

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17076

研究課題名（和文）急性肝不全モデルにおけるトロンボモジュリン製剤の効果増強作用

研究課題名（英文）Enhanced effect of recombinant human soluble thrombomodulin by ultrasound irradiation in acute liver failure

研究代表者

星野 耕大 (Hoshino, Kota)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：40762266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では急性肝不全モデルに対してトロンボモジュリン製剤投与後に肝臓に超音波を経皮的に照射した。トロンボモジュリン製剤投与後に超音波を照射する群は、トロンボモジュリン単独群と比較して血漿中AST、ALT、HMGB-1値は有意に低かった。また病理学的検討においてもトロンボモジュリン製剤に超音波照射を加えることで、肝傷害やアポトーシスは有意に改善を認めた。一方で肝組織内におけるトロンボモジュリン製剤の濃度に変化は認められなかった。結論として、急性肝不全モデルにおいて、超音波照射はトロンボモジュリン製剤の効果を増強させる作用が確認された。一方でメカニズムの解明には追加検討を必要とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、超音波照射がトロンボモジュリン製剤の効果を増強させる効果が認められた。トロンボモジュリン製剤は副作用である全身の出血合併症が問題となり、高用量の投与は危険である。そのため低用量のトロンボモジュリン製剤に超音波照射を加えることで、副作用のリスクを抑えた上で、効果を最大限に引き出すことができるため、理想的な治療法となる。また、超音波はすでに日常診療で広く用いられているため、臨床への応用は極めて容易である。さらには、他の薬剤にも応用できる可能性があり、超音波の新たな活用法を切り開いた意義ある研究である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to determine the enhancement effect of US irradiation on recombinant human soluble thrombomodulin (rhsTM) in acute liver failure (ALF). rhsTM (1 mg/kg) and US (1 MHz, 0.3 W/cm<sup>2</sup>) were irradiated to the liver of lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced ALF mice model. The post-treatment aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and high-mobility group box 1 levels were significantly lower in the rhsTM + US group than in the rhsTM alone group. Histopathological findings revealed significantly reduced liver injury and apoptosis in the rhsTM + US group. By contrast, US irradiation had no effect on rhsTM and TNF- $\alpha$  concentration in the liver tissue. In conclusion, US irradiation enhanced the effect of rhsTM in the ALF mice model. However, further studies must be conducted to determine the exact mechanism of such enhancement effect.

研究分野：集中治療

キーワード：超音波 急性肝不全 トロンボモジュリン ソノポレーション

## 1. 研究開始当初の背景

急性肝不全(acute liver failure: ALF)は tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを惹起させることで肝臓に炎症を引き起こし、肝細胞が機能不全となる病態である。ALFは急激に肝機能を低下させるため、約 30%は肝移植が必要となり、生存率 67%の予後不良な病気の一つである。

recombinant human soluble thrombomodulin (rhsTM) は disseminated intravascular coagulation (DIC)の治療薬として臨床で広く使用されている抗凝固薬である。この rhsTM は抗凝固作用のみならず、rhsTM のレクチン様ドメインが HMGB-1 (High Mobility Group Box-1) を吸着、分解し、更には protein C を活性化することで TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを抑制することで抗炎症作用を併せ持つ。Osumi らによると ALF マウスモデルに対して rhsTM を投与することで、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを抑え、肝障害を軽減させ、予後が改善したと報告している。

超音波は画像診断として臨床で広く用いられているが、近年は治療の手段として使用できる可能性が広がっている。中でも、低出力超音波が照射された際に細胞に一過性の小孔が形成される現象を sonoporation と言い、この小孔から薬物が細胞内に取り込まれることにより、薬剤透過が促進され薬剤吸収率が高まる報告がある。つまり、超音波照射によって薬剤の効果増強作用が期待されている。

## 2. 研究の目的

今回、ALF モデルマウスに対して rhsTM を投与後に肝臓に超音波照射を行うことで rhsTM の効果が増強するかを検討する。

## 3. 研究の方法

### アニマルモデル

モデルは C57BL/6 のマウス 8 週を用い、lipopolysaccharide (LPS) 4  $\mu$ g/kg と D-galactosamine (GalN) 600 mg/kg を腹腔内投与し、ALF モデルを作製した。Normal、Placebo、rhsTM 1mg/kg、rhsTM 5mg/kg、rhsTM 1mg/kg+US、rhsTM 5mg/kg+US の群に分類し、各 5 匹ずつで検討を行った。rhsTM はモデル作成から 30 分後に尾静脈に投与し、超音波照射は rhsTM 投与直後にマウスの腹部を剃毛した上で Intensity 0.3 W/cm<sup>2</sup>, Duty 50%, 60 秒間の設定で経皮的に肝臓へ照射した。モデル作成から 7 時間後に血液及び肝組織を採取した。

### 血漿中の肝酵素・HMGB-1 の検討

採取した血液検体は 4 $^{\circ}$ C、3000rpm、15 分間で遠心分離を行い、血漿を分離した。ELISA 法を用いて血漿中 AST、ALT、HMGB-1 を測定し、各群間で比較検討した。

### 肝組織の病理学的検討

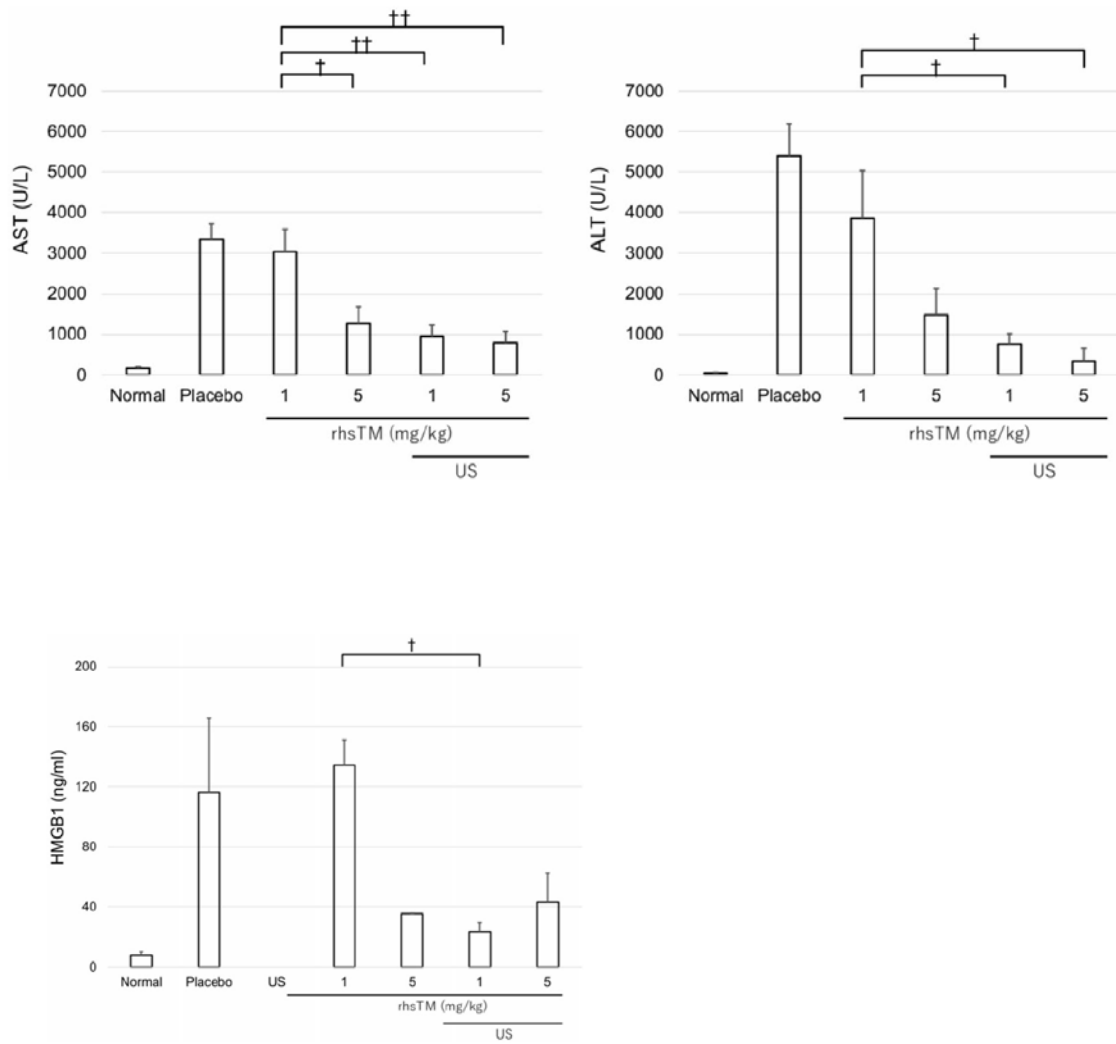
肝左葉を摘出し、摘出した肝臓はホルマリンで固定し、パラフィン固定後に 3 $\mu$ m の薄さで切片を作成した。組織標本は HE 染色の後に histological score で肝障害度、TUNEL 染色の後に TUNEL 陽性細胞数でアポトーシスを評価し、各群間で比較検討した。

### 肝組織中の rhsTM 濃度

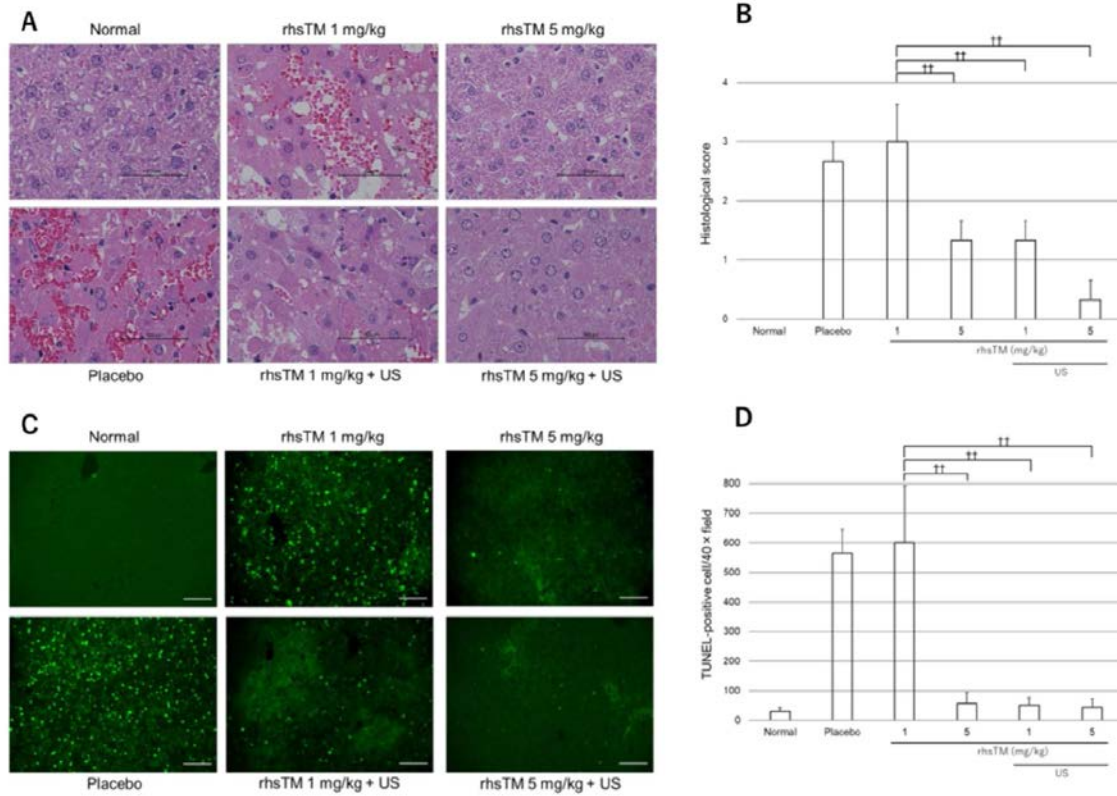
肝組織をホモジナイズさせ、ELISA 法を用いて肝組織中の rhsTM 濃度を測定した。

#### 4. 研究成果

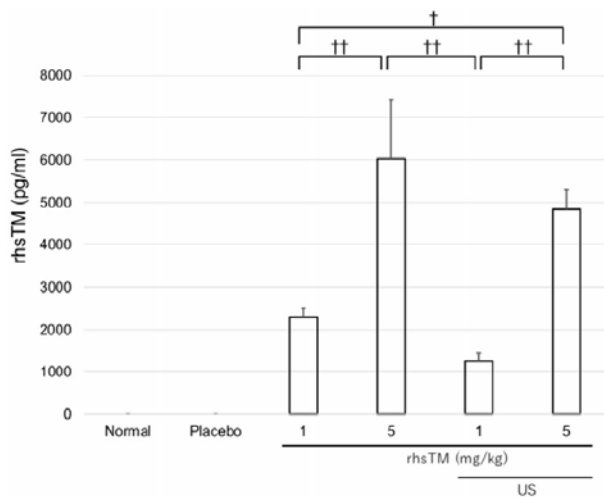
rhsTM+US 群は rhsTM 単独群と比較して血漿中 AST、ALT、HMGB-1 値は有意に低かった。



また病理学的検討においても rhsTM+US 群は Histological score、TUNEL 陽性細胞数が有意に低く、肝傷害やアポトーシスの有意な改善を認めた。



一方で肝組織内のトロンボモジュリン濃度に関しては、超音波による影響を認めなかった。



以上より超音波照射によるトロンボモジュリン製剤の効果増強作用を確認できた。一方でメカニズムの解明には追加検討を必要とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Hoshino Kota, Nakamura Yoshihiko, Nakano Takafumi, Watanabe Akiko, Sheng Hong, Tachibana Katsuro, Ishikura Hiroyasu | 4. 巻<br>10         |
| 2. 論文標題<br>Enhanced effect of recombinant human soluble thrombomodulin by ultrasound irradiation in acute liver failure       | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>1742 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-020-58624-0   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-          |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>星野 耕大                      |
| 2. 発表標題<br>超音波照射によるトロンボモジュリン製剤の効果増強作用 |
| 3. 学会等名<br>第28回日本超音波医学会九州地方会          |
| 4. 発表年<br>2018年                       |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>星野 耕大                      |
| 2. 発表標題<br>超音波照射によるトロンボモジュリン製剤の効果増強作用 |
| 3. 学会等名<br>第46回日本集中治療医学会学術集会          |
| 4. 発表年<br>2019年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>星野 耕大                                  |
| 2. 発表標題<br>急性肝不全モデルにおける超音波照射によるトロンボモジュリン製剤の効果増強作用 |
| 3. 学会等名<br>日本超音波治療研究会                             |
| 4. 発表年<br>2017年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>星野 耕大                              |
| 2. 発表標題<br>超音波照射によるナノバブルと抗がん剤を併用したがん細胞殺傷効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第36回日本脳神経超音波学会                     |
| 4. 発表年<br>2017年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|