

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16971

研究課題名(和文) リゾホスファチジルセリンの血栓止血分野における意義の解明および検査医学的応用

研究課題名(英文) The significance of lysophosphatidylserine in the field of thrombosis and hemostasis and clinical laboratory applications

研究代表者

西川 真子(Nishikawa, Masako)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30779369

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)：リゾリン脂質の一つであるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)は、その特異的受容体が2012年に同定され、リンパ球、マクロファージに対する免疫抑制作用などの強力な生理活性を有する新規リゾリン脂質メディエーターとして注目されてきている。LysoPSが急性冠症候群患者の血漿で上昇すること、LysoPS受容体が血小板に存在することなどを背景とし、LysoPSの血栓止血領域における役割を解明し、さらにその成果を検査医学的に応用することを目的とした。血小板はヘテロな細胞集団であり、個々の血小板を個別に評価する手法としてフローサイトメトリー法とFISH法を融合させた測定系を用いて解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リゾリン脂質は親水基である残基と疎水性部位を有するリン脂質の総称であり、申請者の所属する研究グループを含め、ヒト疾患との関連が盛んに研究されている。代表的なリゾリン脂質は、リゾホスファチジン酸(LPA)とスフィンゴシン1リン酸(S1P)であるが、申請者はLPA、S1Pに次ぐリゾリン脂質メディエーターとして、リゾホスファチジルセリン(LysoPS)に注目した。LysoPSは、2012年に3種の特異的G蛋白共役型受容体(GPR34、P2Y10、GPR174)が同定され、その作用は免疫学を中心に明らかになってきたが、血栓止血領域におけるLysoPSの意義は明らかになっていない。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidylserine (LysoPS), one of lysophospholipid, has attracted much attention as a novel lysophospholipid mediator with potent immunosuppressive activity against lymphocytes and macrophages. LysoPS is elevated in the plasma of patients with acute coronary syndromes, in which platelet activation is an important factor, and LysoPS receptors have been shown to be present on platelets.

The aim of this study was to elucidate the role of LysoPS in the area of thrombosis and hemostasis, and to further apply the results to clinical laboratory medicine. Platelets are a heterogeneous cell population, and we used a measurement system that combines flow cytometry and FISH as a method to evaluate each platelet individually.

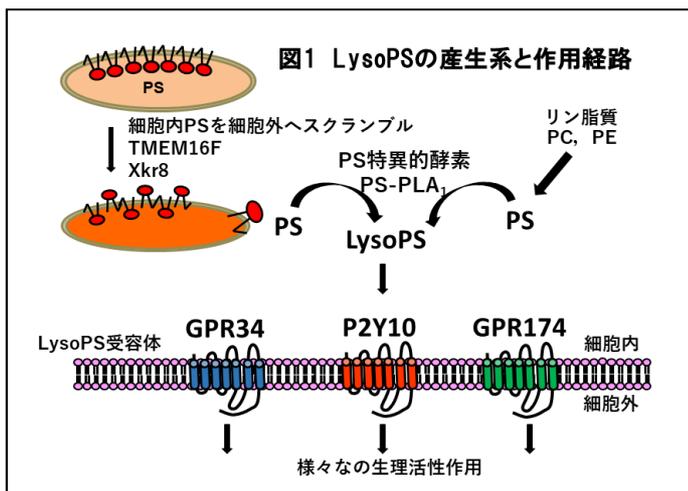
研究分野：臨床検査医学、血栓止血学

キーワード：血小板 リゾホスファチジルセリン 臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

リゾリン脂質は親水基である残基と疎水性部位を有するリン脂質の総称であり、申請者の所属する研究グループを含め、ヒト疾患との関連が盛んに研究されている。代表的なリゾリン脂質は、リゾホスファチジン酸(LPA)とスフィンゴシン 1 リン酸(S1P)であるが、申請者は LPA, S1P に次ぐリゾリン脂質メディエーターとして、リゾホスファチジルセリン(LysoPS)に注目した。LysoPS は、ホスファチジルセリン(PS)からホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A1(PS-PLA1)により生成され、2012年に3種の特異的G蛋白共役型受容体(GPR34, P2Y10, GPR174)が同定された(図1)。LysoPSは日本が世界をリードしている分野である。LysoPSはI型アレルギーを促進するマスト細胞の脱顆粒反応の促進、リンパ球やマクロファージによる免疫抑制作用、脳内免疫担当細胞であるミクログリアの抗炎症作用など、免疫学を中心に発展してきており、血栓止血領域におけるLysoPSの意義は、我々のグループ以外からの報告はない。

リゾリン脂質は一般的に血小板に多く含まれている。LPAは主にオートタキシン(ATX)により加水分解されて生じ、6種のG蛋白共役型受容体を通じて様々な疾患に関連するが、とくに血管生物学の分野において重要な役割を果たすことが明らかになっている。動脈硬化性疾患においては、血管内皮細胞の単球接着因子の発現を増加させ、単球接着を促進し、遊走因子としても働く。また、マクロファージのスカベンジャー受容体的一种であるCD36の発現を増加させ、酸化LDLの取り込みを促進させることでマクロファージの泡沫化を促進する。さらに、血小板の強力な活性化作用を有し、血小板凝集を促進することにより、急性冠症候群の原因であるプラーク破綻にも関係している。実際に急性冠症候群患者の血漿で増加するLPAの分子種を測定することで、その産生経路を解析した研究では、LysoPSやリゾホスファチジエタノールアミン、リゾホスファチジイルノシトールといったマイナーリゾリン脂質を含めた基質が増加することによりLPAが産生される経路が同定された。



そこで我々は、LysoPSと血小板の関連について検討してきた。その結果、(1)急性冠症候群患者の発症急性期の血漿LysoPS濃度、LysoPS産生酵素であるPS-PLA1濃度が有意に高値であること(Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015)(J Lipid Res, 2017)、(2)急性冠症候群患者において、血小板活性化のバイオマーカーであるセロトニンと血漿LysoPS濃度が有意な正の相関をもつこと(BBA Clinical, 2015)、血小板の活性化によりLysoPSが放出されること、血小板にLysoPS受容体が存在すること、血小板の産生や成熟にLysoPSが関連することなどを発見した。さらに、他のグループなどから提唱されているように、血小板の動脈硬化進展作用、LysoPS受容体2(P2Y10)の発現量が多いこと、急性冠動脈疾患の急性期に幼若血小板比率が著増すること、血小板増多性疾患において幼若血小板比率の高値は血栓症の危険因子であることを考慮すると、「LysoPSは血小板の産生、機能に関連するのではないかと考えられ、本研究の着想に至った。

世界的に罹患率、死亡率の高いアテローム血栓症の重要な寄与因子である血小板には、トロンピン受容体やADP受容体など、多数の血小板表面Gタンパク質共役受容体(GPCR)が存在する。血小板GPCRを介した刺激は血小板活性化のシグナル伝達を起こし、脳梗塞や心筋梗塞などの動脈血栓を引き起こすことが知られている。実際、血小板の凝集を阻害する抗血小板薬には血小板GPCRを標的とする薬剤が多く存在し、アテローム血栓症の予防および治療の中心的薬剤として広く臨床応用されている。クロピドグレルはP2Y12阻害剤であり、アスピリンはTXA2産生を抑制し血小板機能を障害する。抗血小板薬は脳梗塞、心筋梗塞発症後の二次予防には多くのエビデンスがある一方で、動脈血栓症ハイリスク症例に対する一次予防については、出血など副作用のリスクを超える明確なエビデンスは存在しない。そのため、動脈血栓症のリスク評価に関する新しい検査法の開発が求められている。

血小板疾患、血栓止血領域の臨床上の課題として、(1)世界的に罹患率の高い動脈硬化症の主なリスク因子であるLDLを低下させても冠動脈疾患を40%ほどしか低下させることができないという残存リスクの問題、(2)敗血症に続発するDICの病態形成(血栓形成と致死臓器障害)に

重要な役割を果たしている NETs 形成に、血小板が関わっていることは明らかだが、詳細な血小板の作用機序は不明であること、(3)難治性免疫性血小板減少性紫斑病に対して新規治療薬のトロンボポエチン受容体作動薬が導入されたが、2 割の患者には効果を認めないこと、などが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、LysoPS の血栓止血領域における役割を解明し、さらにその成果を臨床検査医学的に応用することを目的とし、血小板に注目して解析を行った。

3. 研究の方法

(1)健常人ヒト多血小板血漿に LysoPS および LysoPS 受容体各種アゴニストを添加し、血小板活性化マーカーである PF4 や血小板凝集を解析した。

(2)健常人ヒト洗浄血小板に各種血小板刺激物質を加え、各種リゾリン脂質を質量分析計(LC-MS/MS)を用いて測定した。

(3)アテローム血栓症の危険因子である糖尿病において、血小板容積、血小板受容体の発現増加による血小板易凝集性が関連すると想定されている。糖尿病患者における血小板容積および LysoPS 受容体などの血小板受容体の発現を解析した。通常の遺伝子解析は、サンプル中の包括的な遺伝子発現データを得ることはできるが、不均一な細胞集団である場合、個々のデータを平均化してしまう、という問題点がある。血小板はヘテロな細胞集団であり、個々の血小板を別々に解析する方法で病態への関与を評価する必要がある。そこで本研究では、細胞単位の表面抗原発現量の客観的な数・質的評価ができ、高い臨床的評価を受けているフローサイトメトリー法と FISH 法を融合させた測定系・PrimeFlow RNA Assay を用いて、個々の血小板細胞ごとの mRNA 発現量を解析するという手法をとった。これまでに血小板を用いた PrimeFlow RNA Assay の報告はなく、新しい特色のたる研究といえる。

4. 研究成果

(1)健常人ヒト多血小板血漿に LysoPS を添加し、血小板活性化マーカーである PF4 を測定したところ PF4 上昇を認めたが、ヒト洗浄血小板の検討では、LysoPS 単独および LysoPS 受容体各種アゴニスト単独添加の条件では、明らかな PF4 など活性化マーカーの上昇、血小板凝集を認めず、血小板活性化は認めなかった。

(2)健常人ヒト洗浄血小板に各種血小板刺激物質を加え、各種リゾリン脂質を質量分析計(LC-MS/MS)を用いて測定したところ、他の多くのリゾリン脂質はトロンピン刺激で放出がより顕著であったが、LysoPS はトロンピン刺激と比較してコラーゲン刺激において、血小板からの放出がより顕著であることを発見した。

(3)糖尿病患者 24 名、健常者 12 名の臨床血液検査検体を用いて、血小板容積および個々の血小板ごとの LysoPS 受容体 mRNA 発現量の解析・測定を行った。自動血球計数器を用いて血小板容積指数を比較すると、平均血小板容積(MPV)、血小板分布幅(PDW)、大型血小板比率(P-LCR)は糖尿病患者で有意に大きかったが、HbA1c との有意な相関は認めなかった。血小板受容体 mRNA 量を解析する方法として、フローサイトメトリー法と in situ hybridization (ISH)法を融合させた測定系 PrimeFlow RNA Assay を用いて P2Y12, TXA2 受容体(TXA2R)、血小板のリゾホスファチジン酸(LPA)シグナル伝達に抑制的に関与する LPA 受容体(LPA4R)、2-ミクログロブリン(B2M)の mRNA 解析を行った。CD41 陽性細胞を血小板としてゲートし、CD41 のパルス面積とパルス高を組み合わせたダブルレット除去により凝集細胞をゲートアウトし、positive control とした B2M mRNA 発現細胞のみを抽出した。検出細胞の径と CD41 は正の相関があったが、各 mRNA 量とは相関を認めなかった。糖尿病群と健常群の血小板受容体 mRNA 量を、B2M を基準として比較したところ、糖尿病群で LPA4R および P2Y12 の mRNA 量の平均値および第三四分位数の有意な増加を認めた。TXA2R は糖尿病群で減少傾向があったが、有意差は認めなかった。また、HbA1c 値が同じ患者においても受容体発現量の差異を認めた。

糖尿病患者において血小板容積の増加、P2Y12mRNA 量、LPA4RmRNA 量の増加を認めた PrimeFlow RNA Assay を用いて細胞単位の解析を行うことで、mRNA 量の多様性を明らかにすることができた。解析時にはダブルレットを多く認め、血小板の易凝集性や ISH 工程の影響が考えられた。検体処理のプロトコルについては更なる検討が必要と考えられた。HbA1c 値が同じ患者において受容体発現量の差異を認めており、糖尿病における血栓リスク関連の新規指標として応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川 真子, 蔵野 信, 矢富 裕
2. 発表標題 フローサイトメトリーを用いた糖尿病における血小板受容体のmRNA解析.
3. 学会等名 第43回 日本血栓止血学会学術集会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川真子、蔵野信、矢富裕
2. 発表標題 P2Y10の血小板機能における役割の検討
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 西川 真子, 蔵野 信, 名倉 豊, 岡崎 仁, 青木 淳賢, 矢富 裕.
2. 発表標題 フローサイトメトリーを用いたヒト血小板のリゾホスファチジルセリン受容体mRNA発現量解析の基礎検討.
3. 学会等名 第41回 日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川 真子, 蔵野 信, 名倉 豊, 岡崎 仁, 青木 淳賢, 矢富 裕
2. 発表標題 リゾホスファチジルセリンに着目した糖尿病における血小板易凝集性と新規血小板関連検査の開発.
3. 学会等名 第20回 日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川 真子, 蔵野 信, 谷口 寛, 矢富 裕.
2. 発表標題 健康人の血小板活性化により放出されるリゾリン脂質分子種の解析.
3. 学会等名 第66回 日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医学部附属病院 検査部 ホームページ http://lab-tky.umin.jp/achievements/2021.html 東京大学医学部附属病院 検査部 ホームページ http://lab-tky.umin.jp/achievements/2020.html 東京大学医学部附属病院 検査部 ホームページ http://lab-tky.umin.jp/achievements/2019.html

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

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