

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670789

研究課題名(和文) 致死的血栓症の病態解明：細胞外ヒストン - 異常高分子VWFマルチマー仮説の検証

研究課題名(英文) Extracellular histones stimulate endothelial cells to release unusually-large von Willebrand factor multimer: mechanistic insight into the pathogenesis of lethal coagulopathy

研究代表者

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：20381171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、「細胞外ヒストンが血管内皮細胞を傷害することによって、異常高分子von Willebrand因子(UL-VWF)の放出を誘導し、血栓性微小血管障害(TMA)様の病態を引き起こす」という仮説を検証した。培養血管内皮細胞をヒストンで刺激すると、ヒストンの濃度依存性にVWFが放出された。また、ラットにヒストンを持続投与して血清ヒストン濃度を高めると、糸球体において、血管内皮細胞上のVWFが減少し、血管内腔にVWFを含んだ血栓が形成された。また、VWFマルチマー解析ではUL-VWFの増加を認めた。遺伝子組換え型トロンボモジュリン製剤を投与すると、ヒストンによる血栓形成が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Extracellular histones stimulated endothelial cells to release von Willebrand factor (VWF). This resulted in massive thrombosis in glomeruli of histone-injected rats. Recombinant thrombomodulin bound to histones and inhibited histone-induced VWF-rich thrombus formation in rats. These findings suggest a novel role of extracellular histones in the pathogenesis of lethal coagulopathy, including thrombotic microangiopathy (TMA) and disseminated intravascular coagulation (DIC).

研究分野：血栓症

キーワード：敗血症 血栓症 ヒストン 血管内皮細胞 von Willebrand因子 トロンボモジュリン

1. 研究開始当初の背景

ヒストンは DNA を折りたたんで核内に収納するのに必須のタンパク質だが、敗血症の際には、好中球によって細胞外トラップ (NETs) の形で放出され、血栓症を引き起こす。細胞外ヒストンの作用を中和すると、敗血症モデル動物を救命できることから (*Nat Med.* 2009;15:1318-21)、細胞外ヒストンは敗血症の際の致死性メディエーターとして注目を集めている。

我々は平成 24 年度の挑戦的萌芽研究で、細胞外ヒストンの測定系の開発に取り組み、臨床検体中のヒストン濃度を測定したところ、健常人では測定した 15 例全例で血漿ヒストン値がゼロ ng/mL なのに対し、敗血症患者では数千 ng/mL にまで上昇することを見出した。また、マウス・ラットにおいて、血中のヒストン濃度が上昇すると、循環血小板数が減少し、プロトロンビン時間が延長し、フィブリノゲン値が低下し、出血症状をきたすようになり、DIC に似た病態に陥ることを見出した (*PLoS One.* 2013;8(9):e75961)。その一方で、細胞外ヒストンが引き起こす病態は、血小板血栓が主体であり、DIC よりもむしろ血栓性微小血管障害症 (TMA) の病態に近い、という観察結果も得た。この仮説を支持する所見として、細胞外ヒストンは培養血管内皮細胞を傷害して von Willebrand 因子 (VWF) の放出を誘導すること、マウスにおいて VWF 切断酵素 (ADAMTS13) 活性を低下させ、VWF に富む血栓の形成を誘発することなどを予備検討で確認した。

2. 研究の目的

本申請課題では、「細胞外ヒストンは血管内皮細胞を傷害することによって異常高分子 VWF マルチマー (UL-VWF) の放出を誘導し、ADAMTS13 活性の低下と相俟って、TMA を引き起こす」という仮説を検討すべ

く、(1) ヒストン持続静注動物モデルにおいて、経時的に血漿を採取して、VWF マルチマー解析を行うとともに、病理組織学的解析を行い、(2) 培養血管内皮細胞をヒストンで刺激した際の、VWF の放出ならびに内皮細胞表面の接着因子や凝固関連因子の発現を検討し、(3) 敗血症患者の血漿ヒストン濃度を測定し、UL-VWF や ADAMTS13 活性との相関を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒストン持続静注動物モデル

SD ラットの尾静脈より 4 時間かけてヒストンを持続投与し、投与前、投与 1 時間後、2 時間後、3 時間後、4 時間後の血液を採取し、ヒストン濃度、VWF マルチマー解析、血球数、凝固検査、生化学検査を行い、ヒストンの血中濃度が高まった際の病態の変化を解析する。また、投与 4 時間後の採血の後、肺、腎臓、肝臓、脾臓を採取し、病理学的解析を行う。

(2) ヒストンが血管内皮細胞に及ぼす影響

培養血管内皮細胞をヒストンで刺激し、培養上清中に放出された VWF 濃度を測定する。また、ヒストン持続静注ラットの腎臓をはじめとした各臓器の血管内皮細胞の変化を病理学的に解析する。

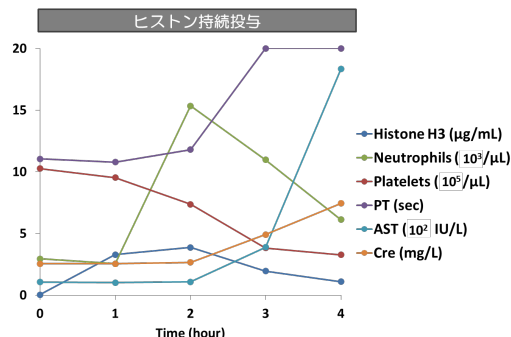
(3) 敗血症患者および敗血症モデル動物の血漿ならびに血清ヒストン濃度を測定し、UL-VWF や ADAMTS13 活性との相関を検討する。

4. 研究成果

SD ラットの尾静脈より 4 時間かけてヒストンを持続投与したところ、ヒストンの血中濃度は投与 1 時間後には約 3 μ g/mL にまで上昇し、3 時間目以降には減少に転じた (図 1)。血小板数は経時的に減少し、肝障害の指標としての AST、腎障害の指標としてのクレアチニン、凝固障害の指標としてのプロトロンビ

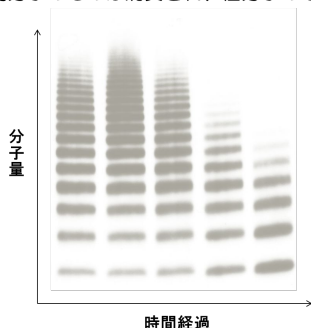
ン時間は 3 時間目以降に上昇した (図 1) 。
また、3 時間目以降は溶血の所見も認められた。

図 1 ヒストンの血中濃度は 1 時間でピーク付近まで上昇するが、それによる障害が出現するのは 2-3 時間以降である



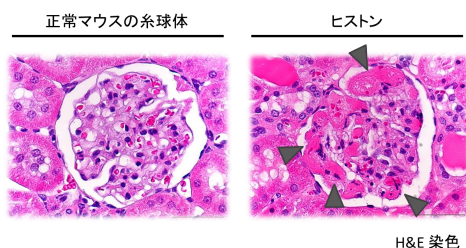
次に、血漿 VWF マルチマー解析を行ったところ、1 時間よりも早い時点から高分子量の VWF (UL-VWF) の増加を認め、その後、高分子量 VWF は消費され、低分子量 VWF の蓄積を認めた (図 2) 。他のマーカーと比較し、UL-VWF の増加は早期のイベントであり、病態の上流に位置していると考えられた。

図 2 ヒストン投与開始後早期に高分子量 VWF が増加し、その後、高分子のものは消費され、低分子のものが蓄積する

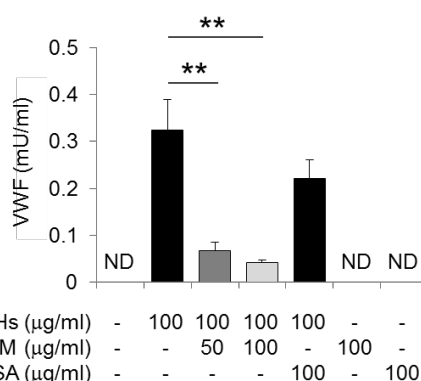


次に、ヒストン投与 4 時間の採血後、各臓器をサンプリングして、病理組織学的解析を行ったところ、肺では血管周囲の出血像を認め、腎臓では糸球体の毛細血管内に血栓の閉塞を認めた (図 3) 。

図 3 ヒストンが血中に入ると血栓ができ、腎臓の糸球体に血栓を認める



次に、培養血管内皮細胞をヒストンで刺激したところ、ヒストン (Hs) の濃度依存性に VWF の放出を認めた。また、我々は、トロンボモジュリン製剤 (rTM) がヒストンと結合してヒストンの作用を抑制することを報告しているが (*PLoS One*. 2013;8(9):e75961)、rTM はヒストンによる血管内皮細胞からの VWF の放出も有意に抑制した。ヒストン投与 4 時間後のラットにおいても、血管内皮細胞から VWF が放出されていることを示唆する所見が認められ、生体内においても同様の事象が生じていると考えられた。



次に、盲腸結紮穿孔刺 (CLP) マウスの血清ヒストン濃度を測定したところ、CLP 施行 12 時間後には血清ヒストン濃度の上昇を認め、24 時間後にはほぼ頭打ちとなった (mean = 35 ng/mL) 。血清中のヒストンの由来については、好中球由来のものと壊死細胞由来のものが想定されているが、本実験結果では、好中球由来のものがメインであることが示唆された。マウスの白血球分画では、リンパ球が大多数を占めているだが、少数派の好中球がヒストンの放出については大きく関与していると考えられた。

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 3 件)

PAMPs and DAMPs as triggers for DIC.

Ito T.

J Intensive Care. 2014;2(1):67.

doi: 10.1186/s40560-014-0065-0. 査読有

Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment.

Kawano H, Ito T, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I, Hisatomi T, Nakamura M, Sakamoto T.

Lab Invest. 2014;94:569-85.

doi: 10.1038/labinvest.2014.46. 査読有

Hyaluronan protection of corneal endothelial cells against extracellular histones after phacoemulsification.

Kawano H, Sakamoto T, Ito T, Miyata K, Hashiguchi T, Maruyama I.

J Cataract Refract Surg. 2014;40:1885-93.

doi: 10.1016/j.jcrs.2014.07.026. 査読有

[学会発表](計3件)

敗血症性 DIC におけるヒストンの net effect

伊藤隆史

第 42 回日本集中治療医学会学術集会
2015/02/10 東京

Extracellular histones and HMGB1 in sepsis-associated coagulopathy

Ito T

HMGB1 workshop in Stockholm 2014/10/01
スウェーデン

DIC/TMA の新規メディエーター：ヒストン

伊藤隆史

第 36 回日本血栓止血学会学術集会(血栓止血学会・救急医学会ジョイントシンポジウム) 2014/05/30 大阪

[図書](計1件)

ファーマナビゲーター-DIC 編

伊藤隆史

メディカルレビュー社

分担執筆 Chapter 5 トピックス

PAMPs/DAMPs (148-157) 2014 年

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

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
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

松本 雅則 (Matsumoto, Masanori)

奈良県立医科大学
教授

研究者番号: 60316081

早川 正樹 (Hayakawa Masaki)

奈良県立医科大学
助教

研究者番号: 30516729

中原 真由美 (NAKAHARA MAYUMI)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
特任助教

研究者番号: 90707514

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

(4) 研究協力者

永里 朋香 (NAGASATO TOMOKA)

藤森工業株式会社

山田 晋吾 (YAMADA SHINGO)

株式会社シノテスト