

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462831

研究課題名(和文)細胞死関連核内タンパク質に焦点を当てたプロテオーム解析による敗血症の病態分析

研究課題名(英文)Proteomic analysis for the cell-death related proteins makes it possible to address the pathophysiology of sepsis

研究代表者

射場 敏明(Iba, Toshiaki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40193635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症では種々の細胞死が誘導され、逸脱した障害関連分子パターン(DAMPs)が、さらに炎症反応を活性化することが知られている。そこでまずDAMPsの挙動を臨床例で測定した。その結果、histoneやnucleosome, HMGB1の血中レベルは死亡例では高値であり、重症度評価に有用であることが明らかになった。続いてDAMPsの傷害性を検討したところ、histone H3およびH4に強い傷害性がみられることが明らかになった。さらにhistone傷害を緩和する物質について検討をおこなった。その結果、アルブミンや活性化プロテインC、ペントラキシン3には抗ヒストン効果がみられることが確認された。

研究成果の概要(英文)：It is known that various types of cell-death is induced in sepsis. Damage-associated molecular patterns from the dead cell is known to activate further inflammation. In the first study, we measured circulating levels of DAMPs in the sepsis patient. The result shows that the levels of histones, nucleosome and HMGB-1 increases significantly in non-survivors. Thus, we think these DAMPs are useful as bio-markers for severity of sepsis. In the second study, we examined the toxicity of DAMPs to the vascular endothelial cells. The results showed that histone H3 and H4 showed the strong toxicity. In the third study, we examined the protective effects of physiological serum proteins. As a result, significant protective effects of either albumin, activated protein C or pentraxin 3 to the histone H3 were revealed.

研究分野：救急医学

キーワード：proteome sepsis cell-death DAMPs histone nucleosome protein C pentraxin 3

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症では病原体自体、あるいは産生された毒素により、また宿主の炎症反応によって、様々な細胞死が誘導される。このうちネクローシス(necrosis)は炎症を増強する細胞死であり、アポトーシスは炎症を活性化しない、もしくは沈静化する細胞死であると考えられている。たとえば好中球を高濃度の lipopolysaccharide (LPS)で刺激すると短時間の間にネクローシスによる細胞死をきたす。Time-lapse による観察を行なうと、細胞形態は風船が膨らむように膨大する現象がみられるが、これは細胞膜の破断にともなう容積の増大を反映している。この際、本来は分葉状である核も球状に膨大し、クロマチンが処理されない状態で遺残していることが確認できる。これに対し、比較的少量の LPS で好中球を刺激すると、はじめに核の処理が行なわれて消失し、続いて細胞質が小胞状に分裂するアポトーシスで死亡する様子が観察される。この細胞死は 24 時間程度かかるプログラムされた能動的な細胞死であり、ネクローシスが 5 時間程度で見られる、受動的な細胞死であることとは対照的である。ネクローシスは炎症を増幅する核が細胞死完了の時点で処理されていない点が最大の特徴であり、これによって核内から炎症を増幅させる damage-associated molecular patterns (DAMPs) が逸脱して炎症反応を増幅させることになる。DAMPs は Toll-like receptor をはじめとする特異的受容体、pattern recognizing receptors (PRRs)との結合を介して炎症反応の活性化をきたす。実際の感染症ではネクローシスとアポトーシスはどちらかだけがみられるわけではなく、両者は混在して存在し、刺激が強いほどネクローシスの割合が増えることになる。またこれらの細胞死スタイルはそれぞれ独立したものではなく、アポトーシスは途中からネクローシスに移行することもあり、また一つの細胞でア

ポトーシスとネクローシスが混在する状況もしばしば観察される。ネクローシスは障害が高度である際にみられる、回避不能な死であり、その際に細胞外に逸脱する核内物質は炎症や免疫反応において重要な働きをしていると考えられ、それらの変動を解析することによって病態解析や重症度評価に役立てることが可能ではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

敗血症はいったん重症化すると極めて治療が困難になるために、発症時点から重症度を正しくモニタリングすることが重要である。現在敗血症の重症度評価に用いられているバイオマーカーには、CRP やプロカルシトニン、プレセプシンやインターロイキン 6 などがあるが、これらの有用性については未だ議論のあるところである。すなわち、どれをとっても信頼にたるマーカーといえるものは存在しない状況である。その理由として考えられるのは、これらはいずれも侵襲に対する宿主の生体反応を反映するものであり、侵襲の程度や障害程度を直接的に評価するものではないことが考えられる。そこで今回、敗血症症例から得られた血液サンプルにおいて経時的に変化する血中タンパク質をプロテオーム解析によって網羅的に測定し、重症度マーカーとしての有用性や病態解析に利用できる可能性のあるタンパク質を探索することを目的とした。

重症病態で変動するタンパク質は、マーカーとして有用であるだけでなく、それ自身が病態形成にかかわっている可能性が考えられる。よってそのようなタンパク質の病態形成における意義を検討するため、第二段階では *in vitro*、あるいは *in vivo* モデルにおいてターゲットとしたタンパク質の傷害性を検討した。さらに今回の研究では、このような機序で生じる障害を緩和する治療の検討まで行なうことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 臨床例における検討

ICU に入室して集中治療を要した重症敗血症 30 症例において、敗血症発症当日 (Day 0), Day1, Day3, Day7 に採血を行ない、得られた血清サンプルをもちいてプロテオーム解析を行なった。まず、アルブミン・グロブリン除去処理を行なった後に酵素分解 (in-gel digestion) を行い、その後に二次元電気泳動を実施して炎症早期、ピーク期、抑制期の各時相で発現が増強、もしくは減弱するタンパク質のプロテオームマッピングを行ない、臨床的評価との関連を検討した。以上の手技により発現タンパク質の経時的な増減からバイオマーカーとしての有用性が期待できるタンパク質についてスポットプロットング後にハイスループット法によって質量分析を実施し、同定を行なった。

#### 2) 培養細胞における検討

予備実験として培養血管内皮細胞をヒストンで刺激し、細胞障害性の検討を行った。その結果、ヒストン傷害により内皮細胞ではアポトーシスやオートファジーが誘導され、高濃度ではネクローシスもみられることが確認された。

そこでこの培養系においてヒストン傷害を緩和する各種の血漿タンパク質の有用性を検討した。培養液中にアルブミン、活性化プロテイン C、ペントラキシン 3 を加え、その後にヒストン H3 を投与して、各種タンパク質の障害緩和効果を検討した。

さらに薬剤として未分画ヘパリン、低分子量ヘパリン、アルガトロバンの治療効果を上記と同様の方法で検討した。

#### 3) 敗血症モデルにおける抗ヒストン治療の効果

ラットにヒストンを投与して作成した敗血症モデルに未分画ヘパリン、低分子量ヘパリン、アルガトロバンを投与し、臓器障害指標および生存率を検討した。

### 4. 研究成果

敗血症症例における血清中のタンパク質発現をプロテオミクスによって解析すると、挙動が 2 倍以上のものだけに限っても、ゆうに 50 種類以上のタンパク質量が増加していることが明らかになった。そして質量分析によってそれぞれのタンパク質の同定を行なうと、変化率が特に大きいタンパク質は以下の 4 つのカテゴリーに分類可能であった。1) 急性相タンパク質：CRP やトランスサイレチンなどのタンパク質合成が誘導されものと推測された。2) 凝固系タンパク質：凝固機能の亢進は自然免疫系において重要な役割を担っていると考えられており、実際にプロトロンビンや von Willebrand factor などの血中レベルが増加していることが確認された。3) 補体系タンパク質群。補体は病原体処理において必須のタンパク質であり、その増加は合目的な反応と考えられた。そして第 4 のタンパク質群として、これまで炎症時の挙動があまり確認されていなかったヒストンをはじめとする核内タンパク質の血中レベルが増加することが確認された。

具体的には、敗血症症例において発症から経時的に DAMPs を測定すると、病態の変化にリンクして変動することが明らかとなった。図 1 は平均 SAPS スコアが 40 以上の敗血症症例 30 名における DAMPs の変動を示したものであるが、従来からバイオマーカーとして測定されている IL-6 やプロカルシトニンなどの生体反応を反映するマーカー類は重症病態が持続しているにもかかわらず、1-3 日以内にみられるピークを過ぎると、その後は低下するという挙動を示した。これに対して、ヒストンやヌクレオソーム、HMGB1 などの死細胞から逸脱する DAMPs は上昇が持続的であり、重症度の改善がみられなければ一週間程度は高値のまま推移する。しかも生存例と死亡例の間で推移を比較すると、SAPS 高値が持

続する死亡例では DAMPs も高値が持続し、このような推移から重症例の鑑別に従来のマーカーより有用であることが期待された。

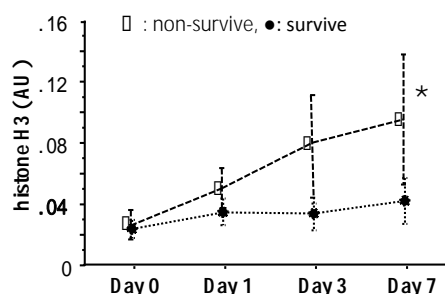


図 1 重症敗血症における血中ヒストンレベルの変動

プロテオームでスクリーニングされたヒストンは、本来核内で DNA を効率よく収納するために機能している核タンパク質であり、H1, H2A, H2B, H3, H4 の 5 種類が亜型として存在する。そして、このうち H3, H4 には特に強力な傷害性がみられることが知られている。たとえばマウスにヒストンを投与すると、用量依存性に死亡率が増加する。そして剖検では、肺を中心に出血や血栓形成、そして浮腫性変化などの敗血症でみられる組織障害と同様の所見が観察される。このようにヒストンは細胞外に逸脱すると、強力な組織障害作用を発揮するため、生体はこれに拮抗するための手段を備えている。代表的なものはアルブミンや活性化プロテイン C などの血漿中に存在する生理的なタンパク質であり、最近注目されているものにペントラキシン 3 がある。ペントラキシンファミリーに属する CRP は、炎症の際の急性相タンパクとしても知られており、CRP の機能としてヒストン障害緩和作用がみられることは興味深い。これまでに生理的な抗凝固物質である活性化プロテイン C によるヒストン障害緩和効果を有することを報告しているが、しかし敗血症においては活性化プロテイン C 量が著しく減少することが知られており、その効果は限られたもの

になると想定される。今回、これらのタンパク質を培養液中に加えて、それぞれのヒストン傷害緩和効果を確認することができ、治療への応用が期待された。

一方、生理的物質以外の治療薬としては、ヘパリンやヘパリン類にヒストンの障害緩和作用がみられることが確認された。

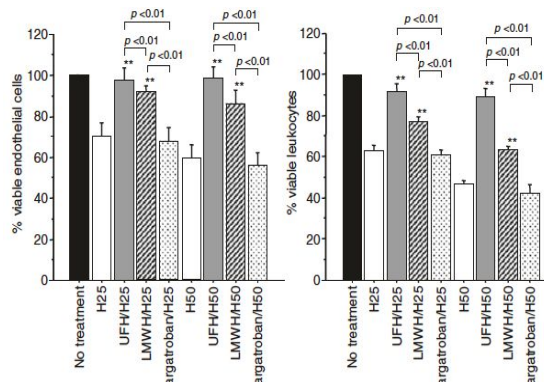


図 2 ヘパリンによる細胞死抑制効果の比較

このような効果はヒストンを投与して作成した動物モデルにおいても確認することが可能であった。すなわち、臓器障害の程度や死亡率については、未分画ヘパリンや低分子ヘパリン投与によって改善がみられ、同様の効果はアルガトロバンでは確認できなかったことから、これらの効果は抗凝固効果によるものではなく、抗ヘパリン効果によるものであることが推測された。

そしてそのメカニズムとしては、ヒストンは DNA と結合するために強い陽性荷電を帯びているが、ヘパリンはその構造に陰性荷電した硫酸基を多数含んでいるため、ヒストンと結合することにより、これを凝集して傷害性を緩和しているものと考えられた。

以上の結果より、敗血症においては細胞死によって逸脱する、ヒストンをはじめとする DAMPs 類が病態形成に深く関与していることが明らかとなった。そして血中を循環するヒストンは内皮細胞傷害を介して臓器微小循環障害を誘発し、重症化に寄与している。またヒストンによる傷害を緩和す

るために血漿タンパク質が機能するものの、重症化とともにその機能は低下するため、積極的な治療介入が必要になると考えられた。

#### 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 5 件)

1. Iba T, Miki T, Hashiguchi N, Tabe Y, Nagaoka I. Combination of antithrombin and recombinant thrombomodulin modulates neutrophil cell-death and decreases circulating DAMPs levels in endotoxemic rats. *Thromb Res* 2014; 134(1):169-173. (査読あり)
2. Iba T, Nagakari K. The effect of plasma-derived activated protein C on leukocyte cell-death and vascular endothelial damage. *Thromb Res* 2015;135(5):963-9. (査読あり)
3. Iba T, Ito T, Maruyama I, et al. Potential diagnostic markers for disseminated intravascular coagulation of sepsis. *Blood Reviews* 2015 doi: 10.1016/j.blre.2015.10.002. (査読あり)
4. Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, et al. Heparins attenuated histone-mediated cytotoxicity in vitro and improved the survival in a rat model of histone-induced organ dysfunction. *Intensive Care Med* 2015;3(1):36. (査読あり)
5. Iba T, Hamakubo T, Nagaoka I, et al. Physiological Levels of Pentraxin 3 and Albumin Attenuate Vascular Endothelial Cell Damage Induced by Histone H3 In Vitro. *Microcirculation*. 2016 Apr;23(3):240-7. doi: 10.1111/micc.12269.) (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Iba T. Circulating damage-associated molecular patterns (SAMPs) play major roles in the development of coagulation disorder in infectious diseases. 第 80 回日本循環器学会学術総会. 2016 年 3 月 19 日. 宮城県仙台市
2. Iba T. Neutralizers of histone and DAMPs in DIC. 62<sup>nd</sup>. International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2016 年 5 月 25 日. モンペリエ, フランス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

射場 敏明 (IBA, Toshiaki)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 40193635

##### (2) 研究分担者

林 宣宏 (HAYASHI, Nobuhiro)  
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授  
研究者番号: 80267955

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: