

令和元年6月13日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05499

研究課題名(和文) シトルリン化ヒストンH3を標的とした重症病態の制御

研究課題名(英文) Citrullinated histon H3 for control of critical illness

研究代表者

田崎 修 (TASAKI, Osamu)

長崎大学・病院(医学系)・教授

研究者番号：90346221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：重症病態の一つである外傷の概要を把握するため、長崎医療地域の外傷数、分類、死亡率を評価し、外傷センター開設前後で地域の外傷死亡率が減少していることを明らかにした。

NETsとの関連が示唆されている静脈血栓塞栓症のスクリーニング法および予防法を開発し、臨床患者で有用であることを明らかにした。

マウスの広範囲熱傷モデル、および敗血症モデルを開発し、両モデルにおいて自然免疫受容体、その下流のシグナル分子群、およびNETsの放出に重要なPAD4の遺伝子発現が有意に変化することを明らかにした。両モデルにPAD4阻害薬であるCI-Amidineを投与したが、遺伝子発現には変化がみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症病態の一つである広範囲熱傷モデル、および敗血症モデルを作成し、侵襲前後における自然免疫受容体およびその下流のシグナル分子群における遺伝子発現の変化を明らかにした。また、上記モデルはそれぞれ非感染性と感染性の炎症モデルであるが、遺伝子発現のパターン解析により病態を判別できることを明らかにした。

また、上記モデルにおいて、NETs形成のためのヒストンH3のシトルリン化に重要な酵素であるPAD4の遺伝子発現も更新していることを明らかにした。これらの結果は、上記病態におけるNETsの関与を示唆するものであり、NETsの制御による重症病態の治療に関する研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To overview traumas in Nagasaki medical region, we determined annual number of trauma, classification, and mortality. We clarified the mortality in the region significantly decreased after implementation of Trauma center.

We developed methods of screening and prevention of venous thromboembolism which was considered to be relevant to NETs, and they were useful in the clinical situation.

We developed murine models of 20% full-thickness burn injury and sepsis with cecal ligation and puncture. We discovered that gene expression changed significantly in innate immune receptors, signaling molecules, and PAD4 which was most important for release of NETs. Although we administered a pharmaceutical inhibitor of PAD4(CI-Amidine) to the two types of models, there was no significant change in gene expression in innate immune receptors, signaling molecules, or PAD4.

研究分野：救急医学

キーワード：自然免疫受容体 NETs

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

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、好中球の新たな感染防御機構である NETs (Neutrophil Extracellular Traps) に関する研究を行ってきた。NETs は感染防御の第一線で機能している一方で、重症病態においては生体に悪影響を与える可能性があることも報告されていた。例えば、Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や Damage-associated molecular patterns (DAMPs) に反応して好中球は NETs を放出し病原体を捕獲するが、この時同時に凝固系 pathway を亢進させ血栓形成を促す (immunothrombosis)。この時生理的範囲内では、NETs が誘導する immunothrombosis は病原体を局所に閉じ込めるといった感染防御の役割を果たすが、生理的範囲を超えて病的なまでに進行すると、動静脈の血栓形成や DIC を引き起こし多臓器不全の原因となる可能性がある。従って、NETs 形成を制御できれば重症病態に対する新たな治療展開が生まれる可能性があった。我々は、臨床検体を用いた NETs 研究の過程でヒストン H3 のシトルリン化がクロマチンの脱凝集を起こし NETs 放出につながることを示唆する所見を得ていた。そこで、ヒストン H3 のシトルリン化を制御できれば、感染症の重症化や多臓器不全への進行を抑制できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、救命救急センターで遭遇することの多い、感染症、重症外傷、広範囲熱傷等において、シトルリン化の抑制が病態に与える影響を明らかにすること、とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 外傷患者の概要の把握と外傷センター開設の効果

重症病態の一つである外傷の概要を把握するため、長崎医療地域の外傷死亡率の変化を長崎県版検診票を用いて地域網羅的に解析した。外傷の定義としては、長崎県版検診票の診断コードである、「大腿骨近位部骨折」、「外傷性頭蓋内出血」、「心大血管肺損傷」、「腹部臓器損傷」、「骨盤骨折」、「脊髄損傷」、「重症多発外傷」、および「その他の骨折」とした。予後は1週間後の転帰とし、外来および入院後の死亡を死亡と定義した。救命救急センターおよび外傷センター開設前後の地域の死亡率を多変量解析により評価した。

### (2) 深部静脈血栓塞栓症の診断と予防法の開発

NETs 産生との関連が注目されている静脈血栓塞栓症 (VTE) のスクリーニング法と予防法についての研究を行った。スクリーニング法に関しては、当センターで作成したスクリーニング基準の有用性を外傷患者 455 例を対象に検討した。また、予防法に関しては、外傷の重症度を示す Injury severity score (ISS) が 15 以上、VTE 発症のリスク指標である Risk Assessment Profile score (RAP score) が 5 以上の重症外傷患者 (n=69) に対して臨床的に止血が完成した時点から未分画ヘパリン 1 万単位/日を最長 14 日間投与しその効果を検討した。対照は、ヘパリンを予防投与していない historical control 群とした (n=105)。

### (3) 重症病態のモデル作成と自然免疫受容体の変化、およびシトルリン化阻害の効果

重症病態のモデルとして、感染モデル (盲腸結紮穿孔 (Cecal Ligation and Puncture: CLP))、および非感染モデル (体表面積 20% の III 度熱傷 (Burn)) を作成した。侵襲を与えた後、6、12、24 時間後に全血より total RNA を抽出して定量 RT-PCR により自然免疫受容体 (TLR2、TLR4、TLR9、NLRP3、RIG-I) の遺伝子発現を測定し判別分析を行った。また、自然免疫受容体の下流の主なシグナル分子群をターゲットに遺伝子発現を測定した。自然免疫受容体の主なシグナル分子群は Myd88、Trif、Irf3、Irf7、Casp1、Casp8、c-Fos、内部コントロールは Rps18 を用いた。マウスは受傷 3、6、12、24 時間後に sacrifice して心腔内採血を行った。Prime-Script RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) を用いて逆転写後、SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.) を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio Inc.) で PCR 施行し、Rps18 を内部コントロールとして mRNA を定量化した。

次に、NETs 形成のためのヒストン H3 のシトルリン化に重要な酵素である Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) の遺伝子発現を、Sham、CLP、Burn のモデルにおいて受傷 24 時間後に全血より total RNA を抽出し定量 RT-PCR により測定した。また、PAD4 阻害薬 (CI-Amidine) を用いて、PAD4 によるシトルリン化を阻害して、上記モデルにおける NETs 形成阻害の自然免疫系 (自然免疫受容体およびその下流のシグナル分子群) への影響を評価した。CI-Amidine (N-[(1S)-1-(aminocarbonyl)-4-[(2-chloro-1-iminoethyl)amino]butyl]-benzamide) は、活性部位のシステインに結合することで、PAD の 4 つのサブタイプ全てを不可逆的に阻害する。

## 4. 研究成果

### (1) 外傷患者の概要の把握と外傷センター開設の効果

長崎医療地域において、2010 年 4 月に救命救急センターが、2011 年 10 月に外傷センターが開設された。研究期間である 2016 年度までの 10 年間 (2007 ~ 2016 年度) で、外傷患者は長崎医療地域において 22904 例救急搬送されており、2007 年度は 1492 例であったが、その後増加し 2016 年度には 2101 例の患者が救急搬送されていた。また、この間搬送患者の平均年齢は 67 歳から 73 歳まで上昇しており、外傷患者の高齢化が顕著であった。最も症例数が多かったのは

「その他の骨折」であり、続いて「大腿骨近位部骨折」、「外傷性頭蓋内出血」、「骨盤骨折」の順に多かった。救命センターと外傷センターが開設された後の2012年以降を後期、それ以前を前期とすると、2007年度の救急搬送患者全体の死亡率は2.3%であったが、後期に入り死亡率が低下し2016年度には1%に低下した。前期を基準にすると、後期の2013年度以降で有意に死亡率が低下していた。このことは、救命センターおよび外傷センターが地域の外傷患者の死亡率低下に寄与したことを示唆している。この結果は、2018年のThe 4th World Trauma Congressで発表し論文化した。(Trauma Surgery & Acute Care Open, 印刷中。DOI: 10.1136/tsaco-2018-000291.)

## (2) 深部静脈血栓塞栓症の診断と予防法の開発

外傷後のVTEに対する我々のスクリーニング基準を、「受傷後5日目以降において、D-dimerが3測定日連続して増加、かつ15 $\mu$ g/mL以上」と設定し、この基準を満たした症例には造影CTを施行しVTEの有無を評価した。455例中スクリーニング基準を満たした73例中34例にVTEが認められた(陽性率46.6%)。一方、基準を満たさなかった他の症例においては症候性のVTEを認めることはなかった。このことより、本スクリーニング基準がVTEの早期検出に有用であることが示唆された。この結果は、第44回日本救急医学会総会で発表し論文化した。(Acute Medicine & Surgery. 6(1):40-48, 2018. doi: 10.1002/ams2.375.)

未分画ヘパリンの予防投与の効果に関しては、来院時の年齢、性別、ISS、RAP score、D-dimerは予防治療群とcontrol群に差は認められなかったが、VTEの発症率はhistorical control群(n=105)と比較して有意に低下した(29% vs 15%)。このことは、未分画ヘパリンの予防投与が重症外傷後のVTE抑制に効果があることを示唆している。この結果は、第78回米国外傷学会で発表予定である。

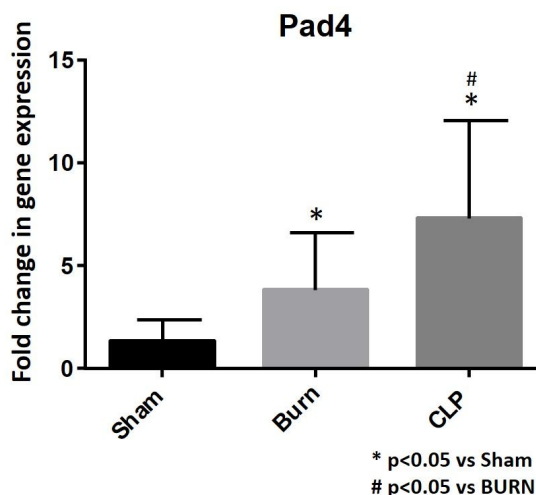
## (3) 重症病態のモデル作成と自然免疫受容体の変化、およびシトルリン化阻害の効果

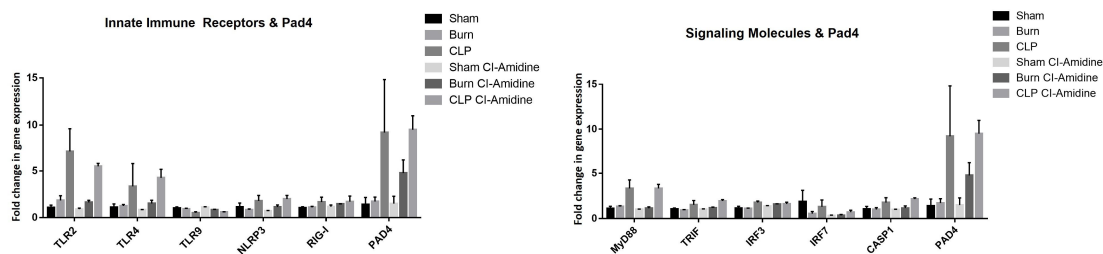
TLR2, TLR4の発現は6時間後からCLP、Burnにおいて有意に上昇した。TLR9の発現はCLPにおいてSham、Burnより12時間後から有意に低下した。NLRP3の発現は6時間後、24時間後でCLP、Burnにおいて有意に上昇した。判別分析では、侵襲後6時間後から各群で特徴的な遺伝子発現パターンを示し、各時間(6、12、24)において過誤率0%で各病態を判別することができた。研究結果は、76th Annual Meeting of the AASTで口演し論文化した(Journal of Trauma and Acute Care Surgery. 84:583-589, 2018.)。

下流のシグナル分子群を含めた判別分析では以下の結果が得られた。TLR2, TLR4, NLRP3, MyD88の発現はCLP、Burnにおいて3時間後から有意に上昇した。CLPにおいてTLR9は12、24時間後でSham、Burnより有意に低下、IRF7は有意に上昇した。3時間後から各群で特徴的な遺伝子発現パターンを示し、判別分析では3時間後で判別過誤率6.06%、6時間後からは0%で各病態を判別できた。研究結果は、2019年のSociety of Critical Care Medicine 48th Critical Care Congressで発表した。

以上より、自然免疫系のパターン解析により全身性炎症反応の病態を判別できる可能性が示唆された。

PAD4の遺伝子発現は、Shamと比較して、Burn、CLPにおいて24時間後に発現亢進を認め、CLPではBurnよりも更に発現亢進を認めた(右図)。次ページ図は、PAD4阻害薬(CI-Amidine)投与24時間後の自然免疫受容体、その下流のシグナル分子群、およびPAD4の遺伝子発現を示す。CI-AmidineはCLPやBurnにおける自然免疫受容体、シグナル分子、およびPAD4の遺伝子発現、そのいずれにも影響を与えなかった。その理由として、実験動物数が少ないこと(n=4)や、CI-Amidineが蛋白レベルでPAD4を阻害するため遺伝子発現のレベルまでには影響を与えなかった可能性がある。また、24時間という時間が、影響が与えるには短かった可能性もある。さらに、本実験ではNETs形成を直接観察していないので今後観察する必要がある。





## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Yuji Takahashi, Shuntaro Sato, Kazunori Yamashita, Naoya Matsumoto, Yoshihiro Nozaki, Tomohito Hirao, Goro Tajima, Takamitsu Inokuma, Shuhei Yamano, Kensuke Takahashi, Takashi Miyamoto, Kenichiro Inoue, Makoto Osaki, Osamu Tasaki. Effects of a trauma center on early mortality after trauma in a regional city in Japan: A population-based study. Trauma Surgery & Acute Care Open, 印刷中. DOI: 10.1136/tsaco-2018-000291. 査読有.

2. Iyama K, Inokuma T, Sato S, Yamano S, Tajima G, Hirao T, Tasaki O. Novel screening criteria for post-traumatic venous thromboembolism by using D-dimer. Acute Medicine & Surgery. 6(1):40-48, 2018. doi: 10.1002/ams2.375. 査読有.

3. Tajima Goro, Tokunaga Ayako, Umehara Takahiro, Ikematsu Kazuya, Miyamoto Junya, Sato Shuntaro, Tasaki Osamu. Early diagnosis using canonical discriminant analysis of innate immune receptor gene expression profiles in a murine infectious or sterile systemic inflammation model. Journal of Trauma and Acute Care Surgery. 84:583-589, 2018. DOI:10.1097/TA.0000000000001789. 査読有.

[学会発表](計11件)

1. Tajima G, Tokunaga A, Umehara T, Ikematsu K, Tasaki O. Novel Method to Discriminate the Pathophysiology of Inflammation by Patterns of Innate Immune System. Society of Critical Care Medicine 48th Critical Care Congress, 2019.

2. 高橋 優二、田崎 修、山下 和範、松本 直也、野崎 義宏、平尾 朋仁、田島 吾郎、猪熊 孝実、山野 修平、宮本 俊之、尾崎 誠. 救命救急センターおよび外傷センター開設と外傷患者の転帰に関する地域網羅の解析. 第46回日本救急医学会総会・学術集会, 2018年.

3. 井山 慶大、猪熊 孝実、平尾 朋仁、岡村 岳、上村 恵理、山野 修平、田島 吾郎、野崎 義宏、松本 直也、山下 和範、田崎 修. 外傷後静脈血栓塞栓症の有効かつ安全な予防法に関する検討. 第46回日本救急医学会総会・学術集会, 2018年.

4. 田島 吾郎、徳永 彩子、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修. 全身性炎症における自然免疫受容体発現パターンの経時変化. 第46回日本救急医学会総会・学術集会, 2018年.

5. Takahashi Y, Yamashita K, Matsumoto N, Nozaki Y, Hirao T, Tajima G, Inokuma T, Yamano S, Takahashi K, Miyamoto T, Inoue K, Tasaki O. Effects of Trauma Center on Mortality at A Regional City in Japan: A Population based study. The 4th World Trauma Congress, 2018.

6. 田島 吾郎、徳永 彩子、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修. 組織損傷における全身性炎症の自然免疫受容体発現パターン. 第32回日本外傷学会, 2018年.

7. 田島 吾郎、徳永彩子、梅原敬弘、池松和哉、田崎 修. マウス広範囲熱傷モデルにおける急性期の自然免疫受容体発現変化. 第44回日本熱傷学会総会・学術集会, 2018年.

8. 井山 慶大、猪熊 孝実、池田 聡司、高橋 健介、山野 修平、田島 吾郎、平尾 朋仁、野崎 義宏、山下 和範、前村 浩二、田崎 修. 外傷後静脈血栓塞栓症の新規予防法に関する検討. 第45回日本救急医学会総会, 2017年.

9. 田島 吾郎、徳永 彩子、梅原 敬弘、池松 和哉、田崎 修. 全身性炎症における自然免疫受容体発現パターンによる早期病態判別法. 第45回日本救急医学会総会, 2017年.

10. Tajima G, Umehara T, Ikematsu K, Tasaki O. Early diagnosis using canonical discriminant analysis of innate immune receptor gene expression profile in infectious

or sterile systemic inflammation. 76th Annual Meeting of the American association for the surgery of trauma and clinical congress of acute care surgery, 2017 年.

11. Tajima G, Umehara T, Ikematsu K, Tasaki O. Infection Diagnosis Systemic Inflammation by Innate Immune Receptor Expression Pattern. 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the American association for the surgery of trauma and clinical congress of acute care surgery, 2016 年.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

・研究分担者氏名：田島 吾郎

ローマ字氏名：(TAJIMA, Goro)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院（医学系）

職名：助教

研究者番号（8桁）：00437427

・研究分担者氏名：朝野 和典

ローマ字氏名：(TOMONO, Kazunori)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40202204

・研究分担者氏名：嶋津 岳士

ローマ字氏名：(SHIMAZU, Takeshi)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：50196474

・研究分担者氏名：山野 修平

ローマ字氏名：(YAMANO, Shuhei)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院（医学系）

職名：助教

研究者番号（8桁）：6057538

・研究分担者氏名：小倉 裕司

ローマ字氏名：(OGURA, Hiroshi)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70301265

・研究分担者氏名：廣瀬 智也

ローマ字氏名：(HIROSE, Tomoya)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：招へい教員

研究者番号（8桁）：70597509

・研究分担者氏名：竹川 良介

ローマ字氏名：(TAKEGAWA, Ryosuke)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：30759577

・研究分担者氏名：松本 直也

ローマ字氏名：(MATSUMOTO, Naoya)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院(医学系)

職名：助教

研究者番号（8桁）：50359808

・研究分担者氏名：清水 健太郎

ローマ字氏名：(SHIMIZU, Kentaro)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：60379203

・研究分担者氏名：平尾 朋仁

ローマ字氏名：(HIRAO, Tomohito)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院(医学系)

職名：助教

研究者番号（8桁）：10404261

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。