

令和元年6月14日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10957

研究課題名(和文)血小板の細菌感染防御メカニズムの解明：新しい敗血症治療戦略を提唱するために

研究課題名(英文)Protection mechanism against bacteria by platelet: A novel strategy for sepsis

研究代表者

亀井 政孝 (Kamei, Masataka)

三重大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60443503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プロテオミクスにおける定量的解析手法の検討を行った。検討した方法はiTRAQ法である。iTRAQ法は、「マイクロアレイのタンパク質版」のような手法であり、タンパクのiTRAQ標識により複数サンプル間でタンパク質の存在量を網羅的に比較することができる。このiTRAQ標識化反応の、本研究におけるプロトコルを検討した。まずはタンパク溶出後、アルブミン除去を行う必要があり、アルブミン除去カラムを用いて行った。アルブミン除去後のタンパク溶液をiTRAQ標識反応に供したところ、十分な標識効率と、その後の質量分析によるiTRAQ標識タンパクの同定も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液検体から抽出されたタンパクをアルブミン除去後にiTRAQ標識することに成功したことで、今後の血液検体の定量的プロテオミクスの道筋ができた。アルブミン除去処置をした後のタンパクサンプルのiTRAQ標識にて、100個ほどのペプチド同定、データベースとの照合によるタンパク同定を行うことができた。本研究では血小板タンパクを標的とするが、今回構築された血液検体タンパクのデータベースは、血小板の抽出効率の評価に使用できる。

研究成果の概要(英文)：Optimization of quantitative proteome of blood was performed using iTRAQ method as a pilot study. The iTRAQ method is based on the covalent labeling of the N-terminus and side chain amines of peptides from protein digestions with tags of varying mass. Removal of albumin was needed. The blood proteins without albumin were successfully labeled by iTRAQ in our laboratory, and the samples were then pooled and usually fractionated by liquid chromatography and analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS). A database search is then performed using the fragmentation data to identify the labeled peptides and hence the corresponding proteins.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：敗血症 血小板 プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

新生児の周術期では血小板機能の未熟性がしばしば問題となる。新生児血小板の止血機能の未熟性については最近の精力的な研究により、多くの重要な知見が集積されてきた (Sola-Visner, ASH Edu Book 2012)。血小板は血栓止血能だけでなく、免疫系とのクロストークを通じて多彩な生体防御機能を有していることが明らかとなってきた。免疫系が完全には発達していない新生児では、血小板の生体防御機能が周術期感染症や炎症反応の制御に貢献し、敗血症の病態を左右する要因であると考えられるが、ほとんど研究が進んでいない。本提案ではこの未決の重要な問題に取り組む。

血小板と免疫系のクロストーク：血小板は、血栓症における中心的な細胞メディエーターであると同時に、好中球や単球などの自然免疫細胞と直接・間接にリンクすることで、ある場面では生体防御機能を発揮し、またべつの場面においては、動脈硬化症から敗血症にいたるまで幅広い炎症性疾患の発症や進行に関与していることが明らかとなってきた (Semple, Nat Rev Immunol 2011; Morrell, Blood 2014)。しかし、新生児血小板が成人血小板と同じレベルで自然免疫系とクロストークしているのか不明な点が多い。

敗血症と血小板：敗血症では、血小板と自然免疫系のクロストークにより、全身性の炎症反応と血栓症が互いに増幅しあいながら、重要臓器の微小血管レベルでの循環不全をまねき多臓器不全に陥る。敗血症における血栓症は、凝固カスケード亢進によって形成されるフィブリン塊だけでなく、局所に凝集した血小板によるさらなる凝固カスケード亢進により悪化していくと考えられている。敗血症が重症化するほど血小板数低下を示し、血小板数低下は死亡リスク因子の一つとして広く認められている。敗血症マウスモデルでは、血栓症と血小板減少症は血小板 GPIb を介して引き起こされる (Yin, ATVB 2013)。新生児では敗血症時の致死率は成人と比較して低い (10-15%) が、血小板の止血機能、免疫調節機能、組織修復機能などに新生児に特異的な変化があるのか、その詳細は明らかでない (Vincent, Crit care Med 2002; Yaguchi, J Thromb Haemost 2004)。

Platelet Rich Plasma (PRP) 抽出液の創傷治癒活性・免疫調節活性：PRP は整形外科スポーツ医学領域や美容外科領域で組織修復を目的として広く使用されている。その作用機序や効果のエビデンスは完全には確定してはいないが、PRP 中に含まれる成長因子やサイトカインの複合的な効果である可能性が高い。最近ハーバード大学の Mammoto らは PRP 抽出液が血管増殖因子受容体 Tie2 を活性化し、組織修復と血管内皮バリア機能を維持する能力を持ち (Mammoto, AJRCCMB 2015a)、エンドトキシン急性肺傷害による肺水腫を抑制すること (Mammoto, AJRCCMB 2015b) を報告し注目を浴びている。本研究では新生児血小板の免疫調節機能と血管内皮修復機能が未熟であるのか (または十分成熟や、むしろ亢進しているか) を *in vitro* と *in vivo* 双方で検討する。*In vivo* の検討ではマウス盲腸結紮穿孔 (CLP) 敗血症モデルを用いる。

## 2. 研究の目的

敗血症は、微生物感染によって引き起こされる全身性炎症性疾患で、容易に多臓器障害を引き起こし、院内死亡の実に 1/3 以上に関連し、麻酔科学領域において最も死亡率が高い病態の代表となっている。

近年、血小板は、血栓止血能だけでなく、細菌感染防御機能も有していることが明らかとなってきた。我々は、白血球血管外遊出と血管内皮細胞バリアー機構に関する多くの知見を報告してきた。さらに、全血流動状況下における血小板機能測定系をすでに確立している。これまでの研究成果をもとに、本研究では、血小板・白血球・血管内皮細胞相互作用の面から、敗血症における血小板の感染防御機能に関する基礎的研究を実施することにより、新しい敗血症治療戦略を展開するための基盤となる研究を行う。

## 3. 研究の方法

血小板の免疫系調節能・血管内皮細胞修復能の新生児-成人間での比較検討を網羅的に行う。Part-1 ではヒト臨床検体を用いて iTRAQ プロテオミクス解析 (タンパク質発現相対定量解析) を行い、新生児に特徴的なタンパク分子の変化プロファイルを明らかにする。Part-2&3 では PRP 抽出液を臨床サンプルより作成し、単球と好中球および血管内皮細胞に対する活性を *in vitro* で検討し (Part-2)、さらにマウス敗血症モデルで新規治療作用を評価する (Part-3)。本研究により、新生児血小板の免疫調節機能や血管内皮細胞修復能の未熟性の有無、さらに PRP 抽出液の敗血症病態を改善する可能性について明確な答えを出すことができる。

本提案の研究の流れは (図) まず血小板の免疫系調節活性や血管内皮細胞修復活性は新生児では低下しているのか (未熟性) を定量的に解析する。さらに PRP 抽出液の敗血症モデルに対する新規治療活性を検証し、新生児血小板での新規活性を比較評価する。

平成 28 年度

【Part-1】新生児血小板に特異的なタンパク発現変化のプロテオミクス解析

プロテオミクス解析により新生児血小板と成人血小板でのタンパクの発現を網羅的に比較解析し、発現に差違のある分子を同定する。

臨床サンプル：帝王切開新生児臍帯血サンプル

iTRAQ プロテオミクスによるタンパク質発現相対定量解析：日本国内の iTRAQ 受託サービス (Bio Garage) を利用し、新生児と成人血小板のタンパク発現解析を行う。新生児と成人とで発現に大きな差が見られる分子群のうち、いくつかは免疫系や組織修復に対する機能がすでに知られた分子であると予測される。まずタンパク発現量の差違をより定量的な別の方法で確認する (フローサイトメトリー (FACS)、ウエスタンブロッティング)。差違が確認できた分子については、知られた機能に基づき、データの医学的な意義を考察する。免疫機能調節に関わる機能が知られた血小板分子にはサイトカイン (IL-1 $\alpha$ , TGF $\beta$ 等), HMGB1, ケモカイン, Toll 様受容体, TREM リガンド, CD40, CD154 と、組織修復能に関連する増殖因子 (PDGF, VEGF, HGF, EGF 等) がある。

対照的に、新生児と成人とで発現に大きな差が見られる分子群のうち、その免疫系や組織修復に対する機能が全く不明な分子が多数含まれると予測する。これらの分子についてはバイオインフォマティクスやマイニングにより機能予測に尽力するが、それでも免疫系や組織修復との関連性を示す情報が得られないときには、ケースバイケースで判断し一旦保留とし本研究の別の部分にリソースを向ける。

最初はスクリーニングとして 3~5 サンプルを同量ずつ混合したプールサンプルを使用し、偏りを均す。

【Part-2】新生児 PRP 抽出物の免疫調節能の解析：

Part-1 のデータの機能的な解析をするために最も単刀直入な方法は、新生児血小板と成人血小板そのものの活性や機能を実験的に検証することである (例：血小板と免疫細胞を共培養する等)。しかし厳密な解析には患者より分離後すぐに新鮮な血小板サンプルを使用する必要があり、現在の我々の勤務状況では対応できない。またサンプルが新鮮なまま、数サンプルをプールして十分量を得ることは現実的に難しい。次善の現実的な策として凍結サンプルより調整可能な PRP 抽出物の自然免疫系細胞や血管内皮細胞を制御する活性を新生児と成人サンプル間で比較検討する。

PRP 抽出液の調整：Mammoto らの方法 (AJRCCMB 2015a) を用い、PRP の超音波破碎処理により、可溶性フラクシオンを分離して PRP 抽出液とする (凍結保存可)。タンパク濃度を測定しサンプル間で同じになるように調整する。

単球活性化に対する作用：単球細胞株 THP-1 または健常成人末梢血単核球より分離した単球を用いる。新生児または成人 PRP 抽出液存在下で単球を培養し、活性化の指標である MHC-II や Mac-1 の発現レベルや、炎症促進型 (M1 型:IFN $\gamma$ 産生) または炎症抑制型 (M2 型:IL-10産生) への分化への影響を FACS で定量的に評価する。

単球接着と遊走に対する作用：PRP 抽出液存在下で単球のフィブロネクチンや ICAM-1 基質への接着性や遊走能をライブセルイメージングまたはボイデンチャンパー法で定量的に評価する。

好中球活性化と貪食能に対する影響：分化を誘導した好中球様細胞株 HL-60 または健常成人末梢血単核球より分離した好中球を用いる。PRP 抽出液存在下で培養し、活性化マーカーとしての Mac-1 の発現、活性化酸素産生能、ピーズ貪食能を FACS で定量的に評価する。

好中球接着と遊走に対する作用：上記単球と同様に接着と遊走能に対する影響を解析する。

血管内皮修復作用：ヒト臍帯静脈内皮細胞の活性化 (ICAM-1 発現; FACS) や、修復能・細胞遊走能 (in vitro 創傷治癒アッセイ) に対する PRP 抽出液の影響を検討する。

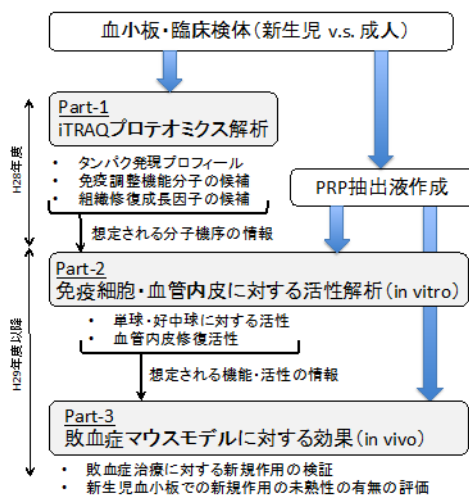
データ解析：ここで観察される免疫系調節活性を、Part-1 の発現データと関連付けて解釈する。観察された活性を示す分子を同定するためには、その分子に対する阻害抗体で中和実験を行う。免疫系調節活性は複数の分子の発現量の差による可能性もあり、PRP 抽出液の未精製ではあっても多彩な活性が、実際の臨床的な活性を反映している可能性もある。その意味では PRP 抽出液の使用は臨床での病態を理解する上ではメリットがあると考えられる。またコントロールとして健常成人 PRP 抽出液の効果も検討する。

平成 29 年度

【Part-3】新生児 PRP 抽出物の敗血症に対する効果の検討：

PRP 抽出液の総合的な免疫系調節活性や組織修復活性をより臨床に近い設定で検証するために、マウス CLP 敗血症モデルに対する影響を検討する。最近の研究では PRP 抽出液が急性肺傷害を軽減するとの報告があり (Mammoto, AJRCCMB 2015b)、PRP 抽出液の CLP 敗血症モデルに対する作用の解析は、新規治療法につながる可能性のある重要な新規活性の発見につ

(図) 全体構想と研究の流れ



なると期待される。

マウス細胞に対する活性の確認：PRP 抽出液中のヒト由来の生理活性物質が種を超えてマウスに活性があるかどうかを確認するために、マウスから分離した単球と好中球、マウス血管内皮細胞株を用いて Part-2 と同様に予備実験を行う。

CLP マウスモデルの作成：麻酔下に開腹し、盲腸結紮穿孔を行う。盲腸穿孔の具合を調節することにより、死亡率を 30% 程度に調整する。現時点では PRP 抽出液が死亡率を改善するのか、あるいは悪化させるのか確定していないことから、臨床に近い中等度の 30% を標的とする。

PRP 抽出液の効果検討：まず *in vivo* で活性を確認するために、PRP 抽出液は敗血症発症前に予防的に投与するプロトコルを使用する（効果が認められれば、敗血症発症後の治療的投与も別途検討する）。豊富に入手可能な健常成人 PRP 抽出液を用いて予備実験を行い、敗血症に対する新規活性があるかどうかと、活性の見られる容量のあたりをつける（効果があればこのデータで独立した論文を作成する）。抗原性を考慮し 1 回だけ投与する。予備実験により最適化された投与プロトコルを使用して、新生児 PRP 抽出液の効果と比較検討する。コントロールとして CLP マウスに生食を投与したグループ、Sham 手術に PRP 抽出液を投与したコントロール群も実施する。

データ解析： Kaplan-Meier 法を用いて生存分析を行い、PRP 抽出液の効果（改善または増悪）を解析する。先行研究では急性肺傷害や血管内皮透過性亢進を抑制する効果が報告されているので、生存率改善効果をまずは期待する。敗血症病態中期で臓器（肺、肝臓）への好中球や単球の浸潤を組織学的に検討する。摘出肺のウェット/ドライ比より肺水腫（血管透過性）を評価する。血液中のマウス炎症性メディエーター（TNF, IL-10, HMGB1）を ELISA で測定し、炎症の重症度を評価する。以上の解析により、PRP 抽出液の敗血症に対する新規作用の解明が期待できる。さらに新生児血小板の新規活性のレベルを明らかにし、免疫調節機能・血管内皮修復能の未熟性の有無と関連づけて理解を深めることが期待できる。

#### 4. 研究成果

血液検体の iTRAQ 法による解析プロトコルの確立に成功した。血液検体の前調整としてアルブミン、免疫グロブリンを除去する必要があり、その方法の最適化を行った。iTRAQ 標識に最適なタンパク濃度の検討を行った。iTRAQ 標識されたペプチドライブラリーを LC-MS/MS を用いて解析したところ、100 個レベルの iTRAQ 標識タンパクの同定と定量化に成功した。今回同定されたタンパクの個数は、網羅性には不十分と考えられたため、より多くのタンパクを同定できる質量分析法を検討しており、現在標識化を行わない定量的プロテオーム解析として出ている最新プロトコルの活用を検討している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：島岡 要

ローマ字氏名：SHIMAOKA Motomu

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40281133

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。