

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21373

研究課題名(和文) 血液線維素溶解系による実質臓器の炎症性疾患の制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Development of new therapy of inflammatory diseases in parenchymal organs by fibrinolytic pathway

研究代表者

田代 良彦 (TASHIRO, Yoshihiko)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：20636245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な急性肝炎マウスモデルの作成し、線維素溶解系(線溶系)線溶系の役割を解明し、新規治療法の開発を行なった。

急性肝炎の病態形成において、凝固および線溶系因子の活性と各種MMPs(matrix metalloproteinase)の活性化が明らかになった。それらの各種遺伝子欠損マウスで急性肝炎の病理所見などが改善していたことから、線溶系の亢進に伴うMMP活性が急性肝炎の病態を制御していることが明らかになった。そして、線溶系因子のplasminを阻害する新規薬剤YO-2の投与することで、急性肝炎モデルマウスでは炎症性サイトカインが抑制され、急性肝炎を制御することができ、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We prepared a severe acute hepatitis mouse model, elucidated the role of fibrinolytic system, and developed new therapy.

In the pathogenesis of acute hepatitis, the activity of coagulation and fibrinolytic factors and the activation of various MMPs (matrix metalloproteinase) were revealed. Since pathological findings of acute hepatitis were improved in these gene-deficient mice, it was revealed that MMP activity accompanying enhancement of fibrinolytic system controls acute hepatitis pathology. By administering a novel drug YO-2 that inhibits the fibrinolytic factor plasmin, inflammatory cytokines are suppressed in acute hepatitis model mice, acute hepatitis can be controlled, and future clinical applications are expected.

研究分野：消化器外科

キーワード：Plasmin 炎症性疾患 MMP-9 線維素溶解系

1. 研究開始当初の背景

急性肝炎や急性膵炎が劇症化や重症化した場合、劇症肝炎で約70%、重症急性膵炎で約10%と未だに高い致死率となっている。重症化や劇症化にはサイトカインストームの発生がその一因と考えられている(J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2002)。内科的治療では炎症反応の抑制を目的とした副腎皮質ステロイドや白分解酵素阻害剤の投与が行われるほか、炎症性サイトカイン除去目的で血漿交換や血液透析が行なわれているが、抵抗性となることが多く、患者救命にとって重症化や劇症化阻止は重要課題である。

急性肝炎・膵炎の病態に関与するサイトカインとしては、TNF- α 、Fas-ligand、CD40-ligandが示唆されている。これらは細胞外マトリックスの構成分子を基質とするマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)あるいはADAM(a disintegrin and metalloprotease)ファミリーと呼ばれる金属要求性蛋白分解酵素群による細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)によって産生されていることが解っており(Leuk Lymphoma,2000)、病勢を制御している可能性が示唆されている(Hepatogastroenterology,2012)。

一方、これら炎症性サイトカインの末梢血や組織への供給源として、主に炎症性細胞である顆粒球、マクロファージであることが知られている。そして、これら炎症性細胞が末梢血や組織中へ動員および浸潤する過程で、各種MMP・ADAMが活性化されていることが判明している(Cell,2002)。このことから各種MMP・ADAMがサイトカイン分泌、炎症性細胞浸潤の双方を制御している可能性が示唆されている。

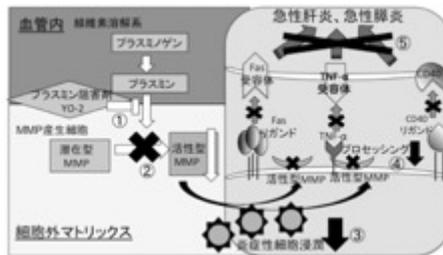
そして近年、線溶系因子であるプラスミンによりMMPの活性化が制御されていることが判明している(Cell Stem Cell,2007)。これまで申請者は、今回使用予定であるプラスミン阻害剤YO-2を用いたマウス実験で、MMPの活性化を抑制することでサイトカイン分泌、炎症性細胞の組織内浸潤を抑制することに成功した(Ishihara M, Tashiro Y Leukemia 2012、Sato A, Tashiro Y Leukemia 2014)。このことから、プラスミン阻害剤を投与することで、MMPなどのプロテアーゼ活性を抑制し、炎症性細胞浸潤とサイトカイン分泌の両面に作用し、急性肝炎・膵炎の炎症反応の抑制に寄与するとの仮説に至った(図1)。

この仮説のもと、申請者らは急性肝炎モデルマウスの作製に成功し、プラスミン阻害剤を投与したマウスはコントロール群と比較して有意に生存率が改善、臓器への炎症性細胞浸潤の抑制および炎症性サイトカインの血中濃度の低下を確認した。さらに、線溶系因子あるいはMMP-9遺伝子欠損マウスを使用した急性肝炎マウスモデルでも同様の結

果を既に得ている。

そして、この研究成果をさらに発展させて、より確かなエビデンスに基づき臨床に役立つ。

図1 プラスミン阻害による急性炎症制御イメージ



2. 研究の目的

急性肝炎・急性膵炎など実質臓器の急性炎症重症化の一因に、サイトカインストームの発生があることが知られており、サイトカインの抑制および除去を目的とした、内科的ならびに外科的治療法が開発されている。しかしながら未だ致死率も高く、新規治療法の開発は急務と言える。

本研究課題の第一の特色は、多くの炎症性サイトカインの分泌機構に注目した点である。その主体となるMMP・ADAM活性の制御によるサイトカイン分泌、そして白血球動員を抑制することによる急性炎症病勢の沈静化というコンセプトは、申請者のこれまでの研究成果の延長線上にあるもので、急性肝炎・急性膵炎病態解明へのアプローチとして世界で唯一の研究となる。さらに新規標的となる線溶系の急性肝炎・膵炎における役割についても不明な点が多く、先例のない希少な研究課題と考えられる。

結果として、急性肝炎・膵炎病態における線溶系因子群、およびMMP等のプロテアーゼ活性の機能解明がなされ、血液凝固・線溶系と実質臓器の炎症との間に見いだされた関連性により、両分野の研究者の新たな交流が始まる。そして新しい分子標的治療、補助療法のアイデアが創出される可能性があり、よりリスクの少ない新たな急性肝炎・急性膵炎の治療法開発が進み、現在劇症肝炎の約50%、急性膵炎の約10%に存在する内科治療抵抗性な症例に対して、代替療法が創出される可能性がある。

本研究は、急性肝炎・膵炎に対する線溶系阻害剤を利用したMMP活性低下と炎症性サイトカイン分泌抑制による急性肝炎・膵炎の新規治療法の開発と、臨床応用に向けた精査を目的とする。

そして、本研究課題の結果によって、基礎的・臨床的の両面において有用な研究で、豊かな国民生活に必ず寄与するものであるとした。

3. 研究の方法

急性肝炎、急性膵炎の劇症化、重症化による死亡率の改善に向けて、本研究では新規治療薬であるプラスミン阻害剤を用い、最終ゴールを臨床応用の実現化と設定して研究を行う。このゴール達成に向けて、次の①～③を設定して戦略的にアプローチする。

①プロテアーゼ活性化のトリガー因子とプロテアーゼ産生に関わっている細胞の特定と解析、

②各種炎症性細胞の働きについて解析を行う。

③副作用や毒性など臨床応用に向けた解析を行う。

以上を3カ年計画で行いプラスミン阻害剤を新規治療薬として確立するために実験を行なった。

以下に、具体的な実験方法を記載する。

1) 急性肝炎・急性膵炎モデルマウスとプラスミン阻害剤 YO-2 について

急性肝炎、急性膵炎モデルは様々ありますが、急性肝炎の薬剤誘発モデルはこれまでと同様に TLR のアゴニストである CpG DNA と D-Galactosamine を投与して作製し、これを実験モデルとして利用する(Ae-Kyung Yi et al., *J Bio. Chem.* 281 : 15001-15012, 2006)。急性膵炎の薬剤誘発モデルはセルレインを投与して作製し実験モデルとする(Sharif R et al. *Gut.* 58 : 813-9, 2009)。プラスミン阻害剤である YO-2(Okada Y et al., *Bioorg Med Chem Lett.*,10:2217-21, 2000)はこれまでと同様に腹腔内投与(4mg/kg/day 連日)で実験を行う。YO-2 は神戸学院大学薬学部との MTA に基づき東京大学医科学研究所より供与を受けた。

2) プロテアーゼを中心とした病態機構の解析

申請者らは、線溶系因子あるいは MMP-9 遺伝子欠損マウスを使用した急性肝炎マウスモデルを作製したところ、血中の各種炎症性サイトカイン濃度(TNF- α 、Fas-ligand, CD40-ligand など)が抑制されることを確認した。このことから、肝炎病態に関与する炎症性サイトカインの多くが各種 MMP の活性化に伴い末梢血中へ産出されていることが考えられた。

しかし、何がこれらのプロテアーゼ活性化のトリガーになっているのか、またどのような細胞がこうしたプロテアーゼ産生に関わっているのかが分かっていない。それらを確認するために肝臓・脾臓など各種臓器から各種細胞を得てフローサイトメトリーを用いて解析を行う。プロテアーゼの濃度は ELISA 法、Western blotting 法、Gelatin Zymography 法を用いて評価する。また、臓器の組織切片を用いて、各種プロテアーゼの免疫組織染色を行い、関連する細胞との肉眼的な関係を調べた。

以上を実施して、急性炎症と線溶系因子、プロテアーゼ活性との関係を明らかにすべく研究を行なった。

3) 各種炎症性細胞の機能解明

線溶系因子あるいは MMP-9 遺伝子欠損マウスを使用した急性肝炎マウスモデルの臓器組織の病理所見でも炎症の鎮静化傾向が認められた。そして病理組織観察・精査及び各種臓器組織浸潤細胞群のフローサイトメーター解析から肝臓・脾臓への炎症性細胞の浸潤が抑えられていることも判明した。そこでサイトカインの供給源が炎症性細胞(骨髄由来細胞)であること、また炎症性細胞の浸潤に関係している各種ケモカイン(CCL2 など)を調べるためにフローサイトメーターを使用する。各モデルマウスの末梢血と肝臓、脾臓をホモジナイズした lysate を各種サイトカイン・ケモカインと顆粒球(主にマクロファージ、好中球)マーカーで染色してフローサイトメトリーを行う。肝臓と脾臓の病理組織標本作製し免疫組織染色で肉眼的に局所における各種サイトカイン・ケモカインと炎症性細胞の関係を調べた。

4) YO-2 の臨床応用に向けた至適投与量の決定、副作用、毒性などの精査

プラスミン阻害剤 YO-2 がマウス体内で線溶系因子へ影響するかを調べる。plasmin が血栓の溶解に重要な役割を果たしていることから、第一に血栓症のリスクが増大する可能性があることに留意しなければならない。容量依存性にそのリスクは増大していくと考えられるため、各種凝固線溶系の血液データ(D-Dimer, FDP など)や血管や各種臓器の病理組織標本作製し、HE 染色、免疫染色して血栓の存在を調べ、治療効果を判定しながら至適投与量の決定を行うと同時に YO-2 独自による各種副作用の発生を調べた。

5) YO-2 と既存の治療法の治療効果の比較および併用療法による評価

既存の内科的治療法である副腎皮質ステロイドや蛋白分解酵素阻害剤と比較して高い治療効果が得られるか確認する。また、それら既存の内科的治療薬や炎症性サイトカイン除去を目的とした血漿交換や血液透析を併用することで更なる治療効果を得られるか評価した。

上記計画の中の実験では、適宜サイトカインの測定や病理標本作製など外部委託出来る部分は委託した。

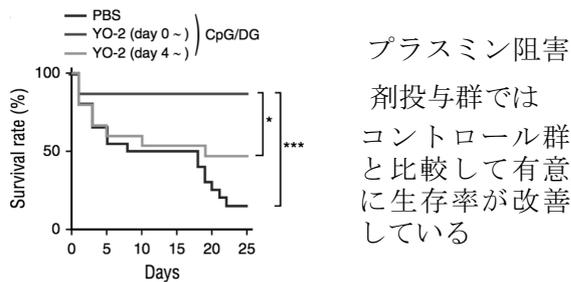
6) 研究は所属機関である順天堂で行なう。主に申請者が研究の遂行、データ解析および総括を行うが、大学院生や実験助手と協力して研究を行なった。また、申請者の所属長の坂本一博教授と YO-2 の供給先である東京大学医科学研究所の服部浩一准教授と議論を行いながら、慎重に研究を遂行した。

4. 研究成果

今研究では、Toll like receptor-9 agonist (CpG-ODN 1826) に加え、D-galactosamine を C57BL/6 mice に複数回投与することで、重篤な急性肝炎の病態を誘導するマウスモデルの作成に成功した。そして、その病態形成において、凝固の活性化だけでなく、線溶系の主因子である plasmin の活性化 および 各種 MMPs (matrix metalloproteinase) の活性化が見られることを明らかにした。次に急性肝炎の病態におけるこれらの因子の機能解析を行うため、plasminogen 遺伝子欠損マウスおよび MMP-9 遺伝子欠損マウスを用いて急性肝炎モデルを作成したところ、これらの遺伝子欠損マウスでは、野生型と比較し、生存率の改善および肝臓の病理所見の改善を認めた。そこで、plasmin の活

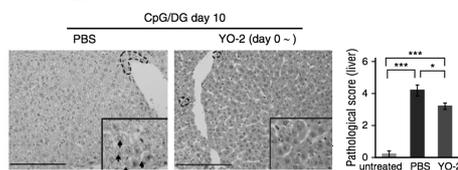
性中心を阻害する新規薬剤 Y0-2 の投与による急性肝炎の病態制御を試みた。Y0-2 の投与によって、TNF- α ・Fas-L などの各種炎症性サイトカインの産生および CCL2 などの各種炎症性ケモカインの産生が抑制され、生存率が有意に改善した(図2、Blood. 2017より引用)。

図2 急性肝炎モデルの生存率



また Y0-2 は plasmin 活性阻害を行うことで MMP-9 の活性化を阻害しており、その結果各種炎症性細胞の動員および組織浸潤が抑制されていることが明らかになった(図3、Blood. 2017より引用)

図3 急性肝炎モデルの病理組織像



プラスミン阻害剤を投与された群では、炎症性細胞の浸潤が制御され、組織構造が維持されている。

また凝固の活性化がみられるような病態において Y0-2 の投与が血栓傾向を助長する可能性も十分に考えられたが、今回のマウスを用いた実験では、Y0-2 の介入による明らかな血栓症の増加は認めなかった。上記の内容を論文化し、Blood に投稿し、2017年に Accept

された(Shimazu H et al. Blood)。

これまで、plasmin を始めとする線溶系因子群はフィブリンを溶解する働きとしての側面はよく知られていたが、今回の急性肝炎モデルにおける線溶系の病態解析から、線溶系因子群の活性化が各種炎症性疾患の病態形成に重要な役割を持つことが示唆された。

今後は、実質臓器である膵炎や、脳、腎臓、肺などと言った臓器の炎症性疾患の新規治療法への開発も期待される結果となり、継続して研究を行なっていく予定である。

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 7 件)

- ① Shimazu, H., Munakata, S., Tashiro, Y., Salama, Y., Dhahri, D., Eiamboonsert, S., Ota, Y., Onoda, H., Tsuda, Y., Okada, Y., Nakauchi, H., Heissig, B. and Hattori, K.
Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality in a murine model of macrophage activation syndrome. *Blood*. 130(1):59-72, 2017. doi:10.1182/blood-2016-09-738096. 査読あり
- ② Honjo K, Munakata S, Tashiro Y, Salama Y, Shimazu H, Eiamboonsert S, Dhahri D, Ichimura A, Dan T, Miyata T, Takeda K, Sakamoto K, Hattori K, Heissig B.
Plasminogen activator inhibitor-1 regulates macrophage-dependent postoperative adhesion by enhancing EGF-HER1 signaling in mice. *FASEB J*. 31:2625-2637, 2017. doi:10.1096/fj.201600871RR. 査読あり
- ③ Dhahri D, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Nishida C, Tashiro Y, Munakata S, Shimazu H, Salama Y, Eiamboonsert S, Nakauchi H, Hattori K, Heissig B.
Fibrinolytic crosstalk with endothelial cells expands murine mesenchymal stromal cells. *Blood*. ;128:1063-75, 2016. doi:10.1182/blood-2015-10-673103. 査読あり
- ④ Heissig B, Eiamboonsert S, Salama Y, Shimazu H, Dhahri D, Munakata S, Tashiro Y, Hattori K.
Cancer therapy targeting the fibrinolytic system. *Adv Drug Deliv Rev*. 99:172-179. doi:10.1016/j.addr.2015.11.010. 査読あり

〔学会発表〕（計 4 件）

① 第 79 回日本血液学会学術集会

2017 年 10 月 21 日

血球貪食症候群の病態における線溶系の機能解析

島津浩、宗像慎也、田代良、高橋強志、中内啓光、Heissig Beate, 服部浩一

〔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〕

ホームページ等

順天堂大学下部消化管外科学講座 HP

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/lab-oratory/labo/kabusyokakan/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 良彦 (TASHIRO, Yoshihiko)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：15K21373

(3) 連携研究者

服部 浩一 (HATTORI Koichi)

東京大学大学院・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：10360116

(4) 研究協力者

坂本 一博 (SAKAMOTO Kazuhiro)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60205763