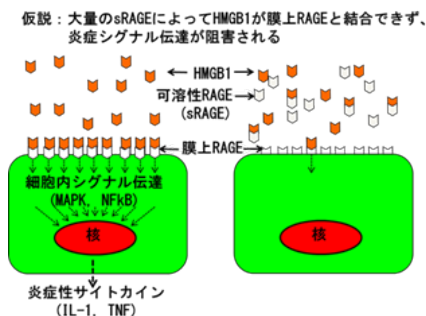
キーワード：急性肝不全 HMGB1 可溶性受容体

### 1. 研究開始当初の背景

当グループでは劇症肝不全患者に対し血漿交換、脳死及び生体肝移植などの治療を行ってきた。成人生体肝移植 21 名の劇症肝不全患者の 5 年生存率は 80% と成績良好で、脳死肝移植を 1 例に施行し長期生存を得ている。が、当院への劇症肝不全に関する問い合わせは年間平均 12 件あり、救命できている症例は極一部と言わざるを得ない。こうした臨床的背景から、過去 10 年以上にわたり劇症肝不全の移植に代わる治療の開発のため基礎研究に力をいれてきた。研究代表者は、当初劇症肝不全患者、劇症肝不全動物モデルにおいて IL-1、IL-18 などの炎症性サイトカインが病態に関与していることを報告した。2006 年以降は、核内タンパクである HMGB1 が本疾患の key mediator と考え、国内の HMGB1 研究ネットワーク（鹿児島大学丸山征朗教授統括）に参加、各種の共同研究の下肝不全と HMGB1 の研究を展開してきた。肝疾患患者の血中 HMGB1 の上昇を確認し、大小の動物実験モデルでの HMGB1 動態を解明、さらに抗 HMGB1 抗体や HMGB1 の阻害タンパクである A box タンパクの遺伝子導入がラット肝不全モデルにおいて絶大な病態改善効果をもたらすことを発見した。当グループにおける、劇症肝不全の臨床経験、動物モデル作成技術、HMGB1 制御戦略はいずれも国内トップレベルと自負している。

### 2. 研究の目的

難病にも指定されている劇症肝不全は、種々の原因で急速に肝が壊死し肝不全に陥る予後不良な疾患で、血漿交換と血液濾過透析を組み合わせた体外循環療法などの内科的治療では救命できないことも多い。2010 年に臓器移植法が改正され、脳死肝移植が始まり移植件数は増加しているものの、未だ臓器不足問題があり、限られた臓器提供を考えると肝移植に代わる新しい治療法の開発が期待されている。本研究では、敗血症等の各種の病態で治療標的として注目されている核内タンパク High mobility group box-1 (以下 HMGB1) とその可溶性受容体 (sRAGE) に着目し、遺伝子治療、細胞移植、体外循環治療などの特殊技術を駆使し本疾患の治療の研究・開発を進める。

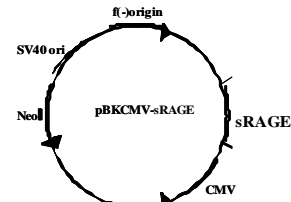


### 3. 研究の方法

【平成26 年度前期】～基礎実験～

#### (1) HMGB1 sRAGE cDNA を発現するアデノウイルスベクターの作製 (高柳)

COS-TPC 法を用いて、sRAGE cDNA を組み込んだ組換えアデノウイルス (Adex-sRAGE) を作製した (右図)。



作成中のアデノウイルスベクター

#### (2) Adex-sRAGE の導入、タンパク発現等機能確認 (篠田、雨宮)

Adex-sRAGE を HeLa 細胞、各種培養肝細胞に導入し、上清中 sRAGE タンパクを Western Blot 法で確認する。さらにマクロファージ細胞 (RAW264.7 細胞) を培養し、リコンビナント HMGB1 と sRAGE の分泌が確認されている Adex-sRAGE 感染 HeLa 細胞の上清を同時添加し、HMGB1 のマクロファージ細胞に対する TNF 放出刺激が阻害されるか検討する。また、ラット (Wistar 系雄性) 門脈内に投与し、肝臓への導入を行う。経門脈投与後 6h, 12h, 24h, 48h, 72h と経時的に血清、肝組織を採取し、Western Blot 法、免疫染色等にてタンパク発現がピークとなる時点を検討する。

#### (3) sRAGE 産生性肝細胞の作製と体外循環型リアクターへの埋め込み (篠田)

肝細胞の培養：ラット・ブタ初代培養肝細胞、ヒト不死化肝細胞を使用する。ヒト不死化肝細胞はヒト肝細胞に hTERT 遺伝子を導入し作製する (Transplantation, 2004; 77: 1357)。

sRAGE 産生性肝細胞の作製：上記の各種肝細胞の培養上清中に Adex-sRAGE (MOI=64) を添加、37℃にて 1 時間培養し感染を成立させる。培養上清中の sRAGE を Western blot にて確認する。

sRAGE 産生性肝細胞のリアクターへの埋め込み：コラーゲンで 24 時間前処置されたガラスプレート上に各種の肝細胞を 10 x 106 個巻き 24 時間生着を待つ。培養上清中に Adex-sRAGE を添加、37℃にて 1 時間培養し、リアクターに内蔵する。

【平成 26 年度後期～平成 28 年度】～小動物実験～ (雨宮、篠田)

#### (4) 小動物 (ラット) 急性肝不全モデルにおける sRAGE 遺伝子導入効果の検討

Wistar 系雄性ラットに D-ガラクトサミン (2.0 g/Kg)を腹腔内投与し、薬剤性劇症肝不全を誘発する。D-ガラクトサミン投与 72 時間前に Adex-sRAGE( ウイルス量 5x10<sup>9</sup> pfu/body)を門脈内に投与し、下記の各種パラメータを測定・評価する。

- a) 血漿中 T-Bil、GOT、GPT、LDH、IL-1、IL-6、TNF、HMGB1、sRAGE
- b) 肝組織中 IL-1、IL-6、TNF、HMGB1
- c) 肝組織 H.E 光顕像、TUNEL 染色、HMGB1 染色
- d) 生存率 (7 日間観察)

(4) **小動物(ラット)急性肝不全モデルにおける sRAGE 産生性肝細胞移植の効果の検討**  
 実験(4)と同様のモデルにおいて、門脈または脾臓内にあらかじめ作成した sRAGE 産生性肝細胞を D-ガラクトサミン投与 24 時間前に注入し、実験(4)と同様のパラメータを測定し評価する。

(4) **小動物(ラット)急性肝不全モデルにおける sRAGE 産生リアクター治療効果の検討**  
 実験(4)と同様のモデルにおいて、D-ガラクトサミン投与と同時に sRAGE 産生リアクターを接続、10 時間の灌流を行う。実験(4)と同様のパラメータを測定し評価する。

【平成 26～28 年度】～大動物実験～(篠田、雨宮)

(5) **大動物(ブタ)劇症肝不全モデルに対する Adex-sRAGE の効果の検討**

雄性ブタ(体重 20kg 前後)に D-ガラクトサミン(0.6 g/Kg)を静脈内投与し劇症肝不全モデルを作製する。肝不全誘発 72 時間前に Adex-sRAGE (ウイルス量 5x10<sup>11</sup> pfu/body)を投与、実験(4)と同様のパラメータを測定し、病態改善効果を解析する。

(6) **生体、脳死移植患者におけ sRAGE 動態の検討(篠田)**

倫理委員会申請の上、患者血清を用いて HMGB1、sRAGE 動態を検討する。

4. 研究成果

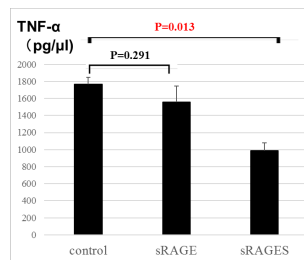


上図のようにアデノウィルスベクター-sRAGE を作成し、HEK293 細胞に感染させる事で sRAGE タンパクの発現を Western blot で確認した。



2 種類の cDNA を組み込んだ Plasmid を HEK293 細胞に添加し、sRAGE の発現を確認した。

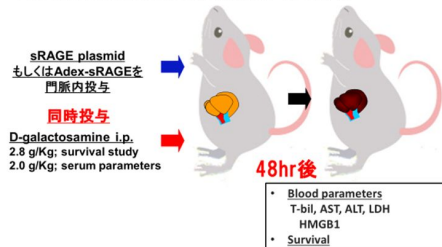
Plasmid を用いた TNFα 抑制試験



sRAGE Plasmid を用いて TNF 抑制試験を行い、sRAGE 添加群において有意に TNF を抑制する結果となり、invitro での生理活性を確認した。

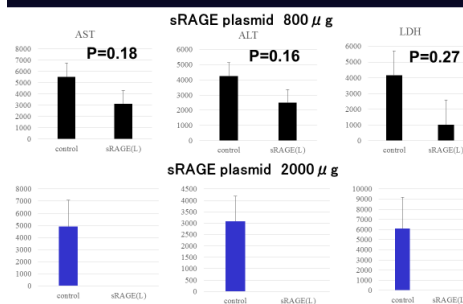
ラット急性肝不全モデルに対する sRAGE 導入効果

- Male Wistar rats, 200-300g
- D-galactosamine による薬剤性急性肝不全モデル

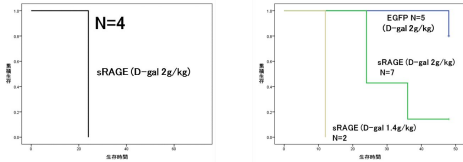


ラットにおける治療効果を検討した結果を以下の図に示す。

ラット急性肝不全モデルに対する sRAGE 導入効果



sRAGE Plasmid を 800 μg 門脈内注射した結果では上図のように肝逸脱酵素の低下傾向を認めたが現段階では有意差を認めていない。したがって現在は plasmid の投与量を増やして再実験を検討している段階である。



また生存率に関する実験では上図に示す通りであり、sRAGE 投与群で早期に死亡する結果であった。現在原因検索を行い、今後の実験計画を検討している。

#### 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1件)

北川雄光, 竹内裕也, 篠田昌宏, 熊谷厚志, 松田諭. 外科侵襲学と腫瘍学のストローク 病態解明と治療応用を求めて. Shock 30(2):9-13. 2015.01 (査読無)

〔学会発表〕(計2件)

篠田昌宏, 溝田高聖, 雨宮隆介, 西山亮, 高柳淳, 島田薫, 海老沼浩利, 尾原秀明, 板野理, 北川雄光. HMGB1 targeting therapy for acute liver failure. 第71回日本消化器外科学会総会 アステイトくしま(徳島県徳島市), 2016.7.14

篠田昌宏, 溝田高聖, 雨宮隆介, 西山亮, 大島剛, 高野公德, 島田薫, 山田晋吾, 宮庄拓, 高柳淳, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 丸山征郎, 北川雄光. 核内蛋白 high-mobility-group box1 制御による急性肝不全治療法の開発. 第22回外科侵襲とサイトカイン研究会 京都市国際交流会館(京都府京都市), 2015.12.12

〔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:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

篠田昌宏 (Shinoda Masahiro)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50286499

##### (2) 研究分担者

高柳淳 (Takayanagi Atsushi)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号: 80245464

雨宮隆介 (Amemiya Ryusuke)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 60626696

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

( )