

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06696

研究課題名（和文）補体第二経路に着目した微小血管傷害発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of thrombogenic microvascular injury focusing on complement alternative pathway

研究代表者

山田 成樹（Yamada, Shigeki）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：20719926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：志賀毒素投与により作製した溶血性尿毒症症候群モデル動物は、当初期待していた血管内皮障害は弱く、治療実験に適したモデルではないと判断し、ゲムシタピン投与によるモデル作製を試みたところ、一定の所見が認められた。ヒストン投与後の補体第3因子（C3）欠損、C4欠損、C5欠損、Factor D欠損、Properdin欠損マウスの組織解析を行ったところ、野生型と比較して、明らかな所見改善が認められず、補体第二経路の関与を示すことはできなかった。一方で、ヒストン投与により作製した血栓性微小血管症モデルマウスの肺障害に、補体3型受容体が関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血栓形成性微小血管傷害は、自己免疫疾患や薬剤により誘発される。補体系は免疫系の一つであり、感染防御のみならず、血栓形成にも関与する。志賀毒素投与により作製した溶血性尿毒症症候群モデル動物は、当初期待していた血管内皮障害は弱かったものの、ゲムシタピン投与によるモデル作製で一定の所見が認められた。ヒストン投与による血栓性微小血管症モデルマウスにて、補体第二経路の関与を示すことはできなかったが、ヒストン投与により作製した血栓性微小血管症モデルマウスの肺障害増悪に、補体3型受容体が好中球細胞外トラップ形成を介し、関与していることを明らかにした。今後、同領域を標的とした創薬が期待される成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：The animal model of hemolytic uremic syndrome induced by Shiga toxin administration was not found to be a suitable model for therapeutic experiments because vascular endothelial damage was weaker than initial expectation. Gemcitabine-induced thrombotic microangiopathy model partially showed clinical findings. Histological analysis of complement component 3 (C3)-deficient, C4-deficient, C5-deficient, factor D-deficient, and properdin-deficient mice did not show obvious improvement in findings compared to wild-type mice, thus we did not indicate the involvement of complement alternative pathway. However, the complement type 3 receptor associated with lung injury in histone-induced thrombotic microangiopathy.

研究分野：医療系薬学

キーワード：血栓形成性微小血管傷害 血小板減少 補体3型受容体

1. 研究開始当初の背景

『腎を主体とした血栓形成性微小血管傷害』

抗 GBM 型腎炎では、糸球体基底膜への IgG 型抗体沈着により、活性化白血球集積による炎症反応の結果、毛細血管内では血栓形成、管外では毛細血管壁破綻の結果、半月体と呼ばれる血管外炎症細胞集積像を呈する(半月体形成性糸球体腎炎、CGN)。一方、血栓性微小血管症(Thrombotic microangiopathy: TMA)は、細血管内血小板血栓、破壊性血小板減少症、細血管障害性溶血性貧血を3徴とし、腎、心血管、神経障害を主体とする劇症型内皮細胞障害の代表的疾患である。また、播種性血管内凝固症候群(DIC)においても腎は主要傷害臓器となり、細血管内で血栓形成が生じる。上記いずれの病態においても、数日から数週で高率に腎機能廃絶をきたし、致命的転機を示す。ゆえに腎微小血管傷害の発症メカニズムの解明は、腎保護を目的とする創薬のため重要である。

『補体および好中球の血栓形成における役割』

補体系は古典、第二、レクチン経路から構成され、細菌感染等から宿主を保護するが、異常な補体活性は炎症性臓器傷害を引き起こす。また補体-凝固系クロストークの存在も報告されている。申請者らは、予備実験として、細胞外ヒストン投与により惹起した DIC モデルマウスサンプルを用い、プロテオミクス解析を実施した。その結果、肝臓で補体第二経路に関与する Properdin、Prothrombin、Anti-thrombin および好中球顆粒タンパクが有意に増加していることを確認した。加えて、主に好中球に発現する補体3型受容体(Mac-1)欠損マウスでは、DIC 惹起後の死亡率改善がみられ、かつ好中球を抗 Ly6G 抗体により除去したマウスでも臓器障害の軽減が見られた。以上より、補体第二経路および好中球が DIC に伴う肝障害に関与することが示唆された。事実、TMA の原因疾患である非定型 HUS (aHUS) において、好中球遊走や活性化に関与する抗 C5 抗体療法が劇的な治療効果を示しており、補体を標的とした血栓形成制御は魅力的な創薬分野である。

2. 研究の目的

研究開始当初の目的は、「血栓形成に補体第二経路を介した補体-凝固クロストークおよび好中球の関与を明らかにする」ことであった。

3. 研究の方法

Stx 投与による HUS モデル動物の作製:

TMA を評価するため、7週齢 C57BL/6J 雄性マウスへ志賀毒素(Stx)を腹腔内投与することにより、溶血性尿毒症症候群(HUS)モデルマウスの作製を行った(図1)。先行研究を参照し(Suyama K et al., *Nephrol Dial Transplant.* 2015)、投与量を調整することにより、致死的血栓症を呈する重症群(sHUS)と尿量減少を呈さない中等症群(mHUS)を作製した。モデル作製後、血清クレアチニン、尿中アルブミン測定および病理組織を解析することで、その妥当性を評価した。

ヒストン投与による血栓性微小血管症モデルマウスの作製:

血栓性微小血管症を呈するヒストン投与モデルを作製し、血中の好中球細胞外トラップ(NETs)測定を行った。補体3型受容体(Mac-1)欠損マウス由来および野生型マウス骨髄より単離した好中球を用い、多血小板血漿下でヒストン刺激を行った。共同研究先より、ヒストン投与を実施した C3 欠損、C4 欠損、C5 欠損、Factor D 欠損、Properdin 欠損マウスの組織提供を受け、組織解析を実施した。

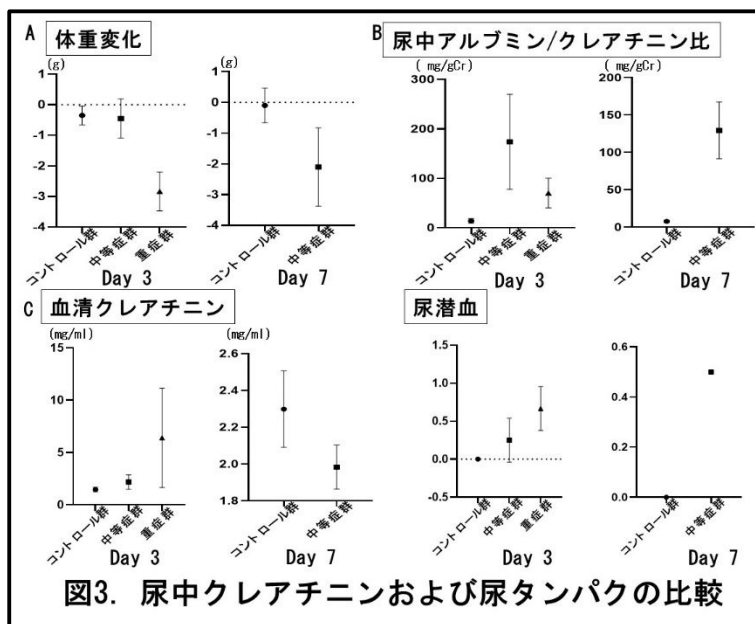
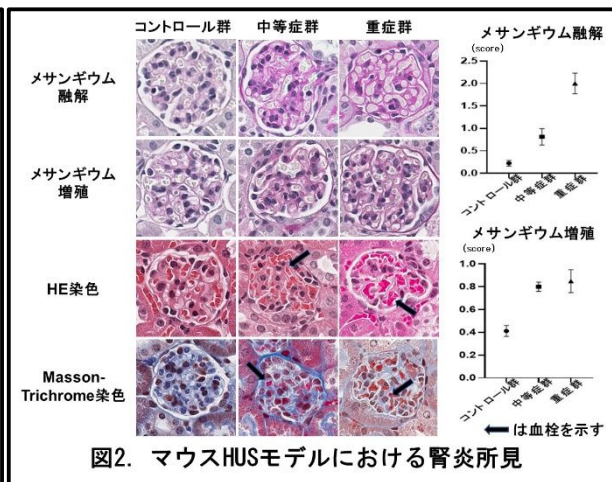
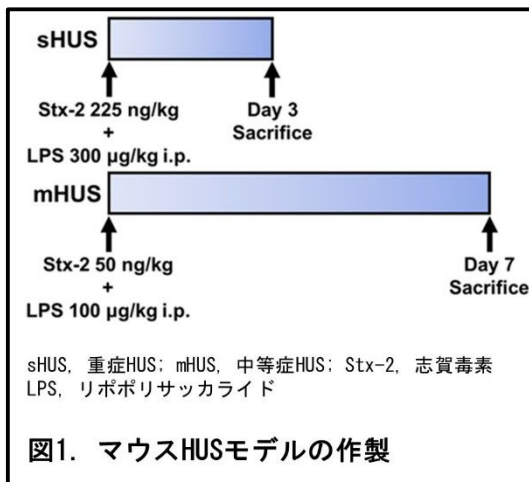
ゲムシタピン投与による血栓性微小血管症(TMA)モデルマウスの作製:

薬物投与による TMA モデル作製を行うため、敗血症関連研究を含む、関連文献を調査した。文献調査の一部について、メタ解析を実施した。藤田医科大学倫理委員会の承認を得て、ゲムシタピン投与を受けた膀胱がん患者の診療録調査を実施した。細胞外ヒストン投与により血小板減少が誘発されることから、ヒストン投与後にゲムシタピンを追加投与することで、新規血栓性微小血管症モデルの作製を試みた。

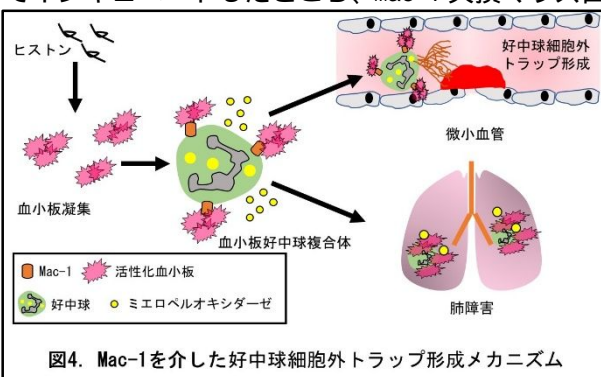
4. 研究成果

Stx 投与による HUS モデル作製:

sHUS では薬剤投与と3日目に、mHUS では7日目に非投与と比較して明らかな体重減少を呈した。ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソントリクローム染色後、組織解析を行ったところ、両モデル共に血栓形成を呈しており TMA の誘導ができていたことを確認した(図2)。尿タンパクの増加は mHUS で強くみられ(図3B)が血清クレアチニンの上昇は sHUS でのみであった。ただし、個体数を追加し、腎組織解析を再度実施したところ、当初期待していた血管内皮障害は弱く、治療実験に適したモデルではないと判断し、別の薬物投与による TMA モデルを検討した上で、実施することとなった。



ヒストンによる NETs 形成への Mac-1 の関与:
 血栓性微小血管症を呈するヒストン投与モデルを作製し、血中の好中球細胞外トラップ (NETs) 測定を行った。同モデルにて、NETs の一種であるミエロペルオキシダーゼの上昇が確認された。加えて、C57BL/6J 雄性マウス (野生型マウス) および補体 3 型受容体 (Mac-1) 欠損マウス由来の好中球を用い、ヒストンと多血小板血漿下でインキュベートしたところ、Mac-1 欠損マウス由来の好中球では、好中球細胞外トラップ形成が抑制された。また、DNase-1 を前投与したところ、ヒストン投与による致死率は軽減したものの、肺障害は軽減しなかった。加えて、DNase-1 を後投与した場合は、肺障害が増悪した。これらの成果は *FEBS OPEN Bio* 誌へ掲載された(参考文献 1)(図4)。以上の結果を踏まえ、NETs 形成阻害を実施するタイミングが治療効果に影響を与える可能性が示された。現在、藤田医科大学倫理委員会の承認を得て、NETs 形成阻害薬であるシベレスタットの投与を受け



た急性呼吸促迫症候群患者の診療録調査を実施している。

ヒストン単回投与後の C3 欠損, C4 欠損, C5 欠損, Factor D 欠損, Properdin 欠損マウスの腎組織解析を実施したが、顕著な所見は認められず、当初予定していた補体第二経路を標的とした治療実験は未実施となった。

ゲムシタビン投与による血小板減少:

関連文献を調査したところ、薬剤性 TMA が多数報告されているのはゲムシタビンであった。尚、並行して実施した敗血症関連研究のメタ解析結果は、*In vivo* 誌へ掲載された(参考文献 2)。藤田医科大学倫理委員会の承認を得て、ゲムシタビン投与を受けた膀胱がん患者の診療録調査を実施したところ、血小板数低値、ゲムシタビン高用量投与、ヘモグロビン低値が Common Terminology Criteria for Adverse Events Grade3 以上の血小板減少に関与していることを明らかにした。その成果は *Clinical Drug Investigation* 誌へ掲載された(参考文献 3)。また、ゲムシタビン投与後の血小板減少リスク因子として同定したヘモグロビン低値は、TMA の所見と一致する。既報の症例報告と併せて、ゲムシタビン投与による疾患モデル動物の作製は妥当である可能性が示された。ヒストン単独投与(45 µg/g 重)を day0,3,6 に行い、7 日目に解析を行ったところ、コントロール群と比較して、ヘモグロビン値の有意な低下 ($p=0.048$) および血小板数の低下傾向が認められた($p=0.071$)。同様の方法でゲムシタビンを単独投与(0, 20, 40, 80mg/kg)したところ、0mg/kg 群と比較して、80mg/kg 投与群では有意なヘモグロビン値低下 ($p<0.01$) および血小板減少が認められた ($p=0.035$)。細胞外ヒストン(45 µg/g 重)から 1 時間後にゲムシタビン(80mg/kg)を併用投与したところ、投与から 24 時間経過していたが、ヒストン単独投与群と比較してゲムシタビン併用群では、ヘモグロビン、ヘマトクリット値が有意に低下し、血小板数も低下傾向を示した ($p=0.052$)。以上の結果より、細胞外ヒストンを併用することにより臨床経過に類似した所見が増悪することが明らかになった。今後、乳酸脱水素酵素、ハプトグロビンの測定を追加し、モデル評価を実施する。

参考文献

1. Macrophage-1 antigen exacerbates histone-induced acute lung injury and promotes neutrophil extracellular trap formation.
Mizuno T, Nagano F, Takahashi K, Yamada S, Fruhashi K, Maruyama S, Tsuboi N.
FEBS Open Bio. 2024 Apr;14(4):574-583.
2. Efficacy of Ascorbic Acid, Thiamine, and Hydrocortisone Combination Therapy: Meta-analysis of Randomized Controlled Trials.
Kato T, Mizuno T, Nakanishi M, Lee JK, Yamada S, Tsuboi N, Takahashi K.
In Vivo. 2023 May-Jun;37(3):1236-1245.
3. Prediction Model for Severe Thrombocytopenia Induced by Gemcitabine Plus Cisplatin Combination Therapy in Patients with Urothelial Cancer.
Matsumoto N, Mizuno T, Ando Y, Kato K, Nakanishi M, Nakai T, Lee JK, Kameya Y, Nakamura W, Takahara K, Shiroki R, Yamada S.
Clin Drug Investig. 2024 May;44(5):357-366.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 KATO TAKAHIRO, MIZUNO TOMOHIRO, NAKANISHI MASANORI, LEE JEANNIE K., YAMADA SHIGEKI, TSUBOI NAOTAKE, TAKAHASHI KAZUO	4. 巻 37
2. 論文標題 Efficacy of Ascorbic Acid, Thiamine, and Hydrocortisone Combination Therapy: Meta-analysis of Randomized Controlled Trials	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1236 ~ 1245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.13200	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 該当する

1. 著者名 Mizuno Tomohiro, Nagano Fumihiko, Takahashi Kazuo, Yamada Shigeki, Fruhashi Kazuhiro, Maruyama Shoichi, Tsuboi Naotake	4. 巻 14
2. 論文標題 Macrophage 1 antigen exacerbates histone induced acute lung injury and promotes neutrophil extracellular trap formation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 574 ~ 583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13779	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 -

1. 著者名 Matsumoto Noriaki, Mizuno Tomohiro, Ando Yosuke, Kato Koki, Nakanishi Masanori, Nakai Tsuyoshi, Lee Jeannie K., Kameya Yoshitaka, Nakamura Wataru, Takahara Kiyoshi, Shiroki Ryoichi, Yamada Shigeki	4. 巻 44
2. 論文標題 Prediction Model for Severe Thrombocytopenia Induced by Gemcitabine Plus Cisplatin Combination Therapy in Patients with Urothelial Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Clinical Drug Investigation	6. 最初と最後の頁 357 ~ 366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40261-024-01361-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤貴大、水野智博、中西正範、山田成樹、高橋和男
2. 発表標題 敗血症患者におけるビタミンC、チアミン、ヒドロコルチゾンの3剤併用療法の有効性評価：無作為化比較試験を用いたメタ解析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2022
4. 発表年 2022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	水野 智博 (Mizuno Tomohiro) (40711669)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	
研究分担者	坪井 直毅 (Tsuboi Naotake) (50566958)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	高橋 和男 (Takahashi Kazuo) (90631391)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	中井 剛 (Nakai Tsuyoshi) (80753285)	藤田医科大学・医学部・講師 (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	伊藤 辰将 (Ito Yoshimasa)		
研究協力者	長野 文彦 (Nagano Fumihiko)		

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