京都大学	博士（　医学　）	氏　名	門野　賢太郎
論文題目	Thrombomodulin Attenuates Inflammatory Damage Due to Liver 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)		

（論文内容の要旨）

【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。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、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、toll-like receptor 4 (TLR4)が key factor の一つとして報告されている。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。今回、肝 IRI に対する rTM の保護効果と、その作用機序を HMGB1-TLR4 経路に着目して、検討解析を行った。

【方法】(1)野生型(wild type:WT)C56BL/6 マウスにおいて、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 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 HMGB-1 値、肝組織中の RT-PCR による炎症性サイトカインの発現、western-blot による経時的な TLR4 シグナルのリン酸化、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。(2)TLR4 ノックアウト(KO)マウスにおいて、同様のモデルを作成し比較検討を行った。(3)in vitro 実験として、腹腔マクロファージ(Mφ)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-α値により評価した。(4)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】(1)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。(2)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。(3)WT 由来 Mφでは rHMGB1 刺激により容量依存性に TNF-α 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 Mφでは rHMGB1 刺激による TNF-α誘導を認めず、rTM 投与による変化も認めなかった。(4) rTMD1 投与では、IR 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。

【結語】IR 刺激による HMGB1 産生は TLR4 により制御され HMGB1 が細胞に与える炎症作用も TLR-4 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。本研究による抗炎症作用の解明により 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。

（論文審査の結果の要旨）

肝虚血再灌流障害の予防は、肝移植や肝切除などにおいて重要である。

播種性血管内凝固異常症の標準治療薬である recombinant thrombomodulin (rTM)は抗炎症作用を持つことが報告されている。申請者は、肝虚血再灌流障害における rTM の抗炎症効果による虚血再灌流障害改善効果の解明を目的として、high mobility group box-1 protein (HMGB-1)-TLR(toll-like receptor)-4 経路に着目して検討解析を行った。

肝温虚血再灌流障害を加えた野生型マウスにおいて rTM 投与は肝障害改善効果、TLR-4 シグナルの抑制効果、及び HMGB-1 産生の抑制効果を示した。一方 TLR-4 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して障害は抑制されており、rTM による肝障害改善効果は認められなかった。マクロファージによる in vitro 実験では、HMGB-1-TLR-4 シグナルを抑制し、さらに in vivo 実験において、ドメイン 1 分画製剤の投与にて、rTM 投与と同等の虚血再灌流障害抑制効果が得られた。rTM は HMGB-1-TLR-4 経路を抑制することで、肝虚血再灌流障害の改善を誘導したことを解明した。

以上の研究は rTM の抗炎症作用の解明に貢献し、rTM の抗炎症作用を目的とした臨床における適応拡大及びドメイン 1 分画製剤の新規治療薬としての開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成２９年２月２２日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降