

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08873

研究課題名(和文) 血小板産生と機能獲得におけるAutophagyの役割の解明

研究課題名(英文) regulation of autophagy flux in megakaryocyte-platelet lineage

研究代表者

古和田 周吾 (Kowata, Shugo)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：30418884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：巨核球から血小板が作られる過程では、proplateletより血小板前駆体に分配されたオルガネラは過剰であり、個々の血小板として成熟する過程でオルガネラ量が調整されてゆくことが示された。この過程をautophagyがオルガネラの消化を通じて制御していることが示された。この現象を利用して、ヒトの血小板減少症の鑑別診断に有用かを検討した。免疫性血小板減少症の患者の血小板ではAutophagyの亢進が起っており、その測定は鑑別診断の一助となる事が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、一つの巨核球(血小板産生細胞)が、数千の血小板を短時間で産生する際に、一旦ばらばらの大きさの血小板が放出されるが短時間のうちに、均一な血小板に変化している現象について、autophagy(細胞内の自食装置)が大きく関わっている事を示した。ついでこの現象を臨床検体で把握することにより、ヒトの血小板減少症において、臨床的に原因を調べる手掛かりとなりうることを示した。今後、血小板が関わる他の疾病(血栓症、脳卒中、白血病など)における、創薬(血栓予防薬や血小板数抑制薬)、検査法(血小板産生状況、血小板の未熟さや血栓傾向の程度)の理解が進む足場となる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In our studies of mice, autophagosome-rich platelets (ARPs), which possess autophagosomes detectable by the electron microscopic assay and the cationic fluorescent dye Cyto-ID, were increased in nascent platelets and proplatelet fragments. The dynamics of the proportion of ARPs (ARPs%) parallels that of RPs%, implying that ARPs are young platelets. To determine this property in human, we measured the proportion of ARPs% in patients with thrombocytopenia, including immune thrombocytopenia (ITP). We examined 34 patients with ITP and 52 patients with other types of thrombocytopenic disorders. Among thrombocytopenic patients, ARPs% was significantly elevated only in ITP patients ( $P < 0.01$ ). These data suggest that enhanced autophagy of platelets is a characteristic finding in patients with ITP and shows diagnostic potential in thrombocytopenia.

研究分野：血液内科学

キーワード：血小板産生 autophagy

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血小板産生過程において、巨核球は細胞分裂を精密に遂行するには不利な場(流血中)で短時間に数千の娘細胞(新生血小板)を細胞質分裂により産生している。その為、新生血小板はサイズ/オルガネラ数において不均一な細胞集団である。この後、個々の新生血小板で細胞分裂が行われサイズの調整が行われている。同時にオルガネラの数も適切に調整されているがそのメカニズムは明らかでない。しかし最終的にはオルガネラの数や種類も整えられた成熟血小板となる(図1A)。

Autophagyは、細胞の分化成熟やオルガネラの健全性を維持する為に、オルガネラや蛋白質などを適切に分解する細胞機能である。ヒト、マウス血小板ではAutophagyを駆動させる機構が備わっていることが既に報告されている(Ouseph MM. *et al.* Blood. 2015)。成熟血小板では成熟巨核球レベルのATG7-KOマウス(血小板のAutophagyが減少)では血小板の活性化能が低下するが、そのメカニズムは解明されていない(Ouseph MM. *et al.* Blood. 2015)。また起源的近縁で血小板同様に無核の細胞である赤血球では、Autophagyによりミトコンドリアの分解が行われ成熟赤血球への分化が行われている(Nishida Y, *et al.* Nature. 2009)。これらは、Autophagyは血小板産生過程で血小板活性化能の獲得に深く関与する可能性を示している。しかし具体的に何をを行っているかは明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究は、新生血小板と成熟血小板の間に存在する、細胞構造とAutophagy Fluxの違いに着目する。Autophagyの巨核球・血小板系での働きを、血小板の細胞構造と機能の視点から解析する。Autophagyにより新生血小板内で分解処理されるオルガネラを明らかにする。またAutophagy fluxを指標とした新たな臨床診断法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス血小板産生過程における autophagosome の解析

マウスの巨核球、proplatelet 形成巨核球、血小板前駆体(proplatelet 断片, 新生血小板)成熟血小板を分離した。

(A)電顕による細胞内構造の変化を評価。

(B)オルガネラをラベルして time lapse imaging。

(C)新生血小板の正常成熟過程における時間経過(Autophagy flux と処理オルガネラ量)の確認。(d)生化学的解析(新生血小板と成熟血小板でウエスタンブロット法)。

#### (2) ヒト末梢血での血小板内 autophagosome の定量

大型血小板を含む領域の細胞集団をゲーティングした後、CytoID 試薬で autophagosome をラベルし、各型の血小板減少患者でその比率を求めた。疾患特異性と診断能を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス血小板産生過程における autophagosome の解析

Proplatelet 及び新生血小板中には、小胞体(ER)近傍の位置に autophagosome を認めた。

骨髄巨核球自体には autophagosome は認められなかった。以上から autophagosome 形成は、

血小板産生時に始まり、成熟血小板には autophagosome が乏しいことが示された ( 図 1 B )。

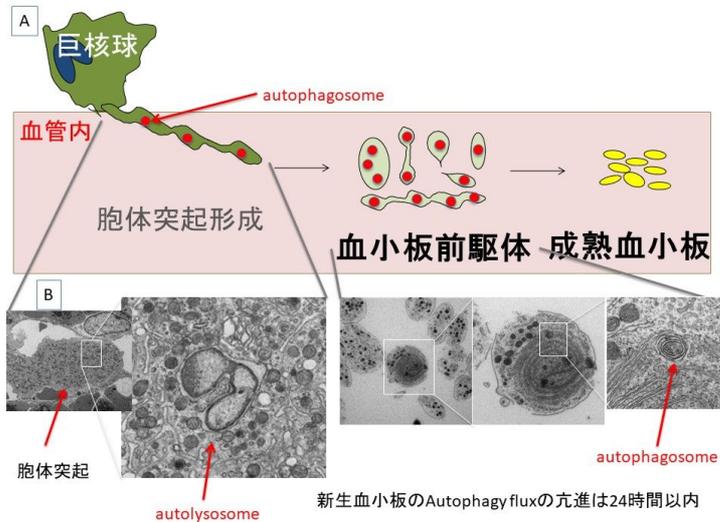


図 1 : 血小板産生過程における autophagosome の存在

A: 血小板産生過程

B: 電子顕微鏡

またミトコンドリアをラベルした巨核球を培養し proplatelet 形成過程を観察したところ、巨核球細胞質より粒子状のミトコンドリアが分配される過程が観察された。そこで血小板前駆体 ( 新生血小板 ) をマウス体内でラベルして、その後経時的に autophagosome 陽性血小板比率を追跡した所、24 時間で基底値に復した ( 図 2 上段 )。同様にオルガネラ量 ( ミトコンドリアおよび小胞体 ) も同じ挙動を示した ( 図 2 下段 )。これらの結果から、proplatelet より血小板前駆体に分配されたオルガネラは過剰であり、個々の血小板として成熟する過程でオルガネラ量が調整されてゆくことが示唆された。

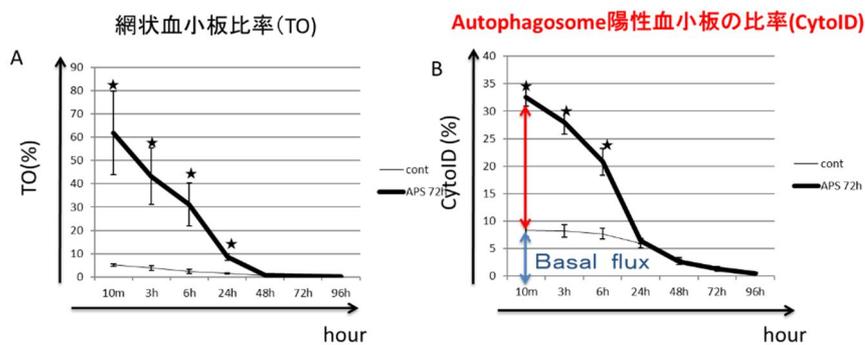
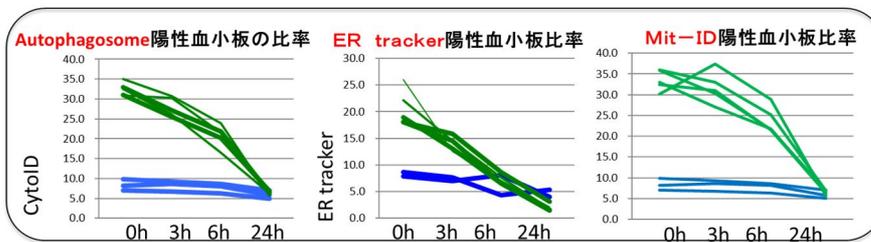


図 2 : 新生血小板の Autophagy 亢進とオルガネラ量

上段 :

autophagosome 量はおおむね 24 時間以内に基底値に復した。

下段 : オルガネラ量も、小胞体 ( ER )、ミトコンドリア ( Mit-ID ) も 24 時間以内に成熟血小板レベルに復した。



次に新生血小板と成熟血小板を、それぞれサイズごとに分離した後に培養し、autophagosome 形成率を測定した ( 図 3 )。また、Autophagosome 増加が、autophagy flux の増加によるものか autolysophagy の障害によるものかの鑑別の為に、培養下でクロロキンを加え autolysophagy を障害した。成熟血小板では autophagosome の増加は認めなかったが、新生血小板では autophagosome の増加を認めた。これらから新生血小板での autophagosome 増加は autolysophagy の障害では無く、autophagy flux 増加によることが示された。

### Autophagosome陽性血小板の比率 (CytolD)

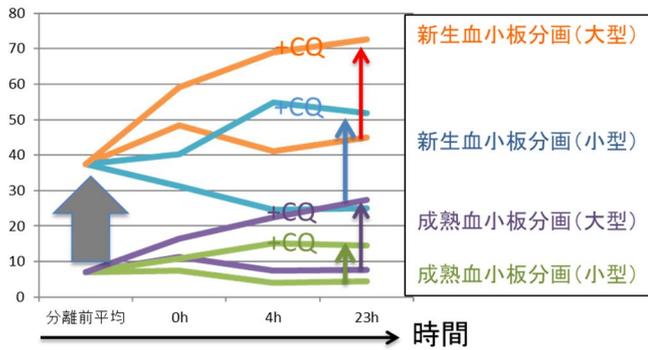


図 3 : 各血小板分画の autophagosome 形成率変化

CQ: クロロキン添加

### (2) ヒト末梢血での血小板内 autophagosome の定量

(1)の結果から、血小板前駆体(新生血小板)は24時間以内であれば、autophagosomeを形成しているという時間特異性があることが明らかとなった。次にこれをヒトの血小板減少症患者検体で調べ、疾患特異性の有無を検討した。

岩手医科大学血液腫瘍内科を受診、入院中の血小板減少症(血小板数が10万/ $\mu$ L以下)患者計86名を対象とした。検体は受診時の検体(約3ml)を用いた。本研究は岩手医科大学医学部倫理委員会の承認を得て行った(H29-114)。染色処理は、チアゾールオレンジ(網状血小板(RNA)同定の為の蛍光試薬)、CYTO-ID®(autophagosome同定の為の蛍光試薬)染色後、CD41-PEおよびCD235a-APC-Cy7で血小板および赤血球を標識した。3カラーフローサイトメトリーで解析した(図4)。

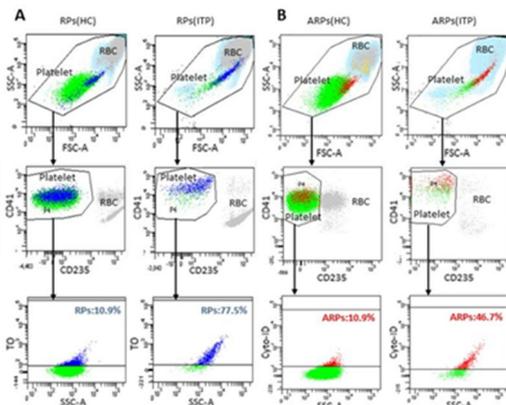


図 4 : フローサイトメトリーによるヒト血小板の autophagosome 陽性比率の方法

CYTO-ID®によって染色された Autophagosome が豊富な血小板を、Autophagosome 形成血小板 (Autophagosome rich platelets; ARPs) と定義した。チアゾールオレンジによって染色された RNA に富む血小板は、既報の通り網状血小板 (Reticulated platelets; RPs) である。有意差の検定は Tukey-Kramer 法を用い、P 値が 0.01 未満の場合を有意差ありとした。

ITP (免疫性血小板減少症) の患者では、他の原因による血小板減少症に比べて有意に autophagosome が豊富な血小板が多かった(図5上)。しかし一部の MDS(骨髄異形成症候群)患者では autophagosome の豊富な血小板が認められた。そこで ITP における診断の感度と特異度を検討した所、高い感度と特異性が示された(図5下)、一部の MDS を除外できないことが示された。

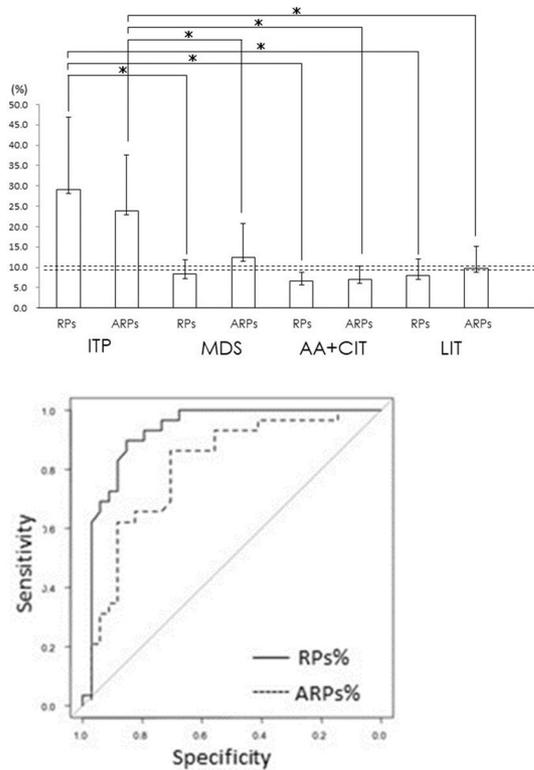


図5 ヒト検体による解析結果

上段：疾患ごとの autophagosome 形成血小板の比率の比較

ITP:免疫性血小板減少症

MDS:骨髄異形成症候群

AA:再生不良性貧血

CIT:化学療法後血小板減少

LIT:白血病による血小板減少

下段：ITP における網状血小板と autophagosome 形成血小板の感度と特異度。

RPs:網状血小板

ARPs: autophagosome 形成血小板

Sensitivity:感度

Specificity:特異度

これらの検討から、ITP 患者の血小板では Autophagy の亢進が起こっており、また、ARPs の測定は ITP 診断の一助となる可能性が示唆された。しかし一部の MDS の患者でも autophagosome 形成が亢進していた。このことは、一部の MDS では autophagy の障害が生じている可能性を示していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akihiro, Otsu., Shugo, Kowata., Yuki, Seki., Kazunori, Murai., Kazuki, Kiyohara., Shinri, Miyajima., Wataru, Izumita., Jiro, Hitomi., Yoji, Ishida., Shigeaki, Ito.	4. 巻 72
2. 論文標題 Autophagosome-rich Platelets are increased in immune thrombocytopenia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Iwate Medical Association	6. 最初と最後の頁 103-113
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura S, Imagawa J, Murai K, Hino M, Kitawaki T, Okada M, Tanaka H, Shindo M, Kumagai T, Ikezoe T, Uoshima N, Sato T, Watanabe R, Kowata S, Hayakawa M, Hosoki T, Ikeda K	4. 巻 7
2. 論文標題 Treatment-free remission after first-line dasatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukaemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lancet Haematol.	6. 最初と最後の頁 218-225
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 Oyake T, Takemasa-Fujisawa Y, Sugawara N, Mine T, Tsukushi Y, Hanamura I, Fujishima Y, Aoki Y, Kowata S, Ito S, Ishida Y. :	4. 巻 98
2. 論文標題 Doripenem versus meropenem as first-line empiric therapy of febrile neutropenia in patients with acute leukemia: a prospective, randomized study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann. Hematol	6. 最初と最後の頁 1209-1216
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 宮島真理, 古和田周吾, 関裕葵, 佐藤剛, 前田峻大, 阿保亜紀子, 岡野良昭, 佐々木了政, 小宅達郎, 伊藤薫樹	4. 巻 73
2. 論文標題 JAK2 V167F変異を伴う骨髄増殖性腫瘍の変異クローンの拡大はP D-1陽性CD8陽性T細胞の減少を伴う	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 岩手医学誌	6. 最初と最後の頁 165 176
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akihiro Otsu, Shugo Kowata, Yuki Seki, Kazunori Murai, Kazuki Kiyohara, Shinri Miyajima, Wataru Izumita, Jiro Hitomi, Yoji Ishida, Shigeki Ito.
2. 発表標題 Autophagosome-rich platelets are increased in patients with immune thrombocytopenia.
3. 学会等名 25st European Hematology Association (EHA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮島真理, 古和田周吾, 関裕葵, 佐藤剛, 前田峻大, 阿保亜紀子, 岡野良昭, 佐々木了政, 小宅達郎, 伊藤薫樹
2. 発表標題 JAK2V617F変異を伴う骨髄髄増殖性腫瘍におけるアレルバーデンとPD1陽性CD8T細胞の解析
3. 学会等名 第83回日本血液学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuo Oyake, Kazuki Kiyohara, Shinri Miyajima, Akihiro Otsu, Tadashi Shimoyama, Maki Nishiya, Norifumi Sugawara, Yoshiaki Okano, Wataru Izumita, Yashuhiko Tsukushi, Shugo Kowata, Shigeki Ito.
2. 発表標題 Presepsin is remarkably elevated in hemophagocytic syndrome patients with hematological disease: possibility for one another diagnostic biomarker.
3. 学会等名 25st European Hematology Association (EHA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大津瑛裕、古和田周吾、
2. 発表標題 Autophagosome-rich platelets are increased in immune thrombocytopenia
3. 学会等名 Tohoku Thrombosis seminar 2022
4. 発表年 2022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	佐々木 了政  (Sasaki Ryosei)  (40825501)	岩手医科大学・医学部・助教   (31201)	

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
---------	---------