

## Recombinant human soluble thrombomodulin is associated with attenuation of sepsis-induced renal impairment by inhibition of extracellular histone release

PLoS One. 2020 Jan 23; 15(1): e0228093. doi: 10.1371/journal.pone.0228093

Akatsuka M, Masuda Y, Tatsumi H, Yamakage M

**要旨** 感染症によって重篤な臓器障害が引き起こされて敗血症に至る過程で DAMPs (damage - associated molecular patterns) の関与が注目されている。今回、ヒストン H3 に着目し、ラット腹膜炎敗血症モデルを用いてリコンビナントトロンボモジュリン (rhTM) とその抗炎症作用をもつ D1 がヒストン H3 濃度と腎障害に与える影響を検討した。rhTM と D1 の投与は、ヒストン H3 濃度上昇と血清クレアチニン値上昇を抑制し腎の組織障害が軽減し、生存率改善との関連が示唆された。これらの結果は臨床応用を見据えた場合、rhTM の D1 領域が細胞外ヒストン H3 蛋白を制御し、敗血症での治療戦略の一つとなる可能性が示唆された。

### 【緒言】

敗血症では生体に侵襲が加わると自然免疫細胞が活性化し、好中球やマクロファージから damage - associated molecular patterns (DAMPs) が放出され、内皮や上皮の組織損傷を引き起こし、これがさらに DAMPs を放出させることで臓器障害へと進展することが明らかとなってきた。こうした DAMPs による負のサイクルが敗血症の重症化に寄与する。近年、DAMPs のなかでも細胞外ヒストンが敗血症の予後と関与するメディエータとして注目されている<sup>1)</sup>。

トロンボモジュリン(TM)は、内皮細胞表面に発現するトロンビン結合性抗凝固補因子であり、血管内凝固の制御に重要な役割を担っている<sup>2)</sup>。TM を構成するドメインの中で、レクチン様ドメイン(D1)が抗炎症作用を呈し、炎症性サイトカインの産生を抑制することや、DAMP の一つである high-mobility group box-1 (HMGB1) に結合することが示されてきた<sup>3), 4)</sup>。

しかし、TM や D1 の投与により細胞外のヒストン H3 レベルが抑制され、臓器障害が改善されるかどうかに関しては不明であり、まだ明らかにされていない。今回、敗血症の病態形成と関連する因子の一つであるヒストン蛋白と腎障害に着目し、リコンビナントトロンボモジュリン (rhTM) とその D1 ドメイン (D1) がヒストン蛋白 (ヒストン H3) 濃度と腎障害に及ぼす影響を検討することを目的とした。

### 【方法】

雄性 Wistar ラット (250-300 g) を用いて盲腸結紮穿孔 (CLP) 腹膜炎モデルを作製した。1. ヒストン H3 濃度の推移の検討: CLP 作製 24 時間後まで 4 時間ごとに測定した (各群 n = 5)。2. rhTM によるヒストン H3 濃度変化: CLP 作製後に濃度の異なる rhTM を以下に群分けし投与した; sham 群, vehicle 群, low dose 群 (1 mg/kg), middle dose 群 (3 mg/kg), high dose 群 (6 mg/kg) (各群 n = 5)。3. 2. で得られた至適投与量を用いて CLP 作製後に rhTM と

D1 を投与し、ヒストン H3 濃度変化と血清クレアチニン値の測定、さらに腎組織学的評価 (HE 染色, PAS 染色, 抗ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色) を行なった (各群 n = 6)。4. sham 群, vehicle 群, rhTM 群, D1 群の 24 時間生存率 (Kaplan-Meier 法) について比較検討した (各群 n = 10)。

### 【結果】

#### 1. ヒストン H3 濃度の経時的変化

ヒストン H3 濃度は CLP 作製 16 時間後には有意に上昇した (未掲載データ)。この結果から、以後の採血時期は CLP 作製 16 時間後とした。

#### 2. rhTM の投与量とヒストン H3 濃度との関連

Vehicle 群と比較して、low dose 群 (1 mg/kg) では、ヒストン H3 濃度は低下したが、有意な低下は認められなかった。一方、middle dose 群と high dose 群では、vehicle 群と比較して、ヒストン H3 濃度は有意な低下がみられ、middle dose 群で特に強い低下が認められた (未掲載データ)。この結果から、至適投与量は middle dose 群の 6mg/kg と設定した。

#### 3・1. ヒストン H3 濃度の変化

Vehicle 群では、ヒストン H3 濃度の上昇が認められたが、rhTM 投与群, D1 投与群では、ヒストン H3 濃度の上昇はそれぞれ有意に抑制された (未掲載データ)。

#### 3・2. 血清クレアチニン値の変化

Vehicle 群では、血清クレアチニン値の上昇が認められたが、rhTM 投与群, D1 投与群では、血清クレアチニン値の濃度はそれぞれ有意に減少した (未掲載データ)。

#### 3・3・1. 腎組織学的評価 (HE 染色)

HE 染色によって腎の組織学的変化を観察したところ、vehicle 群では広範囲に腎組織の変性が及んでい

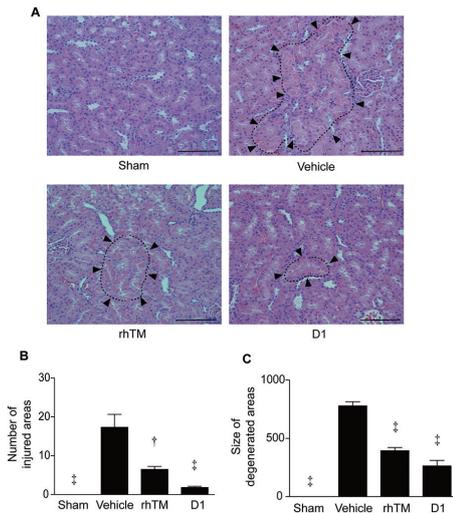


図1 腎組織学的評価 (HE 染色)

- (A) ラット腎臓の組織学的所見  
CLP 作製 16 時間後に腎臓組織を採取し、HE 染色をおこなった。矢印は変性部位を示す。
- (B) 腎臓変性部位の定量化 (損傷部位の数)
- (C) 腎臓変性部位の定量化 (変性領域の大きさ)
- †  $P \leq 0.01$  vs. vehicle.  
‡  $P \leq 0.001$  vs. vehicle. Scale bar : 200  $\mu$ m

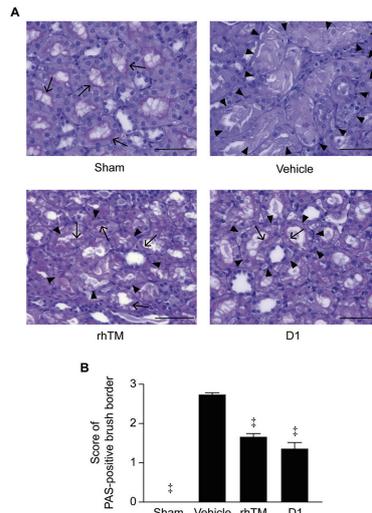


図2 腎組織学的評価 (PAS 染色)

- (A) ラット腎臓の組織学的所見  
CLP 作製 16 時間後に腎臓組織を採取し、PAS 染色をおこなった。Arrowheads は変性部位、矢印は PAS 陽性の刷子縁を示す。
- (B) PAS 陽性刷子縁のスコア
- ‡  $P \leq 0.001$  vs. vehicle. Scale bar : 100  $\mu$ m

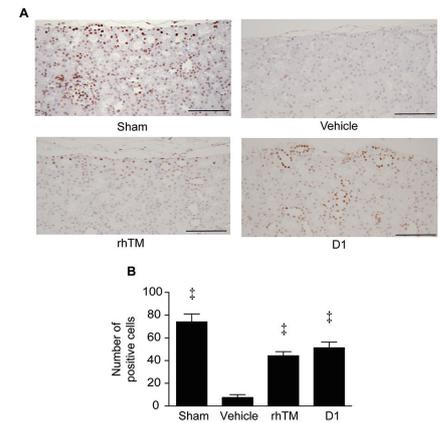


図3 腎組織学的評価

(抗ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色)

- (A) ラット腎臓の組織学的所見  
CLP 作製 16 時間後に腎臓組織を採取し、抗ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色をおこなった。
- (B) 免疫染色陽性細胞数の定量化
- ‡  $P \leq 0.001$  vs. vehicle. Scale bar : 200  $\mu$ m

たが、rhTM 投与群と D1 投与群では神経組織の変性領域はそれぞれ縮小した (図 1A)。腎組織の変性領域の数と変性領域の大きさを定量化したところ、rhTM 投与群と D1 投与群では vehicle 群と比較してそれぞれ有意に低下した (図 1B, C)。

### 3.3.2. 腎組織学的評価 (PAS 染色)

PAS 染色による観察では、vehicle 群では brush border はほぼ消失したが、rhTM 投与群と D1 投与群では brush border を認める領域がそれぞれ増加した (図 2A)。これを定量化してスコアリングをおこなうと、rhTM 投与群と D1 投与群では vehicle 群と比較して、それぞれ有意にスコアの改善を認めた (図 2B)。

### 3.3.3. 腎組織学的評価 (抗ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色)

ヒストン抗体を用いて免疫染色をおこなうと、vehicle 群で免疫染色陽性となった細胞数が減少したが、rhTM 投与群と D1 投与群では免疫染色陽性の細胞数が増加した (図 3A)。これを定量化したところ、vehicle 群と比較して rhTM 投与群と D1 投与群は免疫染色陽性細胞数をそれぞれ有意に増加させた (図 3B)。

## 4. 24 時間生存率

rhTM 投与群と D1 投与群では、vehicle 群と比較して生存率をそれぞれ有意に改善させた (未掲載データ)。

## 【考察】

本研究から、ヒストン H3 濃度の上昇が腎障害と高い死亡率と関連することが示唆された。また、rhTM と D1 を投与することでヒストン H3 濃度を減少させ腎障害を軽減し、死亡率を改善させるということが示された。本研究における CLP 腹膜炎モデルにおける臓器障害は腎障害が認められており、腎組織細胞内の

ヒストン H3 濃度減少と細胞外へ放出されたヒストン H3 濃度上昇が腎障害と関連していると考えられた。また、rhTM と D1 はヒストン H3 蛋白が細胞外へ放出されるのを制御し、腎障害の軽減に寄与すると考えられた。さらに、24 時間生存率を延長させたことから、予後の改善にも関与する可能性が考えられた。rhTM と D1 の 2 つの薬剤間におけるヒストン蛋白制御と腎障害軽減効果や生存率には差は認めなかったことから、抗炎症作用を発揮するのは D1 である可能性があることが示唆された。

## 【結論】

ラット敗血症モデルでの腎障害では、rhTM と D1 がヒストン H3 蛋白の制御による抗炎症作用と腎保護作用との関連が示された。これらの結果は今後、臨床での敗血症性急性腎障害に対する治療において rhTM と D1 が効果的な薬剤として応用できる可能性があると考えられた。

## 参考文献

- Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009; 15: 1318-1321.
- Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 2005; 131: 417-430.
- Ito T, Maruyama I. Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation. *J Thromb Haemost* 2011; 9 Suppl 1: 168-173.
- Abeyama K, Stern DM, Ito Y, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest* 2005; 115: 1267-1274.

## 赤塚 正幸

略歴

2008 年 3 月 札幌医科大学医学部医学科 卒業

2020 年 3 月 札幌医科大学大学院医学研究科 博士課程 修了

2021 年 4 月 札幌医科大学医学部 集中治療医学 助教