

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02885

研究課題名(和文) 抗IL-6受容体抗体による術後癒着抑制の分子機構検証と臨床試験への展開

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of regulation of abdominal adhesion formation by anti-IL-6 antibody.

研究代表者

藤元 治朗 (Fujimoto, Jiro)

兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授

研究者番号：90199373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：今回は、IL-6、TNF、TGF- $\beta$ の重要性を発見、具体的には外科侵襲により腹膜中皮細胞が障害を受け、NKT細胞活性化を通じて大量のIFN- $\gamma$ 、PAI-1が産生される、また、中皮細胞が産生したDAMPはIL-6を産生、CXCL2を産生、好中球をリクルートする。これらの好中球にIL-6が働き、TNF、TGF- $\beta$ を産生、最終的にはTGF- $\beta$ が中皮細胞を活性化、myofibroblastとなり、線維産生、癒着を形成するメカニズムの発見である。この研究を受けて、TNFモノクロー抗体により癒着が制御されることを報告、さらにAT-III 阻害剤の使用により癒着が制御されることも加えて報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりこれまでは不明であった外科手術により生じる腹部癒着の分子機構が解明され、またその予防法も発見された。具体的には手術侵襲による腹膜中皮細胞の障害、それにより惹起されるIL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF、TGFの活性化により、腹膜中皮細胞自身myofibroblastに変身し、線維に置き換わる事実である。またこの研究の結果、IL-6のモノクロー抗体、TNFのモノクロー抗体、AT-III阻害剤により癒着が制御されることもマウスモデルで証明されこれらの薬剤は既に日常臨床で使用されており、近い将来、腹部癒着制御に関して臨床で使用される可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We reported importance of neutrophil, IL-6, TNF, TGF in the progress of adhesion formation. (Scientific Reports: 2019: 9: 17558. Next we investigated the importance of anti-TNF medicine. We have used the monoclonal antibody of TNF which results inhibition of abdominal adhesion in mice model. (Cell Physiol Biochem: 2020: 54: 1041-53), Moreover We investigated the role of anti thrombin and NETS, and found that they also blocked the adhesion formation in mice. (Cell Physiol Biochem: 2021: 55: 400-412).

研究分野：消化器外科

キーワード：術後癒着 線維化 腹膜中皮細胞 IL-6 TNF TGF トロンピン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは腹部外科術後癒着形成における免疫系(主にIFN-)と血液凝固線溶系(主にPAI-1)の中心的役割を報告した(Nat Med 14:437-41,2008)。最近の知見で肝線維化と同様のコラーゲン線維が手術部位で産生されていることが判明、また集積した好中球が線維形成に深く関与するデータを得ている。これら一連の術後線維形成過程において、IL-6が術後早期より著明に上昇していることが認められた。

### 2. 研究の目的

そこで IL-6 KOマウス、抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体を用い、癒着制御の可能性を試みた。IL-6 KOマウス、および抗IL-6抗体投与実験では癒着形成には変化は認められなかった。しかし、抗IL-6受容体抗体投与群では著明に癒着制御を認められた(特許出願 2017-203271号)。本研究で抗IL-6受容体抗体の術後癒着制御の臨床試験を目指し、詳細な癒着形成の分子機構解明・抗IL-6受容体抗体の安全性確認・用量設定実験を実施、非臨床POCを取得し、橋渡し研究進展を目的とする。

### 3. 研究の方法

腹膜構成細胞がコラーゲン産生細胞である可能性が高く、(1)WT-1(Wilms tumor gene-1)遺伝子は腹膜細胞で発現、この性質を利用してWT-1染色(核染色)実施予定、(2)WT-1-GFPのトランスジェニックマウス入手、この遺伝子改変マウスにて腹膜細胞のトレーシング実施予定である。さらにコラーゲン産生の分子機構を検討するために、タイムコース(腸管焼灼後1h、6h、12h、24h、72h、168h)で癒着モデル組織よりRNA摂取、発現遺伝子の網羅的解析を実施、重要な分子を同定する。術後癒着制御を実施する場合に大切な点は「創傷治癒に影響は及ぼさないか?」という危惧である。このためにプレリミナリーな実験として、創傷治癒判定によく使用されているマウス皮膚モデル(約20mm<sup>2</sup>のマウス皮膚切除・回復実験)を実施した。抗IL-6受容体抗体投与群とコントロール群(IgG投与群)では有意差が無く皮膚創傷治癒は良好であった。可溶性のIL-6受容体は発現量が限られており、抗IL-6受容体抗体での抑制は可能であると考えられる。またIL-6 KOマウスではgp130に直接作用する分子の活性化があり、シグナル伝達が達成された可能性がある。検証のため、それぞれのモデルでSTAT-3分子のリン酸化を検討する。また、IL-6の中皮細胞に対する直接作用を検証するために*in vitro*実験で腹膜細胞にIL-6添加、遺伝子変化を調査する。また抗IL-6受容体抗体の癒着制御の分子機構を検証するために、と同様に抗IL-6受容体抗体投与群にて発現遺伝子の網羅的解析を実施する。今後腸管癒着モデルの別部位の大腸に小切開・縫合を加え、腸管自身の創傷治癒を検討する予定である。抗IL-6受容体抗体の非臨床POCを取得するため上記のこれまでの研究に加え、抗IL-6受容体抗体のマウス癒着モデルにおける安全性の確認が必須である。マウス死亡率(現時点では術後1週間の犠死の時点で、1/14:0.07%でありPBS投与群:0.08%と有意差なし)・感染症併発有無・合併症有無・臓器障害有無、の検討を中・長期術後観察モデル(術後2週~4週)にて検証予定とする。また、臨床試験を考慮する場合に薬剤の用量設定が必須なPOC項目である。マウス癒着モデルにおいて2mg~10mg/mouseにおける用量設定を実施、有効性・安全性の検証を実施する。

### 4. 研究成果

術後癒着形成において重要な分子は IFN-g、PAI-1、さらに腹膜中皮細胞より産生される IL-6 が癒着の起点であることを解明した。また IL-2 により遊走された好中球より TNF が産生され、TNF が再度腹膜中皮細胞に関与、TGF-b を介して腹膜中皮細胞自身の線維化を惹起することを発見、術後癒着形成の分子機構を解明した。また IL-6 および TNF のモノクローナル抗体は癒着を著明に抑制し、今後の臨床応用の可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Naoki Uyama, Hiroko Tsutsui, Songtao Wu, Koubun Yasuda, Etsuro Hatano, Xian-Yang Qin, Soichi Kojima, Jiro Fujimoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-interleukin-6 receptor antibody treatment ameliorates postoperative adhesion formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17558-17571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54175-1	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Wu S, Uyama N, Itoh RA, Hatano E, Tsutsui H, Fujimoto J.	4. 巻 42
2. 論文標題 The effect of Daikenchuto, Japanese herbal medicine, on adhesion formation induced by cecum cauterization and cecum abrasion in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 179-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00543	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 M. Sudo, K. Iida, H. Tsutsui, K. Mitani, M. Jimbo, E. Hatano, J. Fujimoto	4. 巻 54
2. 論文標題 Blockade of tumor necrosis factor by etanercept prevents postoperative adhesion formation in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Physiol Biochem	6. 最初と最後の頁 1041-1053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33594/000000286	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 M. Sudo, J Xu, K. Mitani, M. Jimbo, H. Tsutsui, E. Hatano, J. Fujimoto	4. 巻 55
2. 論文標題 Antithrombin together with NETs inhibitor protected against postoperative adhesion formation in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Physiol Biochem	6. 最初と最後の頁 400-412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33594/000000392	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 J Fujimoto, N. Uyama, H. Tsutsui, W, Songtao, M. Sudo, E. Hatano
2. 発表標題 Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody Robustly Ameliorated Postoperative Adhesion Formation in Mice.
3. 学会等名 15th Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujimoto J, Uyama N, Tsutsui H, Wu S.
2. 発表標題 Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody robustly ameliorated postoperative adhesion formation in mice.
3. 学会等名 The 14th Annual Academic Surgical Congress. Huston, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uyama N, Fujimoto J, Tsutsui H, Wu S.
2. 発表標題 IL-6 may regulate adhesion formation induced by cecum cauterization in mice.
3. 学会等名 The 14th Annual Academic Surgical Congress. Huston, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	石戸 聡  (Ishido Satoshi)  (10273781)	兵庫医科大学・医学部・教授    (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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	筒井 ひろ子 (Tsutsui Hiroko) (40236914)	兵庫医科大学・医学部・教授  (34519)	
研究分担者	Qin Xianyang (Qin Xianyang) (60756815)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員  (82401)	
研究分担者	宇山 直樹 (Uyama Naoki) (70402873)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  (34519)	
研究分担者	波多野 悦朗 (Hatano Etsuro) (80359801)	兵庫医科大学・医学部・教授  (34519)	
研究分担者	小嶋 聡一 (Kojima Souichi) (10202061)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ユニットリーダー  (82401)	削除：2019年9月17日
研究分担者	宮下 正寛（裴） (Miyashita Seikan) (30423883)	兵庫医科大学・医学部・講師  (34519)	

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
---------	---------