

論文要約

京都大学大学院医学研究科 医学専攻 法医学

川合 千裕

論文題目

Circulating extracellular histones are clinically relevant mediators of multiple organ injury

(血中細胞外ヒストンは臨床的意義のある多臓器障害メディエーターである)

要約

【背景】細胞が障害された時に放出され、自然免疫による炎症を惹起する自己由来の分子を damage-associated molecular patterns (DAMPs) と呼ぶ¹⁾。核内タンパク質であるヒストンは DAMPs の 1 つで、敗血症や重症外傷時の急性肺障害などの誘発因子として近年注目されており^{2), 3)}、血中に放出されると多臓器障害をきたす可能性もある。しかし、これまでの研究では個々の臓器での障害機序の解明が主体であった。そこで、本研究ではヒストンによる多臓器間の障害の出現時期、程度の比較、病態進展機序についてマウスを用いて検討した。また、抗ヒストン作用が期待される物質^{4), 5)}の臨床応用への可能性もマウスにより検証した。

【方法】精製ヒストンを C57BL/6 マウスに静脈投与し、肺、肝、腎障害の薬剤用量反応性および経時の変化を検討した。薬剤用量反応性の検討では個体の生存率や、各臓器の病理学的変化と障害マーカーの変化を検索した。経時的变化の検討では上記検査に加えて、免疫組織化学的検査、超微細構造学的検査、内皮障害関連マーカーである soluble thrombomodulin (sTM) や別の DAMPs であり主要な核内タンパク質でもある high-mobility group protein box 1 (HMGB1)⁶⁾の血中濃度、そして各種遺伝子の発現量について検討した。また、抗ヒストン作用をもつことが知られるヘパリン、アルブミンや抗 HMGB1 抗体を投与し、その多臓器障害抑制の効果を検証した。さらに全身障害のマウスモデルとして zymosan 静脈投与、lipopolysaccharide (LPS) 腹腔投与モデル、虚血再灌流モデルマウスを使用し、その血中ヒストン量を反映するヌクレオソーム濃度や遺伝子発現量を測定した。

【結果】LPS 投与モデルおよび虚血再灌流モデルマウスではともに血中のヌクレオソーム濃度が sham 群に比べそれぞれ 5 倍から 40 倍に増加した。ヒストンに対する用量反応性変化では、投与量に依存して生存率および肺、肝、腎障害のいずれもが増悪した。肺ではエバンスブルーを用いた検査で高度な肺水腫の形成が示され、特に 100 mg/kg のヒストン投与では全てのマウスが 1 時間以内に死亡し高度な肺水腫を伴っていた。病理学的検査により、肺は少量 (25 mg/kg) のヒストン投与で肺胞壁内への好中球浸潤が出現し始め、腎臓では 50 mg/kg の投与から高度な尿細管壊死や好中球浸潤が認められた。

一方、肝臓では 75 mg/kg 投与で肝細胞壊死が出現した。血清学的検査においてもヒストンは用量依存性を示し、腎障害を示す creatinine や blood urea nitrogen (BUN) の濃度は 50 mg/kg のヒストン投与から有意に上昇し、肝障害を示す aspartate transaminase (AST) や alanine transaminase (ALT) の値は 25、50、75 mg/kg と投与量に依存して増加する傾向にあった。経時的变化では、組織障害が肺、肝ではヒストン投与直後 (15 分) から出現し、組織学的、血清学的、機能的に肺で 1 時間、肝で 4 時間、腎で 16 時間後に障害のピークがみられた。さらに血清中の sTM 濃度はヒストン投与 15 分で 4 倍に上昇していたが、このヒストン投与 15 分後の時点での免疫染色により肺や肝では内皮細胞表面にヒストンが接着しており、電子顕微鏡によりその内皮細胞は壊死を起していることが確認された。また内皮障害を示す Vegfr2 の mRNA の発現量は両臓器で 3 倍から 5 倍に増加した。そこで、電荷によりヒストンと結合するとされるヘパリンおよびアルブミンを投与したところ、ヘパリンはヒストンの内皮細胞への接着を阻害することで内皮細胞障害を抑制し、生存率と各臓器障害は有意に改善した。しかし、アルブミン投与ではヒストンの内皮細胞接着の阻害が起らず、肝障害が増悪し生存率は変わらなかった。また、経時的な免疫組織化学検査および ELISA 検査により、各臓器の HMGB1 はヒストン投与直後から各細胞の核から消失し、血中に放出されていることが確認された。そこで、この HMGB1 に対する中和抗体を投与したところ、血清の ALT、creatinine 濃度がヒストン投与 4 時間後では変化が認められなかったが 16 時間後で減少した。さらに、DAMPs の代表的なレセプターである toll-like receptor (TLR) 2/4 の遺伝子発現量について、TLR2 のアゴニストである zymosan 投与モデルと比較したところ、ヒストン投与は肝や腎を障害するとともに TLR2 の mRNA 発現量を後期に上昇させていた。

【考察】本研究では、ヒストンによる 2 つの障害機序が明らかとなった。1) 感染、外傷などで血中に放出される細胞外ヒストンは早期に内皮細胞障害を介して多臓器障害を惹起する。2) 細胞外ヒストンで障害された組織から二次的に放出された他の DAMPs (HMGB1) がさらなる臓器障害を引き起こし、多臓器障害の増悪機序の一端となる。さらに、ヘパリンはヒストンの内皮接着を阻害して早期の臓器障害を抑制すること、また抗 HMGB1 抗体は二次的に放出された HMGB1 による炎症反応を阻害することで多臓器障害後期の悪循環を抑制しうることが明らかとなった。

ヒストンは強い塩基性タンパク質であり⁷⁾、電荷により内皮細胞と接着し膜構造を破壊させ細胞死を誘導するとされる^{2), 8)}。今回、早期に組織障害がみられた肺や肝は内皮へのヒストンの接着や内皮細胞障害がみられた。一方で、腎臓では組織障害が遅れて現れ、早期のヒストンの内皮細胞への接着は認められなかった。このことから、各臓器の内皮構造や性状の違いが、ヒストンに対する反応性の違いを引き起こしていると考えられる。また、強い負電荷をもつヘパリンがヒストンの内皮細胞接着を抑制し、臓器障害が緩和したことも、このヒストンによる内皮細胞障害を介した早期の多臓器障害機序を示唆している。

細胞外ヒストンには細胞に対する直接障害の他に、血小板凝集⁹⁾やTLR2/4を介した障害機序¹⁰⁾が報告されている。今回それらの機序がどの程度ヒストンによる臓器障害に寄与しているかまでは明らかにすることはできなかった。しかしながら、TLRに関しては肝や腎でTLR2のmRNAの発現量が上昇していたことから、その臓器障害への関与は示唆された。

本研究はヒストンに対する多臓器の障害を比較し、臓器ごとの脆弱性の違いや時期による障害機序の違いを明らかにした初めての報告である。DAMPsに対する各臓器の脆弱性や障害発生時期が異なることを考慮することは、ヒトの多臓器障害においても、その正確な病態理解、診断、新たな治療法の確立に繋がると期待される。

参考文献一覧

1. Kono H, Rock KL: How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008, 8:279–289.
2. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT: Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009, 15:1318–1321.
3. Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, Wang SS, Brohi K, Kipar A, Yu W, Wang G, Toh CH: Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2013, 187:160–169.
4. Wildhagen KC, Garcia de Frutos P, Reutelingsperger CP, Schrijver R, Areste C, Ortega-Gomez A, Deckers NM, Hemker HC, Soehnlein O, Nicolaes GA: Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood* 2014, 123:1098–1101.
5. Lam FW, Cruz MA, Leung HC, Parikh KS, Smith CW, Rumbaut RE: Histone induced platelet aggregation is inhibited by normal albumin. *Thromb Res* 2013, 132:69–76.
6. Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ: HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:1768–1773.
7. Von Holt C, Strickland WN, Brandt WF, Strickland MS: More histone structures. *FEBS Letters* 1979, 100:201–218.
8. Freeman CG, Parish CR, Knox KJ, Blackmore JL, Lobov SA, King DW, Senden TJ, Stephens RW: The accumulation of circulating histones on heparan sulphate in the capillary glycocalyx of the lungs. *Biomaterials* 2013, 34:5670–5676.
9. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M: Coagulopathy of Acute Sepsis. *Semin Thromb Hemost* 2015, 41:650–658.
10. Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, Mulay SR, Hagele H, Lichtnekert J, Hagemann JH, Rupanagudi KV, Ryu M, Schwarzenberger C, Hohenstein B, Hugo C, Uhl B, Reichel CA, Krombach F, Monestier M, Liapis H, Moreth K, Schaefer L, Anders HJ: Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol* 2012, 23:1375–1388.