

主論文の要旨

**Expression of a Crry/p65 is reduced in acute lung  
injury induced by extracellular histones**

〔Crry/p65発現は細胞外ヒストン誘発性急性肺障害時に減少する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

長野 文彦

## 【緒言】

急性肺障害 (Acute Lung Injury : ALI) は敗血症や外傷などの基礎疾患存在下にて呼吸不全を呈する予後不良疾患である。ALI 発症機序として肺胞壁や肺毛細血管障害があげられ、これらによって肺のバリア機能低下することで血管透過性が亢進し肺水腫を引き起こす。ヒストンは細胞の核内にて DNA と複合体を形成して存在するが、重症敗血症や炎症時に死細胞や好中球により細胞外へ放出される。細胞外へ放出されたヒストンは血小板凝集や凝固活性化、内皮細胞障害を引き起こし ALI に関与することが報告されている。一方で ALI 発症におけるヒストンの詳細な機序については明らかになっていない。

血管内皮は過度な補体活性化から血管を保護するために膜補体制御因子が細胞表面に発現している。代表的なものとして CD46、CD55 などが挙げられ、これらは C3 転換酵素の制御および C3b の分解を介して補体第 3 因子 (C3) レベルでの活性を制御している。また膜補体制御因子の 1 種である Complement rodent regulatory protein Y (Crry)/65 は CD46、CD55 双方の機能を有しており、補体活性化経路のうち古典経路および第二経路の阻害に関与している。

細胞外ヒストンは内皮細胞障害およびアポトーシスを促進し、細胞膜表面の形態を変化させる。腹膜上皮細胞において細胞障害による膜表面の形態変化が Crry/p65 発現を低下させることが報告されているが、血管内皮細胞におけるヒストン誘発性細胞障害での報告はない。加えて動物実験にて ALI モデル動物に対し抗補体療法が有用である事が報告されているが、ヒストン誘発性 ALI モデルにおける補体制御因子への影響は明らかになっていない。本研究では ALI モデル動物を用いて Crry/p65 発現への影響を検討することで、ALI における Crry/p65 の役割を明らかにした。

## 【方法】

雄性 C57BL/6J マウス (9-12 週齢) に対して未分画ヒストンまたは生理食塩水 (対照群) を尾静脈内投与し ALI モデルマウスを作製した。ALI モデルマウス作製に際してヒストンの用量依存性 (30-60 $\mu$ g/g 体重) および時間依存性 (投与後 10-30 分) を検討した。ALI モデルマウスより肺および血液を採取し、肺組織学的評価 (肉眼および H&E 染色所見)、肺重量、肺血管内皮上の Crry/p65 発現 (組織免疫学的染色およびフローサイトメトリー法)、血小板数、凝固時間 (PT、APTT)、血中 LDH および C3a 濃度を測定した。ALI モデルへの治療実験として C3a 受容体拮抗剤を前処置し、肺組織の評価を実施した。加えて上記検討を裏付けるために *in vitro* にて、マウス血管内皮細胞 (RCB1994 株) にヒストンを暴露し、生細胞率、Crry/p65 発現、血管透過性および C3c 沈着を測定した。

## 【結果】

ALI モデルマウスにおいてヒストンの用量依存性を検討したところ、用量が増えるにつれて肉眼所見での肺障害の増悪、肺重量/体重の増加および血管内皮細胞上の

Crry/p65 発現の低下が認められた。ALI モデルにおける時間依存性について検討したところ 10 分後と比較して 30 分後にて肉眼所見での肺障害の増悪、Crry/p65 発現低下が認められた。両検討より ALI モデルマウス作製方法としてヒストンの用量を 45 $\mu$ g/g、投与後の時間を 30 分に設定し以降の検討を行った。

ALI モデルマウスの血液検体を用いて解析した結果、血小板数減少、PT、APTT の延長、血中 LDH および C3a 濃度の上昇が認められた。肺組織では肺出血面積および肺重量/体重の増加、肺血管内皮上の Crry/p65 発現の低下が認められ、Crry/p65 発現は肺重量/体重、血中 LDH および C3a 濃度のいずれにおいても負の相関関係が認められた。一方で C3a 受容体拮抗剤を前処置したところ、非処置群と比較して肺出血面積および肺重量/体重は低下した。

マウス血管内皮細胞を用いた *in vitro* の検討にて、ヒストンの用量依存的な生細胞率および Crry/p65 発現低下および血管透過性亢進が認められ、生細胞率と Crry/p65 発現間に正の相関関係が認められた。加えてヒストン暴露により血清 C3c の細胞沈着が認められた。

#### 【考察】

Crry/p65 は内皮細胞表面に発現し主に C3 レベルでの補体活性を制御するが、内皮が障害されることで Crry/p65 は機能不全となり補体の過度な活性化を引き起こす。本研究にて ALI モデルマウスにおいても細胞障害マーカーである LDH の増加に伴い Crry/p65 発現が低下していることから、ヒストンによる内皮細胞障害に伴い Crry/p65 発現が低下した。さらに Crry/p65 発現低下に相関して C3a の上昇および肺障害の増悪が認められた。細胞外ヒストンは C4 と相互作用を介して補体活性化を抑制することが報告されており、C3a 生成を直接的に促進しないと考えられている。ALI モデルにおける C3a 濃度の上昇は補体制御因子 Crry/p65 発現低下による抑制系制御が障害された事に起因したと考えられる。*in vitro* の検討においても内皮細胞の Crry/p65 発現が低下しており、ヒストン暴露後の細胞表面に血清 C3c が沈着したことから内皮細胞障害に伴う補体制御因子の障害によって補体系が活性化された *in vivo* の結果を支持した。

C3a 受容体拮抗剤を用いた治療実験では肺出血および肺浮腫が抑制され ALI の症状が軽減された。C3a 受容体拮抗剤は補体経路を直接阻害しないことから、補体系に作用する他の薬剤と比較して免疫抑制作用が弱く、ALI 患者への臨床適用として有用な治療候補となりうると考えられる。

#### 【結論】

細胞外ヒストンは血管内皮障害を引き起こす事で補体制御因子 Crry/p65 を障害し、C3 を中心とした補体の活性化を介して肺障害を悪化させる。