

審査の結果の要旨

氏名 小田 紘子

本研究の目的は妊娠高血圧腎症 (PE) に対する新たな治療薬としてのヒト遺伝子組み換えトロンボジュリン製剤 (rTM) の効果と、同疾患における炎症性サイトカイン High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) の役割について、アンジオテンシン II (Ang II) 誘導 PE マウスモデルとヒト絨毛細胞株を用いた実験で明らかにするものであり以下の結果を得ている。

1. 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討した。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が、Ang II 誘導性 PE マウスではこれら全ての臨床症状が rTM 投与により改善されることが示された。また、PE の病態の本幹である胎盤組織障害や血管内皮障害についても抗 CD 31 抗体による免疫染色を含む病理学的所見により評価を行い、Ang II によって惹起される胎盤組織障害を示唆する所見が rTM 治療により減少することが確認された。

2. rTM が PE に対して治療効果を示す機序に HMGB1 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 HMGB1 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 HMGB1 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 HMGB1 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 HMGB1 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 HMGB1 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 HMGB1 は胎盤由来であり、rTM は血清 HMGB1 を吸着中和することにより PE に対する治療効果を示す可能性が示唆された。

3. 続いて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、細胞内 sFlt-1 mRNA 発現量及び上清中の分泌 sFlt-1 タンパクの増加が認められ、rTM によりその上昇が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 HMGB1 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 AngII 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 AngII 刺激により sFlt-1、HMGB1 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。

4. 絨毛細胞に対する HMGB1 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 HMGB1 遺伝子抑制を行い AngII 刺激に対する反応を検証した。AngII 刺激を加えた HMGB1 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 HMGB1 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、AngII 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 HMGB1 が直接的に関与していることが示された。

5. rTM は副作用が出現する可能性があるために妊婦に対しては原則投与禁忌である。そこで rTM の副作用のリスクを減らすこと目的として、Drug Delivery System ナノテクノロジーを応用し胎盤標的型 PEG 化 rTM (rTMPEG) を作成した。蛍光標識した rTMPEG をマウスに投与し in vivo imaging system (IVIS) にて解析行った結果、rTM は PEG 化することで胎盤集積性が有意に向上することが示された。さらに rTMPEG を AngII 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討した。rTMPEG は PE に対し rTM 単体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、PE に対する治療効果を向上させることが可能であった。

以上、本論文は AngII 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、胎児発育不全及び sFlt-1 産生を抑制することを示し、そ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。また、これまで未解明であった絨毛細胞における HMGB1 の作用と PE の病態との関連性について明らかにした。本研究結果はこれまで発症後に有効な治療が存在しなかった PE に対する新たな治療薬として rTM が大きな可能性を持つことを示し、その更なる病態の解明にも重要な貢献をなすと考えられる。よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。