

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08587

研究課題名(和文) 緊急手術で使用可能な新規止血薬およびnectin-2を標的とした抗血小板薬の開発

研究課題名(英文) Development of the new hemostatic which is available by emergency surgery and the platelet agent

研究代表者

上妻 行則 (Kozuma, Yukinori)

熊本保健科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：90550145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工髄液(aCSF)及びaCSFに含まれる重炭酸塩が血小板活性化を増強することを明らかにしてきたが、aCSFが抗血小板薬使用時においても血小板機能を増強するか明らかでない。本研究では、aCSFが、抗血小板薬使用時においても血小板活性化を増強し、止血薬として有用であるか否か検証した。生理食塩水と比較しaCSFはaspirinやclopidogrelにより抑制された血小板活性化を増強した。また、aspirin投与により延長した出血時間がaCSFの存在下で短縮した。以上より、aCSFは抗血小板薬により抑制された血小板機能をも回復することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強力な止血薬として臨床応用の可能性が高い人工髄液に含まれる重炭酸塩をターゲットとした。本研究により、重炭酸塩による血小板活性化能の増強効果が抗血小板薬使用時においても実証されれば、患者QOL向上はもちろ、安全かつ安価な新規止血薬の発見となり、学術的価値は高く、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Previously, sodium bicarbonate in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) was found to facilitate physiological hemostasis by amplifying platelet aggregation. This study aimed to verify the amplification effect of aCSF on platelet-dependent hemostasis in the presence of antiplatelet agents. Compared with normal saline (NS), aCSF amplified aspirin or clopidogrel-inhibited platelet aggregation by recovering inhibited Platelet activation (phosphatidylserine (PS) exposure, CD62P expression, GPIIb activation, and MP release in platelets). The prolonged tail bleeding time in aspirin-injected mice was significantly shorter in the presence of aCSF than in NS. aCSF and sodium bicarbonate restore inhibited physiological hemostasis, even in the presence of aspirin or clopidogrel by restoring suppressed platelet aggregation.

研究分野：血栓止血学

キーワード：血小板 人工髄液 抗血小板薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外科手術における出血量の低減は、患者 QOL の向上および血小板輸血による感染症など重大な合併症のリスク回避のために重要である。近年、血栓症増加に伴い aspirin など抗血小板薬の服用患者が増加している。しかし、緊急手術の際に用いられる有効な止血薬はなく、新しい薬剤の開発が急務である。そこで申請者は、圧迫法や血小板輸血などに代わる安全かつ有効な止血方法の開発に着手した。血小板機能を亢進させる物質を探索した結果、人工髄液 (artificial cerebrospinal fluid :aCSF) 及び aCSF に含まれる重炭酸塩が血小板活性化を増強することを世界に先がけて発見した (Kozuma Y, *et al.* Neurosurgery 2016)。また、aCSF にはマウス出血時間を短縮させる効果があり、新規止血薬として有望である。しかし、aCSF が抗血小板薬使用時においても血小板機能を増強するかは明らかでない。

一方、申請者は、重炭酸塩の濃度を調節する血小板膜チャネルや膜構造に着目し、血小板機能を制御する分子を探索した。イムノグロブリンスーパーファミリーに属し、血小板膜タンパクである DNAM-1 は、申請者らのグループが巨核球・血小板に発現することを世界ではじめて報告した分子である (Kojima H, *et al.* J Biol Chem 2003)。申請者は、DNAM-1 リガンドである nectin-2 が血管内皮細胞に発現し、血小板機能を抑制する分子である可能性を見出した。さらに DNAM-1 ノックアウト (KO) マウスを用いた解析から、野生型より DNAM-1 KO マウスで、出血時間が短縮し、塩化鉄により誘導される微小血管の血栓形成が促進されていた。これらの研究成果から、nectin-2 と血小板上 DNAM-1 の相互作用により血小板活性化が負に制御されていることが推察された。しかし、nectin-2 による血小板活性化抑制の詳細な分子メカニズムは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでの研究において、aCSF 及び重炭酸塩が血小板活性化を増強し、新規止血薬として有望であること、nectin-2 に血小板機能の抑制効果がある可能性を見出した。そこで本研究では、血小板機能を増強し、マウス出血時間を短縮させる効果がある aCSF が、aspirin など抗血小板薬使用時においても血小板活性化を増強し、止血薬として有用であるかを明らかにすること、新規抗血小板薬の開発を目指して nectin-2 と DNAM-1 の相互作用および nectin-2 による血小板活性化抑制の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

抗血小板薬使用時における aCSF の効果の検討

ヒト血小板に aspirin などの抗血小板薬を添加し、抑制された血小板機能が、aCSF の使用により回復 / 増強するかを検討した。

in vitro での血小板機能解析

血小板凝集能 (血小板惹起物質 : ADP, collagen など)

血小板粘着能 (collagen, fibrinogen などへの血小板接着・形態変化を蛍光顕微鏡で観察)

血小板活性化マーカー測定 (active GP b, P-Selectinなどを flow cytometry で測定)

血小板内情報伝達系の解析 (免疫沈降法及び western blotting)

抗血小板薬投与マウスを用いた aCSF の効果

抗血小板薬投与マウスによる出血を重炭酸塩の使用により低減できるか検討した。マウスに

200 mg/kg の aspirin を投与した後、上記 *in vitro* での血小板機能解析 と下記項目について検討を行った。

in vivo でのマウス血小板機能解析

出血時間測定 (tail bleeding time で評価)

nectin-2 による血小板活性化抑制の分子メカニズムの解明

recombinant nectin-2 タンパク、DNAM-1 に対する特異的阻害抗体を用いて、nectin-2 と DNAM-1 の相互作用を上記 *in vitro* での血小板機能解析 や *in vivo* でのマウス血小板機能解析 の手法で解析した。

血栓モデルを用いた nectin-2 の効果の検討

recombinant nectin-2 タンパク をマウスに投与した後、塩化鉄により血栓を誘導し、nectin-2 による抗血小板・血栓作用を検証した。

4. 研究成果

抗血小板薬使用時における重炭酸塩の効果の検討

まず aCSF を使用し、抗血小板薬 aspirin によって抑制された血小板機能が回復するか検討した。Platelet rich plasma (PRP) を採取した後、aspirin を添加し、collagen で刺激すると血小板凝集能は約 25% に抑制されていたのに対して、aCSF の使用により 50% 程度まで回復した。この傾向は ADP で PRP を刺激した際にも認められた (aspirin: 50%, aspirin + aCSF: 75%)。次に、洗浄血小板を作製し、同様の検討を行ったところ、aspirin 添加後、collagen で刺激すると約 10% 程度に抑制された血小板凝集能が、aCSF 添加により 40% 程度まで回復した。また thrombin で洗浄血小板を刺激した際にも同様の傾向が認められた。次に、flow cytometry を用いて各種血小板活性化マーカーの測定を行った結果、phosphatidylserine (PS) 露出、活性化 GPIIb 血小板の割合、P-selectin 陽性率、microparticle (MP) 放出いづれにおいても aspirin 添加により抑制されたが、aCSF に使用により回復した。以上のことより、重炭酸塩を含有する aCSF は aspirin により抑制された血小板機能をも回復することが明らかとなった。

次に、抗血小板薬 clopidogrel 使用状況下においても aCSF が血小板機能を増強するか否かについて検証を行った。まず、血小板凝集能による評価を行った。Clopidogrel (終濃度: 2.5 μ M) 存在下で collagen (終濃度: 2 μ g/mL) で刺激すると凝集率は 26.4% であったが、aCSF 添加により凝集率は 57.1% と増強した。また、この傾向は clopidogrel (終濃度: 25 μ M) 存在下でも確認された。次に、flow cytometry を用いて血小板活性化マーカーの測定を行った。Clopidogrel (終濃度: 25 μ M) 存在下で血小板を collagen (終濃度: 5 μ g/mL) で刺激したところ、2.3% であった活性化 GPIIb 陽性血小板の割合が aCSF 添加により 11.7% と増強していた。さらに PS 露出を検証したところ、clopidogrel (終濃度: 25 μ M) 存在下で 2.1% であった PS 陽性血小板の割合も aCSF 添加により 10.2% に増強していた。以上のことから、aCSF は、aspirin のみならず clopidogrel 存在下でも人工髄液の使用により抑制された血小板機能が増強することが確認された。

さらに血小板粘着能に与える影響について検証した。Collagen をコーティングした chamber slide に 20 万 / μ L に調整した血小板を播種し、37 \cdot 1 時間反応後、FITC-抗 CD41 抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した結果、多くの血小板が偽足を伸ばし、粘着していた。一方、aspirin

(終濃度：50, 100 μM) 存在下では collagen への粘着能を阻害できず、この結果は clopidogrel (終濃度：2.5 μM) でも同様であった。次に、fibrinogen をコーティングし、同様の検証を行ったところ、血小板の粘着は aspirin の存在により抑制できた。一方、clopidogrel (終濃度：2.5 μM) 存在下では十分な抑制が認められなかったが、終濃度 25 μM で再検証したところ、粘着能は抑制された。次に、aspirin または clopidogrel により抑制された血小板粘着能を aCSF 添加により回復できるか検証したが、粘着能は回復しなかった。

最後に、情報伝達系の解析を行ったところ、collagen 刺激下で aspirin 添加により抑制された protein kinase C (PKC) リン酸化が aCSF 添加により回復した。

抗血小板薬投与マウスを用いた重炭酸塩の効果

8週齢の C57BL/6N マウスに aspirin 200 mg/kg または生理食塩水を腹腔内投与した後、血小板凝集能にて aspirin の効果を確認し、出血時間の測定を行った。生理食塩水添加群と比較し aspirin 添加群では出血時間が延長していたが、aCSF の使用により出血時間は短縮した (NS-NS: 264.6 \pm 100.7 s vs. ASA-NS: 826.0 \pm 304.5 s vs. ASA-aCSF: 502.0 \pm 68.9 s)。

nectin-2 による血小板活性化抑制の分子メカニズムと血栓モデルを用いた nectin-2 の効果の検討

aCSF に含まれる重炭酸塩の濃度を調節する血小板膜チャンネルや膜構造に着目し、かつ血小板機能を制御する分子を探索したところ、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する DNAM-1 のリガンドである nectin-2 が血管内皮細胞に発現し、血小板機能を抑制する分子である可能性を見出した。そこで、nectin-2 が血小板凝集能に与える影響を検証した。Thrombin receptor-activating peptide (TRAP)、collagen を agonist として血小板凝集能を測定したところ、nectin-2 存在下で血小板凝集能は抑制された。一方、血小板表面に発現する DNAM-1 への nectin-2 の特異的結合を確認するために抗 DNAM-1 抗体を添加したところ、nectin-2 添加により抑制された血小板凝集がキャンセルされた。次に nectin-2 により抑制される血小板活性化メカニズムを明らかにするために情報伝達系の解析を行った。その結果、TRAP により誘導される Akt, p44/42 のリン酸化が nectin-2 添加により低下していた。最後に recombinant nectin-2 タンパクをマウスに投与した後、出血時間の測定を行ったが、生理食塩水添加群との間に有意な差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furugaki T, Shigeta O, Kozuma Y, Tsukada T, Nakajima T, Sakamoto H, Mathis BJ, Hiramatsu Y, Suzuki Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 The effect of roller head pump on platelet deterioration during the simulated extracorporeal circulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 22-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10047-020-01192x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上妻行則、登尾一平	4. 巻 17
2. 論文標題 巨核球造血におけるアポトーシス関連タンパクの役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 熊本保健科学大学研究誌	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1. Shiba-Ishi A, Hong J, Hirokawa T, Kim Y, Nakagawa T, Sakashita S, Sakamoto N, Kozuma Y, Sato Y, Noguchi M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Stratifin inhibits SCFFB7 formation and blocks ubiquitination of oncoproteins during the course of lung adenocarcinogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 2809-2820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-3631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 登尾一平、山本隆敏、田邊香野、川口辰哉、上妻行則。
2. 発表標題 保管血小板における MP の経時的変化とその役割
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noboru I, Yamamoto T, Tanabe K, Kawaguchi T, Ikeda K, Kozuma Y.
2. 発表標題 Microparticles released from stored platelet increase coagulation ability.
3. 学会等名 The XXVIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 登尾一平、山本隆敏、田邊香野、川口辰哉、上妻行則
2. 発表標題 保存血小板における老化マーカーの変化
3. 学会等名 日本輸血細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 登尾一平、山本隆敏、田邊香野、川口辰哉、上妻行則
2. 発表標題 保存血小板における老化マーカーの変化
3. 学会等名 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 登尾一平、山本隆敏、田邊香野、川口辰哉、上妻行則
2. 発表標題 保存血小板における老化マーカーの有用性の検討
3. 学会等名 日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 I, Noboru, T. Yamamoto, K. Tanabe, T. Kawaguchi, Y. Kozuma
2. 発表標題 MMP is involved in platelet senescence on platelet concentrates.
3. 学会等名 Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Kozuma, I. Noboru, T. Kawaguchi, H. Ninomiya, T. Yamamoto
2. 発表標題 Artificial cerebrospinal fluid can recover platelet function inhibited by aspirin.
3. 学会等名 Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上妻行則、井上智佐子、山本哲哉、二宮治彦
2. 発表標題 神経内視鏡手術で用いられる人工髄液による aspirin 添加血小板の活性化増強効果
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2018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	二宮 治彦 (Ninomiya Haruhiko) (10198533)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山本 隆敏 (Yamamoto Takatoshi) (10746233)	熊本保健科学大学・保健科学部・講師 (37409)	
研究分担者	登尾 一平 (Noboruo Ippei) (00832007)	熊本保健科学大学・保健科学部・講師 (37409)	

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