

## 学位論文の要約

### **Thrombomodulin Attenuates Inflammatory Damage Due to Ischemia and Reperfusion Injury in Mice in Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner**

(マウス肝虚血再灌流障害におけるトロンボモデュリンの  
Toll-Like Receptor 4 依存性の抗炎症効果の解明)

京都大学大学院医学研究科博士課程

医学専攻 肝胆膵・移植外科学

門野 賢太郎

## 学位論文の要約

### Thrombomodulin Attenuates Inflammatory Damage Due to Ischemia and Reperfusion Injury in Mice in Toll-Like Receptor-4 Dependent Manner

(マウス肝虚血再灌流障害におけるトロンボモデュリンの  
Toll-Like Receptor 4 依存性の抗炎症効果の解明)

【背景】播種性血管内凝固症候群の治療において recombinant thrombomodulin (rTM) 製剤の有用性は高く評価されている(1, 2)。近年、rTM が有する抗凝固作用に加え、抗炎症作用が注目されているが(3, 4)、その作用機序は十分に解明されていない。肝切除や肝移植といった肝臓外科領域においては、虚血再灌流障害(Ischemia Reperfusion Injury:IRI)の予防・軽減はいまだに重要な課題であり(5)、toll-like receptor 4 (TLR4)が key factor の一つとして報告されている(6, 7)。一方、rTM は TLR4 の内因性リガンドである high-mobility group box 1 protein(HMGB1)の作用を抑制するという報告がある(4)。今回、rTM が肝 IRI に対して HMGB1-TLR4 経路依存性に保護効果を発揮することを見出してその作用機序を解明した。

【方法】(I) 野生型 C56BL/6 マウス(wild type:WT)において、虚血 30 分前に rTM(5 mg/kg)を静脈内投与し、70%肝部分温虚血 60 分後に再灌流を行う肝 IRI モデルを作成し、再灌流後 6 時間にて評価を行った。血清 AST/ALT 値、HE 染色及び TUNEL 染色による組織学的評価、血清 HMGB1 値、肝組織中の RT-PCR による炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, CXCL-1, CXCL-2)の発現、western-blot による経時的な TLR4 シグナル(I $\kappa$ B, JNK, ERK1/2)のリン酸化、TLR4 発現量、HMGB1 発現量、及び pyroptosis (HMGB1 産生性の細胞死)を評価し、非投与群との比較検討を行った。(II) TLR4 ノックアウトマウス(KO)において、同様のモデルを作成し比較検討を行った。(III) in vitro 実験として、腹腔マクロファージ(M $\phi$ )を採取し、recombinant HMGB1(rHMGB1)による刺激(48 時間)を加え、rTM 投与の影響を TNF- $\alpha$  値により評価した。(IV) rTM (4 分画より構成)のドメイン分画における作用を検討する為に、WT での肝 IRI モデルを作成しドメイン 1 分画製剤(rTMD1)を単独前投与し、その効果を検証

した。

**【結果】** (I) WT においては、肝障害・apoptosis・血清 HMGB1 値・肝組織中の炎症性サイトカイン・TLR4 シグナル・HMGB1 及び pyroptosis は IR 刺激により誘導されたが、それらは rTM 投与により有意に抑制された。(II) TLR4 KO では WT より肝障害レベル及び HMGB1 の産生が減少し、TLR4 シグナルの活性化も抑制されたが、rTM 投与ではそれ以上の改善効果は認めなかった。(III) WT 由来 M $\phi$  では rHMGB1 刺激により容量依存性に TNF- $\alpha$  の産生を認めたが、それらは rTM により容量依存的に抑制された。一方、TLR4 KO 由来 M $\phi$  では、rHMGB1 刺激による TNF- $\alpha$  誘導を認めず、rTM 投与による変化も認めなかった。(IV) rTMD1 投与では、IR 刺激による血清 AST/ALT 値・HE 染色及び血清 HMGB1 値の上昇に対して、rTM 投与と同等の効果を示した。

**【考察】** WT では IR 刺激による障害は TLR4 KO より増強していたが、rTM 投与により肝障害レベルが TLR4 KO と同程度まで低下し、TLR4 シグナルの活性化も抑制された。一方 TLR4 KO では rTM 投与における改善効果は認められなかった。以上の結果より、rTM 投与は TLR4 シグナルに対する抑制効果を通して、肝障害を軽減したと考えられた。また、肝細胞の apoptosis は、IRI 後の局所障害と相関すると報告されているが(8)、rTM 投与は TUNEL 染色及び western-blot による評価においてアポトーシスを改善した。これはアポトーシスを誘導する TNF- $\alpha$  産生(9)、また JNK 活性化(10)が rTM 投与により抑制された結果と考えられた。

そこで、rTM が TLR4 シグナルを抑制したメカニズムについて検証した。IR 刺激により肝細胞質中及び血清中の HMGB1 が誘導されたが、HMGB1 と TLR4 間の作用を調べるために各々のマウス由来の腹腔 M $\phi$  を rHMGB1 により刺激したところ、TLR4 依存性に TNF- $\alpha$  産生をしたが、これは rTM 投与により抑制された。これらの結果より rTM は HMGB1-TLR4 経路を抑制することを確認した。さらに、TLR4 KO においては、肝細胞質中および血清中の HMGB1 の上昇が抑制されており、HMGB1 の核内から細胞質への移行及び細胞内から血清中への放出が TLR4 に制御されている可能性も考えられた。

近年、HMGB1 が necrosis だけでなく、pyroptosis という細胞死にも伴って放出されることが報告された(11)。pyroptosis に伴う HMGB1 放出はインフラマ

ソームにより制御されており(12)、TLR4 下流のシグナルはインフラマソームを活性化する(13, 14)。本研究では、pyroptosis は特に IR の急性期において誘導されていたが、再灌流後 1 時間においては rTM 投与により抑制された。JNK 及び NF- $\kappa$ B がインフラマソームの活性化を制御することが報告されており(15, 16)、rTM が TLR4 シグナルを抑制し HMGB1 の放出を低下させ、HMGB1-TLR4 経路を介した作用のみならず TLR4 依存性の HMGB1 産生も抑制したと考えられた。さらには、rTMD1 は rTM と同様に IRI を抑制し rTM の効果が主にドメイン 1 分画によることが示され、rTMD1 の新規薬としての可能性が示唆された。

**【結語】** IR 刺激による HMGB1 産生は TLR4 により制御されており、HMGB1 が細胞に与える炎症作用もまた TLR4 依存性であり、rTM 投与はこれら両者を抑制した。rTM は HMGB1-TLR4 経路を抑制することで、TLR4 依存的に抗炎症作用を発揮し、肝 IRI の改善を誘導した。さらに rTM のサブドメイン rTMD1 も同様に IRI 誘導性炎症を抑制した。本研究による rTM の抗炎症作用の解明により rTM 及び rTMD1 の新規治療薬としての可能性、また rTM のさらなる臨床での適応拡大に寄与するものと期待される。

#### 引用文献

1. Saito H, Maruyama I, Shimazaki S, Yamamoto Y, Aikawa N, Ohno R et al. Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J Thromb Haemost* 2007;5(1):31-41.
2. Ozaki T, Anas C, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y et al. Intrarenal administration of recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(1):110-119.
3. Nagato M, Okamoto K, Abe Y, Higure A, Yamaguchi K. Recombinant human soluble thrombomodulin decreases the plasma high-mobility group box-1 protein levels, whereas improving the acute liver injury and survival rates in experimental endotoxemia. *Crit Care Med* 2009;37(7):2181-2186.
4. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility

group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *The Journal of clinical investigation* 2005;115(5):1267-1274.

5. Farmer D, Amersi F, Kupiec-Weglinski J. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplant Rev* 2000;14:106–126.

6. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *The Journal of experimental medicine* 2005;201(7):1135-1143.

7. Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *The Journal of experimental medicine* 2007;204(12):2913-2923.

8. Rüdiger HA, Graf R, Clavien P-A. Liver Ischemia: Apoptosis as a Central Mechanism of Injury. *Journal of Investigative Surgery* 2003;16(3):149-159.

9. Rüdiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor  $\alpha$ , but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;122(1):202-210.

10. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, Westwick JK et al. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol* 2005;42(6):850-859.

11. Inoue H, Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ* 2014;21(1):39-49.

12. Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundback P et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 2012;488(7413):670-674.

13. Rathinam VA, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM et al. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* 2012;150(3):606-619.

14. Lin KM, Hu W, Troutman TD, Jennings M, Brewer T, Li X et al. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3

inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(2):775-780.

15. Laudisi F, Vigano E, Mortellaro A. Tyrosine kinases: the molecular switch for inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 2014;11(2):129-131.

16. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009;183(2):787-791.