

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861235

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流障害における細胞外ヒストンの修飾を介した麻酔薬の臓器保護作用の検討

研究課題名(英文) evaluation of organ protective effects of anesthetic agents using extra-cellular histone modification in liver ischemia-reperfusion injury

研究代表者

中原 真由美 (Nakahara, Mayumi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：90707514

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)：肝臓切除術や臓器移植、血管手術などで生じる虚血再灌流障害は周術期の重篤な臓器不全や組織障害の原因となる。ヒストンは敗血症や外傷、虚血再灌流障害で細胞外に放出され、主要なメディエーターとして働くと報告されている。本研究では、肝臓切除術とマウスの下肢虚血モデルにおけるヒストンの関わりを検討した。ヒストンは肝臓虚血再灌流後に上昇し、虚血時間と関連して上昇する傾向を示した。また、ヒストンが虚血細胞から放出されるのか好中球由来かCLPマウスにて調べた。ヒストンは壊死細胞よりむしろ好中球由来と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Ischemia-reperfusion injury occurs during a surgical procedure, such as liver resection, organ transplantation, and cardiovascular surgery. Moreover, it leads to severe tissue dysfunction and organ failure. Recent studies have shown that histones are released into the extracellular space during sepsis, trauma, and ischemia-reperfusion injury, and act as major mediators of the death of an organism. We investigated the correlation between extracellular histones and ischemia-reperfusion injury during liver resection and lower limb ischemia mouse model. This study showed the trends of the circulating histone H3 levels increase after ischemia-reperfusion and were related to ischemia time. We examined whether circulating histones are released from necrotic cells or neutrophils with cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis. We also found that circulating histone H3 levels in septic conditions are mainly derived from neutrophils rather than damaged cells.

研究分野：麻酔科学、集中治療医学

キーワード：虚血再灌流障害 ヒストン

1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流障害は虚血性心疾患、脳血管障害、多臓器不全などさまざまな疾患に関与している。周術期においても血管手術や臓器移植後や肝臓・消化管の手術において虚血・再灌流による炎症反応や細胞死などにより重篤な臓器不全や組織障害を引き起こすことがある。(Journal of Pathology 2000 190: 255-266) 肝切除術では出血を制御するため、肝十二指腸間膜一括遮断術(Pringle 法)を用いるが、術後に肝機能障害や多臓器不全を惹起する危険性がある。(Br J Surg. 2012; 99: 1209-1210)。また、麻酔薬は吸入麻酔薬、静脈麻酔薬ともに薬理的プレコンディショニング効果があり、心筋などの臓器を保護することが数多く報告されている (Anesthesiology 1997; 87: 361-370, Circulation 1999; 1003: 340-344)。2011年に日本で発売されたデスフルランについても、虚血再灌流障害におけるプレコンディショニング効果が認められている(PLoS ONE 2012; 7(8): e42032, Anesthesiology 2004; 101(6), 1313-1324.)。近年、核内成分であるヒストンが、細胞膜に結合し直接細胞を傷害する作用やTLR2やTLR4を介して細胞を傷害する作用が報告されており、敗血症や虚血再灌流障害において、主要なメディエーターとして働くことが注目されている(Nat Med. 2009; 15: 1318-21, Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 160-169)。また虚血再灌流障害によって生じた細胞外ヒストンが、TNF- α やIL-6などの炎症性サイトカインの産生を促進し、虚血再灌流後にヒストンの構成成分であるH3やH4の抗体を投与すると、炎症性サイトカインの産生が抑制されることが報告されている (Hepatology. 2011;54:999-1008)我々は、血管内皮細胞をヒストンで刺激することにより、内皮細胞傷害を生じ、LDHやVWFの放出が増加することを細胞実験により見いだしている。ヒストンは虚血再灌流後の炎症や細胞障害に深く関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

ヒストンは炎症性サイトカインの放出を促進し、肝臓の虚血再灌流障害においてDAMPs(damage-associated molecular patterns)として働くと報告されている(Hepatology. 2011;54:999-1008)。また、同じ核内タンパク質であるHMGB-1(high mobility group box-1)も壊死細胞から細胞外に放出され、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL1、IL-8など)や細胞接着分子(ICAM-1、VCAM-1など)の発現を惹起させ、炎症反応を促進すると報告されている (Thromb Haemost 2005 ; 94 : 975-979)。吸入麻酔薬や静脈麻酔薬には虚血プレコンディショニング効果があるといわれている。また、

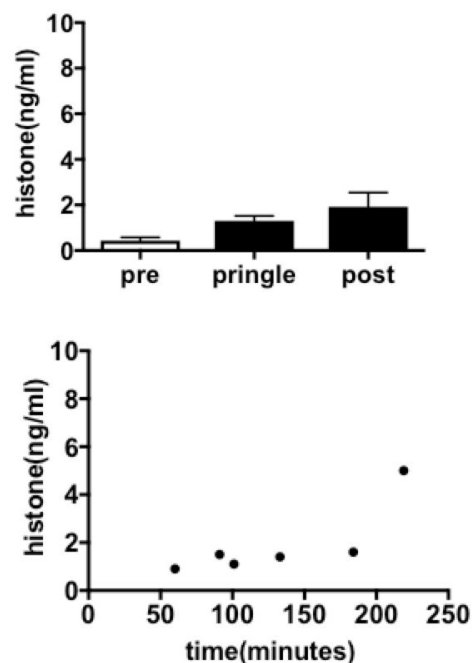
アゴニストであるデクスメトミジンには脳、脊髄保護効果や、虚血再灌流障害抑制効果が報告され、注目されている。しかし麻酔薬の細胞外ヒストンの作用への影響については報告がない。肝切除術において、ヒストンの臨床的意義を検討し、麻酔薬による保護効果を解析することを目的とした。細胞外ヒストンの由来は、血小板と結合して活性化した好中球が放出する網状の構造物(neutrophil extracellular traps: NETs)から遊離してくるものと、臓器障害等による壊死細胞から放出されるものが考えられている。ヒストンの由来について敗血症モデルとして盲腸結紮穿刺(CLP)マウスを用い、細胞外ヒストンの由来についても検討を行った。

3. 研究の方法

まず、臨床研究にて、肝臓切除術を施行された症例の肝臓虚血前後で血中ヒストン値を測定し、ヒストンの値と虚血再灌流障害の関連について検討を行った。また、ラットの肝臓虚血再灌流モデル、マウスの下肢虚血再灌流障害においても血中ヒストン値と虚血再灌流障害の関連について検討を行った。ヒストンの由来について敗血症モデルである盲腸結紮穿刺(CLP)マウスを用い、白血球や好中球を減少させたモデルを作成し、血中のヒストン値やLDHの値を測定し検討した。

4. 研究成果

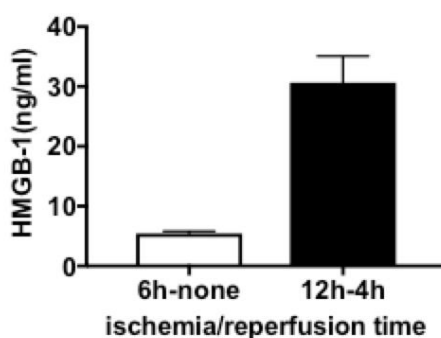
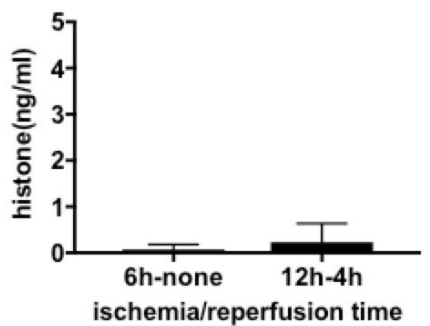
(1) 肝臓切除術を施行した症例にて、麻酔導入後(虚血前)、Pringle法施行直後(虚血後再灌流直前)、虚血再灌流後の血中ヒストン値を測定した。また虚血時間とヒストン値の関連について検討した。



肝臓切除術においてヒストンは虚血再灌流後に上昇し、ヒストン値は虚血時間と関連して上昇する傾向を認めた。

(2) ラットの肝臓虚血再灌流モデルにおいて血中ヒストン値と障害の程度について検討を行った。肝臓虚血45分間、1時間再灌流、4時間再灌流にて測定を行った。血液中H3値は、虚血前：0ng/ml、1時間再灌流：1.3ng/ml、4時間再灌流：76.6ng/mlと上昇した。しかし、ラットの人工呼吸器の設定や虚血時間の設定に難渋し、虚血再灌流障害モデルを確立することができなかった。そこで、マウスの下肢虚血再灌流モデルでの検討を行なった。

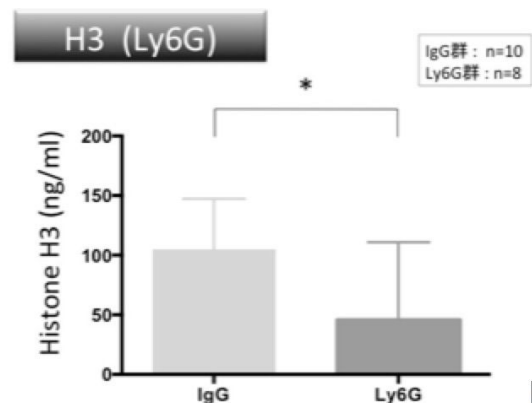
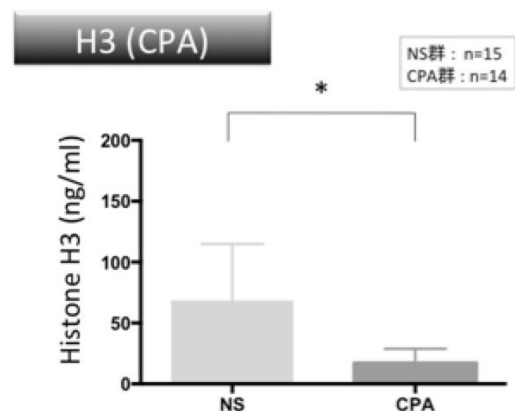
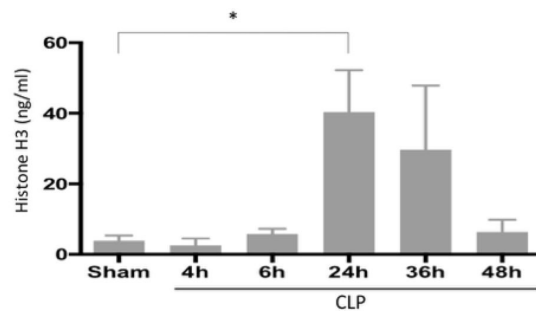
(3) C57BL6 マウスを用い、両側大腿部にゴム輪結紮し、駆血する下肢虚血再灌流モデルにおいてヒストン値とHMGB-1(high mobility group box-1)値について検討を行った。駆血時間12時間、再灌流時間4時間のマウスと駆血時間6時間、再灌流を施行していないマウスを比較した。

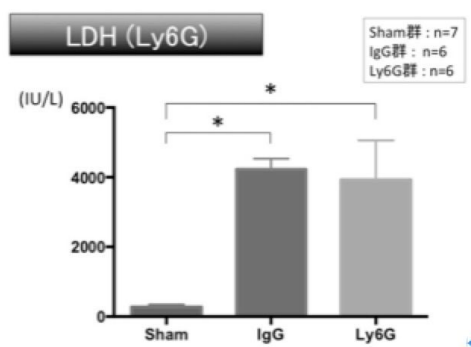
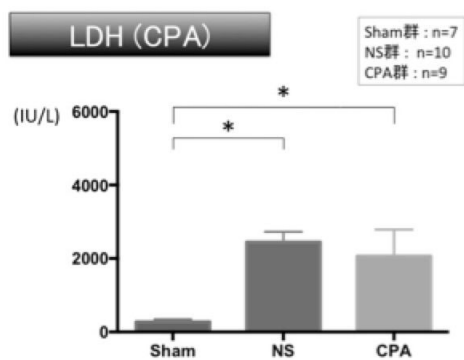


HMGB-1の値は再灌流4時間群にて有意に上昇したが、ヒストンは有意差を認めなかった。虚血時間、再灌流時間に検討が必要と考えられるが、虚血再灌流障害に関してHMGB-1がより関連している可能性が考えられた。

(4) ヒストンの由来を調べるために敗血症モデルとして盲腸結紮穿孔(CLP)マウスを用い、細胞外ヒストンの由来について検討を行った。CLPの手技は麻酔下に腹部正中切開を

行い、盲腸を取り出して、根部を結紮し、21G針で盲腸を全層穿刺する方法を用いた。Sham群では盲腸の結紮穿孔以外はCLP群と同様の手技を行った。白血球を減少させるためにシクロフォスファミド(以下CPA)を投与し、コントロールとして生理食塩水を等量投与した。好中球を減少させるために抗好中球抗体であるLy6Gを投与し、コントロールとしてコントロールIgGを投与した。CLP施行3日前と1日前に各薬剤を投与し、CLPを施行し、24時間後に採血を行い、ヒストンと死細胞の指標としてLDHを測定した。





今回の検討において、敗血症モデルであるCLP マウスにおいて Sham 群と比較して血中H3が上昇していた。白血球を1割以下に減少させたCPA群、好中球を1割以下に減少させたLy6G群において、CLP施行後のH3値は低値であった。LDH値に有意差は認めなかったことより、壊死の程度に差はなかったと考えられる。今回の検討により、敗血症においては主に好中球に由来していることが示唆された。以上の結果より、肝臓や下肢の虚血再灌流障害においてヒストンは上昇傾向であった。今回は症例数が限られており、虚血時間、再灌流時間、臓器障害への影響などの検討が必要であると考えられた。また、敗血症モデルにおけるヒストンの由来について検討したところ、壊死細胞から放出されるものよりもむしろ好中球に由来していることが示唆された。

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2件)

(1)Yasuda, T., Yamaguchi, K., Futatsuki, T., Furubeppu, H., Nakahara, M., Eguchi, T., et al. (2016). Non-invasive Monitoring of Hepatic Oxygenation Using Time-Resolved Spectroscopy. In C. E. Elwell, T. S. Leung, & D. K. Harrison (Eds.), Oxygen Transport

to Tissue XXXVII (Vol. 876, pp. 407–412). New York, NY: Springer New York. (査読有)

(2)Kakihana, Y., Ito, T., Nakahara, M., Yamaguchi, K., & Yasuda, T. (2016). Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. Journal of Intensive Care, 1–10.(査読有)

[学会発表](計2件)

(1)中原真由美、伊藤隆史、安田智嗣、垣花泰之、丸山征郎、上村裕一：敗血症において細胞外ヒストンは主に好中球に由来する、第63回日本麻酔科学会(2016/5/26-28)福岡国際会議場 マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

(2)Y Tomotsugu, Y Kakihana, K Yamaguchi, M Nakahara, T Futatsuki, J Taniguchi, K Nakamura, N Okayama “Time-resolved spectroscopy using non-invasive monitoring may detect hepatic ischemia” 27th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine, Shock, 27 September - 1 October 2014 Barcelona(Spain)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中原真由美(NAKAHARA, Mayumi)

鹿児島大学 医歯学域医学系 助教

研究者番号：90707514

(2)研究協力者

垣花泰之(KAKIHANA, Yasuyuki)

鹿児島大学 医歯学域医学系 教授

研究者番号：20264426

(3)研究協力者

安田智嗣(YASUDA, Tomotsugu)

鹿児島大学 医歯学域附属病院 講師

研究者番号：80437954

(4)研究協力者

伊藤 隆史(ITOU, Takashi)

鹿児島大学 医歯学総合研究科 講師

研究者番号：20381171