

氏名	なかむら よしひこ 仲村 佳彦		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1655 号		
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates cerebral ischemic injury through a high-mobility group box 1 inhibitory mechanism without hemorrhagic complications in mice （マウスにおけるヒト可溶性リコンビナントトロンボモジュリンの high-mobility group box 1 抑制による虚血性脳障害に対する有用性）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	石倉 宏恭
	（副査） 福岡大学	教授	井上 亨
	福岡大学	教授	風川 清
	福岡大学	准教授	三浦 伸一郎

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

脳卒中は未だ疾病率、死亡率が高い疾患である。そして脳卒中は 80%が脳梗塞で 20%が脳出血である。さらに脳卒中の 20-25%が主要な脳血管の閉塞によるものである。

High-mobility group box (HMGB)1 は脳組織を含む種々の臓器において産生される核内タンパクである。脳虚血モデルマウスにおいて虚血部組織から HMGB1 が血中へ放出されることが報告されており、HMGB1 はマイクログリアを活性化し、神経組織の炎症に関与している。そのため、HMGB1 を抑制することは新たな脳梗塞治療につながる可能性がある。

ヒト可溶性リコンビナントトロンボモジュリン(rhsTM)の D1 ドメインは HMGB1 を吸着、分解することで抗炎症作用を有していることが知られている。さらに 2008 年に rhsTM(リコモジュリン®)は本邦において保険収載され、現在播種性血管内凝固症候群に対し、数多く使用されている、しかし、rhsTM が HMGB1 抑制効果を介し、虚血性脳損傷を改善させるか否かを検討した報告はないため、我々は 4 時間の中大脳動脈閉塞(middle cerebral artery occlusion; MCAO)モデルマウスを用いてその効果を明らかにすることとした。

### 【対象と方法】

MCAO モデルマウスの作成手順はマウスをイソフルラン吸入により麻酔導入し、マウスの頸部中央を切開して左総頸動脈と左外頸動脈を結紮後に総頸動脈を切開し、塞栓子として長さ 11mm の 8-0 ナイロンモノフィラメントの先端にシリコン樹脂をコーティングした

物質を左内頸動脈と左外頸動脈の分岐部から左内頸動脈を経由して9mm挿入した。さらにMCAO後に塞栓子を手前に引き抜くことによって再灌流を行った。4時間MCAO後にrhsTM(1, 5 mg/kg)を静脈内に単回投与した群と生理食塩水投与群(vehicle群)間の脳神経障害の程度(Neurological scoreにて評価)、脳梗塞体積(2, 3, 5, -triphenyltetrazolium chloride; TTC染色にて評価)、協調運動機能(ロタロッドテストにて評価)、血中HMGB1濃度、頭蓋内出血の体積をMCAO後24時間の時点で比較した。

#### 【結果】

Neurological scoreはrhsTM投与群(1mg/kg;  $3.6 \pm 0.3$ , 5mg/kg;  $2.9 \pm 0.3$ )、vehicle群( $3.6 \pm 0.3$ )に有意差は認めなかった。脳梗塞体積は用量依存性にrhsTM群(1mg/kg;  $76.7 \pm 7.3 \text{ mm}^3$ 、5mg/kg;  $64.8 \pm 6.4 \text{ mm}^3$ )がvehicle群( $93.1 \pm 7.0 \text{ mm}^3$ )に比較し、有意に低下した( $P < 0.05$ )。さらにrhsTM 5mg/kg投与群( $66.2 \pm 9.9 \text{ sec}$ )はvehicle群( $22.3 \pm 12.2 \text{ sec}$ )に比較し、ロタロッドテストによる協調運動機能が有意に改善した( $P < 0.05$ )。さらに血中HMGB1濃度は用量依存性にrhsTM群(1mg/kg;  $20.1 \pm 3.81 \text{ ng/mL}$ 、5mg/kg;  $14.9 \pm 3.11 \text{ ng/mL}$ )がvehicle群よりも有意( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )に低値であった。また、脳出血体積はrhsTM群(1mg/kg群;  $6.91 \pm 3.25 \text{ mm}^3$ 、5mg/kg群;  $5.08 \pm 2.57 \text{ mm}^3$ )とvehicle群( $3.47 \pm 2.42 \text{ mm}^3$ )に有意な差は認めなかった。

#### 【結論】

rhsTMはHMGB1を抑制する効果を介し、虚血性脳傷害の病態を、出血性合併症を引き起こすことなく改善することが明らかとなった。これら結果からrhsTMは新たな脳梗塞治療薬として有用である可能性が示唆された。

### 審査の結果の要旨

本論文は、中大脳動脈閉塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)モデルマウスに対して、可溶性遺伝子組み換え型ヒトロンボモジュリン(recombinant human soluble thrombomodulin, rhsTM)製剤を投与し、rhsTMが炎症性メデューターの1つであるHigh Mobility Group Box (HMGB)1を抑制することで、虚血性脳障害の病態を改善させるか否かを検討し、その結果を報告している。今回の結果より、rhsTM投与群はコントロール群に比較して、血漿HMGB1濃度を有意低下させ、さらに有意に脳梗塞の範囲を減少させた。これに伴い、マウスの協調運動能も改善した。一方、rhsTM投与による出血性合併症(脳出血)発症の増大は認めなかった。

#### 1) 斬新さ

rhsTMは抗凝固作用を有しており、2008年より播種性血管内凝固症候群の治療薬として臨床現場で用いられている。一方で、rhsTMがHMGB1を抑制し、抗炎症作用を有すること

が明らかとなった。rhsTM の HMGB1 抑制効果に着目して、虚血性脳障害に対する有効性を検証した報告は過去に無く斬新である。

## 2) 重要性

現在プラスミノゲンアクチベーター(tissue plasminogen activator, t-PA)が脳梗塞の予後改善に有用な治療法として推奨されているが、t-PA 投与はときに重篤な脳出血合併症を引き起こす。一方、本検討において rhsTM は脳出血の発症を増大させることなく、虚血性脳障害の病態を改善させることが明らかとなり、新たな脳梗塞治療薬の1つとして応用できる可能性が示唆された事は極めて重要な知見である。

## 3) 実験方法の正確性

既に本モデルマウスは確立した虚血性脳障害モデルマウスである。さらに、脳梗塞の範囲や協調運動能の評価法も既に確立されたものである。また、血漿中 HMGB1 濃度は市販のキットを用いて測定したが、本測定キットは既にいくつもの論文にて HMGB1 の測定に用いられているものである。

以上より実験方法の正確性は十分に担保されている。

## 4) 表現の明瞭性

既存の手法を用いた評価で明確な論文として完成させ、定評のある学術誌である Journal of the Neurological Sciences に原著論文として採用された。

以上より本論文は明瞭に表現されている。

## 5) 主な質疑応答

Q1: rhsTM はペナンプラを改善させたのか?

A1: その可能性が高いと考えられます。

Q2: 本モデルは重症度にばらつきがでるのではないか?

A2: 神経障害の程度を示す neurological score が MCAO 4 時間の時点で 1 点未満は解析から除外し、ばらつきが出来るだけ出ないようにしています。

Q3: 頭部外傷では rhsTM は効果を示すのか?

A3: 頭部外傷モデルラットにおける抗 HMGB1 抗体の有効性が過去に報告されており、rhsTM が頭部外傷に対しても有効性を示す可能性があります。また、HMGB1 は壊死細胞の核内から細胞外へ出て来るので、種々の病態で rhsTM は有効性を示すと思われます。

Q4: 投与回数を増やしても効果があるのか?

A4: 現在、連日投与を行い、虚血性脳障害の慢性期における rhsTM の有効性を検討中で

す。実験は rhsTM 5mg/kg の 14 日間連続腹腔内投与により死亡率は rhsTM 群がコントロール群に比較し、低下傾向でありましたが、有意な差はありませんでした。この結果は静脈内と腹腔内という投与経路の違いによる薬剤 (rhsTM) の血中濃度に起因するのではないかと考えています。

Q5: 臨床応用の可能性は？

A5: 既に播種性血管内凝固症候群でのランダム化比較試験において、rhsTM 投与群がヘパリン投与群よりも有意に転帰を改善させ、かつ出血性有害事象が少なかったことが証明されています。よって、脳梗塞患者でヘパリンが適応となる患者に rhsTM を用いた場合、出血性を抑制しつつ、本剤の抗凝固・抗炎症作用による有効性が期待できるのではないかと考えています。

Q6: 浮腫に対する有効性は？

A6: 今回は検討し得ていません。しかし、虚血性脳障害以外の炎症を惹起させたモデルマウスやラットでは浮腫の軽減が得られています。よって、本モデルマウスにおいても浮腫に対する有効性を示す可能性があります。

Q7: 局所動脈内注射による投与と全身投与での有効性の違いはあるのか？

A7: これまで私が検索した限りでは局所動脈内注射による投与と全身投与での有効性の違いを検討したものはありませんでした。

Q8: 薬剤の有効投与量は動物とヒトでは一般的に約 100 倍異なるが、今回のモデルマウスでのリコモジュリンの有効投与量は臨床で用いられている投与量とどの程度違いがあるのか？

A8: 約 100 倍の違いで一般的なものと相違はありません。

本論文は、斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭性において優れており、学位論文に値すると評価された。