

氏 名 はっとり みずき
服部 瑞樹

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 210 号

学位授与年月日 平成 28 年 6 月 27 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Histamine and its contributory role in promoting organ injury in sepsis.**
(敗血症による臓器傷害進展におけるヒスタミンの寄与)

論文審査委員

(主査) 教授 芳村 直樹
(副査) 教授 清水 忠道
(副査) 教授 西田 尚樹
(副査) 教授 山本 善裕
(指導教員) 教授 山崎 光章

論文内容の要旨

【背景】

集中治療領域において現在最も治療に難渋する病態の一つが敗血症である。近年、集中治療の質が向上しているにもかかわらず、敗血症はいまだ感染症による死亡原因の最たるものであり、特に肺、肝臓、腎臓の傷害が進展し多臓器不全に陥ると救命はより困難なものとなる。しかし、敗血症による多臓器傷害が進展する機序に関してはまだよくわかっておらず、その解明は集中治療管理において非常に重要な意味をもつ。

ヒトの敗血症患者や、敗血症モデル動物において血漿ヒスタミン濃度が上昇することは以前から知られている。また近年、炎症病態において、肥満細胞以外の血球細胞や神経終末、血管内皮細胞等でヒスタミンが過剰に産生されることが明らかとなり、炎症病態を制御する活性因子としてのヒスタミンの役割に注目が集まっている。一方、生体内でヒスタミンの合成に関わるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) や、ヒスタミン受容体 (H_1R , H_2R , H_3R , H_4R) 等のヒスタミンシグナル関連分子についても、炎症病態での各臓器における発現の変化やその役割にはいまだ不明な点が多い。

本研究ではヒスタミンの敗血症病態における役割を明らかにするため、ヒスタミンシグナルを遺伝的、薬理的に遮断した場合の、敗血症による全身炎症ならびに臓器傷害進展の変化について検討を行った。

【方法と結果】

動物は 8-12 週齢の雄性 C57BL/6J(WT)マウス、および C57BL/6J を背景とする HDC ノックアウト($HDC^{-/-}$)マウス、ヒスタミン H_1 -/ H_2 -受容体ダブルノックアウト($H1R^{-/-}/H2R^{-/-}$)マウスを使用した。 $H1R^{-/-}/H2R^{-/-}$ マウスは、 $H_1R^{-/-}$ マウスと $H_2R^{-/-}$ マウスの交配により作製した。

各マウスに盲腸結紮・穿孔 (Cecal ligation and puncture: CLP) を施し、汎発性腹膜炎による敗血症を発症させた。対照群には sham operation として開腹操作のみを行った。

WT マウスにおいて CLP 後、経時的に血液、肺、肝臓、腎臓を採取し、組織中ヒスタミン濃度とヒスタミン関連分子の遺伝子発現の変化を解析した。血清および組織中のヒスタミン濃度は CLP により有意に上昇し、同様に HDC の mRNA 発現も増加した。 H_1 、 H_2 受容体の遺伝子発現は組織によって異なる経時的変化を示し、 H_1R は腎臓で、 H_2R は肺、肝臓、腎臓で、それぞれ CLP による有意な発現増加を認めた。

WT と比較し、 $HDC^{-/-}$ マウスでは CLP18 時間後の組織ならびに血清炎症性サイトカイン、肝トランスアミナーゼ (AST, ALT)、BUN、クレアチニン値の上昇が有意に抑制された。CLP24 時間後の臓器を用いた免疫組織学的検討 (H-E, MPO, NGAL 染色) の結果、 $HDC^{-/-}$ マウスでは WT に対し、敗血症による臓器傷害 (肺、肝臓、腎臓) の軽減、炎症細胞浸潤の減少を認めた。またウエスタンブロット法、蛍光免疫染色により、 $HDC^{-/-}$ マウスでの CLP18 時間後の肺における nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナル経路活性の減弱を認めた。次に $H1R^{-/-}/H2R^{-/-}$ マウスに対し CLP による敗血症を惹起したところ、臓器傷害 (肺、肝臓、腎臓) の進展に関して、 $HDC^{-/-}$ マウスと概ね同様の変化 (軽減傾向) が認められた。

最後に、WT マウスに対してヒスタミン H_1 -、 H_2 -受容体拮抗薬 (chlorpheniramine, famotidine) を CLP1 時間前に腹腔内投与した後、同様の検討を行った。その結果、 $H1R^{-/-}/H2R^{-/-}$ マウスと部分的に合致する所見が得られ、CLP18 時間後の肺、肝臓傷害に H_1/H_2 受容体の両者が深く関与している一方、腎臓傷害には H_2 受容体のみが関与している可能性が示唆された。

【総括】 敗血症マウスにおいて血中、臓器のヒスタミン濃度が上昇し、HDC、ヒスタミン H₁/H₂ 受容体の遺伝子発現にも経時的な変化が見られた。WT マウスと比較して、HDC ノックアウトマウスおよびヒスタミン H₁/H₂ 受容体ダブルノックアウトマウスでは、CLP による多臓器傷害(肺、肝臓、腎臓)の軽減を認め、これらの所見は WT マウスに対する H₁/H₂ 受容体拮抗薬の投与により部分的に再現された。以上の結果から、敗血症時の臓器傷害進展にヒスタミンが増悪因子として関与している可能性が示唆される。

学位論文審査の要旨

【目的】

敗血症はいまだ感染症による死亡原因の最たるものであり、特に肺、肝臓、腎臓の傷害が進展し多臓器不全に陥ると救命はより困難なものとなる。しかし、敗血症による多臓器傷害が進展する機序に関してはまだよくわかっておらず、その解明は集中治療管理において非常に重要な意味をもつ。近年、炎症病態において、肥満細胞以外の血球細胞や神経終末、血管内皮細胞等でヒスタミンが過剰に産生されることが明らかとなり、炎症病態を制御する活性因子としてのヒスタミンの役割に注目が集まっている。一方、生体内でヒスタミンの合成に関わるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) や、ヒスタミン受容体 (H_1R , H_2R , H_3R , H_4R) 等のヒスタミンシグナル関連分子についても、炎症病態での各臓器における発現の変化やその役割にはいまだ不明な点が多い。服部瑞樹君はヒスタミンの敗血症病態における役割を明らかにするため、ヒスタミンシグナルを遺伝子上あるいは薬理的に遮断した場合の、敗血症による全身炎症ならびに臓器傷害進展の変化について検討を行った。

【方法】

動物は 8-12 週齢の雄性 C57BL/6J(WT)マウス、および C57BL/6J を背景とする HDC ノックアウト ($HDC^{-/-}$)マウス、ヒスタミン H_1/H_2 -受容体ダブルノックアウト ($H1R^{-/-}/H2R^{-/-}$)マウスを使用した。各マウスに盲腸結紮・穿孔 (Cecal ligation and puncture: CLP) を施し、汎発性腹膜炎による敗血症を発症させた。対照群には sham operation として開腹操作のみを行った。WT マウス、 $HDC^{-/-}$ マウスおよび $H1R^{-/-}/H2R^{-/-}$ マウスにおいて CLP 後、経時的に血液、肺、肝臓、腎臓を採取し、組織中ヒスタミン濃度とヒスタミン関連分子の遺伝子発現の変化を解析した。さらに WT マウスに対してヒスタミン H_1 、 H_2 -受容体拮抗薬(chlorpheniramine、famotidine)を CLP1 時間前に腹腔内投与した後、同様の検討を行った。

【結果】

WT マウスにおいて、血清および組織中のヒスタミン濃度は CLP により有意に上昇し、同様に HDC の mRNA 発現も増加した。 H_1 、 H_2 受容体の遺伝子発現は組織によって異なる経時的変化を示し、 H_1R は腎臓で、 H_2R は肺、肝臓、腎臓で、それぞれ CLP による有意な発現増加を認めた。WT マウスと比較し、 $HDC^{-/-}$ マウスでは CLP18 時間後の組織ならびに血清炎症性サイトカイン、肝トランスアミナーゼ (AST, ALT) 、BUN、クレアチニン値の上昇が有意に抑制された。CLP24 時間後の臓器を用いた免疫組織学的検討 (H-E、MPO、

NGAL 染色) の結果、HDC^{-/-}マウスでは WT マウスに対し、敗血症による臓器傷害 (肺、肝臓、腎臓) や炎症細胞浸潤は軽度であった。またウエスタンブロット法、蛍光免疫染色において、HDC^{-/-}マウスでの CLP18 時間後の肺における nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナル経路活性は減弱していた。次に H1R^{-/-}/H2R^{-/-}マウスに対し CLP による敗血症を惹起したところ、臓器傷害 (肺、肝臓、腎臓) の進展に関して、HDC^{-/-}マウスと概ね同様の变化 (軽減傾向) が認められた。

ヒスタミン H₁-、H₂-受容体拮抗薬 (chlorpheniramine、famotidine) を CLP1 時間前に腹腔内投与したマウスでは、H1R^{-/-}/H2R^{-/-}マウスと部分的に合致する所見が得られ、CLP18 時間後の肺、肝臓に H₁/H₂ 受容体の両者が深く関与している一方、腎臓には H₂ 受容体のみが関与している可能性が示唆された。

【総括】

今回、服部瑞樹君は、1) 敗血症マウスにおいて血中、臓器のヒスタミン濃度が上昇し、HDC、ヒスタミン H₁/H₂ 受容体の遺伝子発現にも経時的な変化が見られたこと、2) WT マウスと比較して、HDC ノックアウトマウスおよびヒスタミン H₁/H₂ 受容体ダブルノックアウトマウスでは CLP による多臓器傷害 (肺、肝臓、腎臓) の程度は軽く、またこれらの所見は WT マウスに対する H₁/H₂ 受容体拮抗薬の投与によっても部分的に再現されること、という 2 つの新知見を見出した。本研究は敗血症時の臓器傷害進展にヒスタミンが増悪因子として関与している可能性を示唆するものであり、未だ不明な点が多い敗血症による多臓器傷害が進展する機序を解明するための重要な知見を得たという点から高く評価できる。よって本審査委員会は本研究を博士 (医学) の学位に十分値するものと結論した。