

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07232

研究課題名(和文) 致死性血栓症における補体3型受容体の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation for the function of complement type 3 receptor in lethal thrombosis

研究代表者

水野 智博 (Mizuno, Tomohiro)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40711669

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)：本研究は、致死性血栓症における補体3型受容体(Mac-1)の機能解明を目的として実施した。野生型マウスに比して、Mac-1ノックアウトマウスでは、致死率、肺障害およびplatelet-leukocyte aggregates (PLAs)形成が軽度であった。加えて、Leukadherin-1(Mac-1アゴニスト)の前投与により、ヒストンによる肺障害が増悪した。同マウスにて、抗体投与により好中球および血小板を枯渇させたところ、生存期間延長、肺障害軽減が認められた。以上より、ヒストン誘発性肺障害には、Mac-1を介したPLAs形成が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19パンデミックにより、本邦においても急性肺障害(ARDS)による死亡例が増加している。新規治療薬の開発により、ARDS患者の予後は改善されてきているが、治療抵抗性を示し、死亡に至る症例も多い。COVID-19による肺障害に対し、細胞外ヒストンを含むNeutrophil Extracellular Traps (NETs)の関与が報告されており「NETsによる肺障害をどのようにコントロールするか」は、ARDS克服のための重要な臨床疑問であると言える。本研究成果は、ARDSの病態解明および治療薬開発の一助となることが期待され、その学術的意義、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the function of complement type 3 receptor (Mac-1) in lethal thrombosis. The mortality, lung injuries, and the production of platelet-leukocyte aggregates (PLAs) after injection of extracellular histones were milder in the Mac-1 knockout mice than those of wild type mice. In addition, the lung injuries were worsened by pre-injection of leukadherin-1 (Mac-1 agonist). The depletion of neutrophils and platelets improved survival time and lung injuries in wild type mice. Our results suggest that the production of PLAs promoted by Mac-1 is associated with histone-induced lung injury.

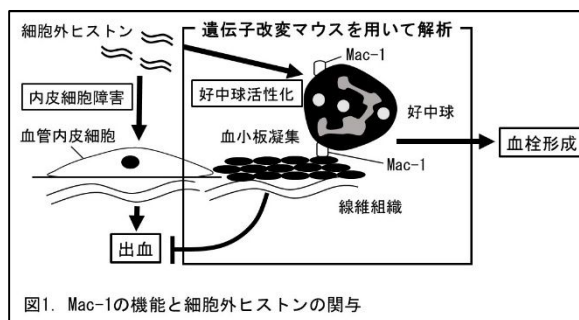
研究分野：医療系薬学

キーワード：補体3型受容体 致死性血栓症

1. 研究開始当初の背景

致死性血栓症は、敗血症等の重症感染症、悪性腫瘍等の難治性基礎疾患を背景に多く発症し、血小板凝集に代表される凝固系亢進と相対的な線溶系亢進の両者を伴う予後不良な疾患である。活性化好中球が放出する neutrophil extracellular traps の一構成成分であるヒストンは、凝固異常を惹起する。その結果誘発される致死性血栓症は、敗血症由来のものとは異なり、線溶系が有意である。従来の致死性血栓症に関する研究の大半は、敗血症由来の血栓症を対象としており、発症の際に凝固系が亢進しやすいことから、原疾患治療のための抗生物質の投与と凝固系抑制作用を持つ薬剤の投与が行われている。一方、線溶系が優位となるヒストン誘導性致死性血栓症に関しては、発症メカニズム解明や治療薬開発が遅れている。免疫システムの一部を成す補体系は、凝固系との間にクロストークを形成し、双方が活性化するため、補体を標的とした治療戦略は大いに有効と考えられる。

補体 3 型受容体 (Mac-1:CD11b/CD18) は、血小板凝集および組織への接着や白血球-血小板複合体の生成促進に関与することが知られている (Hirahashi J et al., *Circulation* 2009) (図 1)。



研究代表者は、白血球における Mac-1 発現

上昇をヒストン誘導性血栓症モデルマウスで確認しているが、出血と血栓形成の双方が関与する致死性血栓症の発症に、Mac-1 がどのように関与するのか、詳細は不明であった。Mac-1 はパターン認識受容体として細胞接着や細胞間相互作用に深く関与していることから、致死性血栓症においても、「Mac-1 が血小板凝集および組織への接着、白血球-血小板複合体の生成促進を介し、致死性血栓症の発症に関与しているのではないか」という仮説を立てた。

2. 研究の目的

「Mac-1 が白血球-血小板複合体の生成促進を介し、致死性血栓症の発症に関与するかどうか明らかにする」ことを目的として実施した。

3. 研究の方法

致死性血栓症における Mac-1 の関与を明らかにするため、C57BL6/J (野生型) マウスおよび同系統の Mac-1 欠損マウスへ細胞外ヒストンを投与し、致死性血栓症モデル動物の作製を行った。

Mac-1 欠損および野生型マウス用い、ヒストン投与 (45, 60 μg/g 体重) 後の生存期間、肺障害の程度、血小板-白血球複合体 (PLAs) 形成率を評価した。

Leukoladherin-1 (LA-1) を用い、Mac-1 を一時的に活性化させることで、上記遺伝子改変マウスと比較して、ヒストンによる反応性が異なるかどうかを検討した。すなわち、野生型マウスに LA-1 (LA-1 群) およびコントロールとして DMSO (コントロール群) を前投与し、その後ヒストンを投与することで致死性血栓症を惹起させた。生存期間、肺障害の程度、血小板-白血球複合体 (PLAs) 形成率を評価した。

好中球および血小板の病態への関与を検討するため、中和抗体前投与により、好中球、血小板を枯渇させ、その後、ヒストン投与を行った。評価項目は上記と同様に、生存期間、肺障害の程度、血小板-白血球複合体 (PLAs) 形成率を評価した。

Mac-1 以外の補体関連物質、特に細胞膜表面に発現する糖鎖機能を解析するため、膜補体制御因子である complement receptor type 1-related gene Y (Crry) の発現を定量した。

4. 研究成果

ヒストン投与 (45 μg/g 体重) を投与したところ、Mac-1 欠損マウスでは、野生型マウスに比して、ヒストン投与後の生存期間が延長し、肺障害も軽度であり、PLAs 形成率も低値を示した。上記結果を踏まえ、LA-1 を用い、Mac-1 を一時的に活性化させることで、上記遺伝子改変マウスと比較して、ヒストンによる反応性が異なるかどうかを検討したところ、LA-1 群およびコントロール群間でヒストン投与後の生存期間、肺障害に有意な差が認められなかった。一方、60 μg/g 体重にてヒストンを投与し、上記検討を行ったところ、野生型と比較して Mac-1 欠損マウスでは生存期間の延長が認められ、血小板減少、PLAs 形成率、肺障害が有意に軽減した。LA-1

群およびコントロール群を比較したところ、LA-1 群にて、肺障害が増悪傾向であった。以上の内容を踏まえ、Mac-1 が致死性血栓症の発症・進展に寄与していることを示唆する結果が得られた。

中和抗体前投与により、好中球、血小板を枯渇させ、その後、ヒストン投与を行ったところ、生存期間が延長し、肺障害が軽減した。

肺組織より単離した血管内皮細胞における Crry の発現を定量したところ、ヒストン投与量依存的に減少していた。また、Crry の発現低下は細胞障害に関連していた(図2)。

以上より、ヒストン誘発性肺障害には、Mac-1 を介した PLAs 形成が関与することが示唆された。加えて、肺障害の進展に伴い、膜補体制御因子である Crry の発現が低下するという新たな知見を得ることができた。COVID-19 パンデミックにより、本邦においても急性肺障害 (ARDS) による死亡例が増加している。新規治療薬の開発により ARDS 患者の予後は改善されてきているが、治療抵抗性を示し、死亡に至る症例も多い。COVID-19 による肺障害に対し、細胞外ヒストンを含む Neutrophil Extracellular Traps (NETs) の関与が報告されており (EA Middleton et al., *Blood*. 2020)、「NETs による肺障害をどのようにコントロールするか」は、ARDS 克服のための重要な臨床疑問であると言える。本研究成果は、ARDS の病態解明および治療薬開発の一助となることが期待され、その学術的意義、社会的意義は大きいと考えられる。

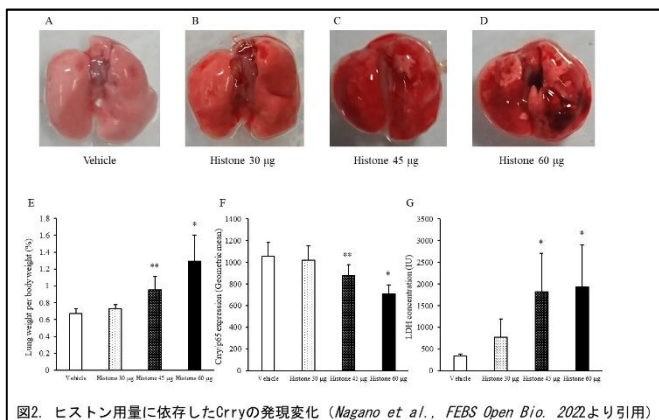


図2. ヒストン用量に依存したCrryの発現変化 (Nagano et al., *FEBS Open Bio*. 2022より引用)

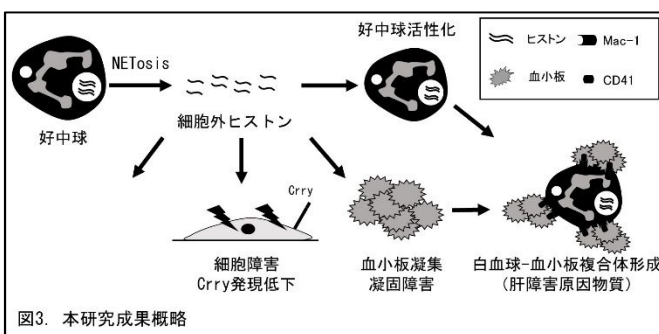


図3. 本研究成果概略

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nagano Fumihiko, Mizuno Tomohiro, Imai Masaki, Takahashi Kazuo, Tsuboi Naotake, Maruyama Shoichi, Mizuno Masashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Expression of a Crry/p65 is reduced in acute lung injury induced by extracellular histones	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 192 ~ 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13322	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水野智博、長野文彦、今井優樹、山田成樹、高橋和男、坪井直毅、丸山彰一、水野正司
2. 発表標題 ヒストン誘発性急性肺障害モデルにおけるCrryの役割
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長野文彦、水野智博、横江 優貴、唐澤 宗稔、丸山 彰一、坪井 直毅
2. 発表標題 播種性血管内凝固症候群における白血球接着因子Mac-1の関与
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長野文彦、水野智博、横江優貴、唐澤宗稔、竹内悠馬、永松 正、丸山彰一、坪井直毅
2. 発表標題 致死性血栓症における補体3型受容体の関与
3. 学会等名 第56回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野文彦、水野智博、今井優樹、山田成樹、高橋和男、坪井直毅、丸山彰一、水野正司
2. 発表標題 ヒストン誘発性内皮細胞障害が補体制御因子Crryに与える影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	丸山 彰一 (Maruyama Shoichi) (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	坪井 直毅 (Tsuboi Naotake) (50566958)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

	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	長野 文彦 (Fumihiko Nagano)	名古屋大学・医学系研究科・大学院生 (13901)	

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
---------	---------