

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861215

研究課題名(和文) 実質臓器における炎症性疾患重症化機構の解明と新規治療法開発の基礎研究

研究課題名(英文) Plasmin inhibition protects against severe acute inflammation in solid organs.

## 研究代表者

田代 良彦 (Tashiro, Yoshihiko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20636245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性肝炎や急性膵炎など実質臓器の急性炎症重症化の病態には、炎症性サイトカインの重要性が知られており、申請者はその重症化に関わる多くの炎症性サイトカインを制御しているマトリックスメタロプロテイナーゼ群(MMP)とMMPの活性化を制御する線維素溶解系(線溶系)因子群に着目した。致死的な急性肝炎モデルマウスに対して線溶系阻害剤を投与することで生存率が有意に上昇した。その機序として、各種MMPの活性化が抑制されることで、炎症性サイトカインやケモカインの血中濃度が低下することと、それらの供給源と考えられる炎症性細胞の標的臓器への浸潤が抑制されることであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Treatment of severe inflammation in solid organs such as acute hepatitis and pancreatitis is still high mortality. It is known inflammatory cytokines in severe inflammation of solid organs is important, and its secretion is dependent on proteases like matrix metalloproteinases (MMP). There are some suggestions that MMPs are the predominant proteinases expressed in solid organ during severe inflammation. Others and we showed that plasmin can activate several MMPs. Here, we investigated the function of MMP9 and plasminogen(plg) in an animal model of severe acute hepatitis. Pharmacological inhibition of plasmin or targeted gene deletion of Plg or MMP9 prevented high mortality of severe acute hepatitis. This was associated with a reduced inflammatory cell infiltration in hepatocyte and correlated with impaired cytokine level elevation. In summary, our data show that pharmacological inhibition of plasmin or the absence of Plg/MMP9 strongly inhibit the inflammatory response.

研究分野：消化器外科

キーワード：急性肝炎 急性膵炎 炎症性サイトカイン MMP9 TNF 線維素溶解系 プラスミン 実質臓器

1. 研究開始当初の背景

(1)急性肝炎や急性膵炎といった実質臓器の急性炎症では、劇症化や重症化した場合、内科的治療法が確立していない上、移植など外科的な手術をしても、劇症肝炎で約 70%、重症急性膵炎で約 10%と未だに高い致死率となっている。急性肝炎、急性膵炎の重症化や劇症化にはサイトカインストームの発生がその一因と考えられており、内科的治療ではサイトカインの制御を目的とした副腎皮質ステロイドや蛋白分解酵素阻害剤の投与が行われる他、炎症性サイトカイン除去目的で血漿交換や血液透析が行なわれているが、いずれも抵抗性となることが非常に多い。このように、急性肝炎、急性膵炎の重症化および劇症化を阻止することは患者救命にとって非常に重要であり、重症化や劇症化阻止は重要課題で、新規治療法の開発は急務と言える。

(2)急性肝炎・膵炎の病態に關与するサイトカインとしては、TNF- $\alpha$ 、Fas-ligand、CD40-ligand が示唆されている。これら炎症性サイトカインは、細胞外マトリックスの構成分子を基質とするマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)あるいは ADAM(a disintegrin and metalloprotease)ファミリーと呼ばれる金属要求性蛋白分解酵素群による細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)によって産生されていることが解っており、病勢を制御している可能性が示唆されている(English WR et al *J Biol Chem* 2000, Hattori K et al *Leuk Lymphoma* 2000)。そして最近になって、急性肝炎・膵炎の臓器障害と MMP 活性の相関についても論じられており、こうした研究成果は MMP の活性化が炎症性サイトカインの産生を介して、急性肝炎・膵炎の病勢を制御している可能性を示している(Wielockx B et al *Nat Med* 2001, Guo J et al *Hepatogastroenterology* 2012)。

(3)これら炎症性サイトカインの末梢血や組織への供給源として、主に炎症性細胞である顆粒球、マクロファージであることが知られている。そして、これら炎症性細胞が末梢血や組織中へ動員および浸潤する過程で、各種 MMP・ADAM が活性化されていることが判明している(Heissig B et al *Cell* 2002, Heissig B et al *J Exp Med* 2005)。このことから MMP がサイトカイン分泌、炎症性細胞浸潤の双方を制御している可能性が示唆されている。

(4)近年、線維素溶解系(線溶系)因子であるプラスミンにより MMP の活性化が制御されていることが判明している(Lijnen HR et al *Arterioscler Vasc Biol.* 1998)。これまで研究代表者は、今回使用予定であるプラスミン阻害剤 YO-2 を用いたマウス実験で、MMP の活性化を抑制することでサイトカイン分泌、炎症性細胞の組織内浸潤を抑制することに成功した(Ishihara M et al *Leukemia* 2012)。このことから、プラスミン阻害剤を投与することで、MMP の活性化を抑制し、炎症性細胞浸潤とサイトカイン分泌の両面に作用し、急性肝

炎・膵炎の炎症反応の抑制に寄与するという仮説に至った。

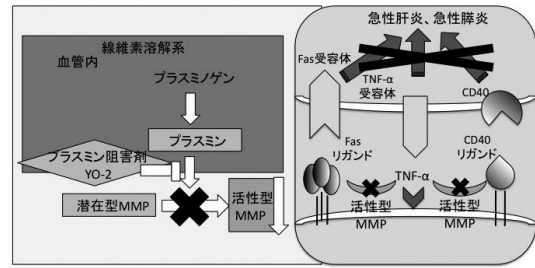


図 1: プラスミン阻害剤投与による急性肝炎・急性膵炎の制御イメージ

プラスミン阻害剤を投与することで、潜在型 MMP の活性化を阻害する。そして、活性型 MMP でプロセッシングされ、分泌する各種炎症性サイトカインが抑制されることで、急性肝炎、急性膵炎の病態が改善されることが予想される。

2. 研究の目的

急性肝炎・急性膵炎の薬物治療には免疫抑制剤だけでなく、蛋白分解酵素阻害剤が投与されているが、未だに治療抵抗性の症例も多く、治療に難渋する例は少なくない。急性肝炎・急性膵炎など実質臓器の急性炎症重症化の一因である炎症性サイトカイン分泌には MMP 群の活性化が関与している。その MMP の活性化は、線溶系因子によって制御されており、線溶系阻害剤であるプラスミン阻害剤を利用することで MMP 活性の低下、炎症性細胞浸潤の抑制、炎症性サイトカイン分泌の抑制という機能解明がなされれば、創薬、そしてリスクの少ない新たな急性肝炎・急性膵炎の治療法開発となると考えられる。

具体的に本研究では、急性肝炎・急性膵炎モデルマウスを用いてプラスミン阻害剤の炎症抑制効果を確認すること、各種炎症性サイトカインの産生分泌抑制効果を評価すること、肝臓、膵臓実質組織に対する白血球の浸潤抑制効果を評価することを主な細目とし、プラスミン阻害剤による急性肝炎・膵炎病態改善効果を総合的に明らかにすることを中心に研究を進める。

そして最終的には、劇症肝炎の約 50%、急性膵炎の約 10%に存在する内科治療抵抗的な症例に対して、代替療法の創出を目的とした臨床応用化を目的とする。

3. 研究の方法

(1)急性肝炎、急性膵炎モデルの確立し、プラスミン阻害剤の有効性を評価する。急性肝炎の薬剤誘発モデルは、TLR のアゴニストである CpG DNA と D-Galactosamine を投与して作製し、これを実験モデルとして利用する(Ae-Kyung Yi et al., *J Bio. Chem.* 281 : 15001-15012, 2006)。急性膵炎の薬剤誘発モデルはセルレインを投与して作製し、これを実験モデルとする。それらモデルマウスに対して、プラスミン阻害剤である YO-2(Okada Y et al., *Bioorg Med Chem Lett.*,10:2217-21, 2000)の

腹腔内投与(4mg/kg/day 連日)群と、溶媒(PBS)のみ投与のコントロール群をそれぞれ作製して以下の解析に用いる。YO-2 については神戸学院大学薬学部との MTA に基づき東京大学医科学研究所より供与を受ける。

(2)(1)で作製したマウスの臓器を採取し、ホモジナイズして lysate を調整して、各種サイトカインおよびその受容体(TNF- $\alpha$ 、Fas-ligand、CD40-ligand、TLR4 など)や、プロテアーゼ活性(MMP-2、MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAM17 など)、線溶系因子(プラスミン、uPA、tPA、PAI-1 など)について、Western blotting、ELISA 法によって調べる。また、各種臓器の病理組織標本を作製し、炎症性細胞の浸潤、各種サイトカインとその受容体、各種プロテアーゼ活性の局在変化を in situ hybridization 法、免疫組織化学染色を行い、YO-2 の効果判定を行う。

(3)(1)で作製したマウスの末梢血を採取し、各種サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、Fas-ligand、CD40-ligand)、プロテアーゼ活性(MMP-2、MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAM17)、線溶系因子(プラスミン、uPA、tPA、PAI-1 など)について real time PCR、Western blotting、ELISA 法を用いて調べる。

(4)このモデルの生体内で、線溶系の主要な因子であるプラスミン(plasmin)および各種マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性化を確認したのちに、これらモデルマウスにおいて、プロテアーゼの活性化の意義およびその機能解析を進めるため、plasminogen 遺伝子欠損マウスとその野生型、および MMP-9 遺伝子欠損マウスとその野生型を使用し、(2)、(3)同様に各種解析を行う。

(5)急性肝炎・急性膵炎モデルマウスに対して、YO-2 以外の阻害剤の効果も評価する。炎症部位への白血球の浸潤度について評価を行う。そして、これまでと同様に急性肝炎・急性膵炎モデルマウスを作製する。炎症誘発の際、MMP 阻害剤 KB-R7785(2mg/day 連日)を併せて投与する群と、プラスミンの作用に直接関与する tPA/uPA を阻害する Recombinant PAI-1 を併せて投与する群、溶媒(PBS)のみを投与するコントロール群をそれぞれ作製して効果判定を行う。

#### 4. 研究成果

C57BL/6 マウスに Toll like receptor-9 (TLR9) agonist の CpG-ODN1826 と D-galactosamine を投与することで、致死的な急性肝炎を誘導するモデルを確立した。

この急性肝炎モデルにおいて、血漿中で TNF $\cdot$ CCL2 などの炎症性サイトカイン/ケモカインの上昇を認め、肝臓の病理所見では肝実質や脈管周囲に多くの単核球浸潤を認め、肝障害が誘導されていることが明らかになった。さらに我々は、このモデルの生体内で、血液線維素溶解系(線溶系)の主要な因子であるプラスミン(plasmin)および各種マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性化を認めることを確認した。

そこで、急性肝炎におけるこれらのプロテアーゼの活性化の意義およびその機能解析を進めるため、plasminogen 遺伝子欠損マウスとその野生型、および MMP-9 遺伝子欠損マウスとその野生型を使用し、この急性肝炎モデルを作製したところ、これらの遺伝子欠損マウスでは生存率の有意な改善を認め、明らかな病態の改善を認めた。これらの結果をもとに、plasmin の活性中心を阻害する新規薬剤 YO-2 をこの急性肝炎モデルに投与することによって、急性肝炎の病態の制御を試みた。YO-2 の投与により、血中での TNF $\cdot$ CCL2 などの各種炎症性サイトカイン/ケモカインの濃度上昇は溶媒投与群と比較して有意に抑制され、その生存率も有意に改善した(図 2)。さらに臓器組織の病理所見でも炎症の鎮静化傾向が認められた(図 3)。その機序として、TNF をはじめとする炎症性サイトカインの多くが、各種 MMP の活性化に伴い、細胞外ドメイン分泌され、末梢血中へ産出されていること、そして YO-2 が plasmin の活性中心を阻害することで各種 MMP の活性化を阻害し、その結果これらの炎症性サイトカインの血中濃度上昇を抑制し、この致死的な病態の改善に寄与していることが示唆された。また、plasmin が各種 MMP の活性化だけでなく、CCL2 などの各種ケモカインの産生/活性化を促進し、その結果単球・マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤が促進されることが明らかになった。

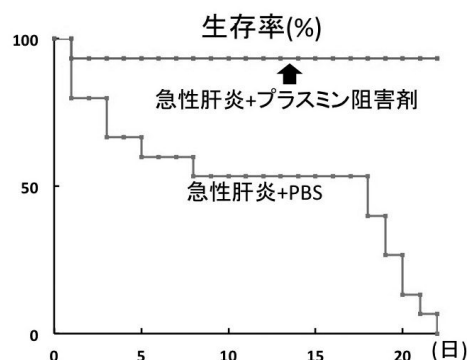
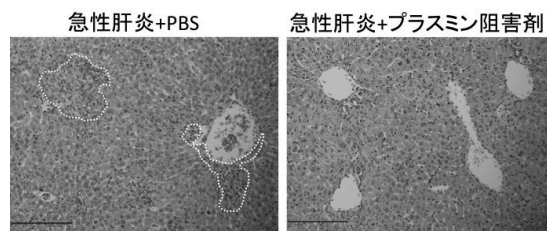


図 2 : 急性肝炎モデルの生存率  
プラスミン阻害剤投与群では、コントロール



群と比較して有意に生存率が改善している。

図 3 : 急性肝炎モデルの肝臓病理組織像  
コントロール群は炎症性細胞が認められる(点線)。一方、プラスミン阻害剤投与群では炎症性細胞浸潤が抑制され、組織構造も維持されている。

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7件)

1. Munakata S, Tashiro Y(sharing first author), Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahri D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B, Hattori K: Inhibition of plasmin protects against colitis in mice by suppressing the matrix metalloproteinase-9-mediated cytokine release from myeloid cells. *Gastroenterology*. 148:565-578,2015
2. Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Shimazu H, Munakata S, Yagita H, Okumura K, Tsuda Y, Okada Y, Tojo A, Nakauchi H, Takahashi S, Heissig B, Hattori K : Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking., *Leukemia*. 29:145-56, 2015
3. Tashiro Y, Kawai M, Takehara K, Munakata S, Ishiyama S, Sugimoto K, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Shibuya T, Osada T, Watanabe S, Sakamoto K : Successful retrieval of a retained capsule endoscope with single incision laparoscopic surgery. *Case Rep Gastroenterol*. 8:206-10 2014
4. Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H, Takahashi M, Yaginuma Y, Ishiyama S, Niwa K, Nagayasu K, Ito S, Kawai M, Takehara K, Tashiro Y, Munakata S : Prognostic factors after palliative resection for colorectal cancer with incurable synchronous liver metastasis. *Open Journal of Gastroenterol*. 3:259, 2013
5. Sugimoto K, Kawai M, Takehara K, Tashiro Y, Munakata S, Ishiyama S, Komiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K, Kawasaki S : T1 colorectal cancer with synchronous liver metastasis. *Case Rep Gastroenterol*.7:266-71, 2013
6. Sugimoto K, Kawai M, Takehara K, Tashiro Y, Munakata S, Nagayasu K, Niwa K, Ishiyama S, Komiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K : The validity of predicting prognosis by the number of lymph node metastases in node-positive colon cancer. *Open Journal of Gastroenterol*. 3:217, 2013
7. Nagayasu K, Komiyama H, Ishiyama S, Ogura D, Takahashi R, Tashiro Y, Niwa K, Sugimoto K, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Niwa S, Sakamoto K : Investigation of free cancer cells in peripheral blood using CEA

mRNA expression in perioperative colorectal cancer patients. *Mol Clin Oncol*. 1:668-674, 2013

〔学会発表〕(計5件)

1. 宗像慎也, 田代良彦, 島津 浩, 西田知恵美, イスマエルグリツリ, 佐藤亜紀, 小泉麻季子, 楠畑かおり, 小見山博光, 坂本一博, 宮田敏男, ハイジツヒペアテ, 服部浩一: PAI-1 阻害剤による血管新生及び組織再生促進療法. 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013.4
2. 宗像慎也, 田代良彦, 島津 浩, 西田知恵美, イスマエルグリツリ, 佐藤亜紀, 小見山博光, 坂本一博, 宮田敏男, ハイジツヒペアテ, 服部浩一: Plasmin inhibition protects against dextran sulfate sodium-induced colitis. 第 13 回東京大学生命科学シンポジウム, 2013.6
3. 西田知恵美, 楠畑かおり, 田代良彦, Ismael Gritli, 佐藤亜紀, 小泉(大木)摩季子, 守田陽平, 長野真, 坂本毅治, 口丸高弘, 近藤科江, 清木元治, 中内啓光, Beate Heissig, 服部浩一: 造血微小環境における MT1-MMP と造血因子の発現調節. 第 12 回日本再生医療学会, 2013.3
4. Hattori K, Munakata S, Sato A, Shimazu H, Tashiro Y, Nishida C, Nakauchi H, Heissig B: Therapeutic targeting of the fibrinolytic system controls TNF-associated inflammatory diseases. 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014. 11
5. Shimazu H, Munakata S, Nishida C, Sato A, Tashiro Y, Sato Y, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K: Pharmacological targeting of plasmin prevents macrophage activation syndrome in mice. 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014. 11

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kabusyoukakan/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田代 良彦 (TASHIRO, Yoshihiko)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 20636245

(2)連携研究者

服部 浩一 (HATTORI Koichi)  
順天堂大学大学院・医学研究科・特任先任准教授  
研究者番号: 10360116