

論文の内容の要旨

論文題目 妊娠高血圧腎症に対するリコンビナント・トロンボモジュリンの効果に関する研究

氏名 小田 紘子

妊娠高血圧腎症（PE）とは胎盤形成異常に起因する全妊娠の 5-7%に合併する疾患である。高血圧症、腎機能障害、胎児発育不全を主症状とする一連の病態であり、周産期予後を増悪させる主要な因子の一つである。しかしながら PE の有効な治療法はなく、新たな治療薬の開発は現代周産期医療の大きな課題である。リコンビナント・トロンボモジュリン（rTM）は血管内皮細胞膜上に存在する糖蛋白質トロンボモジュリン（TM）のヒト遺伝子組み換え型製剤であり、DIC の治療薬として臨床応用されている抗凝固薬である。rTM は炎症性サイトカインメディエーター High-mobility group box1(HMGB1)の抑制を介する抗炎症作用を併せ持つことでも知られている。PE は胎盤組織障害を起源とする炎症性サイトカインの過剰分泌が深く関与する全身性血管内皮障害が主な病態であることから、PE の新たな治療薬として rTM の有効性が期待される。本研究において我々はアンジオテンシン II（Ang II）により誘導される PE マウス疾患モデルを作成し、rTM の治療効果を検討した。さらに HMGB1 に焦点を当て、ヒト絨毛細胞株（HTR-8）を用いて rTM の治療効果の機序を明らかにすることを目的とした *in vitro* 実験を行なった。また、妊婦に投与するにあたり胎児毒性のリスクを考えて rTM の胎盤通過性を厳密に制御すること及び rTM の胎盤組織集積率を上げ PE に対する治療効果の向上を図ることの 2 点を目的に、胎盤標的型 Drug Delivery System(DDS)として PEG 化 rTM（rTMPEG）を作成しその効果を *in vivo* にて検証した。

Ang II 持続投与により誘導される PE マウスモデルを作成し rTM の PE に対する治療効果を検証した。PE の主な臨床症状は胎盤機能障害に起因する高血圧、腎機能障害及び胎児発育不全であり、胎盤より分泌される血清中可溶性 fms 様チロシンキナーゼ 1（sFlt-1）の上昇は病勢を反映するマーカーである。RAS の過剰亢進がヒトにおける PE の病態の一つであることは既知の事実であり、本研究では妊娠マウスへの Ang II 持続投与により誘導される PE の動物疾患モデルを用いて rTM の治療効果を検証した。Ang II 持続投与した妊娠マウスで血清 sFlt-1 上昇を含めた PE の主要な臨床症状が確認され、rTM 投与によりその所見は有意に改善された。

PE の病態の本幹は胎盤組織障害であるため、PE モデルマウス及び rTM 投与マウスの胎盤組織の病理学的変化を比較検証した。PE モデル群の胎盤は小さく、機能層の菲薄化が確認されたが、rTM 投与によりこの胎盤機能障害を示唆する所見は有意に改善を認めた。更に血管内皮障害を評価する目的で抗 CD31 抗体による免疫染色を行なった。PE モデル群の胎盤では CD31 の発現が減弱しており、Ang II 刺激による血管内皮障害が示唆された。一方、rTM 治療群の胎盤で

は CD31 の著名な発現亢進が確認された。以上の病理学的所見より Ang II によって惹起される胎盤組織及び血管内皮の障害が rTM 治療により修復されることが示された。

障害された胎盤絨毛細胞から炎症性サイトカインが母体循環に過剰放出され、胎盤局所から全身への炎症波及に伴う全身血管内皮障害が PE の病態生理である。HMGB 1 は障害された細胞から血液中に排出される炎症性サイトカインメディエーターであり TLR や RAGE を介して二次的炎症を促進する。rTM が PE に対して治療効果を示す機序に HMGB 1 抑制作用が関与している可能性を考え、PE マウスモデルにおける血清 HMGB 1 値とそれにより誘導される炎症性サイトカイン IL-6、TNF α に着目して検証を行なった。マウス母体血清中の HMGB 1 値は PE モデル群で高値であり、rTM 投与によりその上昇が抑制された。また、胎盤組織内に蓄積された HMGB 1 タンパク量はコントロール群と比較して PE モデル群で減少を認めた。臨床症状が改善された rTM 治療群においても胎盤内 HMGB 1 タンパク量は減少しており、組織内タンパク量の回復は認められなかった。続いて、胎盤における IL-6、TNF α の mRNA 発現量を検証した。PE モデル群では血清 HMGB 1 値の上昇に伴って IL-6、TNF α の遺伝子発現亢進が認められ、rTM 治療群ではその発現が抑えられた。以上より、PE モデル群において上昇を認めた血清 HMGB 1 は胎盤由来であり、rTM は血清 HMGB 1 を吸着して二次的炎症を抑えることにより PE に対する治療効果を示すこと可能性が示唆された。

更に in vitro 実験でヒト胎盤絨毛細胞株である HTR-8 細胞における Ang II および rTM の作用を検証した。Ang II 刺激を加えた HTR-8 細胞では、sFlt-1 mRNA 発現量及び上清中の分泌 sFlt-1 量の増加が認められ、rTM によりその上昇が有意に抑えられたことから、rTM は HTR-8 細胞においても Ang II 誘導性 sFlt-1 発現の抑制作用を示すこと確認された。また Ang II 刺激を加えた細胞では上清中 HMGB 1 タンパク量が増加し、これも rTM の投与により抑制された。IL-6 と TNF α も同様に Ang II 刺激により細胞内 mRNA 発現が亢進し、rTM 投与によって抑制された。以上の結果より HTR-8 細胞は Ang II 刺激により sFlt-1、HMGB 1 及びそれにより誘導される炎症性サイトカインの発現が促進されることが確認され、その上昇は rTM 投与により有意に抑制されることが示された。これは本研究の in vivo 実験の結果を裏付けるものであった。

絨毛細胞に対する HMGB 1 の直接的な作用を検証する目的で siRNA トランスフェクションによる HTR-8 細胞の HMGB 1 遺伝子抑制を行い Ang II 刺激に対する反応を検証した。Ang II 刺激を加えた HMGB 1 遺伝子抑制 HTR-8 細胞では、sFlt-1、IL-6、TNF α の発現が有意に抑制されることが示された。さらに HTR-8 細胞をリコンビナント HMGB 1 (rHMGB 1) にて刺激し、その反応を検証したところ sFlt-1、IL-6 及び TNF α 全ての発現亢進を認めた。以上の結果より、Ang II 刺激によって誘導される HTR-8 細胞の sFlt-1 及び炎症性サイトカインの発現亢進には HMGB 1 が直接的に関与していると考えられる。

続いて妊婦への投与を目指すにあたり薬剤の胎盤通過性を制御し、投与量を減量して副作用のリスクを減らす目的で、DDSナノテクノロジーを応用して胎盤標的型 PEG 化 rTM (rTMPEG) を作成した。薬剤生体内分布を評価するため蛍光標識した rTM 単体及び rTMPEG を PE モデルマウスに投与し in vivo imaging system (IVIS) にて解析を行なった。rTM 単体、rTMPEG はいずれも胎児への明らかな移行は確認されず、rTMPEG は胎盤特異的集積性が有意に高いことが示された。さらに rTMPEG を上述の in vivo 実験と同様の方法で Ang II 誘導 PE モデルマウスに投与し、PE に対する治療効果について検証した。rTMPEG は PE の臨床症状に対しより高い治療効果を示し、投与量を減量しても十分な効果が確認された。PEG 化することで rTM を胎盤に効率的に集積させることにより、PE に対する治療効果が向上することが示された。

本研究で我々は Ang II 誘導 PE モデルマウスにおいて rTM が PE の主症状である高血圧、腎機能障害、胎児発育不全を有意に抑制することを示した。その治療効果の機序に炎症性サイトカインメディエーターである HMGB1 と HMGB1 により誘導される炎症性サイトカイン IL-6、TNF α が深く関与していることを明らかにした。HMGB1 を吸着することで rTM は絨毛細胞からの過剰な sFlt1 産生と胎盤局所及びそこから波及する炎症を抑制した。この研究結果は rTM が PE の治療薬として大きな可能性を持つことを示している。また rTM を PEG 化して胎盤選択的に集積させることにより、胎盤通過性を厳密に抑制し薬剤投与量の減量が可能であることが示された。DDS 技術を応用することにより PE の治療薬として rTM のより安全な臨床応用が可能になると考える