

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591600
 研究課題名（和文） IL-18拮抗物質による劇症肝不全に対する治療法の開発
 研究課題名（英文） Establishment of an effective therapy for fulminant hepatic failure focusing on IL-18 inhibition
 研究代表者
 田辺 稔（TANABE MINORU）
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：50197513

研究成果の概要：IL-18制御が劇症肝不全治療に有用であるか否か検証するためにD-ガラクトサミン誘導性劇症肝不全ラットの肝臓にヒトIL-18拮抗物質（以下IL-18bp）遺伝子をadenovirus vectorを用いて導入し、肝障害の抑制効果をみた。しかし、肝障害抑制効果が不十分であったため、核内タンパクであるHigh mobility group box-1（HMGB-1）に着目し、同様の劇症肝不全モデルにおいて血清HMGB-1が上昇することおよび抗HMGB-1抗体投与によるHMGB-1制御によってその予後と病態が改善することを確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

実験経過の中で当初の計画から治療方法に若干の変更を生じることとなった。

近年、敗血症、ショック、全身性炎症反応症候群などの病態で血清中High mobility group box-1（HMGB-1）が上昇することが報告され、新たな炎症性メディエーターとして注目されている。一方、劇症肝不全は広範な肝細胞壊死を伴う病態であり、肝移植が有効な治療法であるが、本邦の深刻な臓器不足を考えれば、新たな治療法の開発が重要な課題とされる。これまでに劇症肝不全とHMGB-1について検討された研究の報告はない。

2. 研究の目的

本研究では広範な肝細胞壊死を特徴とする劇症肝不全においてHMGB1が病態に深く関わっているという仮説のもと、劇症肝不全において新たな治療法を開発すべく本実験に着想した。今回の研究はHMGB1阻害が劇症肝不全の病態改善につながるかどうかを明らかにすることが最大の目的である。

3. 研究の方法

<実験0：ラット劇症肝不全モデルにおけるIL-18bp遺伝子導入効果の検討>
 SDラット（体重250-300g）にイソフルレン全身麻酔下にD-ガラクトサミン（1.4g/Kg）を陰

茎静脈より静脈内投与し、薬剤性劇症肝不全を誘発する。IL-18bp遺伝子をadenovirus vectorを用いて導入し、肝障害の抑制効果を見た。

<実験1：ラット劇症肝不全モデルにおけるHMGB-1動態の検討> (1) SDラット(体重250-300g)にイソフルレン全身麻酔下にD-ガラクトサミン(1.4g/Kg)を陰茎静脈より静脈内投与し、薬剤性劇症肝不全を誘発する。(2) 劇症肝不全誘発後12時間毎に各種パラメータを測定・評価し、HMGB-1動態を検討する。

<実験2：ラット劇症肝不全モデルにおける抗HMGB1抗体投与の予後改善効果の検討> (1)<実験1>と同様のラット薬剤性劇症肝不全モデルを作成する。(2)(1)の直後に、治療群に対しては抗HMGB1抗体(6mg/Kg)を、対照群にはコントロール抗体を(6mg/Kg)を静脈内投与し劇症肝不全誘発後12時間毎に各種パラメータを測定・評価し、HMGB1動態および、治療効果を検討する。

4. 研究成果

<実験0>

ラット劇症肝不全モデルにおいて、血中、肝組織中のIL-18の上昇を認めた(図0-1)

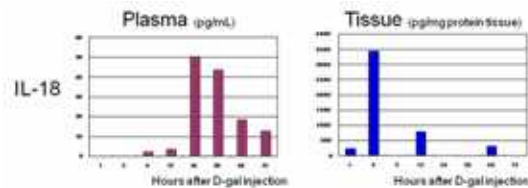


図0-1：ラット劇症肝不全モデルにおける血漿・肝組織中IL-18動態

IL-18bpの肝への遺伝子導入を行ったが、肝障害抑制効果認めなかった。(図0-2)

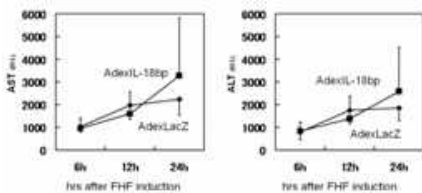
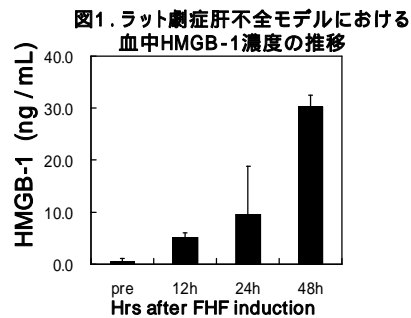


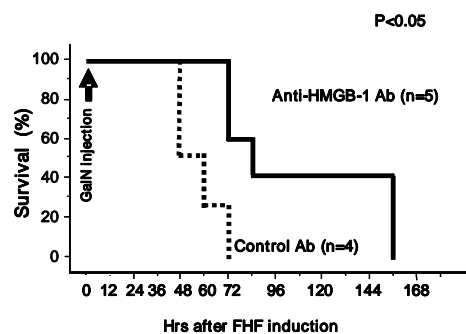
図0-2：IL-18bp導入群とコントロール群におけるASTとALT値

<実験1> 劇症肝不全誘導後に経時的に血清HMGB1の上昇が確認された(図1)



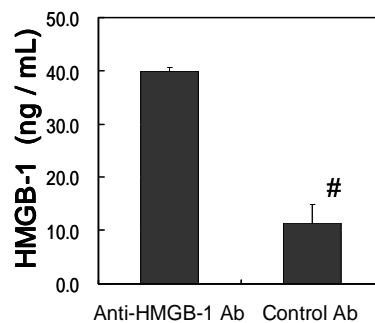
<実験2> 抗HMGB-1抗体投与群ではcontrol抗体投与群と比較して有意に生存率が改善した(図2)

図2. ラット劇症肝不全モデルに対する抗HMGB-1抗体投与の治療効果(生存曲線)



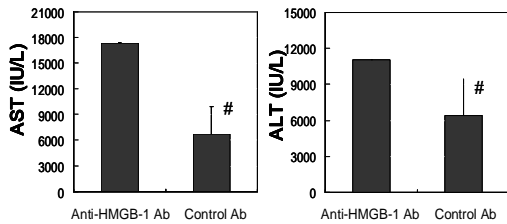
劇症肝不全誘発48時間後の血清中HMGB1は、対照群が 39.9 ± 3.54 (pg/mL)であったのに対し、治療群では 11.4 ± 4.68 (pg/mL)と上昇が抑制された(図3)

図3：劇症肝不全誘発48時間後における治療群と対照群の血清中HMGB-1値の比較。



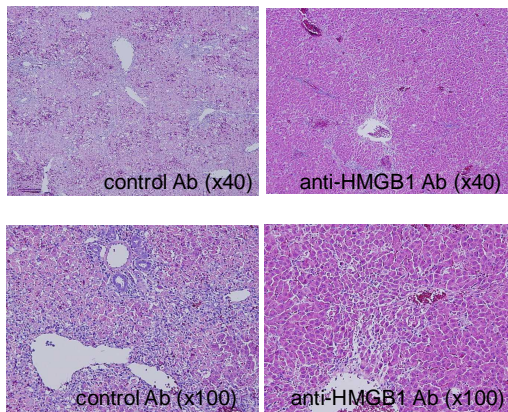
また同採血においてAST(17333 ± 3136 Vs 6746 ± 1698 IU/mL)、ALT(11065 ± 3073 Vs 6373 ± 1427 IU/mL)、LDH(6764 ± 4462 Vs 1879 ± 1050 IU/mL)が、治療群で有意に低値を示した($p < 0.05$)(図4)

図 4: 劇症肝不全誘発 48 時間後における治療群と対照群の AST, ALT 値の比較。



また肝組織 H.E. 染色においてはコントロール抗体投与群に比べ抗 HMGB-1 抗体投与群において肝細胞の壊死、出血、炎症性細胞浸潤が軽減されている所見を得た (図 5)。

図 5: 肝組織の H.E. 染色所見。コントロール抗体投与群 (control Ab) では肝組織の構築が乱れ、肝細胞はほとんど壊死に陥り、出血と炎症性細胞浸潤が顕著である。これに対し抗 HMGB-1 抗体投与群 (anti-HMGB1 Ab) では肝細胞が比較的保たれ、肝組織の構築も大きな乱れを認めない。



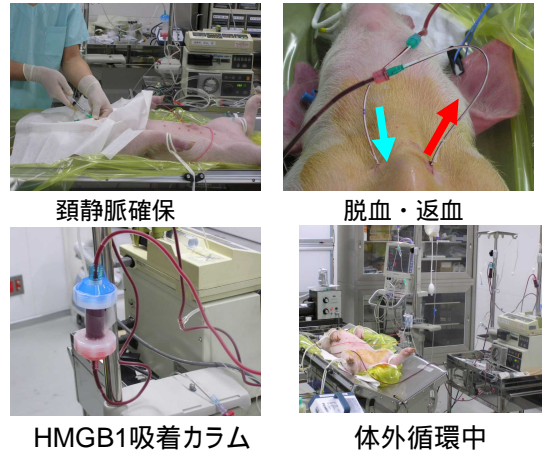
以上の実験により、劇症肝不全において HMGB-1 が重要な key mediator であり、病態に深く関わっている可能性が示唆された。また抗 HMGB-1 抗体投与による HMGB-1 制御が肝障害及び予後を改善したことから、HMGB-1 研究が劇症肝不全に対する新治療法の開発につながる可能性が示唆された。

現在、劇症肝不全に対する治療法として血漿交換と持続的血液ろ過透析 (体外循環治療) が実際の臨床現場で標準治療として用いられており、一定の成果を得ている。しかしこれらはいまだに十分な成績を上げているわけではなく、肝移植が行われることも少なくない。本邦における肝移植はその提供臓器不足が深刻な問題になっており、新たな治療法の開発が待たれているのが現実である。

われわれは現在、大動物 (ブタ) 劇症肝不全モデルに対し、HMGB-1 を特異的に吸着する

HMGB-1 吸着カラムを用いた体外循環療法の開発に向け、実験を進行している (図 6)。コントロールカラムを用いた大動物実験をほぼ終了しており、今後 HMGB-1 吸着カラムを用いた治療群の検討を行っていく予定であり、成果によっては既存の体外循環療法に HMGB-1 吸着カラムを組み合わせるだけで実現可能な本治療法はまさに今後の芸気象肝不全に対する新治療法になると考えている。

図 6: ブタ劇症肝不全モデルに対する体外循環療法実験



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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

高野公徳, 篠田昌宏, 田辺稔, 北川雄光ら. ラット劇症肝不全モデルに対する抗 HMGB-1 抗体投与の予後改善効果. 第 15 回外科侵襲とサイトカイン研究会 岩手, 2008.12.13

高野公徳, 篠田昌宏, 田辺稔, 北川雄光ら. ブタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB-1 動態の検討. 第 63 回日本消化器外科学会総会 北海道, 2008.07.17

Takano K, Shinoda M, Tanabe M, Kitagawa Y, et al. Increased serum level of high mobility group box-1 in the pig fulminant hepatic failure model. 2008 Digestive Disease Week (AASLD) San Diego, 2008.05.22

高野公德, 篠田昌宏, 田辺稔, 北川雄光
ら. プタ劇症肝不全モデルにおける血清中
HMGB-1動態の検討. 第108回日本外科学会定
期学術集会 長崎, 2008.05.17

高野公德, 篠田昌宏, 田辺稔, 北川雄光
ら. プタ劇症肝不全モデルにおける血清中
HMGB-1動態の検討. 第94回日本消化器病学
会, 福岡, 日本, 2008.05.08

Takano K, Shinoda M, Tanabe M, Kitagawa
Y, et al. Increased serum level of high
mobility group box-1 in the pig fulminant
hepatic failure model. 2008 American
Society of Transplantation 12th Winter
Symposium Palm Springs, 2008.03.14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 稔 (TANABE MINORU)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 50197513

(2) 研究分担者

篠田 昌宏 (SHINODA MASAHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 50286499

高柳 淳 (TAKAYANAGI ATSUSHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 80245464

(3) 連携研究者