

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：17701
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24659797
 研究課題名（和文） 敗血症の新規メディエーター“細胞外ヒストン”のダイナミズムの解析
 研究課題名（英文） A role of extracellular histones as mediators of death in sepsis
 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・特任講師
 研究者番号：20381171

研究成果の概要（和文）：(1) 血中ヒストン H3 濃度を測定する方法の開発に取り組み、10-1000 ng/mL のレンジで検出可能な ELISA 系を確立した。(2) この ELISA 系を用いて血中のヒストン H3 濃度を測定したところ、健康な人では測定した全例が 0 ng/mL だったのに対し、敗血症・DIC 患者では 0-1464 (中央値: 19.2) ng/mL と有意に高値を示した。また、生存例と比べ、死亡例では高値を示す傾向にあった。(3) マウスの尾静脈からヒストンを静注して病態解析を行ったところ、血栓塞栓症のほか、致死的不整脈を引き起こし、心停止に至ることが判明した。これらのことから、敗血症の際には、核内タンパク質ヒストンが細胞外に放出されて血中濃度が高まり、これによって血栓症や心筋傷害が誘発される可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We developed a sandwich ELISA to quantify serum or plasma histone H3 levels. The working range of this ELISA was 10-1000 µg/L. Histone H3 was not detectable in plasma of healthy volunteers, but significant levels were observed in patients with sepsis and DIC. These levels were higher in non-survivors compared to survivors. Extracellular histones triggered platelet aggregation, leading to thrombotic occlusion of pulmonary capillaries and subsequent right-sided heart failure in mice. These mice displayed signs of DIC, including thrombocytopenia, prolonged prothrombin time, decreased fibrinogen, fibrin deposition in capillaries, and bleeding symptoms. These findings indicate that histones are released into the extracellular space during sepsis and act as a trigger for fatal thrombotic disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学・

キーワード：集中治療医学・敗血症・DIC・炎症・血栓・DAMPs

1. 研究開始当初の背景

炎症・免疫反応を惹起する分子群として、微生物由来の PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) および壊死細胞由来の DAMPs (damage-associated molecular patterns) が注目を集めている。我々は平成 23 年度の科学研究費研究活動スタート支援プログラムにおいて、共同研究者の細川らと共に開発したリアルタイム血栓モニタリングシステムを用い、DAMPs の血栓形成能を横断的に評価した。その結果、凝固系を活性化する因子として HMGB1 (high mobility group box 1 protein) を、血小板系を活性化する因子としてヒストンを同定した。細胞外ヒストンは、敗血症の際の致死性因子として 2009 年に発表されたばかりの新規の壊死細胞由来分子であり、まだ歴史が浅いため、血中のヒストン濃度を測定するシステムが確立されていない。このため、これまでには細胞内のヒストン濃度を測定するための ELISA キットを利用したり、ウエスタンブロット法を応用したりして、血中のヒストン濃度を推定していた (*Hepatology*. 2011; 54:999-1008, *Blood*. 2011; 118:3708-14)。しかしながら、実験モデルの違いはあるものの、これらの方法により得られた血清/血漿ヒストン濃度の推定値にはおよそ 100 万倍の解離があり、血清/血漿ヒストン濃度の真の値は依然として不明なままである。

2. 研究の目的

(1) 特異的血中ヒストン濃度の測定系を確立し、(2) それを利用して、敗血症・DIC 腫瘍崩壊症候群などでの血中のヒストンのダイナミズムを解析し、(3) 致死性メディエーターとしての細胞外ヒストン像を検証する。

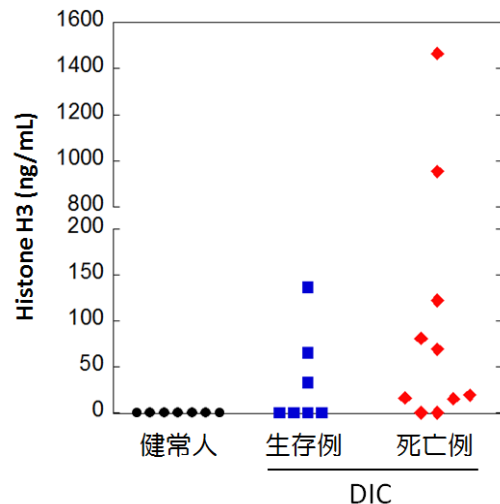
3. 研究の方法

まずウエスタンブロットによる血漿ヒス

トン濃度の測定法を確立させ、この過程において、血漿中のヒストンに対して親和性の高い抗体を選定する。次に、多数の臨床検体を簡便に測定できるように、汎用性の高い ELISA キットの開発に取り組む。その後、これらの測定法を利用して、敗血症・DIC 患者ならびに動物モデルでのヒストンの血中動態を解析し、ヒストンの血中濃度と疾患の重症度、治療効果、予後との関連性を明らかにする。

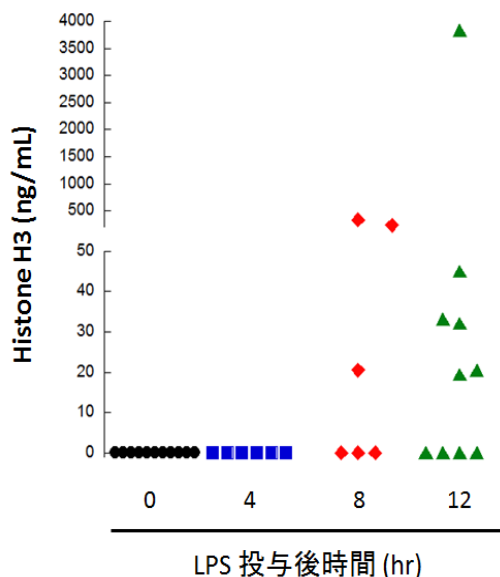
4. 研究成果

(1) まず、我々は血中ヒストン H3 濃度を測定する方法の開発に取り組み、10-1000 ng/mL のレンジで検出可能な ELISA 系を確立した。添加回収試験での回収率は 91-105% だった。(2) 次に、この ELISA 系を用いて健康人、敗血症・DIC 患者、健康なマウス、敗血症モデルマウスの血中のヒストン H3 濃度を測定したところ、健康人では、測定した全例が 0 ng/mL だったのに対し、敗血症・DIC 患者では 0-1464 (中央値: 19.2) ng/mL と有意に高値を示した (下図)。



また、敗血症・DIC 患者を生存例と死亡例に分けた場合、血中のヒストン H3 濃度は、死亡例で高い傾向がみられ、敗血症の際の致死性因子であるという過去の報告に矛盾しな

い結果であった。エンドトキシンを腹腔内に投与したマウスでは、投与4時間後までは血中ヒストン H3 濃度が全例で 0 ng/mL のままだったが、8 時間後には 0-336.1 (中央値: 10.3) ng/mL、12 時間後には 0-3834 (中央値: 20.0) ng/mL に上昇した (下図)。



盲腸結紮穿孔による腹膜炎マウスでも、12 時間後には 2.6-1000 (中央値: 18.8) ng/mL に上昇した。(3) 次に、血中ヒストン濃度の上昇によって引き起こされる病態を考察するために、マウスの尾静脈からヒストンを静注して病態解析を行ったところ、血小板を主体とした血栓が肺の毛細血管にび漫性に閉塞し、心室頻拍のショートラン、房室ブロックなどの致死的不整脈を引き起こし、心停止に至ることが判明した。これらのことから、敗血症・DIC の際には、核内タンパク質ヒストンが細胞外に放出されて血中濃度が高まり、これによって血栓症や心筋傷害が誘発される可能性が考えられた。

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 3 件)

(1) PAMPs/DAMPs による血栓形成と自然免疫
伊藤隆史 日本血栓止血学会誌 23 巻
 241-246 (2012) 査読無
 DOI: 10.2491/jjsth.23.241

(2) PAMPs/DAMPs

伊藤隆史 International Review of
 Thrombosis 8 巻 74-76 (2012) 査読無

(3) NETs (neutrophils extracellular traps)

伊藤隆史 Coagulation & Inflammation 6
 巻 15-16 (2012) 査読無

[学会発表] (計 4 件)

(1) 死細胞由来分子によって引き起こされる
 凝固異常とその制御
伊藤隆史
 第 40 回日本集中治療医学会学術集会
 長野県 2013/2/28-3/2

(2) Extracellular histones are eliciting
 factors for DIC

Takashi Ito

58th Scientific and Standardization
 Committee Meeting of the ISTH 2012
 イギリス・リバプール 2012/6/27-30

(3) The Prothrombotic Roles of PAMPs and
 DAMPs

伊藤隆史

第 34 回日本血栓止血学会学術集会
 東京都 2012/6/7-9

(4) PAMPs/DAMPs から紐解く「敗血症の病態
 生理」と「トロンボモジュリンのポテン
 シヤル」

第 34 回日本血栓止血学会学術集会
 東京都 2012/6/7-9

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
 特任講師

研究者番号: 20381171

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

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

中原 真由美 (NAKAHARA MAYUMI)
鹿児島大学医学部・歯学部附属病院
助教
研究者番号 : 90707514

(4) 研究協力者

山田 晋吾 (YAMADA SHINGO)
株式会社シノテスト

永里 朋香 (NAGASATO TOMOKA)
藤森工業株式会社