

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05684

研究課題名(和文)敗血症性DICの生存率向上を目指して - ヒストンを標的とした新規治療戦略の探索 -

研究課題名(英文)Therapeutic strategy targeting extracellular histones in sepsis-associated DIC

研究代表者

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20381171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：DIC治療薬として使用されている遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤にはヒストンを中和する作用があり、ヒストンによる血小板凝集や好中球細胞外トラップ(NETs)放出を抑制することを細胞レベルで確認した。また、ヒストン投与によるDICモデルにおいて、遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤がNETs放出を抑制しうること、臓器障害を軽減しうる可能性を動物実験レベルで確認した。さらには、遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤にコンドロイチン硫酸鎖が付加されたもの(タイプII)は、従来の製剤よりも、ヒストンによる血小板凝集やNETs放出を効果的に抑制することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Recombinant thrombomodulin (rTM) inhibited histone-induced platelet aggregation and neutrophil extracellular trap (NET) formation in vitro. rTM also inhibited histone-induced NET formation in kidneys, and attenuated histone-induced renal dysfunction in rats. rTM with a chondroitin sulfate side chain (rTM type II) had higher affinity for histone H3 and H4 than the traditional rTM (Type I), and thus, inhibited histone-induced platelet aggregation and NET formation more efficiently than rTM type I. These findings suggest that rTM type II can be a promising therapeutic option for sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. Further studies are needed to elucidate in vivo effects of rTM type II in septic conditions.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：敗血症 播種性血管内凝固症候群 細胞外ヒストン トロンボモジュリン コンドロイチン硫酸

1. 研究開始当初の背景

ヒストンは DNA を折りたたんで核内に収納するのに必須のタンパク質だが、敗血症の際には、好中球によって細胞外トラップ (NETs) の形で放出され、血栓症を引き起こす。細胞外ヒストンの作用を中和すると、敗血症モデル動物を救命できることから (*Nat Med.* 2009;15:1318-21)、細胞外ヒストンは敗血症の際の致死性因子として注目を集めている。

これまでに我々は、敗血症性 DIC 患者では血漿ヒストン濃度が上昇していること、細胞外ヒストンは血小板凝集を引き起こし、血管内皮細胞傷害、心筋傷害、網膜視細胞傷害にも関与していることなどを明らかにし、このようなヒストンの毒性を遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤 (rTM) やグリコサミノグリカンが中和することを報告してきた (*PLoS One.* 2013;8:e75961. *Lab Invest.* 2014;94:569-85)。また、好中球が NETs を放出し、血栓形成を惹起することは、感染防御の観点から重要であるものの、この反応が過剰になってしまうと多臓器障害を伴う DIC に発展する、という概念を提唱し、報告してきた (*J Intensive Care.* 2014 2(1):65)。

rTM 製剤は DIC 離脱効果が認められて 2008 年より臨床の現場で使用されるようになり、市販後の後ろ向き観察研究においては、敗血症性 DIC 患者の予後を改善しうる可能性が示されている (*Intensive Care Med.* 2013;39:644-52)。しかしながら、欧米での後期第 II 相試験の結果を見る限りは、rTM 製剤の敗血症性凝固障害患者に対する予後改善効果は楽観視できるものではなく (*Crit Care Med.* 2013;41:2069-79)、より良い治療法の開発が求められている。

抗ヒストン抗体は敗血症モデル動物の生存率を有意に改善することが示されており、敗血症性 DIC 患者の予後を改善しうる治療戦略として、致死性因子ヒストンの作用を抑

える分子標的治療は有望であると考えられる。rTM には抗凝固作用とともにヒストン中和作用があり (*PLoS One.* 2013;8:e75961)、既存の有望な治療法の一つであるが、現在市販されている rTM 製剤は、血管内皮細胞上に発現している二種類のトロンボモジュリンのうち、コンドロイチン硫酸鎖を持たない分子種 (タイプ I) であり、コンドロイチン硫酸鎖を有するタイプ II の効能についてはほとんど未知である。

これまでの検討で我々は、ヒアルロン酸などのグリコサミノグリカンには、ヒストンの毒性を中和する働きがあり (*Lab Invest.* 2014;94:569-85)、特に、凝集塊を形成してその中にヒストンを閉じ込め、ヒストンの毒性が拡散するのを防ぐ働きがあることを明らかにしてきた。このことから、グリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン硫酸を有する rTM タイプ II は、従来の rTM タイプ I よりもヒストンの毒性を抑えるのに適した薬剤と考えられ、ヒストンを標的とした新規敗血症治療法に応用できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

敗血症病態における細胞外ヒストンの役割を解析し、細胞外ヒストンを標的とした新規治療戦略を構築することを本研究の目的とする。特に、細胞外ヒストンが好中球および血小板に及ぼす作用を *in vitro* ならびに *in vivo* で解析し、これらの作用に対して、rTM タイプ I ならびにタイプ II が保護的に働くのかどうかを検討していく。rTM タイプ II はこれまでにほとんど研究されていない新規の薬剤でありながら、細胞外ヒストンの毒性を強力に抑制して敗血症性 DIC の病態を改善しうる候補薬剤であると考えられるため、この可能性について、*in vitro* ならびに *in vivo* での検討を進めていく。

3. 研究の方法

(1) 末梢血よりヒト好中球を単離し、遺伝子組換えヒストンH3ならびにヒストンH4で刺激した際の変化を蛍光顕微鏡で観察する。また、その作用メカニズムを、シグナル伝達阻害剤等を用いて検討する。さらに、これらの反応に対する rTM の効果を検討する。

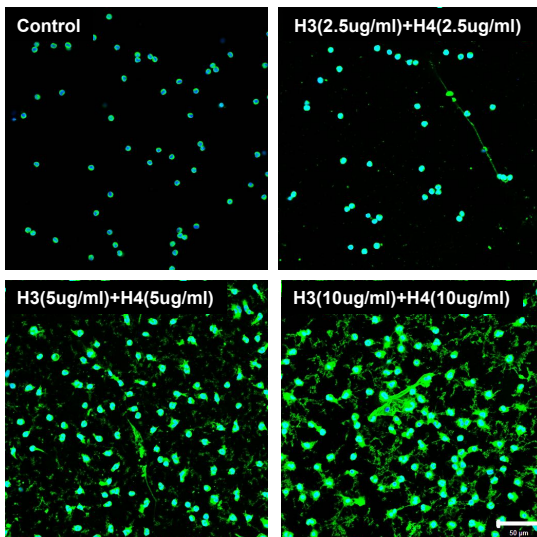
(2) 末梢血よりヒト洗浄血小板を単離し、遺伝子組換えヒストンH3ならびにヒストンH4で刺激した際の変化を血小板凝集計で観察する。また、これらの反応に対する rTM の効果を検討する。

(3) rTM タイプ II を精製し、タイプ I との差異を生化学的に解析する。また、遺伝子組換えヒストンH3ならびにヒストンH4との結合能を、タイプ I と比較して解析する。さらに、好中球や血小板に対する保護効果を、タイプ I と比較して解析する。

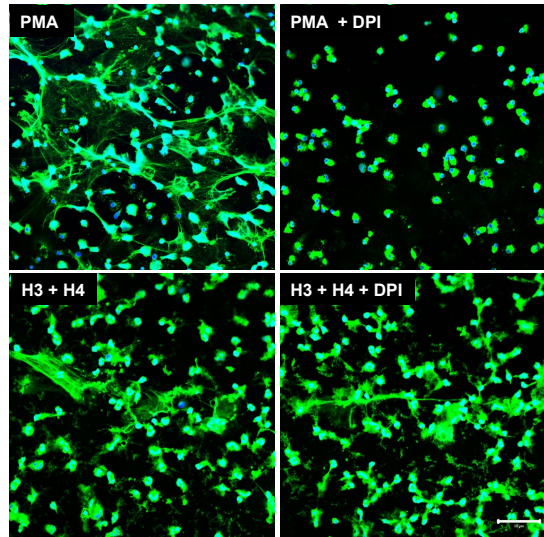
(4) ヒストンを投与する致死的血栓症モデルラットにおける rTM の保護効果を解析する。また、タイプ I とタイプ II の効果の違いについて、マウスを用いて解析する。

4. 研究成果

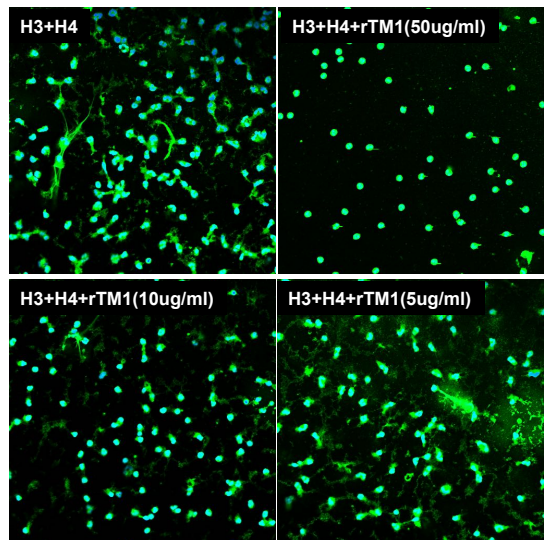
(1) 好中球を遺伝子組換えヒストン H3 ならびにヒストン H4 で刺激すると、濃度依存性に細胞外トラップ (NETs) の放出が誘導された。



この時のヒストン H3 濃度は、敗血症性 DIC 患者の血漿ヒストン濃度として報告されているものと (*PLoS One*. 2013;8:e75961.) ほぼ同等と考えられた。ヒストンによる NETs 放出は NADPH オキシダーゼ阻害剤 DPI によって抑制されないことから、これまでに報告されている活性酸素種産生を介した NETs 放出とは別機序によるものと考えられた。

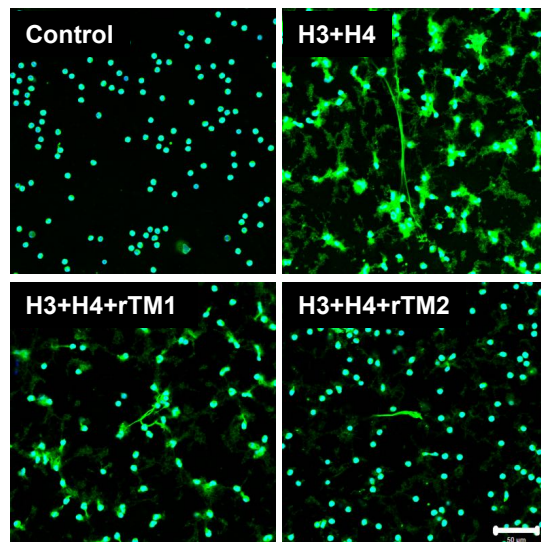
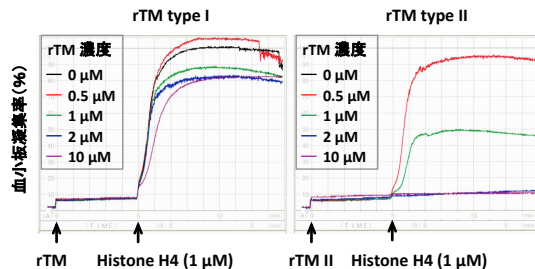


この遺伝子組換えヒストン H3 ならびにヒストン H4 刺激に伴う NETs 放出に対して、培養上清中に rTM を添加しておく、rTM の濃度依存性に NETs 放出反応が抑制された。

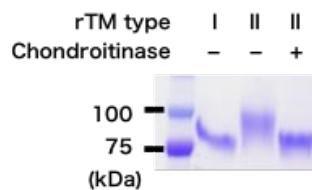


このような NETs 放出抑制効果は、同濃度のアルブミンを添加しても認められないことから、rTM に特徴的な効果だと考えられた。

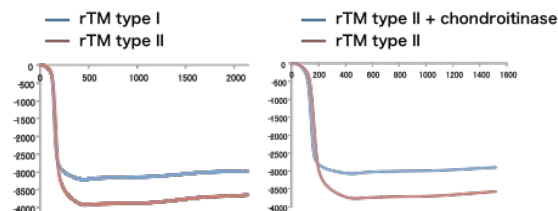
(2) 洗浄血小板を遺伝子組換えヒストン H4 で刺激すると血小板凝集を認めた。rTM タイプ I もしくはタイプ II を添加しておく、濃度依存性に血小板凝集が抑制され、その効果はタイプ II の方が顕著だった。



(3) rTM タイプ I とタイプ II の精製物を電気泳動したところ、タイプ II の方が分子量にして 10kDa ほど大きく、この差異はコンドロイチナーゼ処理することで消失したことから、タイプ I とタイプ II の違いは、想定していたとおりコンドロイチン硫酸側鎖によるものと考えられた。

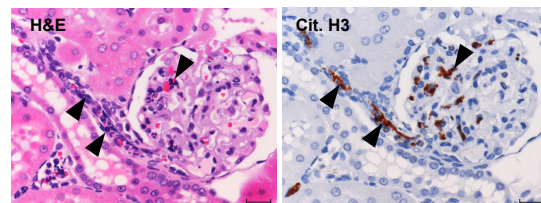


次に、rTM とヒストンとの結合能を NAPiCOS を用いて解析したところ、タイプ II の方がタイプ I と比較してヒストンに対する結合能が強く、この差異はコンドロイチナーゼ処理することで消失した。

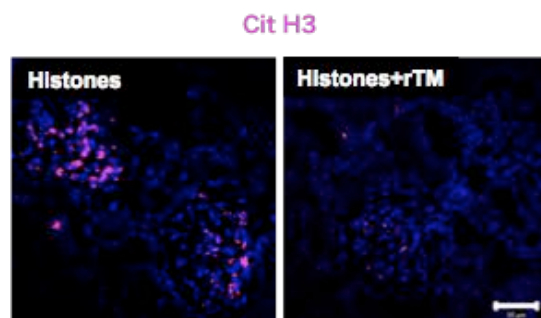


また、ヒストン刺激に伴う好中球 NETs 放出に対する rTM の抑制効果について、タイプ I とタイプ II の効果を比較検討したところ、タイプ II の方がより低濃度で NETs 放出を抑制することが判明した。

(4) ヒストン投与致死的血栓症モデルラットでは、腎糸球体に好中球が集積し、NETs 放出の所見 (Cit H3) を認めた。



ヒストン投与後、臓器障害が出現し始めるタイミングで rTM を投与すると、腎糸球体での NETs 放出が減少し、腎機能障害が軽減する傾向を認めた。



rTM タイプ I とタイプ II の in vivo における効果の差異については、ラットで検討できる十分量のタイプ II を確保できなかったため、検討できていない。ラットと比較して体重が十分の一程度のマウスで予備検討したところ、タイプ I とタイプ II で生存率に明らかな差を認めず、in vitro で認められた所見が必ずしも in vivo では反映されないことが示唆された。さらなる検討が必要であると考えられた。

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6件)

- (1) 八島望, 伊藤隆史, 垣花泰之, 丸山征郎
敗血症における血栓形成の生理と病理
日本外科感染症学会雑誌 14 705-711 2017
査読なし
- (2) Liaw P, Ito T, Iba T, et al. DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC
Blood Rev. 30 257-261 2016
10.1016/j.blre.2015.12.004.
査読あり
- (3) Kakahana Y, Ito T, Nakahara M, et al.
Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management
Journal of Intensive Care 4 22 2016
10.1186/s40560-016-0148-1
査読あり
- (4) Iba T, Ito T, Maruyama I, et al.
Potential diagnostic markers for disseminated intravascular coagulation of sepsis
Blood Rev. 30 149-155 2016
<http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.10.002>
査読あり
- (5) Ito T, Kakahana Y, Maruyama I.
Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases
Expert Opin Ther Targets 20 151-158 2016
10.1517/14728222.2016.1086750
査読あり
- (6) 伊藤隆史, 垣花泰之
敗血症性 disseminated intravascular coagulation(DIC)におけるヒストンの net effect
日本集中治療医学会雑誌 22 499-504 2015
<http://doi.org/10.3918/jsicm.22.499>
査読あり

[学会発表] (計13件)

- (1) 伊藤隆史 目で見る敗血症性 DIC の病態
第 117 回近畿救急医学研究会 2018 年
- (2) 伊藤隆史, 横山弥生, et al. 敗血症診療における急性期 DIC 診断基準の意義
第 45 回日本集中治療医学会学術集会 2018 年
- (3) 伊藤隆史 核由来 DAMPs/alarmins による血管内血栓形成
第 49 回日本動脈硬化学会 2017 年
- (4) 伊藤隆史 敗血症の病態を形づくるもの
第 11 回日本血栓止血学会 SSC 2017 年
- (5) 伊藤隆史 敗血症性 DIC における血栓形成の生理と病理
第 44 回日本集中治療医学会学術集会 2017 年
- (6) 伊藤隆史 好中球→NETs→ヒストンと敗血症性臓器障害
第 44 回日本救急医学会 2016 年
- (7) Ito T, and Maruyama I
Anti-inflammatory and anticoagulant roles of thrombomodulin in sepsis-associated DIC
1st joint Meeting of ISFP and PA 2016 年
- (8) 伊藤隆史 血液凝固の基礎とトロンボモジュリンの意義
第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年
- (9) 伊藤隆史
敗血症性血管内皮細胞障害と NETs
第 38 回日本呼吸療法医学会学術集会 2016 年
- (10) 伊藤隆史 敗血症性 DIC の病態における好中球と血管内皮細胞傷害
第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016 年
- (11) Ito T Uncontrolled immunothrombosis as a basis of sepsis-associated DIC
第 89 回日本薬理学会年会 2016 年
- (12) 伊藤隆史
Protective roles of thrombomodulin in nuclear DAMPs-associated thrombosis
第 77 回日本血液学会学術集会 2015 年
- (13) 伊藤隆史 敗血症性 DIC の病態を再考する~immunothrombosis の役割~
第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015 年

〔図書〕（計3件）

(1) 伊藤隆史, 垣花泰之

克誠堂出版 麻酔・手術後の患者管理

2016年 総ページ数 360

(2) 伊藤隆史

金芳堂 新・血栓止血血管学「凝固と炎症」

2015年 総ページ数 189

(3) 伊藤隆史

金芳堂 新・血栓止血血管学「血管と血小板」

2015年 総ページ数 251

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 隆史 (ITO TAKASHI)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

講師

研究者番号：20381171

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

丸山 征郎 (MARUYAMA IKURO)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

特任教授

研究者番号：20082282

中原 真由美 (NAKAHARA MAYUMI)

鹿児島大学医歯学域医学系

助教

研究者番号：90707514

川原 幸一 (KAWAHARA KO-ICHI)

大阪工業大学工学部生命工学科

特任教授

研究者番号：10381170

(4)研究協力者

永里 朋香 (NAGASATO TOMOKA)

藤森工業株式会社

山田 晋吾 (YAMADA SHINGO)

株式会社シノテスト