

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08425

研究課題名(和文)細胞外ベジクル上ヒストンに着目した敗血症早期診断法の開発

研究課題名(英文)Development of early diagnosis for sepsis focused on histone hold in extracellular vesicles

研究代表者

早田 敬太(Soda, Keita)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 ジェロサイエンス研究センター・研究員

研究者番号：80794502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外ヒストンは敗血症などの重症炎症において血管内皮細胞傷害を引き起こす事が示されてきた。本研究ではヒストン処理後ヒト臍帯静脈内皮細胞から細胞外小胞(EVs)が放出されることを見いだした。炎症時TNFが内皮細胞からEVsを放出する事が知られているためTNF由来EVsとヒストン由来EVsの膜タンパク質成分の違いをプロテオーム解析で比較した。同定した膜タンパク質がヒストンによる内皮傷害の評価に有用なマーカーとなることを示した。また電子顕微鏡観察ではEVsは細胞膜の周辺に形成されており免疫電顕で細胞膜上のヒストン凝集体を観察した。このEVsは他の内皮細胞に対して細胞毒性を発揮する事も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球細胞外トラップ(NETs)やNETs由来の細胞外ヒストンによる血管内皮細胞の傷害は、敗血症などの重傷炎症からCOVID-19に至るまで多様な疾患の病因に関与している。しかしながら、血管内皮細胞傷害の予測に血中ヒストンを対象とした報告は限られる。我々の結果はヒストンによる細胞機能障害の標的を明らかにし、細胞外ベジクル上のヒストンと膜タンパク質のフローサイトメトリーによる検出が、ヒストンによる内皮傷害の評価に有用なマーカーとなることを示唆するものである。血中ヒストンを内皮細胞傷害の予測因子として診断に応用できれば敗血症などの重症炎症の予防及び判定に有用であり医学的・社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Extracellular histones have been shown to induce endotoxicity to the vascular endothelial cells in severe inflammation such as sepsis. In this study, we found that extracellular vesicles (EVs) were released from human umbilical vein endothelial cells after histone addition. Since TNF is known to release EVs from endothelial cells during inflammation, we compared the membrane protein of TNF-derived and histone-derived EVs by proteomics analysis. We showed that the identified membrane proteins were useful markers for the evaluation of histone-induced endothelial injury. We also showed that EVs were formed around the plasma membrane by the electron microscopy, and histone aggregates on the plasma membrane by the immunoelectron microscopy. In addition, this EVs propagates the cytotoxicity to other endothelial cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管内皮細胞 細胞傷害 細胞外ヒストン 細胞外ベジクル

1. 研究開始当初の背景

病原性微生物の感染後に誘導される好中球の特異的な細胞死 (NETosis) により放出される NETs (Neutrophil Extracellular Traps) には強力な抗菌作用を持つ細胞外ヒストンが含まれる^①。この細胞外ヒストンの過剰な量が血管内皮細胞を傷害し、重症炎症である敗血症の原因であることが近年明らかになってきた^②。敗血症は年間約 2000-3000 万の人が発生し、重症敗血症の 25-40% という死亡率は心筋梗塞 (3-10%) や脳卒中 (9%) より高い^③。適切な診断後の早期治療は死亡率を 1-2 割に抑制できる事がわかっているため、敗血症において予防及び判定に有用な方法の開発は患者の命を救う最善の方法の一つである^④。細胞外ヒストンの定量をおこなうことにより敗血症の予測・診断に利用しようとする試みがこれまで報告されているが、ヒストンの血小板活性化による凝集能、自己免疫による抗体の産生により病態、炎症との相関はかならずしも良好ではない^{⑤-⑧}。

2. 研究の目的

我々は細胞外ヒストンが血管内皮細胞 (HUVECs) へ作用すると無数の細胞外ベジクル (EVs) が放出される様子を顕微鏡下で観察しており、プレリミナリーな解析で EVs にヒストンが含まれることを示唆するデータを得ていた。そこで、EVs が血管内皮細胞傷害の予測に有用である可能性を秘めていると推測した。

本研究では EVs 中の細胞外ヒストンを定量評価できる適切な解析法を検証し、早期敗血症診断の有効な方法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞外ヒストンの細胞傷害作用の解析

血管内皮細胞 (HUVECs) を無血清培地および細胞外ヒストンまたは TNF α を含む無血清培地でインキュベーションし、ヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みをフローサイトメトリーにより細胞傷害を定量評価する。また、その細胞培養上清を 10,000 g で回収されるペレットを細胞外ベジクル (EVs) とし、そのプロテオーム解析をおこなう。細胞外ヒストン依存の EVs に含まれるタンパク質、特に膜タンパク質の同定を試みる。また、HUVECs の形態の観察を光学顕微鏡、および電子顕微鏡で観察する。

(2) 細胞外ベジクルに含まれる膜タンパク質の解析

細胞外ヒストンを HUVECs へ投与後、プロテオーム解析で同定した膜タンパク質の検討を HUVEC の免疫蛍光染色、分画したサンプルを用いたウエスタンブロット、および、フローサイトメトリーによりの局在を検証する。

(3) 細胞外ベジクルに含まれるヒストン及び膜タンパク質の解析

細胞外ヒストンを HUVECs へ投与後、HUVEC の免疫染色、および免疫電験、分画したサンプルを用いたウエスタンブロット、および、フローサイトメトリーにより細胞外ヒストンの局在を検証する。また、細胞外ヒストンを HUVECs へ投与後に培養上清を 10,000 g で回収したペレットを抗ヒストン抗体および、膜タンパク質に対する抗体を用いフローサイトメトリーで検出できるかを検証する。

(4) 細胞外ベジクルの細胞傷害性の評価

細胞外ヒストンを HUVECs へ投与後の培養上清を 10,000 g で回収したペレットを再懸濁し、HUVECs へ投与する。量依存的な細胞外ベジクルの細胞傷害性を解析する。

(5) 敗血症モデルマウスの血漿の解析

日本医科大学動物委員会の承認のもと、敗血症モデルマウスとして盲腸結紮穿孔 (CLP) モデルを作成し、血漿を 2000 g で遠心し、乏血小板血漿 (PPP) 調整後さらに 10,000 g で回収されるペレットの評価を抗ヒストン抗体で検証する。

4. 研究成果

(1) 細胞外ヒストンの細胞傷害作用の解析

細胞外ヒストンおよび TNF α を HUVECs へ作用させると、60 分、240 分後ヒストンにより HUVECs が収縮を伴う形態変化が誘導された。一方、60 分、240 分の作用では TNF α による形態変化は示されなかった (図 1)。また PI の取り込みによる細胞傷害はヒストンにより示されたが TNF α では示されなかった (図 2)。プロテオーム解析の結果、細胞外ヒストン投与後の EVs にはヒストンを同定したが、TNF α 投与後の EVs にはヒストンは同定されなかった。このことからヒストン刺激後の EVs 特異的にヒストンが含まれていることが推察された。また、細胞外ヒストン投与後の EVs にはいくつかの膜タンパク質が含まれていることを確認

した（膜タンパク質 A, 膜タンパク質 B, 未発表につき非公開）。電子顕微鏡による観察結果、60 分、180 分および 240 分で細胞膜、および細胞膜直下にベジクルの存在が確認された。（未発表につきデータ非公開）

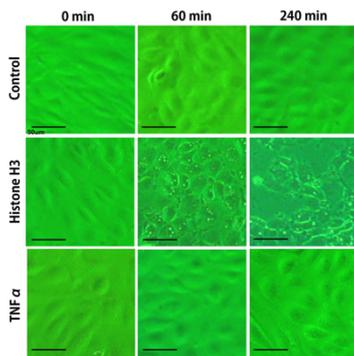


図1 ヒストンおよび TNF α を 60 分、240 分間 HUVECs へ作用した光学顕微鏡像（スケールバー：50 μ m）

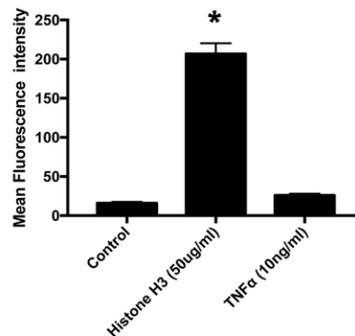


図2 ヒストンおよび TNF α を 240 分間 HUVECs へ作用後の PI の取込みをフローサイトメトリーで評価 (Mean fluorescence intensity: 平均蛍光強度、*P<0.05, One-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test for multiple analysis)

(2) 細胞外ベジクルに含まれる膜タンパク質の解析

HUVECs における膜タンパク質 A の局在を免疫蛍光染色で検討した結果、細胞外ヒストン投与後に局在の変化が示された (図 3)。細胞外ヒストン投与前後の HUVECs を分画後のウエスタンブロット、およびフローサイトメトリーによる解析で膜タンパク質 A の量を解析した。その結果ヒストン投与により膜タンパク質 A が有意に低下することが示された (図 4)。膜タンパク質 A はヒストン投与後に細胞外ベジクルに含まれ放出されることが推察された。

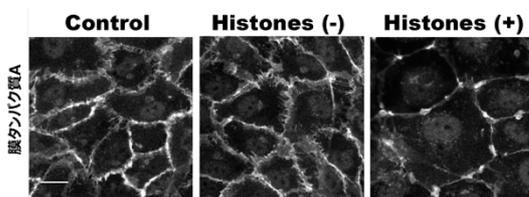


図3 膜タンパク質 A の抗体を用い、膜タンパク質 A に対する蛍光染色をおこなった (スケールバー：10 μ m)

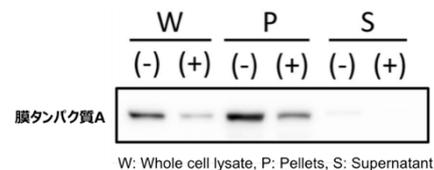


図4 膜タンパク質 A を分画後に膜タンパク質 A に対する抗体を用いウエスタンブロットをおこなった

(3) 細胞外ベジクルに含まれるヒストン及び膜タンパク質の解析

HUVECs への細胞外ヒストンの投与後の細胞外ヒストンの局在を検証した。抗ヒストン H3 抗体 (クローン ZZZZ 未発表につき非公開) を用いフローサイトメトリー (図 5)、および分画後のウエスタンブロットの結果、細胞膜上にヒストンが局在することが示唆された。加えて抗ヒストン H3 抗体を用い免疫電顕で局在を検討した結果、細胞外ヒストンが細胞膜上へ蓄積される結果が示された。蛍光免疫染色の結果とも比較し、細胞外ヒストンは細胞膜へ蓄積することで HUVECs へ傷害を与え、細胞外ベジクルへ含まれて細胞から放出されることが推察された。細胞外ヒストンを投与後に培養上清を 10,000 g で回収したペレット (EVs とみなす) を再懸濁し、抗ヒストン抗体および、膜タンパク質 A に対する抗体を用いフローサイトメトリーで解析した。Isotype IgG と比較し、抗ヒストン H3 抗体 (クローン ZZZZ) および膜タンパク質 A に対す

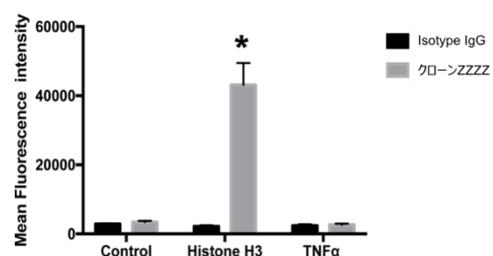


図5 細胞外ヒストン (Histone H3) および TNF α を HUVECs へ作用させた。その後、抗ヒストン H3 抗体 (クローン ZZZZ) を用い、細胞膜上のヒストンとの反応をフローサイトメトリーで解析した。(Mean fluorescence intensity: 平均蛍光強度、*P<0.05, One-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test for multiple analysis)

る抗体とEVs上のヒストンおよび膜タンパク質Aに対する平均蛍光強度(Mean fluorescence intensity)は有意に高く、抗体を用いてフローサイトメトリーでヒストンを検出できることが示された。(未発表につきデータ非公開)

(4) 細胞外ベジクルの細胞傷害性の評価

再懸濁したEVsの量を変化させHUVECsへ投与し、PIの取込みをフローサイトメトリーにより検討した。その結果容量依存的にHUVECsへの細胞傷害性が有意に増加することが明らかになった。(未発表につきデータ非公開)

(5) 敗血症モデルマウスの血漿の解析

敗血症モデルマウスとしてCLPモデルを作成した。CLPモデルは24時間後に体重が15%減少し、Shamに比べて有意に減少していた。血漿成分をフローサイトメトリーで評価した結果、Forward Scatter (FSC)で小さい領域でCLPモデルでは粒子が増加する傾向が得られた。血漿から乏血小板血漿(PPP)調整後さらに10,000gで回収されるペレットの評価を抗ヒストン抗体で検証した結果、抗ヒストンH3抗体(クローンZZZZ)と反応性を示した(図6)。④で示したin vitroの結果がin vivoでも示されることが示唆された。

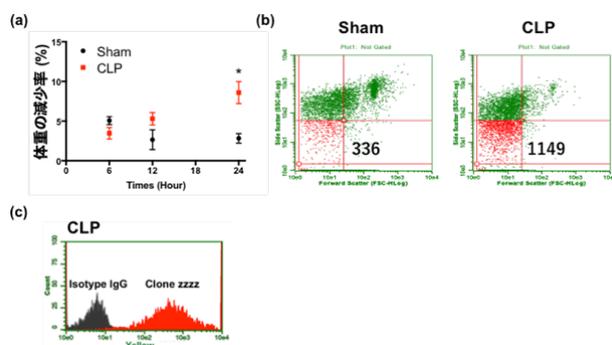


図6 (a) Sham および CLP モデルマウスの体重の減少率(* $p < 0.05$ student t -test)、(b) Sham および CLP モデルマウスの血漿をフローサイトメトリーで解析した粒子の分布(ドットプロット、横軸: Forward Scatter (FSC)、縦軸: Side Scatter (SSC))、CLPモデルで増加した粒子(336 から 1149)の箇所をゲートして赤色で示した(c) CLPモデルマウスの乏血小板血漿(PPP)調整後さらに10,000gで回収後のペレットを Isotype IgG および抗ヒストンH3抗体(クローン ZZZZ)と反応させた(ヒストグラム、横軸: 蛍光強度(Yellow)、縦軸: カウント(Count))

<引用文献>

- ① Brinkmann V et al. Science, 303, 1532 (2004)
- ② Xu J et al. Nature Medicine, 15, 11, 1318 (2009)
- ③ Angus DC et al Crit Care Med 29, 1303(2001)
- ④ 日本版敗血症診療ガイドライン 2016 J-SSCG (2016)
- ⑤ Pemberton AD et al. Proteomics 10, 1484(2010)
- ⑥ Class R et al. Am J Clin Oncol. 19, 522 (1996)
- ⑦ Jiang P et al. Acta Neuropathol. 133, 547 (2017)
- ⑧ Daigo K et al. Sci Signal. 7 (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Soda, Y. Nakada, H. Iwanari, T. Hamakubo	4. 巻 24
2. 論文標題 AT2 receptor interacting protein 1 (ATIP1) mediates COX-2 induction by an AT2 receptor agonist in endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 1, 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2020.100850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 K. Inoue, X. Tian, H. Velazquez, K. Soda, Z. Wang, C.E. Pedigo, Y. Wang, E. Cross, M. Groener, J.W. Shin, W. Li, H. Hassan, K. Yamamoto, P. Mundel, S. Ishibe	4. 巻 30
2. 論文標題 Inhibition of Endocytosis of Clathrin-Mediated Angiotensin II Receptor Type 1 in Podocytes Augments Glomerular Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 2307, 2320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2019010053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 早田敬太
2. 発表標題 血管内皮細胞傷害により生じるベジクルの膜タンパク質プロテオミクス
3. 学会等名 第15回日本臨床プロテオゲノミクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 敗血症における急性臓器傷害を改善するための方法	発明者 浜窪隆雄、太期健二、早田敬太	権利者 学校法人日本医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、500557048	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浜窪 隆雄 (Hamakubo Takao) (90198797)	日本医科大学・大学院先端医学研究所・教授 (32666)	
研究協力者	大橋 瑠子 (Ohashi Riuko) (20447600)	新潟大学・医学部・准教授 (13101)	
研究協力者	川村 猛 (Kawamura Takeshi) (70306835)	東京大学・アイソトープ総合センター・准教授 (12601)	
研究協力者	射場 敏明 (Iba Toshiaki) (40193635)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究協力者	田部 陽子 (Tabe Yoko) (70306968)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究協力者	津本 浩平 (Tsumoto Kohei) (90271866)	東京大学・工学部・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関