

氏名	ほしの こうた 星野 耕大		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第1841号		
学位授与の日付	令和2年9月13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	Enhanced effect of recombinant human soluble thrombomodulin by ultrasound irradiation in acute liver failure （超音波照射によるトロンボモジュリン製剤の効果増強作用）		
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	高松 泰
	福岡大学	教授	岩本 隆宏
	福岡大学	教授	秋吉 浩三郎

内容の要旨

【目的】

急性肝不全(Acute liver failure: ALF)は炎症性サイトカインを惹起させることで肝臓に炎症を引き起こし、肝細胞が機能不全となる病態である。ALFは約30%に肝移植が必要となり、生存率67%の予後不良な病気の一つである。

rhsTMは播種性血管内凝固症候群(DIC)の治療薬として本邦では広く用いられている抗凝固薬である。このrhsTMは抗凝固作用のみならず、rhsTMのレクチン様ドメインがHMGB-1(High Mobility Group Box-1)を吸着、分解し、更にはprotein Cを活性化することでTNF- α などの炎症性サイトカインを抑制することで抗炎症作用を併せ持つ。そのため、rhsTMはDICのみならず、様々な疾患にも効果が期待されている。Osumiらの報告によるとALFマウスモデルに対してトロンボモジュリン製剤であるrecombinant human soluble thrombomodulin(rhsTM)を投与することで炎症性サイトカインを抑え、肝障害を軽減させた上で予後を改善した。

また、当センターの仲村らは、脳梗塞モデルの研究においてrhsTMが濃度依存性に効果が増強すると報告した。そのため、疾患に対しては高濃度のrhsTMを投与することが求められる。しかし、rhsTMの臨床試験において、rhsTM投与群は43.1%に何らかの出血合併症を引き起こし、その内の1.7%は重大な出血合併症のためにrhsTMの投与を中止せ

ざるをえなかった。この出血合併症のために高用量の rhsTM 投与は現実的に不可能と考えられる。そこで、rhsTM の全身投与量を増量させずに、目的臓器においてのみ rhsTM の効果を増強させる手段があれば、それは理想的な治療法となる。

近年、超音波は治療手段として応用できる可能性が広がっており、低出力超音波が照射された際に細胞に一過性の小孔が形成される現象を sonoporation と言う。この小孔から薬物が細胞内に取り込まれることにより薬剤吸収率が高まる可能性があり、超音波による薬剤の効果増強作用が期待される。

今回、ALF モデルマウスに対して rhsTM 投与後に肝臓に超音波照射 (ultrasound: US) を行うことで rhsTM の効果が増強するかを検討する。

【対象と方法】

C57BL/6 マウス 8 週を用いて、lipopolysaccharide (LPS) 4 μ g/kg と D-galactosamine (GalN) 600mg/kg を腹腔内投与し、ALF モデルを作成した。Normal、Placebo、rhsTM 1mg/kg、rhsTM 5mg/kg、rhsTM 1mg/kg+US、rhsTM 5mg/kg+US の 6 群に分類し、各 5 匹ずつで検討を行った。rhsTM はモデル作成から 30 分後に尾静脈投与を行い、超音波照射は rhsTM 投与直後にマウスの腹部を剃毛した上で Intensity 0.3 W/cm², Duty 50%, 60 秒間の設定で経皮的に肝臓へ照射した。モデル作成から 7 時間後に検体を採取し、血漿中の AST・ALT・HMGB1 を測定し、肝組織 (肝臓左葉) を HE 染色することで肝障害度の評価、TUNEL 染色することでアポトーシスの評価、また肝組織をホモジナイズさせた後に肝組織内の rhsTM 濃度を評価することで sonoporation の効果を評価する。

【結果】

各群における血漿中 AST・ALT 濃度は normal: 163 \pm 37 and 48 \pm 15 IU/L, placebo: 3324 \pm 394 and 5391 \pm 796 IU/L, rhsTM 1 mg/kg: 3047 \pm 532 and 3841 \pm 1187 IU/L, 5 mg/kg: 1262 \pm 408 and 1478 \pm 645 IU/L, 1 mg/kg + US: 955 \pm 268 and 754 \pm 258 IU/L, 5 mg/kg + US: 783 \pm 284 and 325 \pm 324 IU/L であった。rhsTM 5mg/kg 群は 1mg/kg と比較して有意に AST 濃度が低く、濃度依存性の効果を認めた (P < 0.05)。また、rhsTM 単独群と比較して、rhsTM+US 群は有意に AST、ALT の改善を認めた (P < 0.05)。

HMGB1 に関しては、rhsTM 1mg+US 群は rhsTM 1mg 単独群より有意に HMGB1 の改善を認めた (23 \pm 6 vs. 134 \pm 16 ng/mL; P < 0.05)。

さらに、肝臓の病理学的検討では、Placebo 群や rhsTM 1mg/kg 群で認められた類洞内出血、肝細胞の巣状壊死、リンパ球浸潤は rhsTM 5mg/kg 群、rhsTM 1mg/kg+US 群、rhsTM 5mg/kg+US 群ではほとんど認められなかった。肝傷害度を評価する Histological score において、rhsTM 5mg/kg 群、rhsTM 1mg/kg+US 群、rhsTM 5mg/kg+US 群は rhsTM 1mg/kg 群と比較して有意な改善を認めた (1.3 ± 0.3 vs. 3.0 ± 0.6 ; $P < 0.01$, 1.3 ± 0.3 vs. 3.0 ± 0.6 ; $P < 0.01$, 0.3 ± 0.3 vs. 3.0 ± 0.6 ; $P < 0.01$)。また、アポトーシスを評価する TUNEL 染色陽性数の数においても、同様の結果であった(各 $P < 0.01$)。一方で肝組織内の rhsTM 濃度に関しては、rhsTM 5mg/kg (+US)群は rhsTM 1mg/kg (+US)群と比較して肝組織内の rhsTM 濃度は有意に高値であった [6029 ± 1388 (4835 ± 465) vs. 2289 ± 218 (1250 ± 192) pg/mL; $P < 0.01$]が、超音波照射による肝組織内 rhsTM 濃度の変化は認められなかった。

【結論】

急性肝不全モデルにおいて rhsTM に超音波照射を加えることで肝臓の傷害度やアポトーシスを更に低下させることができ、超音波による rhsTM の効果増強作用が認められた。一方でそのメカニズムに関しては sonoporation を示唆する結果には至らず、PS externalization の可能性が示唆され、メカニズムに関する更なる検証が必要である。

審査の結果の要旨

本論文は、急性肝不全モデルに対して recombinant human soluble thrombomodulin (rhsTM) を投与した後に超音波を肝臓に照射することで、肝障害や肝組織のアポトーシスを軽減し、超音波による薬剤効果増強作用を *in vivo* で証明した初めての報告である。

急性肝不全の際には障害された肝細胞から HMGB1 が放出されることで、炎症反応が惹起される。一方、rhsTM のレクチン様ドメインには HMGB1 を吸着・分解する作用が存在する。

今回の検討結果でも急性肝不全モデルに rhsTM を投与した場合、血漿中 HMGB1 濃度は有意に低下し、血漿中 AST 及び ALT、肝障害の程度を病理学的にスコア化する histological score、アポトーシスを評価する TUNEL 陽性細胞数が有意に低下していた。つまり、rhsTM は急性肝不全の病態改善に有効な薬剤であることを実証した。

また、その効果は rhsTM 投与後に肝臓に超音波を照射することで rhsTM の更なる効果増強作用を認めた。

現在、*in vitro* において超音波を使用した sonoporation が注目されている。Sonoporation とは超音波で細胞膜に穴を開けて、薬剤を細胞内に浸透させるメカニズムであるが、これまで *in vivo* の研究で sonoporation を検証した報告は見当たらない。

そこで今回は急性肝不全モデルマウスに超音波を照射し、sonoporation により肝組織

内に rhsTM 濃度が上昇するか否かを in vivo で確認した。その結果、肝組織内の rhsTM 濃度上昇は認められず、sonoporation は生じていないという結果を得た。

この結果より、超音波照射による肝障害の軽減効果を以下の様に考察した。

真核細胞の細胞膜はリン脂質二重膜で構成されており、内側に存在する phosphatidylserine (PS) が細胞外に現れる PS externalization が生じた場合、アポトーシスが惹起されるが、超音波照射は PS externalization を抑制することが確認されている。

以上より、今回の急性肝不全モデルに対する rhsTM 投与と超音波照射による肝障害やアポトーシスの軽減効果は rhsTM の抗 HMGB1 作用と超音波照射の PS externalization の抑制効果の相加効果の可能性が示唆された。

1. 斬新さ

rhsTM 投与直後に超音波照射をおこなうことで、肝障害軽減効果が増強する事を in vivo で初めて証明した事は極めて斬新である。

2. 重要性

超音波照射によって、rhsTM の投与量を抑えつつ、薬剤効果を維持・増強させ、さらに出血合併症のリスクの抑制が期待できることから、理想的な治療法となる可能性がある。超音波照射は非侵襲であることから臨床現場への応用も期待できる点で、重要性は高い。

3. 実験方法の正確性

急性肝不全モデルに対する rhsTM 投与、超音波照射、血漿中の AST・ALT ならびに HMGB1 の測定、摘出した肝組織の Histological score や TUNEL 染色および陽性細胞数の計測は既に先行研究があり、確立された実験系を採用した。加えて、正確な統計手法を用いて解析が実施され、実験方法の正確性は確保されている。

4. 表現の明瞭性

目的、方法、結果は正確かつ明瞭に表現されている。考察については、今回の報告における位置づけを示すとともに実施した検討の不十分な点を明確に示している。

5. 主な質疑応答

Q: 超音波単独群での検討はしたか？

A: 超音波単独群における AST、ALT の結果は placebo 群と変化を認めず、超音波単独による効果はなかった。

Q: トロンボモジュリンのドメイン 1 のみを分離することで抗凝固作用を抑えた上で抗炎症作用のみを期待できるのでは？

A: すでにドメイン 1 のみを分離して動物に投与した実験はある。もしかすると今後、ドメイン 1 のみ分離された薬剤が一般化するかもしれない。

Q: 超音波の強さはどうなのか？

A: 今回の実験で使用した超音波の強度は我々が臨床で診断目的に使用しているエコー機器よりも強い。あまりに強い強度の超音波は細胞障害の可能性があるので、人体に用いる際には低出力、短時間、頻回照射による超音波強度の調整が必要である。

Q: 今回使用した rhsTM の投与量は、臨床で使用している投与量と比べてどうなのか？

A: rhsTM 1mg/kg は臨床で用いられている量の数十倍である。今回の実験は rhsTM の投与量も多く、超音波の強度も強いので、臨床応用するためには薬剤の投与量や超音波の強度を調整する必要がある。

Q: 今後はどのような研究を予定しているか？

A: 本検討で PS externalization の抑制効果が超音波による薬剤の効果増強作用に関与した可能性がある。そのため、超音波と PS externalization の関係を明らかにするために in vitro での検討が必要である。

その他の質問に関しても、申請者は適切に回答していた。また、今後の検討に関するアドバイスもあった。

以上より、本論文は独創性を有しており、今後の超音波医学の発展に貢献する内容であり、学位論文に値すると評価された。