

第56回日本補体学会学術集会奨励賞受賞寄稿

～肝虚血再灌流障害における補体制御の有効性～

日下部 治郎¹⁾、秦 浩一郎¹⁾、Yi Wang²⁾、玉木 一路¹⁾、田嶋 哲也¹⁾、宮内 英孝¹⁾、上本 伸二¹⁾

¹⁾京都大学大学院医学研究科肝胆膵・移植外科、²⁾Alexion Pharmaceuticals Inc., New Haven, CT

Complement modulation ameliorates hepatic ischemia / reperfusion injury in mice

Jiro Kusakabe¹⁾, Koichiro Hata¹⁾, Yi Wang²⁾, Ichiro Tamaki¹⁾, Tetsuya Tajima¹⁾,

Hidetaka Miyauchi,¹⁾ Shinji Uemoto¹⁾

¹⁾ Division of Hepato-biliary-Pancreatic Surgery and Transplantation

Kyoto University Graduate School of Medicine

²⁾ Alexion Pharmaceuticals Inc., New Haven, CT, USA

[はじめに]

第56回日本補体学会学術集会奨励賞を受賞させて頂き、大変光栄に思っております。日本補体学会関係各位に深謝申し上げますと共に、受賞寄稿として、学会発表の研究内容の一部に関して紹介させて頂きます¹⁾。

[背景]

肝虚血再灌流障害(Hepatic ischemia/reperfusion injury: IRI)は、虚血状態にある肝臓に血液再灌流が起きた際に、ROS (Reactive oxygen species) 等の毒性物質の産生が惹起され引き起こされる組織障害を指す。この病態は肝切除や肝移植で遭遇し、術後肝不全・晩期胆管障害・拒絶反応、腫瘍手術の術後再発との関連が報告されている²⁾。補体系の肝IRIへの影響が報告されつつあるが³⁾、具体的に補体系のどの経路・分子を抑えれば最適なのかは解明されていない。

近年、抗C5 monoclonal抗体、Eculizumabは、発作性夜間血色素尿症、非典型溶血性尿毒症症候群、全身型重症筋無力症に適応が拡大され、ギランバレー症候群や視神経脊髄炎に対する臨床試験でも

良好な成績が得られている^{4),5)}。今回我々は

Eculizumabによる補体抑制効果に着目し、マウス実験により肝IRIに対するC5制御の有効性を確認した上で、その制御機構を検証した。

[方法]

野生型 (B10D2/nSn) 及び C5欠損マウス (B10D2/oSn) に抗C5抗体 (BB5.1) 40mg/kg あるいは Control IgG (MOPC21) を経静脈投与し、中左葉に対する70%部分肝虚血 (90分) /再灌流を施行、2, 6時間後に各群の肝障害を検討した。C5aとC5b-9 (MAC) の病態関与を比較するため、C5a受容体阻害剤 (PMX53, 1mg/kg 経静脈投与) を野生型マウスに別個に投与し、上記と同様に肝障害を評価した (各群n=8)。(図1)

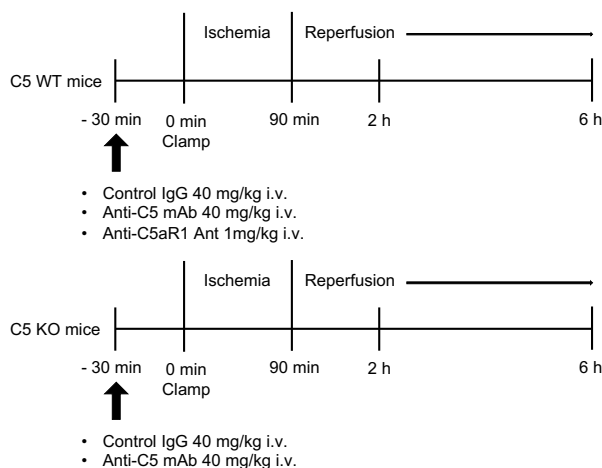


図1. マウス虚血再灌流障害(IRI)モデル

Anti-C5 mAb: マウスモノクローナル抗C5抗体

Anti-C5aR1 Ant: 抗C5a受容体阻害剤

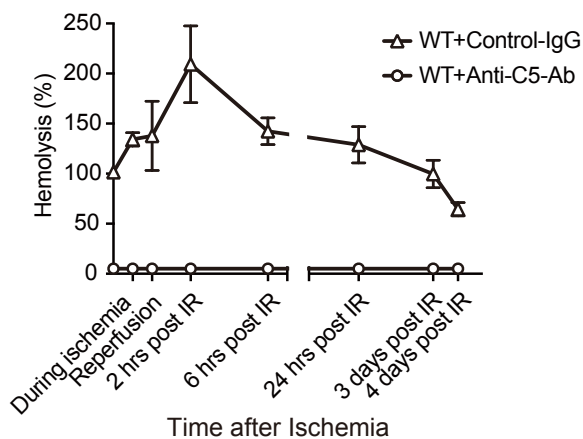


図2. マウス溶血活性の経時的推移

[結果]

ザイモザンを用いたマウス溶血活性測定により、BB5.1単回静脈投与により補体活性は再灌流後4日目まで完全に阻害された(図2)。BB5.1を投与しなかった群では、再灌流後2時間で補体活性はピークとなり、その後徐々に低下した。血清ALT及びHE染色を用いた病理学的スコア(Suzuki Score)は、虚血再灌流後2, 6時間共に抗C5抗体或いはC5欠損で有意に抑制された(図3及び図4)。

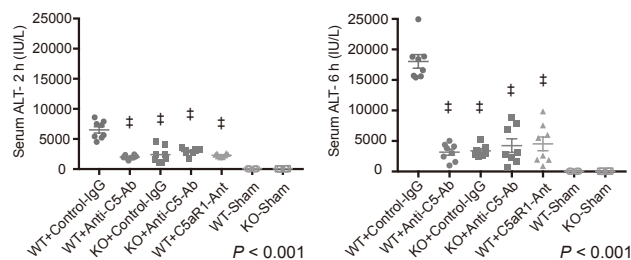


図3. 再灌流後2, 6時間における血清ALTの変化

One-way ANOVA: $P < 0.001$ each

Post-tests†: $P < 0.001$ vs. Control

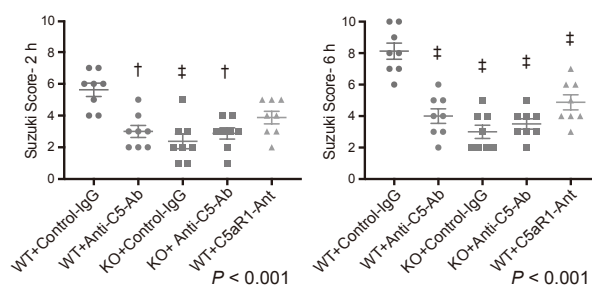


図4. 再灌流後2, 6時間における病理学的スコア

One-way ANOVA: $P < 0.001$ each

Post-tests†: $P < 0.01$ vs. Control

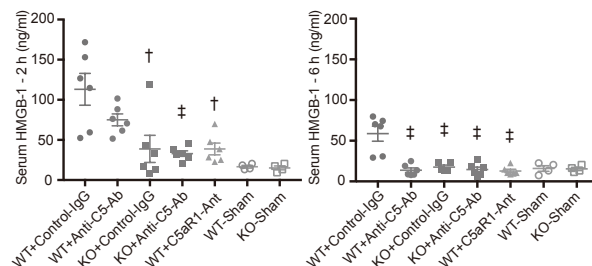


図5. 再灌流後2, 6時間における血中HMGB-1 (ELISA)

One-way ANOVA: $P < 0.001$ each

また C5a受容体阻害抗体により血清ALTはC5阻害とほぼ同等に抑制された。ALTの上昇は再灌流6時間で顕著であったのに対して、HMGB-1の放出は2時間で既に顕著であり、C5欠損及びC5a受容体阻害抗体で有意に抑制された(図5)。

再灌流後2時間では、C5/C5a阻害によりIRIによる類洞内血小板凝集が有意に抑制され（CD41免疫染色: $P < 0.01$ ）、総マクロファージ（MΦ）は維持され

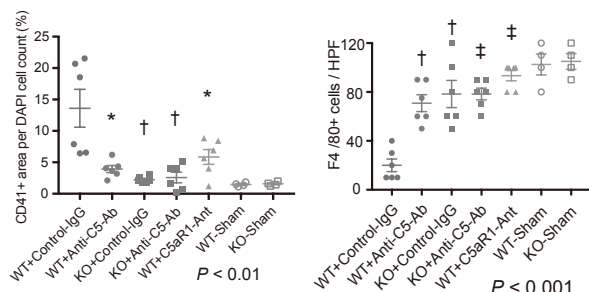


図6. 再灌流後2時間における免疫染色の定量評価（CD41, F4/80染色）

Post-tests*: $P < 0.05$ vs. Control

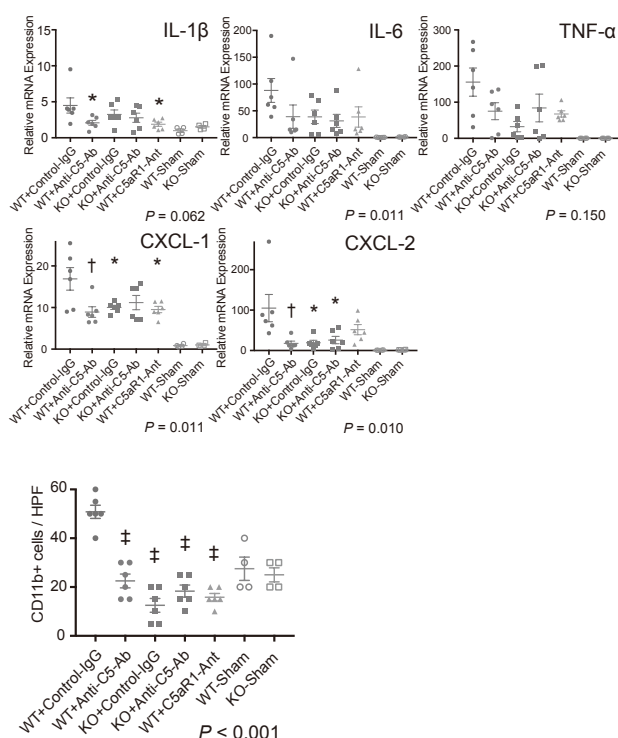


図7. 再灌流後6時間におけるRT-PCR（炎症性サイトカイン）および免疫染色（CD11b）の定量評価

た（F4/80免疫染色、図6）。6時間後では、CD11b+細胞（炎症性MΦ）の浸潤が、各種炎症性サイトカイン（IL-1β, IL-6, TNF-α）と共に有意に抑制された（ P

< 0.001 、図7）。C5/C5a制御は、肝恒常性維持にも寄与するResident MΦ（Kupffer細胞）を維持する一方で、再灌流障害の主役となる炎症性MΦの浸潤を抑

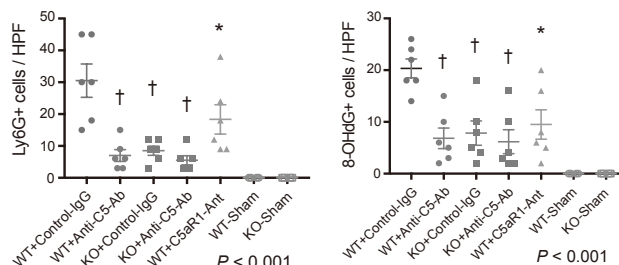


図8. 再灌流後6時間における免疫染色の定量評価（Ly6G, 8-OHdG染色）

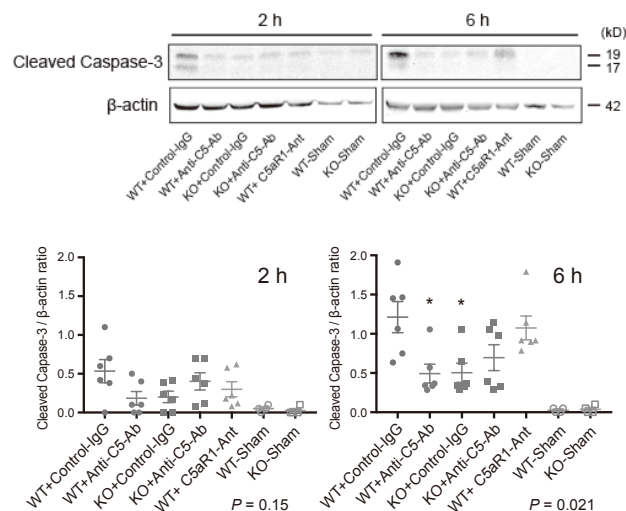


図9. 再灌流後2, 6時間におけるCleaved Caspase-3の評価

制すると考えられた。好中球浸潤（Ly6G免疫染色: $P < 0.001$ ）、酸化ストレス（8-OHdG免疫染色: $P < 0.001$ ）や、アポトーシス（Cleaved Caspase-3: $P < 0.05$ ）も6時間後で有意に改善していた（図8及び9）。

[考察]

C5阻害は、マウス肝IRIを有意に改善した。特異的C5a受容体阻害による肝障害軽減効果はC5抗体

やC5欠損による効果と同等であった。マウスIRIに関しては、その障害メカニズムにおいてC5a/C5aRを介した下流経路が非常に重要であることが示された。但し、好中球浸潤やアポトーシスは、C5抗体及びC5欠損でより抑制される傾向にあり、Membrane Attack Complex阻害の有無が影響していると考えられた。

また、再灌流後2時間の段階で各治療群においてResident MΦの抑制、類洞における血小板血栓の形成抑制が認められ、これらの早期の変化がIRI抑制のメカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。近年、IRI等の侵襲下で

receptor-interacting protein 1 (RIP-1) 依存性に、Resident MΦ (F4/80⁺ / CD11b⁺) が減少し、炎症性MΦ (F4/80⁺ / CD11b⁺)が増加することが報告されている⁶⁾。前者の絶対数が大きい (Kupffer細胞は全身の組織MΦの80-90%を占める) ため、F4/80陽性細胞が減少し、CD11b陽性細胞は増加すると報告されている。今回の我々の検討では、F4/80陽性細胞の減少は再灌流後2時間の段階で既に確認され、CD11b陽性細胞は再灌流後6時間で顕著に増加していた。これらの変化はいずれもC5及びC5a阻害で有意に抑制されていた。

学術集会の発表では、第二経路と肝IRIの関係性、補体制御が部分肝切除後の肝再生に与える影響に関しても報告させて頂いたが、今回は割愛させて頂く。

今後、古典経路、レクチン経路と肝IRIの関連性の評価、及びラット肝移植モデルを用いたC5阻害剤による肝IRIの軽減効果の検討を予定している。

[結論]

C5阻害により、肝IRIが有意に改善した。

[最後に]

この度の受賞は、補体研究に魅了された者として大変光栄に存じます。補体制御による肝虚血再灌流障害の抑制は非常に顕著であり、マウスを犠牲させ

た際、ほとんど障害を受けていない肝臓を見て驚嘆したことを鮮明に覚えております。肝虚血再灌流障害に関する研究は世界中で盛んに行われておりますが、補体制御と同様に、目に見える程顕著に障害を抑制できるMethod/ Agentsは限られています。補体系は、自然免疫に限らず様々な免疫機構に横断的に関与していますが、その詳細に関しては依然未解明な事象も多く、非常に魅力的な研究分野であると実感しております。今回の受賞を励みに、補体研究の発展に少しでも寄与できるよう、微力ながらより一層努力して参ります。

[謝辞・利益相反]

マウスの溶血活性測定に関して多くの助言を頂きました神戸常盤大学、北村肇先生、北野悦子先生に心より感謝申し上げます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬基盤推進研究事業 (No. 16ak0101031h0003) の支援によって行われ、マウス抗 C5 抗体は、アレクシオンファーマより共同研究として供与されました。

[文献]

- 1) Kusakabe J, Hata K, et al. Complement 5 Inhibition Ameliorates Hepatic Ischemia/reperfusion Injury in Mice, Dominantly via the C5a-mediated Cascade. *Transplantation*. 104: 2065–2077 (2020)
- 2) Zhai Y, Petrowsky H, et al. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 10: 79–89 (2013)
- 3) Diepenhorst GMP, et al. Complement-Mediated Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Surg*. 249(6): 889–899 (2009)
- 4) Misawa S, Kuwabara S, et al. Articles Safety and efficacy of eculizumab in Guillain-Barré

- syndrome: a multicentre, double-blind, randomised phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 4422: 1–11 (2018)
- 5) Pittock SJ, Berthele A, et al. Eculizumab in Aquaporin-4-Positive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *N Engl J Med.* 381: 614–625 (2019)
 - 6) Yue S, Zhou H, Wang X, et al. Prolonged Ischemia Triggers Necrotic Depletion of Tissue-Resident Macrophages To Facilitate Inflammatory Immune Activation in Liver Ischemia Reperfusion Injury. *J Immunol.* 198: 3588–3595 (2017)