

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18331

研究課題名（和文）トロンボモジュリンを用いた敗血症におけるDAMPs蛋白抑制と臓器障害軽減の解明

研究課題名（英文）Association of thrombomodulin with DAMPs suppression and improvement of organ damage in sepsis

研究代表者

赤塚 正幸（Akatsuka, Masayuki）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60808161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000円

研究成果の概要（和文）：ラット敗血症モデルでヒストンH3は経時的に上昇していることが示された。また、ヒストンH3濃度の上昇に伴い腎障害が生じることが病理組織学的所見から示された。次に、3種類のトロンボモジュリン（レクチン様ドメイン+EGF様ドメイン、レクチン様ドメイン、EGF様ドメイン）の投与はヒストン蛋白濃度の抑制と腎障害の軽減を認めた。さらに、トロンボモジュリンの投与群では非投与群よりも24時間生存率が延長するということが示された。結果として、敗血症におけるヒストン蛋白の血中濃度の上昇と腎障害との関連性、そしてトロンボモジュリンのヒストン蛋白抑制効果と腎障害軽減効果について示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症が原因で臓器障害に進展して敗血症となると死亡率が高くなり予後が不良となる。臓器障害を進展させる原因となっているヒストンH3と呼ばれる物質に着目して、この物質を抑える可能性を持つトロンボモジュリンを用いて今回の検証をおこなった。結果として、トロンボモジュリンはヒストンH3を抑制して腎障害を軽減させる関連が示唆された。敗血症の予後を改善させるためのあらたな創薬の可能性と患者の予後を改善させることで社会経済的にも大きな影響を及ぼすものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that Histone H3 increased with time in sepsis-induced rats. Histopathological findings showed that renal injury occurred with increasing histone H3 levels. Next, administration of three types of thrombomodulins (lectin-like domain + EGF-like domain, lectin-like domain, and EGF-like domain) suppressed histone H3 levels and improved renal injury. In addition, thrombomodulin treatment resulted in prolonged 24-hour survival compared to the non-treated group. The results suggest that elevated blood levels of histone H3 in sepsis are associated with renal injury, and that thrombomodulin suppresses histone proteins and reduces renal damage.

研究分野：敗血症、多臓器不全

キーワード：敗血症 ラット DAMPs リコンビナントトロンボモジュリン 腎障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染症が起因となり臓器障害を引き起こし、その死亡率は20-40%と高く、予後不良な疾患群である。社会復帰が困難となることも多く、敗血症の治療戦略を確立することが重要となる。近年、敗血症による多臓器不全の病態形成には、damage associated molecular patterns (DAMPs) 蛋白が関与しており、Toll 様受容体や receptor for advanced glycation end products (RAGE) を代表とするパターン認識受容体と結合することで炎症応答を惹起することが明らかになってきた(参考文献1)。DAMPs には様々なものが知られているが、high morbidity group box 1 (HMGB1)、ヌクレオホスミン、ヒストン蛋白などが血中に出現し、重症の敗血症へと進展する。これらの DAMPs 蛋白をいかに制御することができるかが敗血症による臓器障害の進展を防ぐ鍵となる。

2. 研究の目的

まず、敗血症での DAMPs 蛋白の血中濃度の推移と臓器障害(肺、腎臓、肝臓)との関連を実証する。そして次に、3種類のトロンボモジュリン(レクチン様ドメイン+EGF様ドメイン、レクチン様ドメインのみ、EGF様ドメインのみ)を用いて DAMPs 蛋白との中和作用と臓器障害の軽減効果について明らかにすることで、敗血症に対する抗炎症作用を有する薬物による治療戦略を確立することである。

3. 研究の方法

(1) ラット腹膜炎モデルの作製

Wistar ラットを用いて盲腸結紮、穿刺(cecal ligation and puncture: CLP)にて敗血症モデルを作製する。週数12週目のラットを全身麻酔下(酸素+イソフルラン)で開腹する。盲腸を結紮し虚血とするとともに盲腸大湾側に18G注射針を用いて1回穿刺し、穿孔性腹膜炎を作製する。CLP作製後に10%生理食塩水を体重100gあたり10ccを皮下に注射する。

(2) 24時間後の生存率

3種類のトロンボモジュリン(D1:レクチン様ドメインのみ、D2:EGF様ドメインのみ、D1+D2:レクチン様ドメイン+EGF様ドメイン)投与群、CLP群、Sham群、の5群に分けて24時間生存率を確認する。

(3) DAMPs蛋白の経時的な推移観察

CLP作製後、0、4、8、12、16、20、24時間後にイソフルランによる全身麻酔下で採血を行い、DAMPs蛋白の血中濃度を測定する。DAMPs蛋白の血中濃度が最も上がる時間を明らかにし、今後はその経過時間を研究に用いる。

(4) DAMPs蛋白と臓器障害の関連

CLP作製後に

トロンボモジュリン(D1)投与:rTM群

トロンボモジュリン(D2)投与:L-TM群

トロンボモジュリン(D1+D2)投与:fTM群

開腹のみ:Sham群

の4群に分け、(3)で求められた時間経過後に全身麻酔下で採血を行う。同時に肺、腎臓、肝臓を採取してホルマリンによる固定標本作製する。

(5) 臓器障害の評価

ホルマリンの固定標本から各臓器のヘマトキシリン・エオジン染色を行い顕微鏡で組織を観察する。肺、腎臓、肝臓それぞれの組織を観察してその中で組織障害が起きている割合を求めて臓器障害の程度を評価する。

(6) 血漿サイトカイン濃度の測定

DAMPs 蛋白と臓器障害の関連に加えて、IL-6、IL-10、TNF- α の血中濃度を採取した血液の血漿を用いて測定する。これにより、DAMPs 蛋白濃度上昇と血漿サイトカイン濃度変化との関連を明らかになり、トロンボモジュリンのサイトカイン抑制効果に関して調べることができる。

ラット CLP モデルにより敗血症における DAMPs 蛋白が臓器障害の進展と予後にどのような影響を与えるかについて明らかにする。そして、抗炎症作用があるトロンボモジュリンのどのドメインに DAMPs 蛋白が結合して中和作用を發揮し、臓器障害の進展を抑制する効果があるのかを解析する。

4. 研究成果

研究目的の一つである敗血症でのDAMPs蛋白の血中濃度の推移に関しては、ラット敗血症モデルでDAMPs蛋白の代表であるヒストン蛋白は経時的に上昇していることが示された。また、臓器傷害との関連ではヒストン蛋白濃度の上昇に伴い腎障害が生じることが病理組織学的所見から示された。

次に、3種類のトロンボモジュリン（レクチン様ドメイン + EGF様ドメイン、レクチン様ドメイン、EGF様ドメイン）の投与とヒストン蛋白濃度と腎障害に及ぼす影響を検討したところ、レクチン様ドメイン + EGF様ドメイン、レクチン様ドメイン、EGF様ドメインそれぞれのトロンボモジュリンの投与でヒストン蛋白濃度の抑制と腎障害の軽減を認めた。

一方、24時間生存率を検討するため3種類のトロンボモジュリン（レクチン様ドメイン + EGF様ドメイン、レクチン様ドメイン、EGF様ドメイン）の投与群と非投与群で比較検討を行った結果、トロンボモジュリンの投与群では非投与群よりも生存率が延長するということが示された。特に、トロンボモジュリンのうち、レクチン様ドメイン + EGF様ドメイン、レクチン様ドメインの投与が非投与群との比較において有意に生存率を改善したという結果となった。結果として、敗血症におけるヒストン蛋白の血中濃度の上昇と腎障害との関連性、そしてトロンボモジュリン（特にレクチン様ドメイン）のヒストン蛋白抑制効果と腎障害軽減効果について示唆された。

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 Masayuki Akatsuka, Yoshiki Masuda, Hiroomi Tatsumi, Michiaki Yamakage	4. 巻 15
2. 論文標題 Recombinant human soluble thrombomodulin is associated with attenuation of sepsis-induced renal impairment by inhibition of extracellular histone release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0228093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.6084/m9.figshare.9891797	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 1件）

1. 発表者名 赤塚正幸, 巽 博臣, 升田好樹
2. 発表標題 リコンビナントロンボモジュリンは ラット敗血症モデルにおける HMGB1蛋白制御と関連する
3. 学会等名 日本集中治療医学会第3回北海道支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤塚正幸, 巽 博臣, 升田好樹
2. 発表標題 リコンビナントロンボモジュリンはラット敗血症モデルにおけるDAMPs蛋白制御と関連する
3. 学会等名 第25回エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Akatsuka, Hiroomi Tatsumi, Shingo Yamada, Yoshiki Masuda
2. 発表標題 Recombinant thrombomodulin reduces histone H3 level in rats with sepsis
3. 学会等名 ESICM EUROASIA 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤塚正幸, 巽 博臣, 升田好樹
2. 発表標題 リコンビナントトロンボモジュリンはラット敗血症モデルにおけるヒストン蛋白抑制と腎保護作用と関連する
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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