

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19956

研究課題名(和文) 腹腔内癒着における凝固線溶系からみた病態解明

研究課題名(英文) Mechanism of small bowel adhesion correlated with fibrynolytic system

研究代表者

宗像 慎也 (Munakata, Shinya)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50758761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腹部外科手術後の腹腔内癒着のメカニズムについて実験を行った。PAI-1の遺伝子欠損および阻害薬では、PAI1の活性化は抑制され、tPA、Plasminの活性化が認められ、線溶系の促進により癒着が解消された。癒着組織にはマクロファージ(Mq)、T、B細胞の浸潤が認められた。Rag2欠損マウスやクロドロン酸を用いることで、Mqがもっとも癒着に関与する細胞であった。PAI1によりMqの動員が誘導された。またMqはEpidermal growth factor(EGF)の分泌に関与していた。PAI1は腹膜上皮中皮細胞が担当しており、中皮細胞上でEGFRを介して強固な癒着が形成される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adhesive small bowel obstruction remains a common problem for surgeons. Fibrin degradation is important by tPA and plasmin. Peritoneal adhesion was induced by gauze deposition and tPA and PAI1 deficient mice were used. Mice were treated with the novel PAI1 inhibitor, TM5275. Some animals were treated with clodronate to deplete macrophages. Epidermal growth factor (EGF) experiments were performed to understand the role of macrophages and how EGF contributes to adhesion. Genetic and pharmacologic PAI1 inhibition prevented progression of adhesion and increased plasmin. PAI1, in combination with tPA, served as a chemoattractant for macrophages that, in turn, secreted EGF and up-regulated the receptor, HER1, on peritoneal mesothelial cells, which led to PAI-1 secretion. Controlled inhibition of PAI-1 not only enhanced activation of the fibrinolytic system, but also prevented recruitment of EGF-secreting macrophages.

研究分野：消化器外科

キーワード：PAI 癒着 tPA イレウス EGF

1. 研究開始当初の背景

外科の臨床において、腹部手術術後の頻度の高い合併症である腸閉塞は、腸管同士もしくは、腸管と腹壁、各臓器への癒着が原因で生じる。癒着によって生じた腸閉塞により、患者はしばしば嘔吐、腹痛を起こし、入院加療が必要となる。治療はイレウス管による腸管の減圧が一定の治療効果を示すが、難知例は癒着剥離術を行うケースも少なくはない。また一旦減圧しても再燃を認めることが多く、生涯、腸閉塞症状を繰り返す症例も多い。現在、初回手術時に癒着防護フィルムを貼付することが保険収載され認められているが、腹壁と腸管の癒着のみで効果は限定的で、生物科学的に腹腔内全体的に癒着を防止することが外科手術における重要な課題である。

癒着には手術による出血後に血小板による集積である一次止血，凝固因子により2次止血が関与することが解明されてきている。また止血を完了させるためには Plasmin を主体とした線溶系を抑制する必要がある。Plasmin は Fibrin を Fibrin degradation product(FDP)への分解を担当しており、plasmin は tissue-plasminogen activator(tPA) や urokinase-type plasminogen activator (uPA) によって plasminogen から産生される。さらに tPA、uPA の阻害因子として Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)が存在し、術後血小板から PAI1 が分泌され、tPA、uPA を抑制することによって Plasmin の産生を減らすことによって線溶系の抑制が完了する。Fibrin が沈着した組織には骨髓由来の好中球、マクロファージや T 細胞、B 細胞といった炎症細胞や線維芽細胞、そして筋線維芽細胞が動員され、各種成長因子の分泌により強固な癒着が形成される。癒着を防止するためにはこの術後早期におこる Fibrin の沈着を解消する必要がある。tPA、uPA は脳梗塞や心筋梗塞、腸管虚血などの血栓症で広く臨床応用されているため、過去には動物

実験において tPA や uPA をマウスに投与することで癒着が改善することが報告されている(Hill-West JL, J Surg Res, 1995)。しかしながら脳梗塞において tPA 後の脳出血などが臨床上問題となっており、術後出血のリスクがある腹部手術の術後に使うには忍びない現状である。

腸管癒着に関連する炎症細胞は、腹腔内マクロファージが重要な癒着形成細胞であるとの報告(Akiyoshi, J Immuno, 2007)や PAI-1 が腹水中における重要な細胞集団であるマクロファージの遊走因子であることが共同研究者である市村らにより報告されている(Ichimura A, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013)。またマクロファージは Fibrin 下において形態を変化させることがこれまで論じられており(Akassaoglou, PNAS, 2004), なんらかの応答をマクロファージがしていることがわかっている。

癒着を形成する成長因子は過去の文献上、Hepatocyte growth factor (HGF) により PAI-1 を間接的に標的にした治療が、癒着改善に寄与したとの報告 (Kosaka H, Nat med, 2008) や、Epidermal growth factor(EGF)や Fibroblast growth factor(FGF)などが関連するとの報告があり、こういった成長因子と炎症細胞との関連性も判明していない。

2. 研究の目的

閉腹時にメッシュ用の癒着防止剤を現在使用するしか癒着を防止する手段がない中、また tPA、uPA がなかなか癒着防止としては使いつらい背景に対して PAI-1 を標的とすることで、内在性の tPA を亢進させることにより Fibrin の分解を助長し癒着を未然に防止することを期待している。これまでの研究で抗 PAI-1 抗体が癒着防止に有効であったとの報告(Falk K, Br J Surg, 2001)があり、抗体は高価であることから、共同研究者である東北大学から提供をうけた TM5275 による PAI-1 阻害薬は十分癒着防止剤としての可能性が

あると考えられる。この TM5275 は tPA と PAI-1 の結合を阻害する低分子化合物である。そしてそれが有害事象なく、抗体治療に比べ、安価で臨床応用可能であることも視野にいられている。それに加えて、癒着を形成するメカニズムを紐解くことも目的としており、動員される炎症細胞そして炎症細胞が凝固線溶系の因子とどのようにかかわっているのか、またどういった因子を分泌するかまで精査する。

これまでに PAI1 阻害薬以外にも血小板凝集阻害薬 エノキサパリンや Epidermal growth factor receptor inhibitor (EGFR 阻害薬)を使用することによってどの因子が優れているかをこれまで検証してきた。

PAI - 1 を阻害することによって tPA, uPA を介し、線溶系を亢進されることによって癒着が解消される、ないし PAI-1 との炎症細胞との関連性を精査しつつ、癒着部位に集積してきた細胞とのクロストークについて関連性を精査することに本研究の目的がある。

3 . 研究の方法

新たに開発したマウスにガーゼを用いた新規癒着モデルを作成し、癒着に寄与する因子を同定した。癒着における程度を score0 - 5 で評価した。また癒着組織に動員された細胞について免疫染色および Fluorescence-activated cell sorter(FACS)を用いた解析を行った。代表的な線溶系因子 tPA、PAI-1、Plasmin については遺伝子欠損マウスを用いることや、その阻害薬を使用することによって癒着の解消状況を観察した。それら欠損マウスないし、阻害薬が有意に線溶系因子を抑制していることを Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)により確認した。また術後の出血が助長されないか、有害事象の観察も重要であり、腹水中のヘモグロビンや血清のヘモグロビンも測定した。癒着組織に動員された細胞についてはどの細胞が最も重要である

か、T 細胞、B 細胞の欠損した Recombination activating gene(RAG)-2 欠損マウスやクロロロン酸によるマクロファージ阻害試験を使用することで欠損させ、癒着の程度を評価した。またマクロファージ欠損にて線溶系の活性状態も評価した。

また過去の報告にあるように PAI-1 がマクロファージの遊走因子であるか、Migration assay を用い線溶系因子との関連性を解析した。またマクロファージなどの炎症細胞がどのような癒着形成因子 {EGF、FGF-2、platelet-derived growth factor(PDGF)、transforming growth factor(TGF-β)}などを分泌しているかを腹水から炎症細胞を採取し、FACS を用いて分離させ、遺伝子発現レベルを同定した。さらにこれら成長因子が腹膜中皮細胞や線維芽細胞や筋線維芽細胞など癒着構成細胞へのどのような働きかけを行うのかを in vitro の実験で確認した。

その他に腹腔内細胞と Fibrin の作用機序を解明するために、Fibrin plate もしくは Fibrinogen 添加により、マクロファージ細胞株である RAW 細胞もしくはマウス腹腔内マクロファージを用い、マクロファージの接着因子である各種 integrin family の解析や EGF、FGF などの成長因子の分泌について測定した。さらに線溶因子ないし阻害薬を用いることで、in vitro における成長因子の分泌が阻害可能であるかについて確認した。

4 . 研究成果

ガーゼによる新規癒着モデルは再現性のある癒着を形成しており、術後早期に PAI-1 の上昇を認めていた。外科侵襲に伴い線溶系因子 Plasmin が PAI-1 により抑制されることが示された。癒着組織にはガーゼと腸管ないし、腹膜が強固に癒着しており、弾性線維と膠原線維の増生が認められた。

PAI-1 遺伝子欠損マウスでは、癒着がまったく発症しないことが判明した。また東北大学

から提供された PAI-1 阻害薬でも同様の効果を認めた。PAI-1 の遺伝子欠損および PAI-1 阻害薬では、PAI-1 の活性化は抑制され、tPA、Plasmin の活性化が認められ、線溶系の促進をもたらすことで癒着が解消されることが判明した。しかしながらこの PAI-1 阻害効果は tPA 存在下でないとは働かず、tPA 欠損マウスにおいては PAI-1 阻害薬を投与しても癒着は改善しなかった。この tPA 欠損マウスでは Plasmin の活性が認められなかったことから腸管癒着には tPA が重要であり、uPA の効果は乏しいことが判明した。

しかしながら PAI-1 遺伝子欠損マウスでは損傷治癒過程である癒着がもたらされないことで腹腔内出血の可能性が示唆され、ヘモグロビンの低下を認めた。しかしながら PAI-1 阻害薬では、癒着の改善は遺伝子欠損マウスほどではないものの腹腔内出血は認められなかった。癒着組織には腹水中および癒着組織にマクロファージ、T、B 細胞などの炎症細胞の浸潤が認められていた。また遺伝子欠損 PAI-1 マウスでは炎症細胞の浸潤が認められなかった。そこで Rag-2 欠損マウスやクロドロン酸を用いることで、マクロファージがもっとも癒着に関与する細胞であることが示唆された。このクロドロン酸下では PAI-1 の抑制は認められたものの、tPA、Plasmin の活性は認められなかった。よって PAI-1 には線溶系を介さずに癒着を改善させる機序が存在することがわかった。

腹水中における PAI-1 は血清量よりも多く、PAI-1 によりマクロファージの腹腔内の動員がされ、PAI-1 による遊走が PAI-1 阻害薬によって抑制された。また In vitro でも tPA、PAI-1 の存在下でマクロファージの遊走が確認された。つまり PAI-1 には線溶系の亢進のほかにもマクロファージを動員させ、癒着を強固にさせる働きがあることが解明した。しかしマクロファージにも存在する骨髄細胞マーカーの CD11b 抗体存在下では tPA、

PAI-1 の効果は減弱した。tPA、PAI-1 存在下では CD11b の発現量はかわることはなかったが、CD11b も tPA、PAI-1 の遊送に重要であることが解明した。さらにどのようなシグナルが動員にかかわるかを精査したところ、過去の文献では CD11b を介し、RAS-related C3 botulinus toxin substrate(Rac)-1 が関与するといった報告も認められたが、本実験では Focal adhesion kinase(FAK)が tPA や PAI-1 存在下に関与することが判明した。

次にマクロファージは免疫染色による EGF の分泌に関与していることが判明し、また腹水マクロファージを FACS にて採取したところ、EGF の mRNA レベルが上昇していることが判明した。そのほかに癒着形成に重要とされる TGF- β や FGF-2 などは上昇が認められなかった。

この EGF-EGFR シグナルを EGFR 阻害薬を用い、投与することによって癒着が解消された。よってマクロファージの分泌する EGF のシグナルが癒着形成に重要であることが解明された。これまでに PAI-1 は一時止血でも重要な血小板や腹膜上皮である中皮細胞が分泌を担当していることがわかっている。そこで本実験では腹膜中皮細胞を primary culture をし、EGF を添加することにより PAI-1 の上昇を認め、また EGFR の上昇を認めたために腹膜中皮細胞の PAI-1 の分泌もマクロファージを介し、EGF-EGFR シグナルにより癒着組織を形成する重要なメカニズムであることが示唆された。さらに腹膜中皮細胞を EGF で刺激した上清に tPA を加えることで、マクロファージの遊走が可能となり、また PAI-1 阻害剤や EGF の刺激を欠くと遊走しないことがわかった。

Fibrin プレートでのマクロファージの解析ではマクロファージの形態は変化したものの、とくに成長因子の分泌とは関係は認めら

れなかった。

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) Munakata S, Sugimoto K, Honjo K, Kawai M, Kawano S, Kamiyama H, Ouchi M, Takahashi M, Tomiki Y, Sakamoto K. Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Factor in Incurable Stage IV Colorectal Cancer. Open Journal of Gastroenterology. 2018;08(02):45-56.
- 2) Ro H, Munakata S, Ueyama Y, Komiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Tomiki Y, Sakamoto K. Pharmacological Targeting of Neutrophil Serine Proteases Prevents Lethality in Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. Journal of Gastrointestinal & Digestive System. 2018;8(1).
- 3) Shimazu H, Munakata S, Tashiro Y, Salama Y, Dhahri D, Eiamboonsert S, Ota Y, Onoda H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality in a murine model of macrophage activation syndrome. Blood. 2017.
- 4) 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. The FASEB Journal. 2017:fj.201600871RR

[学会発表] (計 1 件)

Munakata S, Honjo K, Sakamoto K, Hattori K, Heissig B. PAI-1 is therapeutic target

molecule for prevention of postoperative adhesion formation. DDW 2018

Washington.DC.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 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 1 件)

名称 : 術後癒着モデル及びその作成方法
発明者 : 本庄 薫平、宗像 慎也、小見山 博光、坂本 一博
権利者 : 本庄 薫平、宗像 慎也、小見山 博光、坂本 一博
種類 :
番号 : 特開 2016-086753
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

宗像 慎也 (MUNAKATA, Shinya)
順天堂大学・医学部・下部消化管外科 助教
研究者番号 : 50758761

(2) 研究分担者

Beate Heissig
順天堂大学・医学研究科・客員准教授
研究者番号 : 30372931

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()