

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791498
 研究課題名(和文) HMGB-1 制御による小腸虚血再灌流障害の抑制法の開発と小腸移植への応用
 研究課題名(英文) Control of HMGB1 and intestinal transplantation in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury
 研究代表者
 西山 亮(NISHIYAMA RYO)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：70528322

研究成果の概要(和文)：

BoxAタンパクがHMGB1と競合的に受容体に結合するためHMGB1の拮抗剤として機能すると考えられている。そこでAdex-BoxAを肝細胞に導入し、BoxAタンパクの産生を確認した。次に、ラット小腸虚血再灌流障害に対するHMGB-1 BoxA遺伝子導入治療効果の検討を行うべく、ラット小腸虚血再灌流障害モデルを作成した。実際にラット小腸虚血再灌流障害モデルにAdex-BoxAを投与し、今後門脈に投与する予定である。また、当教室ではラット急性肝不全モデルでHMGB-1吸着カラムを用いた体外循環治療効果の検討を行っており、同手法でラット小腸虚血再灌流障害を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：

A domain of HMGB1, the BoxA, competes with HMGB1 for binding receptors and attenuates HMGB1-induced inflammation.

We transfected the Adex-BoxA to the hepatocytes, and western blot analysis showed a stronger expression of A box protein in the culture supernatant. We are ready to inject Adex-BoxA or Adex-LacZ (control vector) into the portal vein in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. And we investigated whether reducing plasma high-mobility group box 1 (HMGB1) levels using an adsorption column is feasible and beneficial in a rat intestinal ischemia-reperfusion model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：HMGB-1、Adex-BoxA、小腸虚血再灌流

1. 研究開始当初の背景

脳死移植は、脳死から臓器摘出までの間に循環状態が不良であることが少なくなく、摘出後の冷虚血時間も生体に比べて格段に長い。そこで小腸移植の生存率の上昇と有効な臓器活用には、臓器のviability 低下をきたす虚

血再灌流障害を効率良く抑制することが肝要である。

当教室では炎症性メディエーターであるHMGB-1に着目しており、ラット小腸虚血再灌流モデルにおいても抗 HMGB-1 抗体が病態の改善に働いたデータを得ている。

そこで様々な方法で HMGB-1 を制御し、小腸虚血再灌流障害の抑制法の開発と小腸移植への応用を検討することにした。

2. 研究の目的

(1)小動物を用いた小腸の虚血再灌流障害モデルにおいて、a) HMGB-1 の阻害物質である HMGB-1 BoxA 遺伝子導入療法、b)体外循環治療等の障害改善効果を検討する。(2)前臨床的モデルとして、大動物を用いて小腸移植を行い温阻血の加わった小腸グラフトの viability を改善することを目指す。さらに、(3)臨床応用を念頭に、生体・脳死の小腸移植レシピエントにおける、HMGB-1 動態の検討をする。

3. 研究の方法

(1)HMGB1 A box domain を encode するアデノウイルスベクター (Adex-BoxA) の作成

(2)in vitro で BoxA タンパクの産生を確認
ラット初代培養肝細胞に作成した Adex-BoxA を感染させ、培養上清中の BoxA タンパクを western blot 法にて確認した。

(3)in vitro で BoxA タンパクの発現を確認
Adex-BoxA をラット門脈内に投与し、肝における BoxA タンパクの発現を western blot、免疫染色にて確認し、ピークとなる時点を検討する。

(4)ラット虚血再灌流モデルの作成および Adex-BoxA の導入
虚血再灌流 48 時間前に、ラットを開腹し、治療群に対しては Adex-BoxA を、対照群には Adex-LacZ をそれぞれ門脈内に投与する (それぞれ 10×10^{10} pfu/body)。48 時間後再度開腹し上腸管膜動脈を micro clip にて遮断し、60 分後に遮断解除し虚血再灌流障害を誘発する。再灌流後 3, 6, 12 時間で下記の各種パラメータを測定・評価し、治療効果を検討する。

(5) ラット小腸虚血再灌流モデルにおける体外循環
ラット小腸虚血再灌流モデルにおいて、虚血後 30 分より体外循環を開始、1 時間後より小動物用 HMGB-1 吸着カラムを接続、10 時間の灌流を行う。障害抑制効果を各種パラメータで検討する。

(6)ブタ小腸移植モデルにおける Adex-BoxA

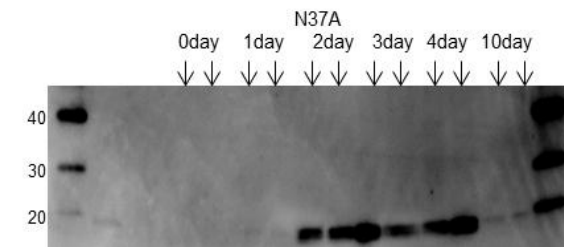
の導入

雄性ブタ (20kg 前後) を使用。ドナーブタを KCl 静注にて心停止させ、40 分間温阻血した後、小腸を約 50cm 摘出、4 時間冷保存しレシピエントに移植する。レシピエントは移植 24 時間前に門脈内に Adex-BoxA、コントロールウイルス (10×10^{10} pfu/body) を投与しておく。障害抑制効果を各種パラメータで検討する。

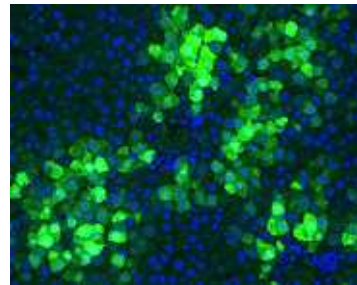
4. 研究成果

(1)HMGB1 A box domain を encode するアデノウイルスベクター (Adex-BoxA) の作成
当教室では以前から Adex-BoxA 使用していたため同ウイルスベクターを使用した。

(2)in vitro で A box タンパクの産生を確認
ラット初代培養肝細胞に Adex-BoxA を感染させたところ Abox タンパクを産生させることが確認され、さらにその産生は感染後 3~4 日でピークとなることがわかった。

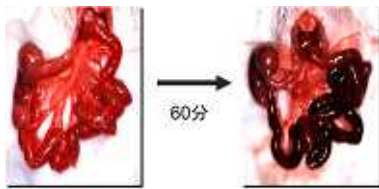


(3)in vitro で BoxA タンパクの発現を確認
Adex-BoxA をラット門脈内に投与し、肝における BoxA タンパクの発現を免疫染色にて確認したところ、72 時間後にピークとなることが確認された。



(4)ラット虚血再灌流モデルの作成および Adex-BoxA の導入
上記方法にてラット小腸虚血再灌流モデルを作成したところ、肉眼的にも病理学的にも小腸に虚血の所見を認め、およそ 24 時間で半数のラットが死亡した。

このモデルに対して今後は治療群には Adex-BoxA を、対照群には Adex-LacZ をそれぞれ門脈内に投与し、治療効果を検討する予



組織所見 60分虚血再灌流後

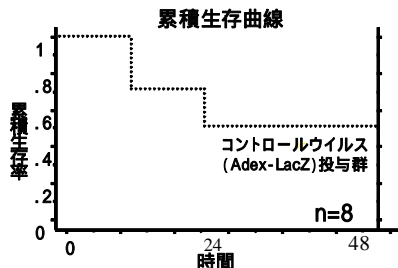
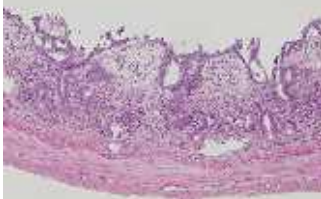


図5、ラット小腸虚血再灌流モデルマクロ所見(上)、組織所見(中)、生存率

(5)、(6)については、当教室ではすでにブタ急性肝不全モデルで HMGB-1 吸着カラムを用いた体外循環の有効性を確認しているため、



図6 小動物用HMGB-1吸着カラム

今後ラット小腸虚血再灌流モデルで行う予定である。

また、ブタ小腸移植モデルについても今後モデル作成を行う予定である。

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. Oshima G, Shinoda M, Tanabe M, Ebinuma H, Nishiyama R, Takano K, Yamada S, Miyasho T, Masugi Y, Matsuda S, Suda

定である。

K, Fukunaga K, Matsubara K, Hibi T, Yagi H, Hayashida T, Yamagishi Y, Obara H, Itano O, Takeuchi H, Kawachi S, Saito H, Hibi T, Maruyama I, Kitagawa Y. Increased plasma levels of high mobility group box 1 in patients with acute liver failure. Eur Surg Res, 48(3): 154-162, 2012 (査読あり)

〔学会発表〕(計29件)

国際学会

1. Tanaka M, Shinoda M, Tanabe M, Takayanagi A, Nishiyama R, Oshima G, Sanuki N, Abe Y, Yagi H, Hayashida T, Kitago M, Obara H, Takeuchi H, Itano O, Maruyama I, Kitagawa Y. Gene transfer of A Box domain of High Mobility Group Box 1 in rat acute liver failure model. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2012.11.13
2. Shinoda M, Tanabe M, Nishiyama R, Oshima G, Takano K, Tanaka M, Fuchimoto Y, Miyasho T, Yamada S, Suda K, Abe Y, Yagi H, Kitago M, Obara H, Takeuchi H, Itano O, Maruyama I, Kitagawa Y. Hemoadsorption of high-mobility group box 1 in a swine acute liver failure model. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2012.11.13
3. Shinoda M, Tanabe M, Nishiyama R, Oshima G, Takano K, Fuchimoto Y, Maruyama I, Kitagawa Y. Hemoadsorption of high-mobility group box 1 in swine acute liver failure model. 10th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Paris, 2012.07.03
4. Shinoda M, Tanabe M, Takayanagi A, Nishiyama R, Oshima G, Yagi H, Maruyama I, Kitagawa Y. Gene transfer of the A box domain of high mobility group box 1 into the liver in rat acute liver failure model. 10th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Paris, 2012.07.03
5. Shinoda M, Tanabe M, Nishiyama R, Oshima G, Tanaka M, Yamada S, Miyasho T, Fuchimoto Y, Yagi H, Suda K, Takeuchi H, Kitago M, Obara H, Itano O, Kawachi S, Maruyama I, Kitagawa Y.

- Hemoabsorption of high-mobility group box 1 in swine acute liver failure model. American Transplant Congress 2012, Boston, 2012.06.04
6. Shinoda M, Tanabe M, Nishiyama R, Takayanagi A, Oshima G, Takano K, Yagi H, Kawachi S, Maruyama I, Kitagawa Y. Gene Transfer of the A box domain of HMGB1 into the Liver in rat acute liver failure model. 97th American College of Surgeons Clinical Congress, San Francisco, 2011.10.24
 7. Shinoda M, Nishiyama R, Tanabe M, Takayanagi A, Oshima G, Takano K, Sanuki N, Nagarekawa T, Miyasho T, Yamada S, Fukunaga K, Suda K, Matsubara K, Obara H, Takeuchi H, Itano O, Kawachi S, Maruyama I, Kitagawa Y. Establishment of rat hepatocyte producing high mobility group box 1 inhibitor. XXXVIII Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2011) and IV Biennial Congress of the International Federation on Artificial Organs (IFAO 2011), Portugal, 2011.10.10
 8. Nishiyama R, Shinoda M, Tanabe M, Oshima G, Takano K, Fuchimoto Y, Miyasho T, Yamada S, Suda K, Fukunaga K, Matsubara K, Obara H, Takeuchi H, Itano O, Kawachi S, Mukai M, Hoshino K, Morikawa Y, Maruyama I, Kitagawa Y. Hemoabsorption of high-mobility group box 1 in swine acute liver failure model. XXXVIII Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2011) and IV Biennial Congress of the International Federation on Artificial Organs (IFAO 2011), Portugal, 2011.10.10
 9. Shinoda M, Tanabe M, Takayanagi A, Nishiyama R, Oshima G, Yagi H, Maruyama I, Kitagawa Y. Gene transfer of a box domain from high mobility group box 1 in rat acute liver failure model. International Surgical Week ISW 2011, Yokohama, 2011.08.31
 10. Nishiyama R, Shinoda M, Tanabe M, Oshima G, Takano K, Kawachi S, Maruyama I, Kitagawa Y. Hemoabsorption of high-mobility group box 1 in swine acute liver failure model. International Surgical Week ISW 2011 (32nd ISS/SIC), Yokohama, 2011.08.30
 11. Nishiyama R, Shinoda M, Tanabe M, Oshima G, Takano K, Fuchimoto Y, Suda K, Takeuchi H, Itano O, Kawachi S, Morikawa Y, Maruyama I, Kitagawa Y. Hemoabsorption of High-Mobility Group Box 1 in Swine Acute Liver Failure Model. The 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, & LICAGE, Valencia, 2011.06.24
 12. Shinoda M, Tanabe M, Takayanagi A, Nishiyama R, Oshima G, Takano K, Yagi H, Suda K, Takeuchi H, Hayashida T, Yamada S, Miyasho T, Fukunaga K, Obara H, Itano O, Kawachi S, Maruyama I, Kitagawa Y. Gene Transfer of the High Mobility Group Box 1 Inhibitor in Rat Acute Liver Failure Model. The 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, & LICAGE, Valencia, 2011.06.22
 13. Nishiyama R, Shinoda M, Tanabe M, Oshima G, Takano K, Takeuchi H, Itano O, Kawachi S, Maruyama I, Kitagawa Y. Hemoabsorption of High-Mobility Group Box 1 in swine acute liver failure model. ASAI0 57th Annual Conference, Washington DC, 2011.06.11
- 国内学会
1. 篠田昌宏, 田邊稔, 西山亮, 大島剛, 高野公德, 田中真之, 山田晋吾, 宮庄拓, 淵本康史, 須田康一, 竹内裕也, 阿部雄太, 日比泰造, 八木洋, 田中克典, 北郷実, 板野理, 丸山征郎, 北川雄光. 急性肝不全における High mobility group box-1 吸着療法の基礎的検討. 第49回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2013.03.13
 2. 篠田昌宏, 田邊稔, 田中真之, 西山亮, 大島剛, 高野公德, 海老沼浩利, 高柳淳, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 林田哲, 八木洋, 阿部雄太, 日比泰造, 北郷実, 田中克典, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 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40回日本集中治療医学会学術集会, 松本, 2013.02.28
 3. 篠田昌宏, 田邊稔, 西山亮, 大島剛, 高野公德, 山田晋吾, 宮庄拓, 松原健太郎, 須田康一, 八木洋, 林田哲, 北郷実, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 河地茂行, 淵本康史, 丸山征郎, 北川雄光. プタ急性肝不全モデルにおける High mobility group box-1 吸着カラムの有用性の検討. 第30回日本肝移植研究会, 福岡, 2012.06.15
 4. 田中真之, 篠田昌宏, 田邊稔, 河地茂行, 板野理, 北郷実, 高柳淳, 大島剛,

- 西山亮, 北川雄光. ラット急性肝不全モデルにおける HMGB1 A box domain の肝への遺伝子導入とその効果. 第 38 回日本急性肝不全研究会, 金沢, 2012.06.06
5. 田中真之, 篠田昌宏, 田邊稔, 西山亮, 高柳淳, 大島剛, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 松原健太郎, 八木洋, 林田哲, 北郷実, 福永興一, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 河地茂行, 丸山征郎, 北川雄光. HMGB1 阻害タンパク A box の遺伝子導入ベクターの確立とラット急性肝不全モデルにおける予後改善効果. 第 27 回日本 Shock 学会総会, 東京, 2012.05.12
 6. 篠田昌宏, 田邊稔, 西山亮, 高柳淳, 大島剛, 田中真之, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 松原健太郎, 八木洋, 林田哲, 北郷実, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 福永興一, 河地茂行, 丸山征郎, 北川雄光. HMGB1 A box 遺伝子導入ベクターの樹立とラット急性肝不全モデルにおける予後改善効果. 第 98 回日本消化器病学会総会, 東京, 2012.04.19
 7. 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, 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. 急性肝不全患者における HMGB1 動態と動物モデルにおける HMGB1 制御の効果. 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 幕張, 2012.04.14
 8. 篠田昌宏, 田邊稔, 西山亮, 高柳淳, 大島剛, 田中真之, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 福永興一, 八木洋, 林田哲, 松原健太郎, 北郷実, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 河地茂行, 丸山征郎, 北川雄光. HMGB1 阻害タンパク A box の遺伝子導入ベクターの確立とラット急性肝不全モデルにおける予後改善効果. 第 48 回日本腹部救急医学会総会, 金沢, 2012.03.14
 9. 田中真之, 篠田昌宏, 田邊稔, 西山亮, 高柳淳, 大島剛, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 松原健太郎, 八木洋, 林田哲, 北郷実, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 河地茂行, 丸山征郎, 北川雄光. HMGB1 阻害タンパク A box の遺伝子導入ベクターの確立とラット急性肝不全モデルにおける予後改善効果. 第 18 回外科侵襲とサイトカイン研究会, 金沢, 2011.12.10
 10. 西山亮, 篠田昌宏, 田邊稔, 大島剛, 高野公德, 尾原秀明, 板野理, 河地茂行, 丸山征郎, 北川雄光. プタ肝不全モデルを用いた HMGB1 吸着カラムの開発. 第 47 回日本移植学会総会, 仙台, 2011.10.06
 11. 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 とプ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, 2011.08.12
 12. 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, 2011.08.11
 13. 西山亮, 篠田昌宏, 田邊稔, 高柳淳, 大島剛, 八木洋, 竹内裕也, 河地茂行, 丸山征郎, 北川雄光. ラット急性肝不全モデルにおける HMGB1 阻害タンパク遺伝子導入による治療効果の検討. 第 66 回日本消化器外科学会総会, 名古屋, 2011.07.14
 14. 篠田昌宏, 田邊稔, 大島剛, 西山亮, 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 111 回日本外科学会定期学術集会, 紙上開催, 2011.05.25
 15. 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, 松原健太郎, 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漿 HMGB1 動態の検討. 第 111 回日本外科学会定期学術集会, 紙上開催, 2011.05.25
 16. 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 とプタ肝不全モデルを用いた HMGB1 吸着カラムの開発. 第 97 回日本消化器病学会総会, 東京, 2011.05.13

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計0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：ハイモビリティグループタンパク吸着担体
発明者：島田薫，井上武大，北川雄光，篠田昌宏，須田康一，大島剛，高野公德，竹内裕也，田邊稔，西山亮
権利者：東レ株式会社
種類：公開特許公報（A）
番号：特許公開2012-5827
取得年月日：平成24年1月12日
国内外の別：日本国特許庁（JP）

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織
(1)研究代表者
西山 亮（NISHIYAMA RYO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70528322