敗血症性臓器障害におけるヒスタミンの役割： ヒスタミン関連遺伝子ノックアウトマウスを 用いた検討

服部 裕一

要約：ヒスタミンは、生体内において、炎症、アレルギー反応、胃液分泌、神経伝達など、多岐にわたる生理活性作用を有し、これら作用はGタンパク質共役型ヒスタミン受容体を介して引き起こされるが、これまでにH1、H2、H3、H4の4種類のヒスタミン受容体が同定されている。1990年代の終わりから、次々と、これらヒスタミン受容体を欠損させた、あるいはヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) を欠損させた、ヒスタミン関連遺伝子のノックアウトマウスが開発され、ヒスタミンの新たな生理的、病態薬理学的役割が見出されている。敗血症は、高齢者人口の増加、悪性腫瘍や移植時の化学療法などによる免疫機能の低下、多剤耐性菌の出現などにより、症例数は増加の一途をたどり、現在においてもなお高い死亡率を有している。現在、敗血症は、感染に対する制御不能な宿主反応による生命に関わる臓器不全と定義されるようになったが、急性肺傷害をはじめとする敗血症性臓器不全の発症・進展機構は、未だ十分に理解されていない。敗血症病態においてヒスタミンの血中レベルが上昇するという報告は古くから知られており、ヒスタミンが敗血症病態の修飾に関与し、ヒスタミンが敗血症による主要臓器の組織傷害の進展に寄与している可能性が想定される。本稿では、HDC ノックアウトマウスと、H1 および H2 受容体ダブルノックアウトマウスを用いて、盲腸結紮穿孔により多菌性敗血症にしたときの主要臓器における組織傷害の程度の、ヒスタミンが欠損している場合、そして、H1 および H2 受容体が欠損している場合での修飾的变化について紹介し、敗血症性臓器障害におけるヒスタミンの役割について考察する。

1. はじめに

敗血症は、感染症などで体内に細菌などの病原体が侵入したことをきっかけに発症し、重症敗血症の死亡率は25~40%とされ、高くとも10%程度である心筋梗塞や脳卒中よりはるかに高い。先進国では、高齢化、高度医療を受けた後の免疫機能の低下、多剤耐性菌の出現などにより、症例数は増加の一途をたどり、2017年には、世界保健機関 (WHO) が、敗血症をグローバルヘルスプライオリティと認識して決議を採択し、敗血症が世界の解決すべき課題として認定された。わが国では敗血症と呼ばれる sepsis の語源は、古代ギリシャ語で「腐敗」という意味である septikos からなり、古くはヒポクラテスの時代からその概念は存在していた。1914年にSchottmüllerにより、細菌の血流感染による侵襲が septicemia と定義され、1989年になってBoneが「sepsis syndrome」という概念を提唱し、これに基づいて、1991年に、敗血症は感染による全身性の炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) であると定義された。その後2001年に、欧米の専門家らが、定義の改訂版を発表して、同時に敗血症により臓器障害を呈する状態として重症敗血症という概念が導入された。その2001年以来四半世紀ぶりに2016年に改訂された新定義では、敗血症は、感染に対して宿主生体反応の統御不全により臓器障害を呈している状態であるとされ、また、敗血症性ショックは、敗血症のうち、循環不全と細胞機能や代謝の異常により死亡率が高くなった状態であるとされるようになった(1)。

敗血症病態における臓器障害が進展するメカニズムは、未だ十分に解明されていない(2)。前向き比較研究では、敗血症患者で血中ヒスタミンレベルは有意に

キーワード：敗血症、ヒスタミン、ヒスチジン脱炭酸酵素ノックアウトマウス、ヒスタミン受容体 H1/H2 ダブルノックアウトマウス

富山大学大学院 医学薬学研究部 (医学) 分子医科薬理学講座 (〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630)

E-mail: yhattori@med.u-toyama.ac.jp 原稿受領日：2018年3月22日、依頼原稿

上昇しており、敗血症病態と因果関係があることが指摘されている(3)。筆者らも、これまでの研究において、細菌内毒素リポポリサッカライドを投与した、あるいは、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture : CLP) 敗血症モデル動物における血中ヒスタミンレベルの上昇は、ヒスタミン生合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase : HDC) の発現増加に関係しており、さらに菌血症状態では、心血管系や肺組織において、ヒスタミン H1 および H2 受容体の過誘導 (superinduction) が起こることを報告した(4-6)。ヒスタミンは、アレルギーや炎症反応、胃液分泌、血管緊張や透過性、中枢系における神経伝達など、広範囲な生体機能に関与しているので(7)、ヒスタミン遊離を促進させるような病態においては、ヒスタミン生体反応はその病態修飾に重要な意義を有しているかもしれない。それ故、ヒスタミンが敗血症による主要臓器の組織傷害の進展に寄与している可能性は十分に考えられる。本稿では、最近の筆者らの研究成果に基づき(8)、HDC ノックアウトマウスと、H1 および H2 受容体ダブルノックアウトマウスを用いて、CLP 敗血症にした場合の主要臓器の組織傷害の程度が、ヒスタミンが体内に存在しないとき、あるいは H1 および H2 受容体が欠損しているときに、どのように修飾されるかについて紹介し、敗血症性臓器障害におけるヒスタミンの意義について考察していきたい。

2. 敗血症病態におけるヒスタミン生合成およびヒスタミン受容体発現

敗血症や敗血症性ショックを引き起こす重要なトリガーであるエンドトキシン投与後にヒスタミンの血中

レベルが上昇するという報告は古くからなされてきた(9-12)。臨床研究においても、血中ヒスタミン濃度の増加が敗血症と因果関係があることが示された(3)。筆者らも、マウスにおけるヒスタミンの血中濃度は、CLP によって誘発された多菌性敗血症後、有意に増加することを見出している(8, 13)。この血中ヒスタミン濃度の上昇は、哺乳類においてヒスタミンを生成する唯一の酵素である HDC の組織発現の増加と関係していた(8, 13)。実際、筆者らは、肺や肝、腎などの主要組織において、HDC mRNA 発現レベルの増加とともに、ヒスタミンの局所レベルは、CLP による敗血症誘導後時間依存性に増加していることを報告している(8)。ウェスタンブロット上では、HDC は、cytosolic enzyme としての 74 kDa と、active form である particulate enzyme としての 53 kDa の二つが検出されるが、CLP 誘発性敗血症により、53-kDa バンドが顕著に増加していた(図 1)。

筆者らの先の報告では、エンドトキシンを投与して敗血症性ショック状態となったマウスやウサギの心血管系や肺組織において、ヒスタミン H1 および H2 受容体の superinduction が起こることを見出している(4-6)。ヒスタミン H1 および H2 受容体の遺伝子発現レベルでのアップレギュレーションは、CLP によって誘発された多菌性敗血症マウスにおいても認められたが、組織によってかなり違いが見られた(8)。すなわち、H1 受容体の mRNA 発現は、CLP 後 6 時間から 12 時間で、sham 群と比較して、肝や腎組織で、3 倍以上もの増加を示した。エンドトキシン投与での結果とは異なり、肺組織では、CLP 後に H1 受容体 mRNA レベルの増加は見られなかった。H2 受容体 mRNA 発現レ

図1 CLP 誘発性敗血症マウスにおける HDC の発現のウェスタンブロット解析

Sham operation または CLP 後 24 時間での脾組織での HDC 発現。棒グラフは、HDC の 54-kDa form を actin との比で表示している (n=4)。

ベルは、肺や腎組織では、CLP 後 3 時間での一過性の増加に留まったが、腎組織では、CLP 後に持続的な増加を示した。

3. HDC ノックアウトマウスにおける敗血症病態

ヒスタミンは、哺乳類の生体内では唯一 HDC により合成されるので、HDC を遺伝的に欠失したノックアウトマウスを使用することにより、ヒスタミンの生理的あるいは病態生理学的な役割を研究するうえで、新たな展開を生み出してきた。HDC 欠損マウスは、HDC の補酵素であるビタミン B6 結合配列を標的として、その領域を含むエクソンを置換することにより作製される(14)。筆者らは、HDC ノックアウトマウスに CLP を施し多菌性敗血症にしたときの病理学的変化を、野生型 (WT) の CLP 誘発性敗血症と比較検討した(8)。

敗血症時には、過剰に産生される炎症性メディエーターの中でも、特に炎症性サイトカインの過剰産生が病態形成に大きく関わっていると考えられている。敗血症における免疫学的な病態部分の多くを、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインが担っているとされ、サイトカインと免疫担当細胞間の positive feedback loop からなる免疫反応は、サイトカイン・ストームと呼ばれ、ときに致命的となり得る。すなわち、免疫システムが病原体を攻撃する際に、サイトカインはリンパ球やマクロファージのような免疫細胞を炎症部位に移送させ、活性化させて、さらにエフェクターとしてのサイトカインを産生させる。いったんこの positive feedback loop が制御できない状態となると、大量の免疫細胞が限局した部位で活性化され、近接の臓器に傷害を引き起こす。さらに、血流中に漏出したサイトカインは、遠隔臓器近在の免疫細胞を活性化して、その臓器を傷害する機序も考えられている。すなわち、サイトカイン・ストームは、体内の臓器に極度な損傷を与える可能性を持っている。筆者らは、CLP 誘発性敗血症マウスを用いて、血中の TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 および

MCP-1 など炎症性サイトカイン・ケモカインのレベルおよびそれらの遺伝子の主要臓器である肺、肝、腎組織での上昇が、HDC ノックアウトマウスで有意に軽減していることを認めた(8)。このことは、敗血症病態では、ヒスタミンの存在が、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現増大に寄与していることを示唆する。

過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸を産生する酵素であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) は、主に好中球のみに存在するため、抗 MPO 抗体を用いれば、好中球の組織内への浸潤の程度を知ることができる。CLP による多菌性敗血症では、マウスの肺や肝組織への MPO 陽性細胞が著明に増加していたが、HDC ノックアウトマウスでは、有意にその数は減少していた(8)。さらに、敗血症による急性肺傷害の程度を、その病理組織学的変化からスコア化すると、HDC ノックアウトマウスで、その数値が WT に比較し有意に低下していた(8)。敗血症状態では、好中球は炎症性サイトカインに誘導されて肺の毛細血管に集積する。これは初期の炎症部位が肺であっても、それ以外の部位であっても起こりうる。好中球は活性化され、エラスターゼや活性酸素種、血小板活性化因子 (PAF) などを放出する。その結果、血管透過性が亢進し肺胞隔壁の肥厚や肺胞内への血漿成分滲出、すなわち肺水腫が起こり、肺の湿・乾重量比が有意な高値を示すが、この値も HDC ノックアウトマウスでは軽減した(8)。以上の結果は、敗血症によって惹起される急性肺傷害には、ヒスタミンは増悪因子として働くことを示唆する。

AST や ALT といったトランスアミナーゼは、人体の重要な構成要素であるアミノ酸をつくる働きをしており、これら酵素は肝細胞中に圧倒的に多く存在しているため、肝細胞傷害で血中に逸脱し、酵素活性が上昇する。血清 AST および ALT は、CLP 誘発性敗血症で顕著に上昇するが、この増加も HDC ノックアウトマウスでは軽減した(表 1)。血液中の尿素に含まれる窒素量である BUN や、筋肉内に存在するクレアチンが使用された後の老廃物であるクレアチニンの血液レベ

表 1 WT および HDC ノックアウトマウスの血液生化学データにおける CLP 誘発性敗血症の影響

	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	BUN (mg/dL)	クレアチニン (mg/dL)
WT				
Sham	98 $\pm$ 9	27 $\pm$ 9	25 $\pm$ 1	0.14 $\pm$ 0.00
CLP	772 $\pm$ 132 ***	356 $\pm$ 66 ***	90 $\pm$ 8 ***	0.37 $\pm$ 0.07 ***
HDC ^{-/-}				
Sham	98 $\pm$ 11	24 $\pm$ 2	28 $\pm$ 3	0.13 $\pm$ 0.01
CLP	381 $\pm$ 30 ##	169 $\pm$ 12 ##	36 $\pm$ 9 ##	0.19 $\pm$ 0.03 #

平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 4~11). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WT sham. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. WT CLP.

図2 WT および HDC ノックアウトマウスの CLP 後の生存曲線
各グループ: n=8. * $P<0.05$ (log rank test).

ルは、腎機能を推定するのに便利な指標である。血清 BUN およびクレアチニンレベルは、WT の CLP 誘発性敗血症では有意に上昇したが、これらの値は HDC ノックアウトマウスで低下した (表 1)。また、好中球ゼラチナーゼ結合性リポカイン (NGAL) は、急性腎障害の有望なバイオマーカーとされているが、抗 NGAL 抗体を用いた免疫組織化学的解析とウェスタンブロット法では、CLP 誘発性敗血症により NGAL の増加が認められるが、HDC ノックアウトではその増加は軽減されていた (8)。すなわち、敗血症状態での肝障害ならびに腎障害においても、ヒスタミンは明らかな増悪因子として働いているようである。

CLP 後、WT マウスでは、進行性に血圧は低下していき、いわゆる敗血症性ショック状態となるが、この血圧低下のレベルは、HDC ノックアウトでも同様に認められた。しかしながら、Kaplan-Meier 法により、CLP 後の WT と HDC ノックアウトマウスの 2 群間の生存時間に差があるかどうかを検定したところ、HDC ノックアウトマウスに有意な延命効果があった (図 2)。

4. H1/H2 受容体ダブルノックアウトマウスにおける敗血症病態

薬物受容体遺伝子ノックアウトマウスはその特異性が高く、いままで受容体拮抗薬を使った薬理学的方法によって明らかにされてきた薬物受容体の生体における機能や病理学的役割をより明確にすることができる。5 世代以上 C57B 系マウスに交配し、遺伝的に均一な C57B マウスのヒスタミン H1/H2 受容体ダブルノックアウトマウスを作成した。作成した H1/H2 受容体ダブルノックアウトマウスを用いて、CLP を施し多菌性敗血症にしたときのサイトカイン産生および臓器傷害の程度を、WT における CLP 誘発性敗血症と比較検討した (8)。

H1/H2 受容体ダブルノックアウトマウスでは、CLP

誘発性敗血症における IL-6 や MCP-1 といったサイトカインの血中レベルでの上昇は明らかに軽減されていた。また、肺や、肝、腎組織での IL-1 β , IL-6, MCP-1 の mRNA レベルも、WT と比較して、CLP 誘発性敗血症による増加が抑えられていた。血清 ALT, BUN, クレアチニンの敗血症下の高値レベルも、H1/H2 受容体ダブルノックアウトマウスでは軽減していることから、敗血症性の肝障害や腎障害などの臓器不全も、H1 および H2 受容体の欠損により軽度になっていると推測された。すなわち、H1/H2 受容体ダブルノックアウトマウスでも、HDC ノックアウトマウス同様に、CLP 敗血症時の炎症性サイトカイン産生や臓器障害が軽減していることから、内在性ヒスタミンは、H1 および H2 受容体を介して、敗血症病態の増悪因子として働いていることが示唆された。

5. 敗血症病態時の NF- κ B 経路の HDC ノックアウトマウスにおける変化

近年、敗血症は遺伝子関連疾患として捉えられており、その発症や重症化に関連して、炎症や細胞死を誘導する遺伝子の発現が多彩に変化して病態に重要な役割を果たしていると考えられる。敗血症病態ではエンドトキシンにより Toll-like 受容体が刺激され、転写因子である NF- κ B の核内移行が誘導されて、多くの炎症性分子の産生が転写段階で亢進される。それは、顕著な血圧低下、血管透過性亢進、心機能低下が起こり、多臓器不全に陥って致死的な状態と関係するかもしれない。先の研究において、筆者らは治療法の限られている敗血症性ショックに対して NF- κ B を標的とした遺伝子治療の開発を目指した。NF- κ B の活性を DNA 領域の NF- κ B 結合領域で抑制する 20 塩基の double strand DNA をリポゾーム法で包埋し、マウスに静脈内投与した。エンドトキシンあるいは CLP により敗血症作成により、劇的な増加を示した肺組織での多くの炎症性分子の遺伝子及びタンパク質の発現は、NF- κ B デコイ核酸による遺伝子治療により強く抑えられ、肺胞洗浄液中の好中球の増加や肺の組織学的炎症所見も有意に改善することを見出した (5, 15)。

筆者らは、敗血症による NF- κ B の活性化が HDC ノックアウトマウスで変化しているのか検討した (8)。NF- κ B の活性化は、その抑制性タンパク質である I κ B α により調節されている。すなわち NF- κ B は普段は DNA に結合しておらず、NF- κ B は、通常 I κ B α タンパク質と複合体を作って細胞質に存在し、I κ B α がリン酸化を引き金として分解されることによって活性化される (16)。CLP 誘発性敗血症での組織中においては、I κ B キナー

ゼ (IKK) により I κ B α のリン酸化が増加し、分解が促進されるが、HDC ノックアウトマウスでは、I κ B α のリン酸化・分解が抑えられていた。さらに、I κ B α の抑制から脱した NF- κ B p65 サブユニットは、核内に移行して、様々なターゲット遺伝子の発現を誘導する。HDC ノックアウトマウスでは、敗血症時の組織での、NF- κ B p65 サブユニットの核移行は明らかに減じていた。これらの結果は、ヒスタミンが NF- κ B シグナリングの活性に促進的に働いていることを示唆する。すなわち、ヒスタミンは、NF- κ B 活性を増強することにより、敗血症時の主要臓器の傷害の進展に寄与しているものと考えられる。ヒスタミンが、H1 あるいは H2 受容体に結合した後、どのようなシグナル伝達を介して、NF- κ B 活性を増強するのかについては、今後着手すべき検討課題として残されている。

6. おわりに

ヒスタミン関連遺伝子改変マウスの使用により、敗血症病態、特に敗血症性臓器不全におけるヒスタミンの病理学的役割を明らかにすることができた。敗血症において、ヒスタミンは、H1 および H2 受容体を介して、主要臓器不全の増悪因子として寄与することが示唆された (図 3)。临床上、周術期には、放出されたヒスタミンが有害な事象をもたらすと考えられており、H1 あるいは H2 受容体拮抗薬の導入の有効性を示唆する報告がある (17)。実際、周術期患者に医療用麻薬を使用する際、その副作用の一つとして掻痒感を生じるため、H1 受容体拮抗薬が処方される (18)。また、集中治療室における重症患者には、消化管出血を避け

るために、H2 受容体拮抗薬が広く使用されている (19, 20)。興味深いことに、入院患者において、院内感染性肺炎のリスクは、プロトンポンプ阻害薬使用例では認められるが、H2 受容体拮抗薬使用例では認められないという報告もある (21)。それ故、H1 および H2 受容体拮抗薬は、重症患者にも安全な投薬であり、筆者らの研究から、敗血症の重篤化を阻止する潜在性が示唆されるが、実際にそれらの使用により敗血症性臓器傷害の進展を回避し得る有効性や実現可能性に関しては、さらなる基礎的な研究が必要であるとともに、今後の臨床研究の展開が待たれる。

謝辞：本稿で紹介した内容は、富山大学大学院医学薬学研究部麻酔科学講座・服部瑞樹助教が筆頭著者となって論文として公表した研究成果を中心にまとめたものであり、この場を借りて感謝の意を表させていただきます。また、本稿の図を作成していただいた藤森俊雄技官に心より御礼申し上げます。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Singer M, et al. JAMA. 2016;315:801-810.
- 2) Hattori Y, et al. Pharmacol Ther. 2017;177:56-66.
- 3) Neugebauer E, et al. Crit Care Med. 1996;24:1670-1677.
- 4) Matsuda N, et al. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2002;366:513-521.
- 5) Matsuda N, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004; 287:L1248-L1255.
- 6) Matsuda N, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2003;307:175-181.
- 7) Panula P, et al. Pharmacol Rev. 2015;67:601-655.
- 8) Hattori M, et al. Intensive Care Med Exp. 2016;4:36.
- 9) Hinshaw LB, et al. Proc Soc Exp Biol Med. 1960;40:1631-1637.
- 10) Hinshaw LB, et al. J Clin Med. 1961;25:80-88.

図 3 敗血症性臓器傷害の増悪因子としてのヒスタミンの模式図

- 11) Spink WW, et al. J Clin Invest. 1964;43:696-704.
- 12) Schumer W, et al. Adv Exp Med Biol. 1971;23:235-243.
- 13) Matsuda N, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2010;332:730-737.
- 14) Ohtsu H, et al. FEBS Lett. 2001;502:53.
- 15) Matsuda N, et al. Mol Pharmacol. 2005;67:1018-1025.
- 16) Baldwin AS Jr. Ann Rev Immunol. 1996;14:649-683.
- 17) Lorenz W, et al. Lancet. 1994;343:933-940.
- 18) St Peter SD, et al. Arch Surg. 2010;145:143-146.
- 19) Brett S. Crit Care. 2005;9:45-50.
- 20) Marik PE, et al. Crit Care Med. 2010;38:2222-2228.
- 21) Herzig SJ, et al. JAMA. 2009;301:2120-2128.

Role of histamine in sepsis-induced organ dysfunction: study using knockout mice of histamine-related genes

Yuichi Hattori

Department of Molecular and Medical Pharmacology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama

Abstract. Sepsis is the leading cause of death in critically ill patients, and its incidence continues to rise. Sepsis is now defined as life-threatening organ dysfunction due to a dysregulated host response to infection. Histamine assumes a critical role as a major mediator of many pathologic disorders with inflammation and immune reactions. However, direct evidence has not been provided showing the involvement of histamine in the development of multiple organ dysfunction or failure in sepsis. We have found that sepsis-induced major end-organ (lung, liver, and kidney) injury is attenuated in histidine decarboxylase (HDC) gene knockout mice. H1/H2-receptor gene-double knockout mice apparently behave similar to HDC knockout mice in reducing sepsis-related pathologic changes. Here we provide an overview on the role of endogenous histamine as an aggregating mediator that could contribute to the development of major end-organ injury in sepsis.