

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2017

課題番号：24591070

研究課題名(和文)SIRS治療のためのPTX3吸着カラムの開発

研究課題名(英文)Development of a PTX3 absorption column for patients with SIRS.

研究代表者

井上 健司 (INOUE, KENJI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80317388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：PTX3カラムのヒストンの非特異的吸着は、PTX3塩基配列の調節、ビーズの種類、ブロッキングバッファの調整等々試みたが、ついには解決に至らなかった。PTX3とヒストンの結合のメカニズムについて検討した。リコンビナントPTX3とヒストン4(H4)を結合反応させたのち、電子顕微鏡で観察するとタンパク質構造が失われているほどの強い凝集反応観察された。このあまりに強い凝固凝集反応が、カラム作成における非特異的結合の原因になると考えられた。しかしこの強い凝固反応が、ヒト内皮細胞に対するヒストンの細胞毒性をPTX3添加で抑制されるメカニズムであることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To overcome a non-specific absorption with histone to pentraxin 3 (PTX3) columns, we have studied which sequence of PTX3 was most appropriate or 2) which beads or blocking buffer were appropriate to reduce the background. However, we could not find an appropriate condition to reduce it. But an electro-microscopy revealed a very strong aggregation of recombinant PTX3 and histone 4, which may cause the non-specific absorption. From this finding, we consider that the mechanism of a strong aggregation is the fact that PTX3 inhibit histone, which cause to damage of human endothelial cell in septic condition.

研究分野：循環器内科学

キーワード：敗血症 全身性炎症反応症候群 体外循環式カラム

## 1. 研究開始当初の背景

### 1-1; 全身性炎症反応症候群

敗血症や非感染性の全身性炎症反応症候群 (Systemic Inflammatory response syndrome :SIRS)をきたす重症急性膵炎、外傷、重症熱傷、心停止後症候群などの疾患は、高率に多臓器不全を合併する。抗生剤や集中治療の進歩にも関わらず、未だに死亡率は高く、新たな治療法の確立が必要される。自然免疫、炎症、細胞死などの SIRS 重症化機序は以下のように考えられている。PAMPs(Pathogen associated molecule patterns:PAMPs), DAMPs ( Damage associated molecule patterns ) や PRRs ( Pattern recognition receptors )が病原体を認識し、炎症性サイトカインなどを産生した結果、炎症が増悪していく。炎症により障害され死滅した細胞からさらに DAMPs が放出され、最終的に多臓器不全を引き起こし、死に至る。

### 1-2: 細胞外ヒストン

現時点で治療薬の可能性のある APC (activated protein C)の薬物動態は1)凝固やアポトーシス、炎症の抑制、2)血管の透過性抑制、3)ヒストンの分解が考えられている。これまでDNA構築に重要な核内タンパク質と考えられていたヒストンは、in vitro では内皮に対して細胞傷害性をもちマウスでは肺胞内出血や大血管および微小血管では血栓(DIC)を引き起こし致死的に働く。APCはヒストンを切断し、その細胞傷害性を低下させ、また実際に抗ヒストン抗体投薬によって敗血症が改善したことからヒストンは新規治療薬の魅力的なターゲットと考えられている。

### 1-3: Pentraxin3 (PTX3)

PTX3はC反応タンパク(CRP)と同じ pentraxin ファミリーに属する急性炎症性反応タンパクで申請者は高感度 PTX3 測定系を開発し(Inoue K. Arterio thromb vascular boil, 2007)、正常値を1700名余りの健常者から規定(Yamasaki K, Inoue K. CCLM 2009)し、これまで、不安定狭心症の診断や睡眠時無呼吸症候群(Kasai T, Inoue K. Am J Hypertension 2011)の治療指標効果に有効と報告してきた。また急性冠症候群の血栓内に浸潤した好中球から PTX3 が放出されること(Inoue K. ISRN vascular biology 2011)。PTX3はこれまで多くの血管病変での異常高値の報告がなされているが、同疾患群以外にも、慢性関節リウマチやシェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎など炎症性疾患での関与も数多く報告されている。

### 1-4: PTX3 と SIRS

Norataは急性心筋梗塞を起こした PTX3 欠損マウスでは梗塞巣の領域が減り、炎症性遺伝子の発現も押さえられていることを見出した(Norata. Circulation 2009)ことから PTX3は身体に対して保護的な作用があることが推測される。MarioらはSIRSの状態入院し、その際、血漿 PTX3 値の増加群の予後が悪いことを報告している(Mauri.CCM、2008)。Norataの報告も踏まえて考えると PTX3は患者の炎症状態を鎮静化させるために増加しているのではないかと推測される。現在のところ同疾患群での PTX3の役割は不明だが、我々は、標的プロテオミクス解析を用いて SIRS患者において PTX3に特異的に結合するタンパクを網羅的に解析し、ヒストンを含む104個の候補タンパクを同定した。また細胞外ヒストンが PTX3のアミノ基末端に特異的に結合し凝集することも発見した。同時に

LPS により SIRS を起こしたマウスに PTX3 を投与したところ、有意に生存期間を延ばすことにも成功した。

## 2 . 研究の目的

上述したように、PTX3 は SIRS の新規治療ターゲットとして成り立つ可能性が極めて高いと考えられるが経口薬、注射薬、いずれの方法をとるにしても開発には、多くの労力と時間を要する。また核内にあるヒストンがなぜ血中に供給されるか不明であること、体内で PTX3 により、ヒストンを凝集させてしまうことが果たして良いかどうか、さらにはヒストンの本来の役割である DNA 構成必須タンパクに対する抗体療法が理にかなっているかという点で非常に疑問が残る。本邦では現在敗血症の治療にはポリミキシン B を固相化したエンドトキシン吸着フィルター (PMX - DHP) が広く使われている。代表的な PAMPs であるグラム陰性桿菌の LPS (リボサッカライド) を、ポリミキシンによるイオン結合により血中から効率的に吸着除去する。体内投与では骨髄抑制作用のあるポリミキシン B をポリエステル製のファイバーにポリミキシン B を共有結合させ固相化させ、血液をそのカラムに体外循環させて PAMPs を効率的に取り除く方法としては大変画期的であり、かつ安全な治療法と考えられている。そこで同様の方法を用いて SIRS 症例に対する新たな治療法として PTX3 吸着カラム作成を目標とした。このシステムでは細胞外に放出されたいわゆる有害なヒストンのみ (核内ヒストンは体外循環には影響がないことが想像される) のみ除去することが理論上可能と考えた。

## 3 . 研究の方法

1) SIRS 症例での血漿 PTX3 値の経時的推移の検討。特に現行治療において血漿 PTX3 値の変化と予後が実際どの程度の強さをもつ

て相関するかどうかを検討する。多臓器障害スコアである SOFA score、急性腎障害合併率、ショック離脱率、血中乳酸値、血中 HMGB-1、炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ ) を変数として血漿 PTX3 値が多変量解析による検討の結果上記パラメーターやバイオマーカーとどのような位置づけにあるかを明らかにする。

### 2) PTX3 固着カラムの作成

共同研究先である JSR 株式会社ですでに開発を始めている PTX3 固着カラムの完成を目指す。

### 3) 動物実験での PTX3 固着カラムによるヒストン吸着療法の効果判定

ラットの開腹盲腸結紮穿孔腹膜炎モデルを作成し以下 3 群の予後比較を検討する。

未治療群、 PTX3 を固着させないカラムを用いて体外循環を施行する群、 PTX3 固着カラム

によるヒストン吸着療法を施行する群。3 群の生存曲線をえがき治療効果を判定する。その他の評価項目として、持続動脈ラインによる血圧、脈拍、DAMPs の一つである HMGB1、炎症性サイトカインである IL-6、TNF- $\alpha$  など測定する。なお、炎症モデルとして、LPS 腹腔内注射モデルも同時に作成し、差異などを検討する。

## 4 . 研究成果

1) 炎症性疾患のひとつである急性冠症候群患者の PTX3 値と SOFA スコアの関連を 2012 年に欧州心臓病学会で報告した。エンドポイントを 1) 死亡、2) 大動脈バルーンポンピング補助を必要とするショック、3) 人工呼吸器を必要とする心不全とし入院時の PTX3 値を含む 5 種類のバイオマーカーを比較したところ PTX3 値がオッズ比 3.6 (95% 信頼区

間 2.2-5.8,  $P < 0.0001$ )で最も優れていた。以上より予想どおり炎症性疾患の重症度を血漿 PTX3 値は反映することが示された。

## 2) 【カラム作成】

1. PTX3 固相プレートを用いたヒストン検出系による血清中でのリコンビナントヒストンの定量。
2. PTX3 固相磁性粒子の作成およびヒストンと反応性の評価。

まず PTX3 と H3.1/H4 構造のヒトヒストンリコンビナントを反応させると血清を希釈していても結合率は落ちず、ヒストンとの反応阻害が発生することがわかった。そこヒストンの量を 0-1,000 ng/mL にまで 4 ポイント設定し同様の実験を行ったが、血清 (10 倍希釈)中においてもヒストンとの反応が阻害された。非特異的結合を減らすためにビーズの特異性をあげることで対応を試みた。しかし JSR ライフサイエンス社の磁性粒子を用いヒストンリコンビナントおよびウシ胸腺由来ヒストンを用いたがヒストンとの反応は阻害された。PTX3 固相プレートを用いたヒストン検出系を構築し、種々のブロッキングバッファーを変えてできるだけ非特異的なヒストンの吸着を抑えるよう工夫をしたがやはり反応阻害が発生した。そこで連携研究機関である東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学と合同で PTX3 とヒストンの結合のメカニズムについて検討した。リコンビナント PTX3 とヒストン 4 (H4)を結合反応させたのち、電子顕微鏡で観察するとタンパク質構造が失われているほどの強い凝集反応観察された。このあまりに強い凝固凝集反応が、カラム作成における非特異的結合の原因になると考えられた。しかしこの強い凝固反応が、ヒト内皮細胞に対するヒストンの細胞毒性を PTX3 添加で抑制されるメカニズムであることがわかった。さらに興味深いことにアミノ基側のリ

コンビナント PTX3 でも同様の結果が得られることから同部位が敗血症の際、内皮細胞障害をもたらすヒストンに対する PTX3 の保護的役割をきたすことがわかった。次にアミノ基側のリコンビナント PTX3 の投与が敗血症に有効かどうか敗血症マウスモデルを用いて検討した。マウスにヒストンを投与すると血管内皮細胞障害を起こし肺出血を起こし死亡することがすでに報告されているが、PTX3 を投与すると血管内皮細胞の障害は抑制され、肺出血もきたさず有意に生存率が改善されました。本結果は 2014 年、*Science Signaling* に報告した (*Sci. Signal.* 16 September 2014; Vol. 7, Issue 343, p. ra88 )。

3) 一方、動物実験系の構築は順調に進んだ。ラットの体外循環において最も難しいところは全身麻酔下にラットの大腿静脈、頸静脈にルートを確認してポンプを用いて安定的に体外循環を継続させることにあった。そこで同システムをすでに構築され論文発表されている順天堂大学医学部救急科射場利明教授に協力を依頼、ラットの体外循環モデルの構築を完了した。

4) ヒストンによる内皮障害の PTX3 の効果を順天堂大学医学部救急科射場敏明教授のご協力をいただき検討した。ヒストン H3 (25  $\mu\text{g/mL}$ ; 敗血症においてみられる程度の濃度として設定)による血管内皮細胞(ラット大動脈由来内皮細胞)障害は、

- a) 血清フリーでは強く見られたが、100% 血清でほぼ完全に緩和された。
- b) 0%アルブミン培養液では、強い内皮細胞障害が見られたが、5%アルブミン(生理的濃度)により高度に緩和された。また 2.5%アルブミンでも相当程度緩和され、1%アルブミンによる緩和効果は少なかった。
- c) 生理的濃度の活性化プロテイン C (APC, 4.0  $\mu\text{g/mL}$ )でも緩和効果がみられたが、治

療的濃度(40 µg/mL)でより強い緩和効果がみられた。

d) 炎症時の反応としてみられる程度のPTX3濃度(0.1 µg/mL)でも緩和効果がみられたが、治療的濃度(1.0 µg/mL)でより強い緩和効果がみられた。

以上より、比較的少量のヒストンによる傷害は、血中に存在する生理的阻害物質であるアルブミンやプロテイン C, PTX3 によって相当程度阻害される。しかし、ヒストン濃度が高くなると、生理的阻害物質では不十分であり、治療的介入の必要があると考えられた。

PTX3はN末端に特異的なドメインをもつ炎症反応性タンパクで同部位のリコンビナントをできるだけ短く特異性を保つように作成を試みたが非特異的吸着を抑制することができなかった。

カラム作成のノウハウのある東レ株式会社に共同研究を依頼の依頼を考えております。同社は世界初の血中エンドトキシン除去向け血液浄化用浄化器を開発、臨床で広く使用されている。カラムの内部にエンドトキシン吸着担体となるポリミキシンB固定化繊維をロール状に巻き付けた形の吸着体で、同方法を用いてPTX3を固定できないか検討していきたい。

#### 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2件)

1) Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, Sudou Y, Kodama T, Naito M, Inoue K, Hamakubo T. The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps.

Mol Cell Proteomics. 査読有り 2012

Jun;11(6):M111.015073

2) Daigo K, Nakakido M, Ohashi R, Fukuda R, Matsubara K, Minami T, Yamaguchi N, Inoue K, Jiang S, Naito M, Tsumoto K, Hamakubo T. Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis Sci. Signal., 査読有り 2014 Sep 16;7(343):ra88. doi: 10.1126/scisignal.2005522.

〔学会発表〕(計1件)

Inoue K, Maruyama M, Diada H Sequential organ failure assessment (sofa) score is superior to multiple biomarkers for the risk stratification in patients with severe chest pain.

,European society of cardiology congress 2012年

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 健司 (INOUE KENJI)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：80317388

(2)研究分担者

( )