

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	三浦 宏平
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 641 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Protective Effect of Neutralization of the Extracellular High-Mobility Group Box 1 on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Miniature Swine (抗 HMGB1 抗体によるミニブタ腎虚血再灌流障害抑制効果の検討)
論文審査委員	主査 教授 窪田 正幸 副査 教授 若井 俊文 副査 教授 山本 格

博士論文の要旨

背景と目的: 本研究は臓器移植における最大の問題である虚血再灌流障害 (Ischemia-reperfusion injury: IRI) を根本的に解決する革新的な治療法の確立を目指すものである。すなわち IRI のトリガーとなるサイトカインである High-mobility group box 1 (HMGB1) をモノクローナル抗体の投与によって抑制し、この病態によって起こり得る問題点を根本から克服することを目標としている。臓器移植におけるグラフト不足は、近年の移植医療における最大の問題の一つであり、この問題を克服するうえで、より条件の悪いマージナルドナーからの移植は不可避となっているのが現状である。しかしながら、これらのグラフトを使用した場合、正常なグラフトと比較して IRI の発生率が高くなることが知られており、移植適応の拡大や術後成績の改善には IRI の克服が必須であると考えられる。核内蛋白質 HMGB1 は炎症性サイトカインの一種であり、壊死細胞からの受動的な放出もしくは、免疫細胞の刺激による能動的な放出により炎症反応の調節因子として機能することが判明している。移植時には臓器の虚血によりグラフト内の細胞が壊死し、更に再灌流後に免疫細胞が活性化されるため、HMGB1 が多量に放出され IRI 発生のトリガーとなることが報告されている。この IRI と HMGB1 の関係について大動物を用いた実験で報告した例は非常に少ない。そこで、1) ヒト心停止ドナーの温阻血と冷阻血を再現した大動物における高度 IRI モデルの確立、2) IRI 時の抗 HMGB1 抗体による細胞保護効果の検討を目的とし本研究を立案した。

方法: 実験は 8~20 kg のクラウンミニブタ 8 頭を使用して行った。全身麻酔下に腹部正中切開で開腹した。左腎動静脈を 120 分間遮断し温阻血を誘導後、冷灌流液による腎臓の灌流、および氷片による 60 分間の局処冷却で冷阻血を誘導した。コントロール群 (n=5) では血管遮断を解除する再灌流のみとし、投薬群 (n=3) では再灌流直前に 1 mg/kg の抗 HMGB1 抗体を投与した。両群とも再灌流前に右腎を摘出した。再灌流後の腎機能の評価として連日の採血による血中のクレアチニン値の測定および再灌流後 2 時間、2 日目、14 日目、28 日目、56 日目に腎生検を施行した。また、再灌流後の炎症反応の評価として炎症性サイトカインである血中 IL-1 β 、IL-6、HMGB1 を ELISA 法によって測定した。

結果: コントロール群では血中 HMGB1 濃度が IL-1 β 、IL-6 に先立ち再灌流後 30 分で上昇した。クレア

チニン値は再灌流後5日をピークに上昇し(11.6 ± 1.6 mg/dL)、14日目までに正常化した。一方、投薬群では血中クレアチニン値は9日目までに正常化し、最大値もコントロール群と比較して有意に低かった(7.4 ± 0.2 mg/dL)。再灌流後2日目の腎生検ではコントロール群で広範な尿細管壊死が確認されたのに対し、投薬群では腎障害は軽度であり、尿細管上皮の再生が顕著であった。炎症性サイトカインであるIL-1β、IL-6についてはコントロール群と投薬群で有意な差は認めなかった。

結論：本研究で申請者は、クラウンミニブタによる高度IRIモデルの確立に成功した。また、IRI時のHMGB1の早期放出とそれに追隨するIL-1βやIL-6などのサイトカイン活性の上昇を確認し、抗HMGB1抗体によってIRIによる腎障害が抑制されることを示した。一方で、炎症性サイトカインの経時的な血中濃度に関してはコントロール群と投薬群で有意差を認めなかった。この結果に関しては、HMGB1の直接細胞障害作用やその他の炎症カスケードの存在などが考えられるが、現段階では推測の域を出ない。また、抗HMGB1抗体の最適な投与量や投与時期に関しても更なる検討の必要性が示された。

審査結果の要旨

申請者は、ミニブタを用いて腎虚血再灌流モデルを作成し、虚血再灌流障害に対する抗HMGB1投与による抑制効果を検討した。HMGB1は核内タンパク質で炎症性サイトカインの一種と考えられ、申請者の作成した虚血再灌流モデルではIL-1βやIL-6よりも早期に血中濃度が上昇していた。また、今回作成した虚血再灌流モデルは、血清クレアチニンの上昇が術後4～5日でピークとなり、2週間で術前レベルにまで復するタイプで虚血再灌流モデルとして適切なものと考えられた。抗HMGB1抗体を投与することで、HMGB1の上昇は抑制され、IL-1βとIL-6は、再灌流後2時間までは抑制された。組織学的にも炎症性細胞浸潤や細胞壊死も軽減され、本虚血再灌流障害モデルでの抗HMGB1抗体による障害防止効果が認められた。

新しくミニブタでの腎虚血再灌流モデルを作成し、抗HMGB1抗体による障害防止効果を明らかにした点に学位論文としての価値を認める。