

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791306

研究課題名(和文)

H G B - 1 制御による肝虚血再灌流障害抑制法の開発と肝移植への応用

研究課題名(英文)

Inhibition of HMGB1 for the treatment of liver ischemia reperfusion injury

研究代表者

篠田 昌宏 (SHINODA MASAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50286499

研究成果の概要(和文): HMGB1 を制御するべく各種のストラテジーを開発することに成功した。すなわち、HMGB1 抑制物質産生性肝細胞、HMGB1 抑制物質産生性人工肝臓、HMGB1 吸着カラムなどである。これらを、肝虚血再灌流障害、一部肝炎モデルを使用し、有用性を検討した。ブタモデルにおいては、病態改善の傾向を認めた。

研究成果の概要(英文): We established HMGB1 inhibitory substance producing hepatocytes, and HMGB1 inhibitory substance producing bioartificial liver, and HMGB1 adsorption column for the control of HMGB1 in liver ischemia reperfusion injury. We tested these modalities in animal models and found promising outcomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

世界的に不足しているドナーソースの拡大は、肝移植医療の中で大きな課題である。いわゆる心停止ドナーからのグラフトも活用できるような効果的な肝虚血再灌流障害の治療法が開発されればその臨床的な意義は絶大である。

2. 研究の目的

本研究では各種炎症性疾患で「死のメディエータ」として注目されている核内タンパク High mobility group box-1 (以下 HMGB1) に着目し、遺伝子治療、人工肝臓、体外循環吸着などの特殊技術を駆使してこの HMGB1 を

制御し新治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究においては、まず(1) 大小動物肝虚血再灌流モデル、肝移植後患者の血清を用いて虚血再灌流における HMGB1 の動態を明らかにする。(2) 小動物虚血再灌流モデルにおいて HMGB1 を阻害し病態改善効果を示すことで、HMGB1 の病態メカニズムとの関連を明らかにする。最終的には(3) 大動物肝移植モデルにおいて体外循環実験を行い、前臨床的治療法を開発する。

(1) HMGB1 動態：ラットモデルにおいては経

時的に血清、肝臓を採取し HMGB1 の増加を確認する。

- (2) 小動物モデル： HMGB1 の中和抗体を用いた HMGB1 制御を試みる。 HMGB1 阻害タンパクである HMGB1 A Box を encode したアデノウイルスベクター（以下 Adex-HMGB1ABox）を作製し、肝臓に同遺伝子を導入し、臓器自身に HMGB1 阻害タンパクを合成させることで HMGB1 制御を試みる。一方、ウイルスベクターを生体に全く投与しない治療法を開発するという観点から、Adex-HMGB1ABox を培養肝細胞に感染させ HMGB1 A Box 産生性肝細胞を作製し、さらにこの肝細胞を人工肝臓に内蔵し体外循環下に治療するという手法を試みる。共同研究関係を結んでいる米国マサチューセッツ総合病院外科（Martin Yarmush 教授ら）と小動物用平板型ハイブリッド人工肝臓を作製している。
- (3) 大動物モデル： 先進実験として、薬剤誘導性劇症肝不全ブタモデルを作成する。さらに薬剤誘導性劇症肝不全ブタモデルに対して、HMGB1 吸着カラムを用いて体外循環を施行し、本カラムが HMGB1 を吸着することを確認する（図1）。

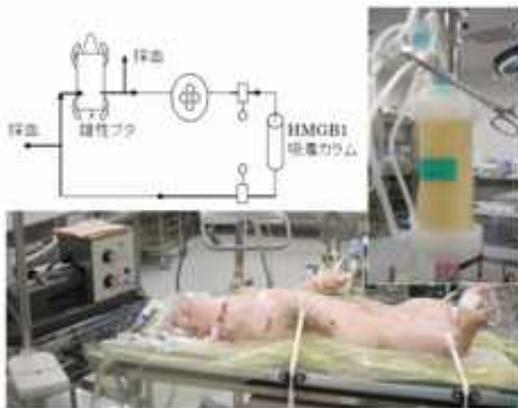


図1：大動物用 HMGB1 吸着カラムによる体外循環

4. 研究成果

- (1) HMGB-1 動態：ラット肝虚血再灌流傷害モデルにおいて血中 HMGB-1 が著明に上昇することを確認した。
- (2) 小動物モデル：HMGB-1 を制御するための strategy を下記のごとく実施、検討予定である。

HMGB-1 抗体。劇的な病態改善効果を確認済みである。

HMGB-1 阻害タンパクである HMGB-1 A Box の遺伝子導入。本学分子生物学教室と共同で本実験用に HMGB-1 A Box のアデノウイルスベクター（以下 Adex-HMGB-1ABox）を作製し、培養肝細胞に遺伝子導入した。培養上清中に

おける A box タンパクの発現、ラット肝細胞内におけるタンパク発現を確認している（図2）。現在ラット肝虚血再灌流傷害モデルにおける病態改善効果を検討中である。

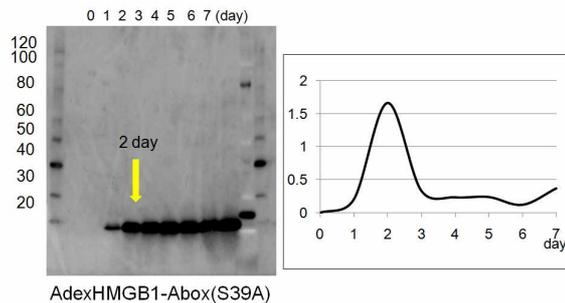


図2：HeLa 細胞における A box タンパクの発現

Adex-HMGB1ABox を培養肝細胞（ラット初代肝細胞、ブタ初代肝細胞、不死化ヒト肝細胞等）に感染させ HMGB-1 A Box 産生性肝細胞を作製し、さらにこの肝細胞を人工肝臓に内蔵し体外循環下に治療するという手法を予定している。共同研究関係を結んでいる米国マサチューセッツ総合病院外科（Martin L Yarmush 教授ら）から小動物用平板型ハイブリッド人工肝臓を供与され、A box タンパク産生性ラット肝細胞を樹立するまでに至っている（図3）。

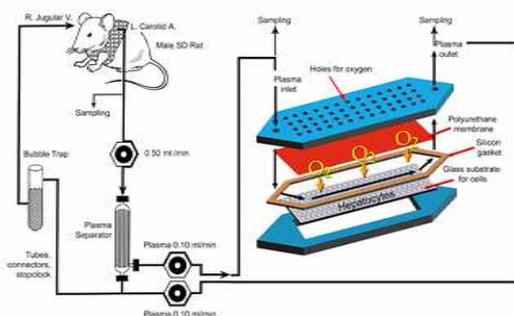


図3：HMGB-1 A Box 産生性肝細胞の体外循環型リアクターへの植え込み

- (3) 大動物モデル：臨床応用を念頭に、HMGB-1 特異的吸着カラムをブタモデルで稼働させ、カラムによる HMGB-1 吸着効果を明らかにした。同カラムによる各種サイトカインの吸着効果はこれまでも報告されていたが、HMGB-1 吸着効果は初の報告であり特許を申請中である。また、同カラムにて肝炎誘発後 20 時間後より 4 時間治療をしたところ、コントロールカラム（空カラム）群に比べて肝逸脱酵素の上昇抑制や生存率の改善傾向を認めた。（図4）今後も治療プロトコルを改変しよりよい治療効果を目指す予定である。

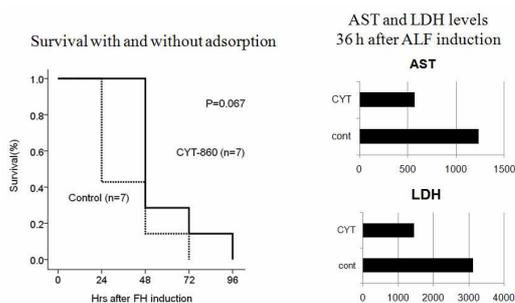


図4：HMGB-1特異的吸着カラムによる肝炎誘発ブタモデルにおける肝逸脱酵素の上昇抑制や生存率の改善

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1件)

1. Takano K, Shinoda M, Tanabe M, Miyasho T, Yamada S, Ono S, Masugi Y, Suda K, Fukunaga K, Hayashida T, Hibi T, Obara H, Takeuchi H, Kawachi S, Kawasaki K, Okamoto M, Yokota H, Maruyama I, Kitagawa Y: Protective Effect of High Mobility Group Box 1 Blockade on Acute Liver Failure in Rats. Shock, 34: 573-579, 2010 (査読あり)

[学会発表](計17件)

1. 西山亮, 篠田昌宏, 田邊稔, 大島剛, 高野公德, 海老沼浩利, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 松原健太郎, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 河地茂行, 齋藤英胤, 丸山征郎, 日比紀文, 北川雄光: 急性肝不全患者における血清HMGB1とブタ肝不全モデルを用いたHMGB1吸着カラムの開発. 第47回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2011.03.18
2. 篠田昌宏, 田邊稔, 高野公德, 大島剛, 西山亮, 海老沼浩利, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 竹内裕也, 板野理, 河地茂行, 齋藤英胤, 丸山征郎, 日比紀文, 北川雄光: HMGB1制御による急性肝不全に対する新治療の開発～診療に役立つ治療法の研究～. 第47回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2011.03.17
3. 篠田昌宏, 田邊稔, 高野公德, 大島剛, 西山亮, 海老沼浩利, 高柳淳, 山田晋吾, 宮庄拓, 福永興吉, 松原健太郎, 須田康一, 林田哲, 八木洋, 尾原秀明, 竹内裕

也, 板野理, 河地茂行, 齋藤英胤, 日比紀文, 丸山征郎, 北川雄光: HMGB1制御による急性肝不全に対する新治療の開発. 第1回HMGB1シンポジウム, 横浜, 2011.02.26

4. 西山亮, 篠田昌宏, 田邊稔, 大島剛, 高野公德, 海老沼浩利, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 松原健太郎, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 河地茂行, 齋藤英胤, 丸山征郎, 日比紀文, 北川雄光: High mobility group box-1に着目した急性肝不全治療の基礎的検討. 第17回外科侵襲とサイトカイン研究会, 千葉, 2010.12.11
5. 大島剛, 篠田昌宏, 田邊稔, 海老沼浩利, 山田晋吾, 宮庄拓, 西山亮, 高野公德, 須田康一, 林田哲, 福永興吉, 山岸由幸, 尾原秀明, 竹内裕也, 河地茂行, 齋藤英胤, 丸山征郎, 日比紀文, 北川雄光: 急性肝不全患者における血清High mobility group box1値とブタ肝不全モデルを用いたHMGB1吸着カラム開発の検討. 第48回日本人工臓器学会大会, 仙台, 2010.11.19
6. Oshima G, Shinoda M, Tanabe M, Ebinuma H, Takano K, Fuchimoto Y, Miyasho T, Yamada S, Suda K, Hibi T, Hayashida T, Fukunaga K, Obara H, Takeuchi H, Kawachi S, Mukai M, Hoshino K, Hibi T, Morikawa Y, Maruyama I, Kitagawa Y: High mobility group box 1 in acute liver failure patients and swines and establishment of an adsorption column. The American Association for the Study of Liver Diseases 61st Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston (U.S.A), 2010.11.02
7. 大島剛, 篠田昌宏, 田邊稔, 海老沼浩利, 山田晋吾, 宮庄拓, 高野公德, 須田康一, 林田哲, 福永興吉, 山岸由幸, 竹内裕也, 河地茂行, 丸山征郎, 日比紀文, 北川雄光: 急性肝不全患者の血清HMGB1濃度とブタ肝不全モデルを用いたHMGB1吸着カラムの開発. 第46回日本移植学会総会, 京都, 2010.10.22

8. 大島剛, 篠田昌宏, 田邊稔, 海老沼浩利, 山田晋吾, 宮庄拓, 高野公德, 須田康一, 林田哲, 福永興壱, 山岸由幸, 尾原秀明, 竹内裕也, 河地茂行, 齋藤英胤, 丸山征郎, 日比紀文, 北川雄光. 急性肝不全患者における血清HMGB1濃度とブタ肝不全モデルを用いたHMGB1吸着カラムの開発. 第52回日本消化器病学会大会, 横浜, 2010.10.14
9. Shinoda M, Tanabe M, Oshima G, Takayanagi A, Miyasho T, Yamada S, Ebinuma H, Takano K, Hibi T, Suda K, Obara H, Takeuchi H, Kawachi S, Fukunaga K, Saito H, Hibi T, Maruyama I, Kitagawa Y: Serum high mobility group box 1 level in the patients with fulminant hepatic failure and its blockade in rat model. The 4th International HMGB1 Symposium, Helsinki (Finland), 2010.06.22
10. Oshima G, Shinoda M, Tanabe M, Takano K, Fuchimoto Y, Miyasho T, Yamada S, Suda K, Fukunaga K, Obara H, Kawachi S, Mukai M, Hoshino K, Morikawa Y, Maruyama I, Kitagawa Y: Hemoabsorption of high mobility group box 1 in swine fulminant hepatic failure model. ILTS 16th Annual International Congress, Hong Kong (China), 2010.06.18
11. Takano K, Shinoda M, Tanabe M, Ono S, Miyasho T, Yamada S, Suda K, Fukunaga K, Hibi T, Obara H, Takeuchi H, Kawachi S, Yokota H, Maruyama I, Kitagawa Y: Protective effect of high mobility group box 1 blockade on acute liver failure in rats. ILTS 16th Annual International Congress, Hong Kong (China), 2010.06.18
12. Oshima G, Shinoda M, Tanabe M, Takayanagi A, Miyasho T, Yamada S, Ebinuma H, Takano K, Hibi T, Suda K, Obara H, Takeuchi H, Kawachi S, Fukunaga K, Hibi T, Maruyama I, Kitagawa Y: Serum level of high mobility group box 1 in patients with fulminant hepatic failure and its blockade in rat model. ILTS 16th Annual International Congress, Hong Kong (China), 2010.06.18
13. 大島剛, 篠田昌宏, 田邊稔, 海老沼浩利, 山田晋吾, 宮庄拓, 西山亮, 高野公德, 須田康一, 林田哲, 福永興壱, 山岸由幸, 尾原秀明, 竹内裕也, 河地茂行, 齋藤英胤, 丸山征郎, 日比紀文, 北川雄光: 急性肝不全患者における血清中HMGB1動態の検討. 第25回日本Shock学会総会, 東京, 2010.05.29
14. 大島剛, 篠田昌宏, 田邊稔, 高野公德, 海老沼浩利, 須田康一, 竹内裕也, 山田晋吾, 宮庄拓, 福永興壱, 林田哲, 尾原秀明, 河地茂行, 日比紀文, 丸山征郎, 北川雄光: 急性肝不全患者血清中High mobility group box -1動態の検討. 第96回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010.04.22
15. Oshima G, Shinoda M, Tanabe M, Takayanagi A, Miyasho T, Yamada S, Ebinuma H, Takano K, Hibi T, Suda K, Obara H, Takeuchi H, Kawachi S, Fukunaga K, Hibi T, Maruyama I, Kitagawa Y: Serum high mobility group box 1 level in the patients with fulminant hepatic failure and its blockade effect in rat model. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) -The International Liver Congress 2010 -, Vienna (Austria), 2010.04.17

16. 高野公德, 篠田昌宏, 大島剛, 田邊稔, 宮庄拓, 山田晋吾, 河地茂行, 日比泰造, 竹内裕也, 石坂彰敏, 丸山征郎, 北川雄光: ラット急性肝不全モデルに対する High Mobility Group Box 1制御の病態改善効果. 第110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010.04.10
17. 大島剛, 篠田昌宏, 田邊稔, 高野公德, 海老沼浩利, 須田康一, 竹内裕也, 山田晋吾, 宮庄拓, 福永興吉, 林田哲, 尾原秀明, 河地茂行, 日比紀文, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: 急性肝不全患者における血清High mobility group box -1動態の検討. 第110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010.04.10

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: ハイモビリティグループタンパク
吸着担体
発明者: 北川雄光、篠田昌宏、田邊稔、他
権利者: 東レ株式会社
種類: 新治療に関する特許
番号: 360C05050A
出願年月日: 平成 22 年 5 月 27 日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

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

(2)研究分担者
なし

研究者番号:

(3)連携研究者
なし