

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15765

研究課題名(和文) トロンボモデュリンを用いた敗血症におけるHistone蛋白制御の検討

研究課題名(英文) Evaluation of effect of thrombomodulin on the regulation of extra-cellular histone in sepsis

研究代表者

升田 好樹 (MASUDA, YOSHIKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10244328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症でのHistone濃度の推移とトロンボモデュリン(TM)によるHistoneの中和作用についてラット腹膜炎敗血症モデルを用いて検討した。

Histone濃度はTNF- α に遅れて上昇し、TMにより拮抗した。レクチン様ドメインのない断片化TM(fTM)ではTMのHistone濃度軽減作用が消失した。敗血症ではHistoneがやや晩期に上昇し、レクチン様ドメインを有するTMにより拮抗されることが明らかとなった。生理活性物質であるTMはレクチン様ドメインが敗血症によるHistone濃度上昇を抑制と関連する可能性が考えられ、新しい治療薬の開発の論理的根拠となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Changes in serum histone level in sepsis rat model and the effect of thrombomodulin(TM) on the regulation of histone level were evaluated. Serum histone level was increased later followed by reaching at maximal serum level of TNF- α . Increased serum histone level was attenuated by TM administration. Fragmented TM that was deficit of lectin like domain of TM inhibited favorable action of TM in septic rat model. It was clarified that serum histone level increases in the period of late phase of sepsis and that reduction in increased serum histone level is associated with lectin like domain of TM in sepsis rat model. These results may be the rationale for development of new drugs for treatment of sepsis.

研究分野：集中治療医学

キーワード：敗血症 thrombomodulin Histone CLP rat

1. 研究開始当初の背景

重症感染症，敗血症の病態形成には病原微生物由来の PAMPs(pathogen associated molecular patterns)や生体に存在する DAMPs (damage associated molecular patterns)と言った物質が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた(1) .DAMPs は生体に対する危険信号として認識され，HMGB1(high mobility group box-1)や可溶性熱ショック蛋白(sHSP)，s100 蛋白質など核内に存在する蛋白質が知られている .DAMPs が過剰に産生放出されるとさらなる生体障害を引き起こし，敗血症での重症化と関連する .DAMPs の過剰な産生に対し，血管内皮細胞上に存在し，血液凝固制御に関わるトロンボモデュリン(TM)は DAMPs の一員である HMGB1 と結合し，消去する機構に関わっていることが明らかとなった .同様に我々はヒト重症敗血症患者では Histone 蛋白が著明に増加し，遺伝子組み換え TM(rTM)を投与すると他の抗凝固薬に比べ明らかに血中 Histone 蛋白濃度が低下することを確認した .

2. 研究の目的

生体へ感染症などの侵襲が生じた際に危険信号として，DAMPs と呼ばれる蛋白が産生放出される .しかし，これらが過剰に産生放出された際には強い炎症を引き起こし，敗血症や敗血症性ショックへと進展する .DAMPs には様々なものが知られているが，本来核内に存在する high-mobility-group box-1(HMGB1)や Histone 蛋白も敗血症時には血中に出現し，その重症度とは関連することが報告されている .さらに血管内皮上に存在する生理活性物質トロンボモデュリン(TM)がこれらの Histone 蛋白を中和する可能性が示されている .本研究では敗血症での Histone 蛋白の動態を動物実験で実証するとともに TM と Histone 蛋白の中和作用について明らかとし，敗血症の治療戦略を確立することである .

3. 研究の方法

I. 敗血症ラットにおける DAMPs の推移の検討 .

1)ラット敗血症モデルの作成

週齢 10-12 週の Wistar rat を用いて腹膜炎敗血症モデルを作成する .敗血症モデルは盲腸結紮穿孔(cecal ligation and puncture: CLP)により作成する .CLP 作製時に頸静脈を露出し，カテーテルを留置し，頭頂部へ誘導し，先端を閉塞させる .このカテーテルから採血と薬物の投与を行う .輸液は皮下に 10ml/kg の細胞外液を投与する .CLP 作製後，ラットはケージ内で自由な状態とし，水分だけを摂取できるようにする .

2) Histone H3 蛋白ならびにサイトカイン，HMGB1 濃度の測定 .

CLP 作製後に経時的に血液を 1ml 採取し，血清に分離後凍結保存する .採血時期は CLP 作成後，0，4，8，12，16，20，24 時間とする .測定項目は TNF- α ，HMGB-1 は市販の ELISA キットを用いて行し，Histone H3 は鹿児島大学医学部システム血栓制御学講座にて測定する(2) .いずれも検体数は 6 例とする .この結果から Histone H3 濃度が上昇し始める時間を種々の薬物投与による効果を比較する経過時間とする .

II. トロンボモデュリン(TM)による DAMPs 濃度との関係 .

1) 適切な TM 濃度の検討

CLP 作製後 遺伝子組み換え TM(rTM)を 1，3，6 mg/kg の濃度で投与し，上記 HistoneH3 濃度が上昇する時間での Histone H3 濃度の比較を行う .この結果から，十分に Histone H3 濃度を低下させることができる rTM 濃度を決定する .

2) 断片化 TM (fTM) 投与と DAMPs 濃度との関係に関する検討 .

CLP モデル作製後に rTM およびレクチン様ドメインを切断しトロンピンレセプターである EGF 様ドメインのみとした断片化 TM(fTM)

を投与する。投与量は最適 rTM 濃度のモル比で換算した量を用いる。即ち, rTM 1mg に対し 0.29 mg とする。CLP 作製後に生理的食塩水を 1ml 投与した対照群と rTM 投与と fTM 投与による Histone H3 濃度を比較する。いずれも 6 例とする。

III. rTM, fTM 投与と敗血症ラット生存率との関係に関する検討。

CLP 作製後に生理的食塩水, rTM, fTM を投与し, 人道的エンドポイントを確認後に安楽死させ, 死亡までの時間とする。評価はそれぞれの薬物での 24 時間死亡率を対照群と比較する。

4. 研究成果

I. 敗血症ラットにおける DAMPs の推移の検討。

図 1, 2 に CLP 作製後のそれぞれ Histone H3, TNF- α 濃度の推移を示した。

血中 Histone H3 濃度は当初検出できなかったが徐々に増加し, 12 時間で有意に増加した。その後も増加しているが, 16 時間以降は測定値に大きなばらつきがあり, 有意な増加ではなかった。したがって, 以下の検討では CLP 作製後 12 時間で比較することとした。また, 本研究で作製した CLP ラットは 11 例中 7 例が 24 時間以内に死亡したことから, 36% の生存率となるモデルであることを確認した。

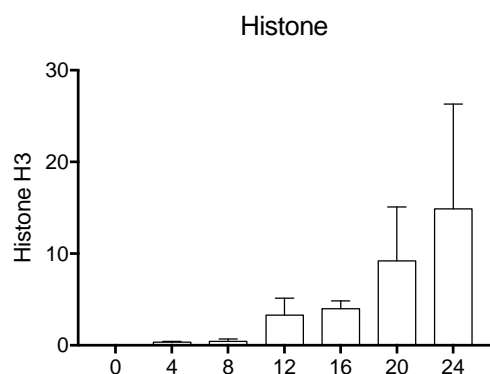


図 1 CLP 作製後の Histone H3 濃度の推移

HMGB-1 濃度は Histone H3 と同様に血中濃度は低値であったが, CLP 作製後 12 時間目で有意に増加し, その後漸増している。同じよう

に測定値の偏位が大きいため, 12 時間以降の有意差はみられなかった。

血中 TNF- α 濃度は測定感度以下であったが, CLP 作製後 4 時間で最大値となり, その後急速に漸減した。

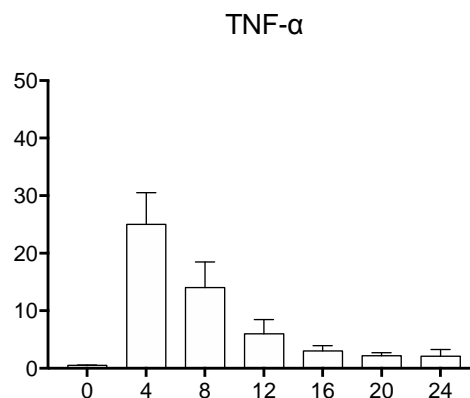


図 2 CLP 作製後の TNF- α 濃度の推移

これらのことから DAMPs として作用する Histone H3 は TNF- α などの従来炎症性サイトカインとは異なり, やや遅れて血中に出現することが明らかとなった。

II. トロンボモデュリン(TM)投与と DAMPs 濃度との関係。

TM による Histone H3 濃度に及ぼす影響について図 3 に示した対照群に比べて, 1mg/kg では差がなかったが, 3mg/kg, 6mg/kg では投与量依存性に Histone H3 濃度の抑制が見られた。したがって, 今後の検討では 6mg/kg の濃度で以下の検討を行うこととした。

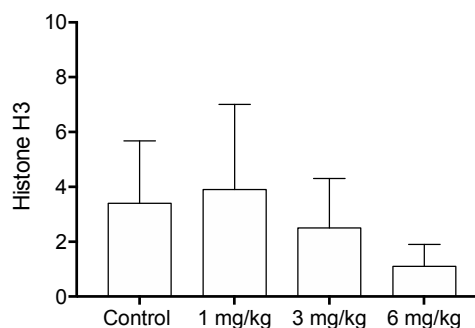


図 3 CLP12 時間後の rTM 投与量と Histone H3 濃度との関係 (いずれも n=3)

III. rTM, fTM 投与と Histone H3 濃度との関係に関する検討 .

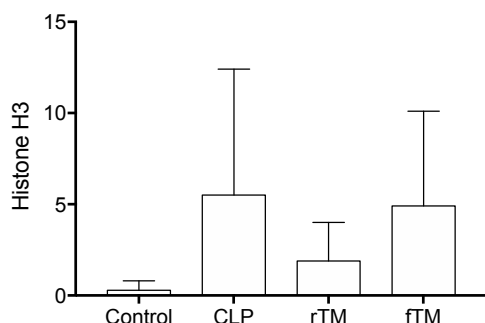


図 4 CLP12 時間後の陰性および陽性対照群と rTM, fTM 投与量と Histone H3 濃度との関係(いずれも n=3)

図 4 に示すように, rTM により CLP 作製により上昇した Histone H3 濃度は有意に低下したが, レクチン様ドメインを有さない, fTM はその作用を失った. したがって, TM による敗血症時の Histone H3 濃度抑制作用にはレクチン様ドメインが重要な役割を担っている可能性が示唆された.

以上のことから, 本研究で得られた CLP による腹膜炎敗血症モデルでは DAMPs である Histone H3 蛋白濃度が炎症性サイトカインよりも遅い phase で上昇することが明らかとなった. 晩期致命的メディエータである HMGB-1 と同様の動態であり, 臨床的に敗血症や敗血症が重症化後も治療できるタイミングであることから治療のターゲットとして考えられる. 本来トロンビンレセプターとして作用する TM はレクチン様ドメインが DAMPs 濃度軽減と関連することが明らかとなり, 同様に敗血症の治療薬として抗凝固作用を有さない薬剤の開発根拠となる可能性が考えられた.

< 引用文献 >

1. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005;17: 359-65.
2. Nakahara M, Ito T, Kawahara K, et al. Recombinant Thrombomodulin Protects

Mice against Histone-induced Lethal Thromboembolism. *PLoS one* 2013; 8 :e75961.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等: 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
升田 好樹 (MASUDA Yoshiki)

研究者番号: 10244328

(2) 研究分担者
巽 博臣 (TATSUMI Hiroomi)

研究者番号: 70404613

(3) 連携研究者
宮庄 拓 (MIYAHOU Taku)

研究者番号: 50568996

(4) 研究協力者
()

