

氏名	いりえ ゆうへい 入江 悠平		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1715 号		
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 15 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	Macrophage-derived HMGB1 as a Pain Mediator in the Early Stage of Acute Pancreatitis in Mice: Targeting RAGE and CXCL12/CXCR4 Axis （マウス急性膵炎の発症早期における内臓痛は RAGE、CXCR4 を標的としたマクロファージ由来 HMGB1 が関与する）		
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 向坂 彰太郎
		福岡大学	教授 植木 敏晴
		福岡大学	准教授 积迦堂 敏

内容の要旨

【目的】

急性膵炎、慢性膵炎、膵臓癌などの膵臓疾患患者において、膵臓痛のコントロールは重要である。膵臓痛の発現機序はいずれも神経免疫相互作用についての報告が多い。核内タンパク質である High mobility group box 1 (HMGB1) は damage-associated molecular patterns (DAMPs) の一種であり、急性期の全身性炎症症候群においてヒトでは血中濃度が上昇し、急性膵炎の際にも同様に上昇する。そこで今回、我々は急性膵炎における膵臓痛にマクロファージ由来 HMGB1 およびその標的細胞表面のレセプターを解明することとした。

【対象と方法】

雄性 ddY マウス (18-22g、4-5 週生) を用いて実験を行った。マウスにセルレイン 50 μ g/kg を腹腔内に一時間毎に計 6 回反復投与を行い、急性膵炎モデルを作成した。セルレイン最終投与から 30 分後にマウスの上腹部を計 4 種類の von Frey filament (0.02g、0.07g、0.16g、1.0g) を用いてそれぞれ 5-10 秒おきに 5 回刺激し、その疼痛スコアの合計値を算出した。スコアリングの方法は 0 点=反応なし、1 点=逃避・舐め行動、2 点=飛び上るとした。von Frey test 終了後、マウスを鎮静し血液を採取後に血清 Amy を測定した。その後、安楽死させた後に膵湿重量を測定した。

検定は2群間比較に Student's t 検定を、多群間比較に Tukey's 検定を用いた。ノンパラメトリック検定には Wilcoxon 検定を用い、除外検定には Kruskal-Wallis H 検定を用いて、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

結果1：HMGB1 中和抗体(0.1~1mg/kg)もしくは HMGB1 の吸着分解作用を有する遺伝子組み換えヒト可溶性トロンボモジュリン(rhsTM：3-10mg/kg)をセルレイン初回投与前に投与したところ、コントロール群と比較して有意に疼痛の軽減を認めた。

結果2：結果1と同様に HMGB1 中和抗体および rhsTM をセルレイン最終投与後に投与すると、HMGB1 中和抗体投与群では30分後に rhsTM 投与群では30分後ではなく90分後に有意に疼痛の軽減を認めた。

結果3：セルレイン誘起膵炎モデルにおける、血中 HMGB1 の濃度を ELISA 法にて測定したところ、コントロール群とセルレイン誘起膵炎モデルの間に有意さは認めなかった。また、同様に膵細胞における HMGB1 のタンパク定量を Western-Blotting を用いて測定したが、この2群間に差は認めなかった。

結果4：マクロファージ由来 HMGB1 が炎症に寄与している報告が散見されている。そこで、セルレイン誘起急性膵炎モデルにマクロファージ由来の HMGB1 が関与しているかを検討した。マクロファージの失活作用があるミノサイクリン、マクロファージからの HMGB1 の放出抑制作用を有するエチルピペートを、セルレイン誘起急性モデルに前投与することで、いずれの場合も上腹部疼痛の有意な軽減を認めた。

さらに、マクロファージの貪食作用を有するリポソームクロドロネートを投与し、検討を行った。生体内のマクロファージが枯渇していることを確認するため、クロドロネート投与24時間後のマウス脾臓のマクロファージの除去率を確認した。フローサイトメトリーを用いて CD11b (+)、F4/80 (+) をマクロファージと判定し、除去率を確認するとコントロールと比較して85%の除去率を認めた。また、クロドロネートを投与しマクロファージを除去したマウスでも同様に上腹部の膵臓痛は有意に抑制された。

結果5：次に、セルレイン誘起急性膵炎マウスにおける、膵臓痛にマクロファージ由来 HMGB1 の標的細胞における責任受容体の検索を開始した。RAGE のアンタゴニストである、FPS-ZM1、低分子ヘパリン (LMWH)、CXCR4 のアンタゴニストである AMD3100、TLR4 のアンタゴニストである LPS-RS を前投与したところ、LPS-RS を除くアンタゴニストにて有意に上腹部の疼痛は抑制された。さらに、これらの阻害薬をセルレイン誘起急性膵炎マウスに後投与することで、上腹部関連痛を抑制するかを検討した。結果、AMD3100 および

RAGE の阻害薬である FPS-ZM1 および LMWH にて強く上腹部関連痛は抑制された。実際、セルレイン誘起急性膵炎マウスの膵臓における RAGE、CXCR4、CXCL12 のタンパク量はコントロール群と比較して有意に上昇していた。

結果 6 : HMGB1 の下流シグナルの検索を開始した。これまで、慢性膵炎の炎症の下流シグナルに MAP キナーゼが関与することが報告されている。セルレイン 3 回目、6 回目投与後の膵臓における JNK のリン酸化は有意にウェスタンブロットで増加していることが確認された。さらにこれらは FPS-ZM1、AMD3100 の投与で CXCR4、RAGE の発言量は有意に低下していることも確認できた。

【結論】

急性膵炎の膵臓痛にはマクロファージ由来 HMGB1 が関与している。HMGB1 はターゲット細胞における、RAGE や CXCR4 に作用し、JNK を介して細胞内シグナルが伝達することで痛みに関与していることが示唆された。

審査の結果の要旨

本論文はセルレイン誘起急性膵炎モデルマウスにおける膵臓痛に関して、真核細胞の核内タンパク質の一つである high mobility group box 1 (HMGB1) が疼痛のメディエーターであることを見い出すと共に、この膵臓痛が遺伝子組み換えヒト可溶性トロンボモジュリン (recombinant human soluble thrombomodulin: rTM) によって軽減することを証明した論文である。

また、膵臓痛に関与する HMGB1 はマクロファージ由来である事も証明した。さらに、HMGB1 の標的細胞に対するパターン認識受容体が RAGE (receptor for advanced glycation end-products) ならびに CXCR4 (cxc chemokine receptor 4) である事、並びに rTM の HMGB1 の吸着・分解作用により膵臓痛が軽減することを見出した。

1) 斬新さ

rTM は抗トロンビン作用やプロテイン C の活性化作用により抗凝固作用を発揮する。本邦では 2008 年から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、rTM は自身の D1 ドメインに HMGB1 を吸着することでその作用を抑制し、抗炎症作用を発揮することが近年明らかとなった。本検討は rTM の HMGB1 抑制効果に着目して、膵臓痛に対する有効性を検証したが、膵臓痛と HMGB1 の関連を報告した内容は過去に無く斬新である。

2) 重要性

膵臓痛発症のメカニズムはこれまでいくつか機序が報告されている。しかし、現時点において、明確な機序は解明されていない。このため、膵臓痛に対する阻害薬の開発が進んでいない現状にある。本検討は、rTMのHMGB1抑制効果により膵臓痛が軽減することを初めて証明した。膵臓痛に対するrTMの疼痛抑制効果を見出した事は極めて重要な知見である。

3) 実験方法の正確性

既にセルレイン誘起急性膵炎モデルマウスは確立した急性膵炎モデルマウスである。さらに、痛みの評価方法である von Frey test も 1980 年代から動物モデルの痛みの評価に普遍的に用いられている。また、今回の実験に使用した各種阻害薬についても、多数の基礎実験において既にその効果が証明されてきた薬剤を使用した。

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 *Neuroimmune Pharmacology* 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: HMGB1 は膵臓痛の発現にのみ関与するのか? 他臓器の疼痛発現には関与していないのか?

A1: 実験レベルでは HMGB1 が膀胱痛や腸管痛の際にも関与していることが確認されています。

Q2: 麻薬に比べて、rTM は痛みをどれくらい軽減するのか?

A2: 麻薬と rTM の疼痛軽減効果を比較した実験は残念ながら行っておりません。ただし、麻薬較べて rTM には沈静作用がないため、臨床上使用しやすい薬剤だと考えています。

Q3: 慢性膵炎にも rTM は有効なのか?

A3: はい、他国の違う研究チームで HMGB1 が慢性膵炎の痛みに関与していることを報告しました。このため、rTM は慢性膵炎の痛み対しても有効であると考えられます。

Q4: クロドロネートを用いたときに、膵臓のマクロファージ除去は確認したのか?

A4: いいえ、確認は実施しておりません。その実験は重要であると考えます。

Q5: HMGB1 が壊死細胞の核内から放出されるのであれば壊死した膵細胞からも HMGB1 は放出されるのか?

A5：今回の膵炎モデルは比較的弱い膵炎モデルです。今回は提示しませんでしたでしたが、この膵炎モデルの H-E 染色による膵臓の病理所見では壊死組織がないことを確認しております。その他の HMGB1 放出の因子としては、もちろん好中球などの免疫細胞などが挙げられます。

Q6：痛み刺激は同一人物がやっているのか？また、やり方によってはフィラメントの刺激の強度に差がでるのでは？

A6：すべての実験はわたくし一人で実施しました。また、von Frey test はフィラメントを用いてゆっくりとマウス上腹部に加速をつけずに刺激します。そして5秒以上の間隔をあけて次の刺激を加えます。これが正式なやり方で、これにより window up 現象が起きないよう心掛けました。

Q7：HMGB1 中和抗体は臨床薬品として存在するのか？

A7：いいえ、今回は実験のために岡山大学の西堀教授から提供していただきました。

Q8：rTM はヒトでも痛みが抑制されるのか？

A8：先に報告された抗がん剤による神経障害性疼痛に対する rTM の予防投与は現在米国において第3相臨床試験が進んでおります。よって、膵臓痛でも抑制効果が期待できると考えております。

Q9：胆石による疝痛にも rTM は有効か？

A9：それについては検討を行っておらず、不明であります。しかし、腸管、膀胱、膵臓の痛みに HMGB1 が関与しておりますので、期待できると考えます。

Q10：rTM の投与量はヒトの投与量と比較して同等か？

A10：いいえ。臨床で DIC 治療時に使用する量の 100 倍量を今回の動物実験では使用しました。

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。