

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18962

研究課題名(和文) 補体を標的とする播種性血管内凝固症候群治療薬の臨床応用を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Basic research aiming for developing anti-disseminated intravascular coagulation drug targeting for complement

研究代表者

水野 智博 (Mizuno, Tomohiro)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：40711669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：播種性血管内凝固症候群(DIC)は、全身性炎症を伴う患者で多く見られる疾患である。本研究では、細胞外ヒストン投与により作成したDICモデル動物を用いて、新規治療薬候補物質のスクリーニングを行った。我々は補体-凝固系のクロストークに着目し、抗補体薬がDICを改善するかどうか検討を行った。補体第5因子a(C5a)受容体阻害薬は、細胞外ヒストン投与による肝障害を改善した。コンドロイチン硫酸(CS)は直鎖状の多糖であり、負電荷を持つため細胞外ヒストンと結合する。本研究では、CSと細胞外ヒストンとの相互作用は、DIC発症時の凝固系に影響しないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

播種性血管内凝固症候群(DIC)は、重篤な感染症やがん患者で発症する疾患であり、その死亡率は高いことが知られています。我々は、DICの新規治療薬を開発するため、補体系の機能を調節する薬物と、DICの原因物質である細胞外ヒストンを中和する薬物の有効性について、実験動物を用いて検討しました。どちらの薬物もDICの症状を緩和することが明らかになり、有望な新規治療薬となりうることが示唆されました。今後、臨床応用に向け、更なる検討を進めていく予定です。

研究成果の概要(英文)：Disseminated intravascular coagulation (DIC) is seen in patients with systemic inflammation. In this study, we used DIC model animal induced by extracellular histones to screen new therapeutic agents. We focused on the cross-talk between complement and coagulation system, and investigated whether an anti-complement drug ameliorated DIC. Complement component 5a (C5a) receptor antagonist ameliorated liver injury in DIC. Heparin and chondroitin sulfate (CS) are linear polysaccharides, and its negative charge allows binding to extracellular histones. Our study elucidated that the interaction between CS and extracellular histones did not affect coagulation system in DIC.

研究分野：医療系薬学

キーワード：補体第5因子 播種性血管内凝固症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

播種性血管内凝固症候群 (DIC) は、出血箇所のみで生じるべき血液凝固反応が全身の血管内で無秩序に起こる症候群であり、致死性疾患である。分子機構として、High Mobility Group Box 1 および C5a がそれぞれ終末糖化産物受容体や補体第 5 因子 (C5) a 受容体に結合し、好中球から炎症性サイトカインやヒストンが放出される。ヒストンは、生体防御および凝固反応に関与するが、循環中に大量に放出された場合、Pattern recognition receptors へ結合し、細胞死を誘導する。そのため、過剰に放出されたヒストンは、血管内皮障害や凝固系の亢進を引き起こし、DIC の進展・増悪に関与する (PLoS One. 2013)。ヒストンをマウスの静脈内へ投与することで、ヒトの DIC に類似した症状を示すこと (Nat Med. 2009)、ヒストン濃度が高い DIC 患者は、予後不良であること (Thromb Res. 2015) が知られている。しかし、ヒストンの作用点に関して、詳細な分子機構は不明である。補体系とヒストンの相互作用を明らかにすることは、新規治療標的分子の同定に繋がると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

- (1) ヒストン投与により作製した DIC モデル動物における、C5 の役割を明らかにする。
- (2) 抗 C5a 受容体阻害薬が DIC に有効であるかどうか明らかにする。
- (3) ヒストン-糖鎖間の相互作用を明らかにする。
- (4) ヒストン暴露による膜補体制御因子への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ヒストン投与により作製した DIC モデル動物における、C5 の役割について
C5 を欠損したマウスと正常マウスの双方に細胞外ヒストンを静脈内投与し、投与後の凝固機能、組織障害の程度、血中 C5a 濃度について定量した。
- (2) DIC 治療に対する抗 C5a 受容体阻害薬の有用性について
細胞外ヒストン投与により DIC モデル動物を作製し、抗 C5a 受容体阻害薬を投与することで、DIC に伴う組織障害が改善するかどうか検討した。
- (3) ヒストンと糖鎖との相互作用について
ヒストンは正電荷を持つため、負電荷を持つ糖鎖 (ヘパリンやコンドロイチン硫酸) と相互作用を示す。これにより細胞外ヒストンの毒性が軽減されるかどうか、疾患モデル動物を用い、検討した。
- (4) ヒストン暴露による膜補体制御因子への影響について
マウス血管内皮細胞へ細胞外ヒストンを暴露し、細胞表面に存在する膜補体制御因子の発現および機能に与える影響を検討した。

4. 研究成果

- (1) C5 欠損マウスは正常マウスと比較して、細胞外ヒストンによる障害が軽度であった。
C5 欠損マウスでは、ヒストン投与後の生存期間が正常マウスに比して、有意に長く (図 1)、凝固異常、組織障害が正常マウスと比較して、軽度であった。また、C5a は正常マウスでのみ検出され、ヒストンを投与することで C5a の濃度が上昇した。以上の結果から、ヒストン投与により C5 が活性化することが明らかになった。

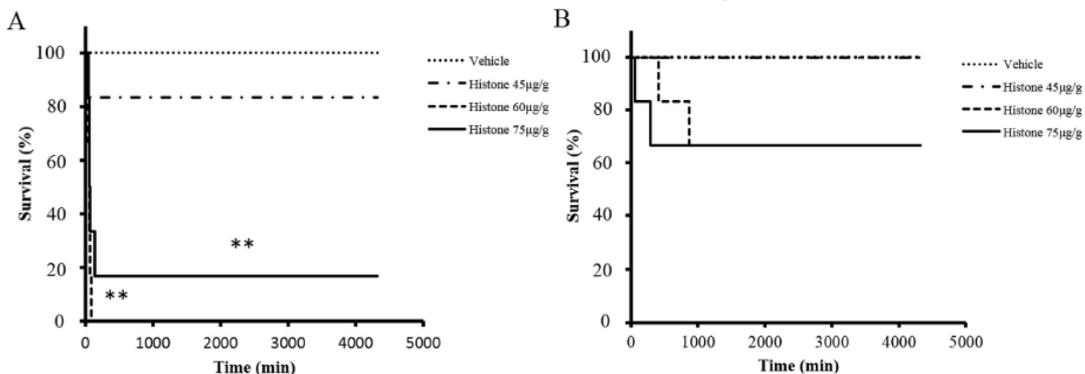


図 1. ヒストン投与後の生存時間

A: 正常マウス、B: C5 欠損マウスの結果を示す。* $p < 0.01$ vs Vehicle (log-rank test)
Mizuno T et al., Sci rep, 2017 より引用

- (2) 抗 C5a 受容体阻害薬は DIC に伴う組織障害を軽減した。
マウスへヒストン投与後、抗 C5a 受容体阻害薬を投与することにより、DIC に伴う組織障害が改善した。すなわち、抗 C5a 受容体阻害薬は DIC の治療薬として有用である可能性が示唆された。
- (3) ヘパリンおよびコンドロイチン硫酸によりヒストンの毒性が軽減された。

ヘパリンおよびコンドロイチン硫酸は、ヒストンと結合することを分子間相互作用解析により確認した。ヘパリンおよびコンドロイチン硫酸と細胞外ヒストンを混和し、マウスへ投与したところ、ヒストンによる組織障害が強力に抑制された(図2)。さらに、ヘパリン投与後は血液凝固時間が延長したが、コンドロイチン硫酸では、凝固時間の延長が軽度であった。以上の結果から、ヘパリンおよびコンドロイチン硫酸は、細胞外ヒストンと結合し、その毒性を中和すること、特にコンドロイチン硫酸はヘパリンよりも安全性が高いことが示された。

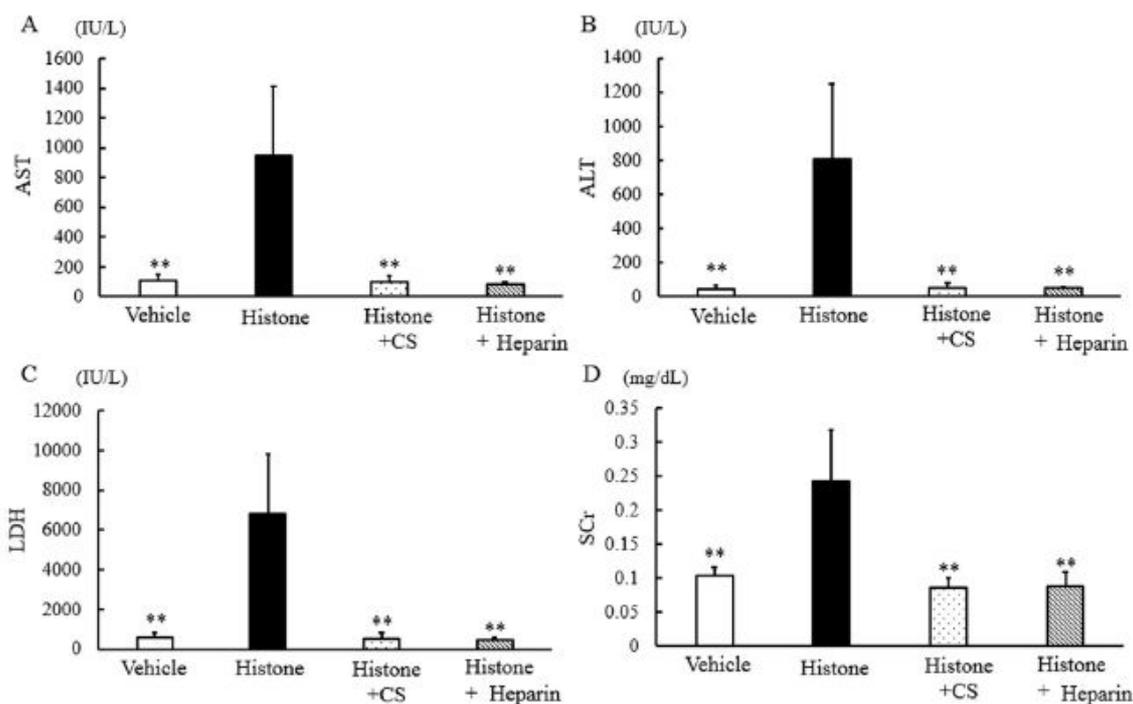


図2. ヘパリンおよびコンドロイチン硫酸 (CS) 投与後の肝・腎機能
ヒストン投与から 1 時間後の A: aspartate aminotransferase (AST) 値、B: alanine aminotransferase (ALT) 値、C: lactate dehydrogenase (LDH) 値、D: 血清クレアチニン (SCr) 値を示す。* $p < 0.01$ vs Histone (Tukey's test)
Nagano F et al., *Eur J Pharmacol*, 2018 より引用

(4) ヒストン暴露により、マウス血管内皮細胞上の膜補体制御因子の発現・機能が低下した。ヒストン暴露後、マウス血管内皮細胞上の膜補体制御因子である Complement receptor type-1 related gene Y (Crry) の発現低下が認められた。補体活性に対する脆弱性も認められたことから、Crry の機能低下も確認された。以上の結果より、ヒストン暴露により血管内皮細胞上の膜補体制御因子の発現が低下し、血管内における補体活性を助長していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Nagano F, Mizuno T, Mizumoto S, Yoshioka K, Takahashi K, Tsuboi N, Maruyama S, Yamada S, Nagamatsu T. Chondroitin sulfate protects vascular endothelial cells from toxicities of extracellular histones. *Eur J Pharmacol*. 5, 2018, 48-55. (査読あり)

Mizuno T, Yoshioka K, Mizuno M, Shimizu M, Nagano F, Okuda T, Tsuboi N, Maruyama S, Nagamatsu T, Imai M. Complement component 5 promotes lethal thrombosis. *Sci Rep*. 16, 2017, 42714. (査読あり)

〔学会発表〕(計11件)

岩田歩実、水野智博、長野文彦、高橋和男、坪井直毅、丸山彰一、今井優樹、水野正司、永松 正. 細胞外ヒストンは細胞表面の膜補体制御因子 (CD59a) 発現を低下させる. 医療薬学フォーラム 2018, 2018.

水野智博、長野文彦、水野正司、岩田歩実、高橋和男、坪井直毅、丸山彰一、永松 正、今井優樹. 細胞外ヒストンは細胞表面の Crry および CD59a 発現を低下させる. 第55回日本補体学会学術集会, 2018.

Tomohiro Mizuno, Fumihiko Nagano, Masashi Mizuno, Ayumi Iwata, Kazuo Takahashi, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Tadashi Nagamatsu, Masaki Imai. Extracellular histones

decrease the expression of membrane complement regulators. 27th International Complement Workshop, 2018.

長野文彦、水野智博、水本秀二、吉岡憲吾、高橋和男、坪井直毅、丸山彰一、山田修平、永松 正. 致死性血栓症に対する治療薬としてのコンドロイチン硫酸の可能性. 日本薬学会第138年会, 2018.

長野文彦、水野智博、水本秀二、吉岡憲吾、高橋和男、坪井直毅、丸山彰一、山田修平、永松 正. コンドロイチン硫酸は細胞外ヒストンによる血管内皮障害を介した臓器障害を抑制する. 第1回フレッシュャーズ・カンファランス, 2017.

長野文彦、水野智博、水本秀二、吉岡憲吾、高橋和男、坪井直毅、丸山彰一、山田修平、永松 正. コンドロイチン硫酸およびヘパリンはヒストンにより誘発された致死性血栓症を軽減する. 第63回日本薬学会東海支部総会・大会, 2017.

水野智博、吉岡憲吾、水野正司、清水美衣、長野文彦、奥田知将、坪井直毅、丸山彰一、永松 正、今井優樹. C5、C5a は細胞外ヒストンにより誘発された致死性血栓症を増悪する. 第54回日本補体学会学術大会, 2017.

長野文彦、水野智博、水本秀二、吉岡憲吾、高橋和男、坪井直毅、丸山彰一、山田修平、永松 正. コンドロイチン硫酸は凝固系に影響を与えずに細胞外ヒストンによる致死性血栓症を改善する. 第11回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2017.

吉岡憲吾、水野智博、水野正司、清水美衣、長野文彦、奥田知将、坪井直毅、丸山彰一、永松 正、今井優樹. C5 は細胞外ヒストンにより惹起された致死性血栓症を促進する. 日本薬学会第137回年会, 2017.

Tomohiro Mizuno, Kengo Yoshioka, Masashi Mizuno, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Tadashi Nagamatsu, Masaki Imai. C5 Promotes Histone-Induced Lethal Thromboembolism. XXVI International Complement Workshop, 2016.

水野智博、吉岡憲吾、水野正司、坪井直毅、丸山彰一、永松 正、今井優樹. 新規播種性血管内凝固症候群モデルにおける C5 の関与. 第62回日本薬学会東海支部総会・大会, 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。