

氏 名	大 住 涉
(ふりがな)	(おおすみ わたる)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成28年1月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Recombinant human soluble thrombomodulin improved lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure in mice (リポポリサッカライド/D-ガラクトサミン誘発性マウス急性肝不全に対する遺伝子組み換え型ヒト可溶性トロンボモジュリンの改善効果)
論文審査委員	(主) 教授 樋 口 和 秀 教授 廣 瀬 善 信 教授 朝 日 通 雄

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

急性肝不全(劇症肝炎を含む)は、広範囲な肝細胞壊死を呈し、肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、消化管出血、播種性血管内凝固症候群(DIC)などが出現する予後不良な疾患である。一旦劇症肝炎に陥ると、内科的治療における救命率は低く、肝移植は確立された治療法ではあるが、本邦の現状を考えると、その機会も少なく、新たな治療法の確立は急務である。近年、不明であった急性肝不全における急激に進行する肝細胞破壊のメカニズムに、high-mobility group box 1 protein (HMGB1)が深く関わっている事が報告された。HMGB1は通常核内タンパク質として核内に存在しDNA構造の保持に寄与している。炎症により核構造が破壊され核外に放出されると、HMGB1はマクロファージなどの炎症細胞

胞を活性化し NF- κ B の活性を介して炎症性サイトカインを産生誘導し炎症を増幅させて全身反応症候群(SIRS)などの致死的病態を引き起こすことが報告されている。トロンボモジュリンは血管内皮細胞に存在するタンパク質で血管内凝固の主要な役割を占めるだけでなく、様々な抗炎症作用を示す事が示されており、近年 HMGB1 の捕捉作用を有する事も報告されている。しかし現在までに急性肝不全に対するトロンボモジュリン製剤(TM- α)の有効性は証明されていない。本研究では TM- α の急性肝不全に対する治療応用の可能性を探るため、C57BL/6 マウスにリポポリサッカライド(LPS)/D-ガラクトサミン(GalN)を投与して作製する急性肝不全モデルを用いて、HMGB1 の関与にも着目しながら、TM- α の急性肝不全に対する治療効果を検討した。

《方 法》

本研究には 8 週齢の雄性 C57BL6 マウスを用いた。LPS/GalN の投与 1 時間後に生食水(偽薬群)または TM- α (300 mg/kg, TM- α 群)を皮下投与し(各群 20 匹)、LPS/GalN 投与 24 時間後の生存率を比較した。急性肝不全の関連因子を経時的に解析するため、LPS/GalN 投与 1 時間後に生食を皮下投与した後、1、3、7 時間に肝臓を摘出し血漿を採取した(各時点、各 6 匹)。LPS/GalN 投与後の TM- α による修飾効果を解析するため、LPS/GalN 投与 1 時間後に TM- α (300 mg/kg)を皮下投与し、LPS/GalN 投与後 7 時間に肝臓を摘出し血漿を採取した(6 匹)。

検討項目としては、血漿中の AST と ALT、HMGB1 を測定した。肝組織をホモジネートし、その上清液を用いて、NF- κ B 活性体である NF- κ B p65 を測定した。組織学的検討としてカルノア固定した後パラフィン包埋した肝組織から厚さ 5 μ m の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色にて肝実質の炎症評価を行い、好中球・マクロファージのマーカーであるミエロペルオキシダーゼ(MPO)陽性細胞数を測定するために免疫組織学的染色を施行した。Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)を用いて肝組織内の tumor necrosis factor (TNF)- α 、MPO、18S ribosomal RNA(18S rRNA)の遺伝子発現レベルを測定し、18S rRNA にて各遺伝子発現量を補正した。

《結 果》

HE 染色及び MPO 免疫染色による組織学的解析では、LPS/GalN 投与 7 時間後で偽薬群は広範囲な肝細胞壊死と MPO 陽性を示す炎症細胞の高度の浸潤を示し、24 時間経過後の生存率は 15%と重度の急性肝不全の病態を呈した。TM- α 群では、偽薬群に比して MPO 陽性細胞は有意に減少し壊死範囲も限局化し、24 時間後の生存率も 55%と有意に改善した。血漿中 AST と ALT 値は偽薬群において投与 7 時間で有意な上昇を認めたが、TM- α 群にて有意に抑制された。血漿中 HMGB1 値は偽薬群で投与後緩やかな上昇を認め、7 時間後の時点で有意差に上昇していたが、TM- α の投与にて有意に抑制された。肝組織中の NF- κ B p65 値は偽薬群で投与後 1 時間から 7 時間にかけて有意な上昇を認めたが、TM- α 群では有意に抑制された。偽薬群において炎症性サイトカインである TNF- α の遺伝子発現は、投与後 1 時間で速やかに上昇したのち 3 時間後では一旦低下し、7 時間後に再上昇したが、TM- α 群は 7 時間後の再上昇を有意に抑制した。MPO の遺伝子発現も偽薬群 (7 時間) で有意に上昇したが、TM- α 投与群では有意に抑制した。

《考 察》

今回使用した実験モデルは、LPS/GalN 投与 7 時間後の組織学的解析にて広範囲な肝細胞壊死と MPO 免疫染色陽性の炎症細胞の集積を認め、24 時間生存率 15%と致死的であり、急性肝不全に矛盾しない病態と考えられた。このモデルにおいて、TM- α 投与は有意な病態抑制効果を示した。機序として、急性肝不全の病態においては炎症性マーカーの TNF- α が重要と言われているが、本実験では偽薬群において TNF- α の遺伝子発現は肝障害早期の LPS/GalN 投与 1 時間後で高値を示したが、3 時間後では低下し、7 時間後に再上昇した。TM- α 群ではその再上昇を有意に抑制したことは、TM- α の修飾メカニズムを考える上で興味深く思われる。肝不全モデルにおいて HMGB1 は遅延性に濃度上昇を認めると報告されてきたが、本研究でも LPS/GalN 投与 7 時間後から急激な上昇を認めた。これらの知見を総合すると、HMGB1 は TNF- α の遺伝子発現を誘導することより、LPS/GalN 投与 7 時間

後での HMGB1 の血中濃度の上昇と TNF- α の遺伝子発現増加が密接に関連し、急性肝不全の致命的病態機序に深く関与する可能性がある。TM- α は HMGB1 の捕捉作用があることが知られており、本研究でも TM- α 群で LPS/GalN 投与 7 時間後の HMGB1 血中濃度の上昇は抑制されていた。今回 TM- α による HMGB1 の捕捉は検討していないが、HMGB1 の抑制が肝組織中の TNF- α により上昇する NF- κ B p65 も抑制や炎症細胞浸潤の指標である MPO の遺伝子発現抑制に寄与した可能性がある。

《結 論》

TM- α は LPS/GalN 誘発性マウス急性肝不全を改善した。そのメカニズムとして HMGB1 阻害作用を介して NF- κ B の活性化を阻害し、炎症性サイトカインの上昇や炎症細胞浸潤を抑制することが関与した可能性が考えられた。

論文審査結果の要旨

急性肝不全(劇症肝炎を含む)は、広範囲な肝細胞壊死を呈し、肝不全症状だけでなく、播種性血管内凝固症候群(DIC)などが出現する予後不良な疾患である。一旦劇症肝炎に陥ると、確立した治療法は肝移植のみであり、新たな治療法の確立は急務である。

申請者は、本研究において、C57BL/6 マウスにリポポリサッカライド(LPS)/D-ガラクトサミン(GalN)を投与して作製する急性肝不全モデルを用いて、トロンボモジュリン製剤(TM- α)による急性肝不全に対する有用性を検討した。

その結果、8週齢のC57BL6の雄性マウスにLPS/GalNを投与後1時間にTM- α を投与することにより、偽薬群に比して有意に生存率が高くなることを確認した。また、LPS/GalNの投与後に血漿中のHMGB1濃度、肝組織中のNF- κ B p65濃度上昇、TNF- α の遺伝子発現増加が見られた。一方、TM- α の投与により、LPS/GalN投後に増加する血漿中のHMGB1濃度上昇、肝組織中のNF- κ B p65濃度、TNF- α の遺伝子発現増加がすべて有意に抑制された。また、LPS/GalN投与後に増加した血漿中のAST、ALT、肝組織中の壊死面積、炎症細胞数もTM- α で有意に抑制された。以上より、TM- α が急性肝不全に対して有効性を持つ可能性が示された。

HMGB1は、壊死した細胞核から放出されるタンパク質であり、細胞外に放出されるとマクロファージなどの炎症細胞を活性化し、NF- κ Bの活性を介して炎症性サイトカインを産生誘導し、炎症を増幅させてSIRSなどの致命的病態を引き起こす。本研究において、TM- α は急性肝不全の病態で増加するHMGB1を抑制し、肝組織中のNF- κ B活性の抑制、急性肝不全と関連性があるTNF- α の抑制、炎症細胞のマーカーであるMPOの遺伝子発現の抑制を介して抗炎症効果を発揮した可能性がある。

申請者は、TM- α がLPS/GalN誘発急性肝不全モデルにおいて、炎症性サイトカインを抑制し病態の改善効果を発揮する事を明らかにし、その改善効果にHMGB1が関与する可能性を示した。したがって、治療が困難な肝不全の新たな病態を示唆するものであり、今後の肝不全における治療応用が期待できる重要な知見である。

以上により、本論文は本学大学院学則第11条第1項に定めるところの博士(医学)の学

位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Pharmacological Science 129(4): 233-239, 2015