

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11567

研究課題名(和文)敗血症性DICにおけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2の役割

研究課題名(英文) Roles of calcium-independent phospholipase A2 in sepsis-associated disseminated intravascular coagulation

研究代表者

相星 淳一 (Aiboshi, Junichi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50256913

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)：ヒト血小板の細胞質内に存在するPLA2はcPLA2、iPLA2、iPLA2である。コラーゲンやADPなどの刺激物質に対してcPLA2が活性化し、その結果、産生されたアラキドン酸やその代謝産物であるエイコサノイドが血小板凝集の過程において重要な役割を演じているが、iPLA2の役割は十分に解明されていない。

本研究は、トロンビンによるヒト血小板機能(凝集能、脱顆粒、エイコサノイド産生、内因系凝固反応)の活性化において、iPLA2、特にiPLA2が強く関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症敗血症に伴う播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation; DIC)は、過剰な凝固系の活性化によって産生されたトロンビンが全身性の血栓形成を促進し、多臓器不全に至る疾患である。非常に致死的な病態であるにもかかわらず、十分な治療効果を示す治療薬は限られている。

本研究の結果から、iPLA2、特にiPLA2に対する阻害は、敗血症性DICに対する治療戦略の一つになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are cytosolic PLA2 (cPLA2) and calcium-independent PLA2 (iPLA2 and iPLA2) in the cytoplasm of human platelets. In general, cPLA2 activated with collagen, adenosine diphosphate, etc. produces arachidonic acid and eicosanoids, which play a crucial role in the process of platelet aggregation; roles of iPLA2 on platelet activation are ill-defined.

Our study has demonstrated that iPLA2, especially iPLA2, is strongly related to human platelet function (aggregation, degranulation, eicosanoid production, activation of intrinsic clotting system) in response to thrombin.

研究分野：救急医学分野

キーワード：カルシウム非依存性ホスホリパーゼA2 血小板 敗血症 播種性血管内凝固症候群

研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

生体への感染は凝固系を活性化し、産生されたトロンビンは血小板の活性化やフィブリンの形成を促進し、全身性の血栓形成を引き起こす。過剰な血管内凝固により発症する播種生血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation; DIC) は微小循環を阻害して多臓器不全に至る、非常に致死的な病態である。

抗血小板薬が敗血症患者の予後を改善するとの報告も散見され、血小板機能の抑制が過大侵襲後の多臓器障害に対する一つの治療戦略になり得ると考えられる。

ホスホリパーゼ A₂は細胞膜の主要な構成成分であるリン脂質を加水分解し、アラキドン酸などの脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素群で、細胞外分泌型ホスホリパーゼ A₂ (secretory phospholipase A₂: sPLA₂)、細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cytosolic phospholipase A₂: cPLA₂)、カルシウム非依存型ホスホリパーゼ A₂ (calcium-independent phospholipase A₂: iPLA₂)、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼの4種類に分類される。急性炎症への関与について、sPLA₂およびcPLA₂はこれまでの研究によって十分に検討されているが、iPLA₂に関してはほとんど皆無である。最近の報告では、iPLA₂はsPLA₂やcPLA₂よりも急性炎症の早期に発現して、免疫細胞の炎症部位への集積や炎症性物質の産生に関与し、好中球をはじめとする免疫細胞を制御している可能性が指摘されている。しかしながら、急性炎症に強く関連する血小板機能に対するiPLA₂酵素の役割については十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、cPLA₂、iPLA₂β、iPLA₂γに対する特異的阻害剤を用いて、血小板機能 (凝集能、エイコサノイド産生、セロトニン分泌、内因系凝固反応) の発現における各酵素の関連性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 血小板凝集能

(a) Platelet aggregometry

光透過法を用いた血小板凝集能測定として、血小板凝集能測定装置 (ヘマトレーサー804: HT) を用いた。健康成人からクエン酸 Na 3.2%含有採血管で採血した。検体を 100g × 15 分間遠心分離して血漿成分 (platelet rich plasma: PRP) と血球成分を分離した。この PRP に PGE₁ (0.1 μM) を添加し再度 700g × 15 分間遠心をかけて血小板成分を沈殿した。ここに HEPES/Tryode's Buffer (NaCl: 145 mM、KCl: 5 mM、HEPES: 10 mM、MgCl₂: 1 mM、D-glucose: 10 mM、pH 7.35) を追加し、血小板数を 20 万/μl に調整した (washed platelet solution: WPS)。

この WPS を 15 分間、37°Cの温浴槽で静置した後、cPLA₂、iPLA₂β、iPLA₂γに対する特異的阻害剤である pyrrophenone (pyrro: 0.02-0.2 μM)、(S)-bromo-enol lactone (S-BEL: 1-10 μM)、(R)-bromo-enol lactone (R-BEL: 1-10 μM) もしくは dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加し 15 分間温浴した。その後 HT で測定開始し、CaCl₂ 溶液 2 mM を投与した 1 分後にコラーゲン (3 μg/ml) またはトロンビン (0.2 U/ml) で刺激し血小板凝集能を測定した。

(b) Thromboelastography

TEG を用いて内因系凝固反応を評価した。健康成人からヘパリン含有のスピッツで採血を行い、検体を 80g × 10 分間遠心分離して PRP を分離した。PRP 内に残存する血小板を除去するため、さらに 2000g × 10 分間遠心分離して platelet poor plasma (PPP) を準備した。PRP の血小板数を 20 万/μl に調整した後、pyrrophenone (10 μM)、R-BEL (500 μM)、S-BEL (500 μM) もしくは DMSO を添加し、platelet mapping カートリッジで測定した。また S-BEL の濃度依存性を確認するため、100、500、1000 μM の濃度を添加し測定を行った。

(2) 脱顆粒

ヒト血小板の脱顆粒 (セロトニン) の評価のために serotonin ELISA kit (ELISA 法) を用いた。WPS を前述の通りに

調整し、37°Cの温浴槽で15分間静置した後にDMSO、pyrrophenone (0.2 μM)、R-BEL (10 μM)、S-BE (10 μM)、もしくはH/T溶液 (negative control) を添加し15分間温浴した。CaCl₂溶液2 mMを添加した1分後、コラーゲン (3 μg/ml) またはトロンビン (0.2 U/ml) で刺激し5分間温浴槽で静置した。反応時間を5分とし、その後直ちに1200g × 12分間遠心分離した。さらに上清を13000g × 3分間遠心し、分離された上清を-80°Cで保存した。添付文書に従い、Serotonin ELISA kit でセロトニンを測定した。

(3) エイコサノイド産生

ヒト血小板のエイコサノイド産生の評価のために、thromboxane B₂ ELISA kit (ELISA法) を使用した。前述のセロトニン評価と同様の保存検体を使用し、添付文書に従ってトロンボキサン B₂ を測定した。

4. 研究の成果

(1) 血小板凝集能および内因系凝固反応

(a) Platelet aggregometry

HTにおける凝集能の測定 (n=6) では、トロンビン刺激においてS-BEL、R-BELで濃度依存性に凝集率の低下を認め、S-BEL (10 μM) で最も有意に凝集率は低下した (S-BEL: 16.0 ± 3.6%; R-BEL: 35.3 ± 7.2%; Pyrrophenone: 87.5 ± 2.0%) (図1A)。一方、pyrrophenone はいずれの濃度でも血小板凝集を阻害しなかった (図1B)。

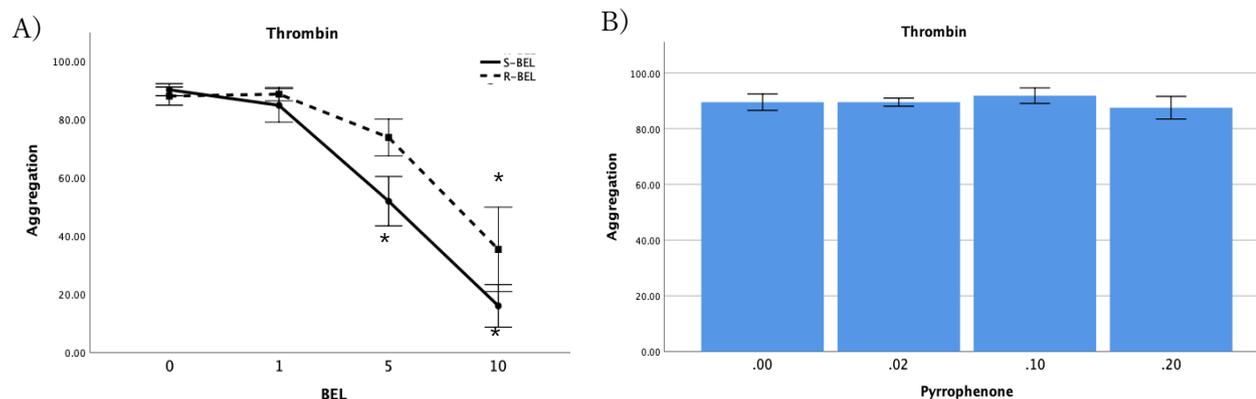


図1. トロンビン刺激による血小板凝集 (A: S-BEL、R-BEL ; B: pyrrophenone)

コラーゲン刺激では、R-BEL、S-BEL ではトロンビン刺激と同様の結果が得られた。一方、pyrrophenone も濃度依存性に血小板凝集を抑制した (図2)。

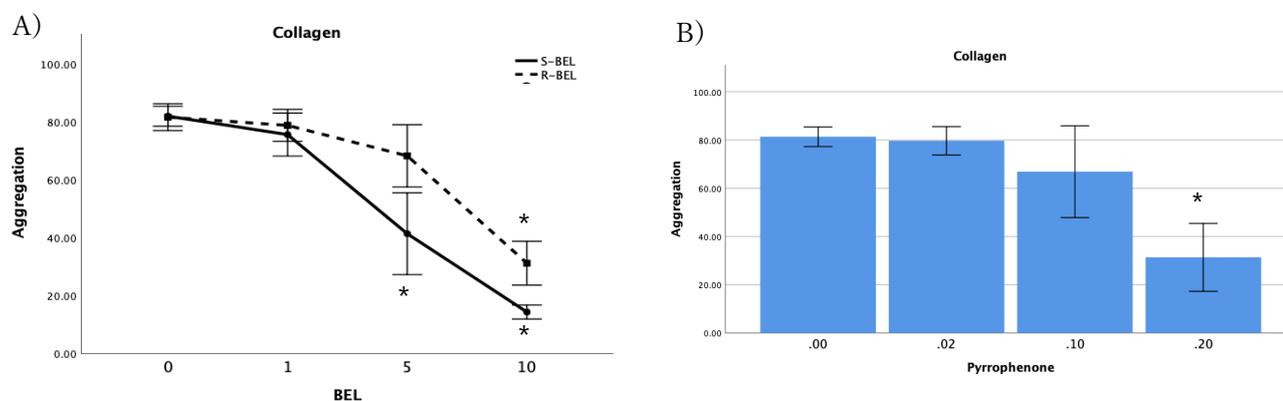


図2. コラーゲン刺激による血小板凝集 (A:S-BEL、R-BEL ; B: pyrrophenone)

(b) Thromboelastography

各阻害剤の比較検討 (n=5) でも、S-BEL は他の阻害剤と比較して有意に内因系凝固反応を抑制した (S-BEL: 21.0 ±

3.8 mm; R-BEL: 55.2 ± 9.8 mm; Pyrrophenone: 67.9 ± 1.4 mm)。また、S-BEL の濃度依存性を確認した。フィブリン血餅強度に関しては阻害剤の影響はなかった (図 4)。

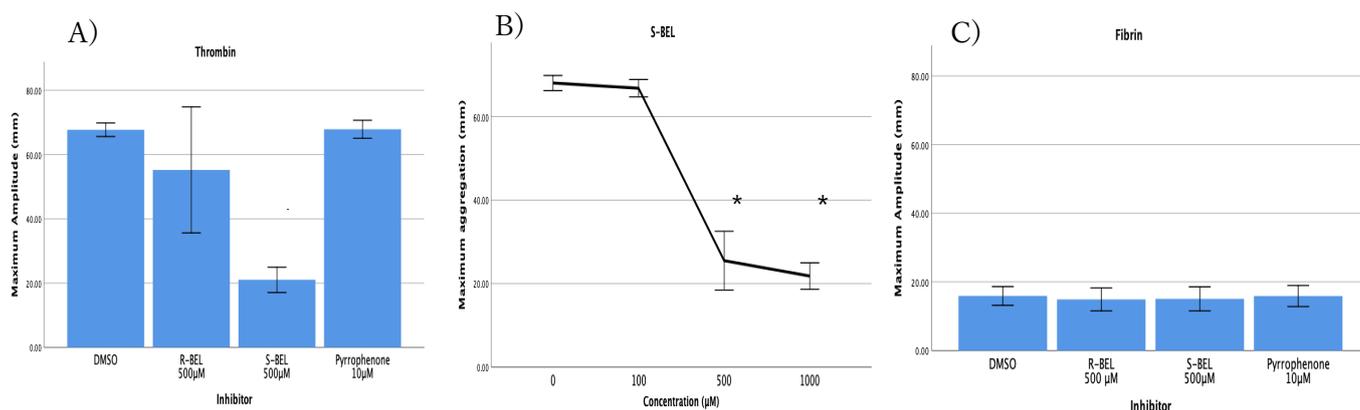


図 3. 各阻害剤による内因系凝固反応の抑制効果 (A)、S-BEL の濃度依存性 (B)、各阻害剤によるフィブリン強度への影響 (C)

Platelet mapping は ADP 刺激に対する血小板凝集能を測定することが可能である。ADP 刺激では S-BEL、R-BEL とも血小板凝集を抑制し、S-BEL の濃度依存性を確認した (図 4)

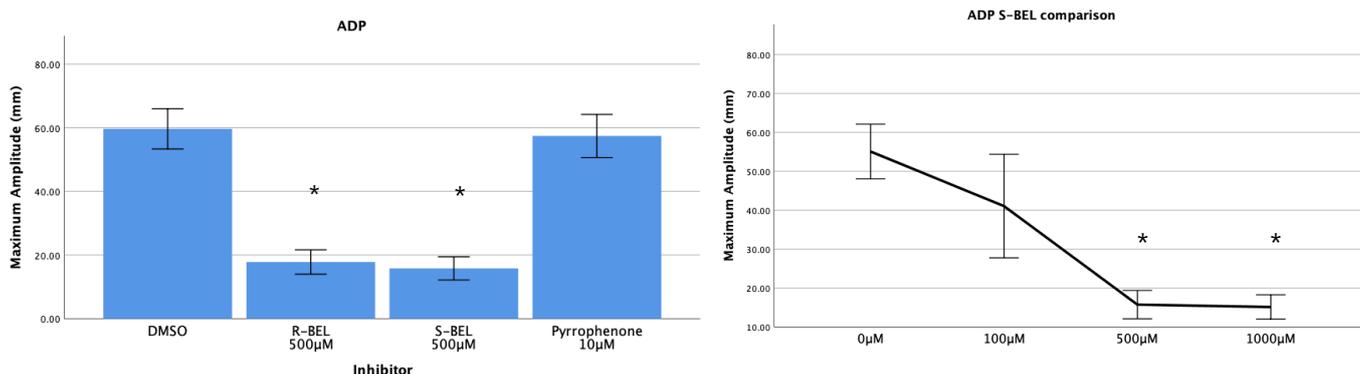


図 4. ADP 刺激に対する阻害剤の抑制効果と S-BEL の濃度依存性

(2) 脱顆粒

トロンビン刺激によるセロトニン分泌 (n=6) では、S-BEL のみ有意な抑制効果を認めた (S-BEL: 38.8 ± 12.2 ng/ml; R-BEL: 53.2 ± 24.4 ng/ml; Pyrro: 71.6 ± 35.8 ng/ml)。一方、コラーゲン刺激では、いずれの阻害剤も有意に抑制した (図 5)。

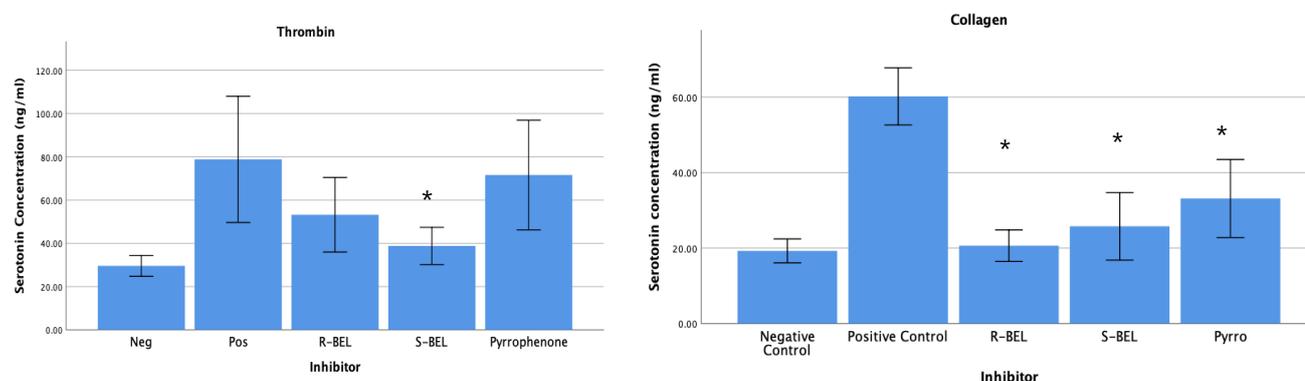


図 5. トロンビンおよびコラーゲン刺激によるセロトニン分泌

(3) エイコサノイド産生

エイコサノイド産生の評価としてトロンボキサン B₂を測定した結果、pyrrophenone および S-BEL はトロンビン刺激によるトロンボキサン B₂産生を有意に阻害したが、R-BEL では抑制効果はなかった (S-BEL: 31.2 ± 8.5 ng/ml; R-BEL: 43.0 ± 14.6 ng/ml; Pyrro: 9.9 ± 4.0 ng/ml)。コラーゲン刺激では pyrrophenone でのみ抑制効果を示した (図 6)。

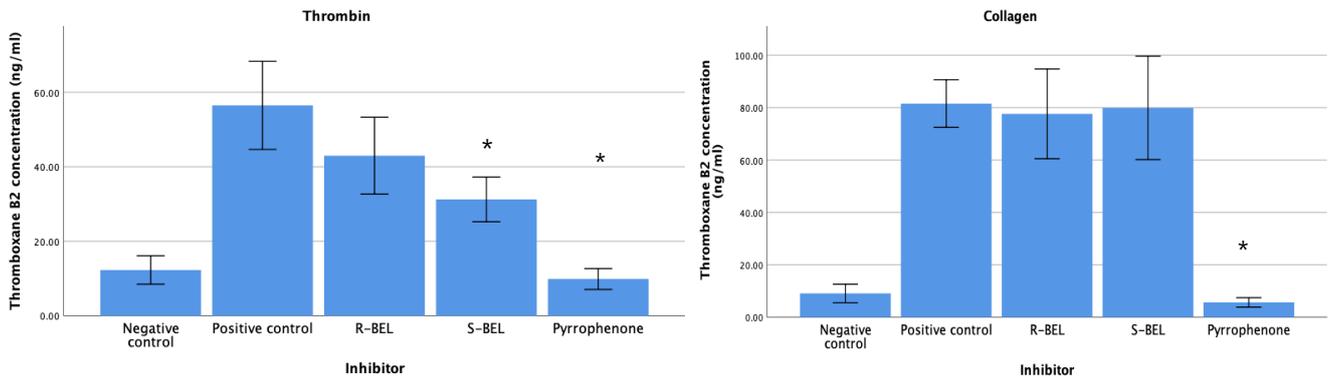


図 6. トロンビンおよびコラーゲン刺激によるトロンボキサン B₂産生

以上の結果から、トロンビン刺激に対する血小板凝集には iPLA₂、特に iPLA₂β が関与している可能性が考えられた。また、cPLA₂はエイコサノイド産生において重要な酵素であることが知られているが、トロンビン刺激による血小板凝集にはエイコサノイドは関与していない可能性がある。

トロンビンによる血小板の活性化には iPLA₂β の活性化を介した、エイコサノイド産生以外の別の機序が存在する可能性が示唆された。今後、ヒト血小板における細胞内カルシウムと iPLA₂β の関連性について研究を進める予定である。

学会発表

- (1) 漆畑直、相星淳一ほか. ヒト血小板機能におけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A₂ の役割. 第 47 回日本集中治療医学会学術集会. 2020 年 3 月 6 日.名古屋国際会議場 (名古屋)
- (2) Nao Urushibata, Junichi Aiboshi, et al. Unique roles of calcium-independent phospholipase A₂ in human platelet function. 80th Annual meeting of the American Association for the Surgery of Trauma and Clinical Congress of Acute Care Surgery. 2021 年 9 月 28 日-10 月 2 日. Atlanta, GA, USA.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 漆畑直、相星淳一、大友康裕
2. 発表標題 ヒト血小板機能におけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2の役割
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nao Urushibata, Junichi Aiboshi, et al.
2. 発表標題 Unique roles of calcium-independent phospholipase A2 in human platelet function.
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Association for the Surgery of Trauma (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 哲幸 (Kobayashi tetsuyuki) (50178323)	お茶の水女子大学・基幹研究院・教授 (12611)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	漆畑 直 (Urushibata Nao)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------