

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591153

研究課題名（和文） 血小板 TOLL-LIKE RECEPTOR の活性化とその臨床的意義

研究課題名（英文） Activation of platelet toll-like receptors and its clinical significance

研究代表者

羽藤 高明 (HATO TAKAAKI)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30172943

研究成果の概要（和文）：

我々は血小板に発現している toll-like 受容体 (TLR) の役割を検討した。血小板 TLR が細菌成分で刺激されると、別の受容体が活性化されて血小板粘着反応が亢進した。細菌感染症の重症型である敗血症患者の血清は TLR を介して血小板粘着反応を亢進させることを見出したが、これは血小板が様々な病原体と接触することで血小板粘着性が高まることを示唆しており、血小板も感染防御に重要な役割を担っている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We examined the role of toll-like receptors (TLR) on the platelet surface. Stimulation of platelet TLR with bacterial components promoted the platelet adhesive response through another platelet receptor. Serum from patients with sepsis, a severe bacterial infection, promoted the platelet adhesive response through platelet TLR. These results indicate that the linkage between platelets and various pathogens promotes the platelet adhesive activity, suggesting a crucial role of platelets on the host defense mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：血栓止血学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血小板、TOLL-like receptor、自然免疫、細菌感染症

## 1. 研究開始当初の背景

血液疾患では、好中球減少に起因する重篤な感染症がしばしば引き起こされ、予後の改善を阻む主因となっている。生体感染防御機

構の破綻が感染症の誘因であるものの、敗血症に伴う全身性炎症反応症候群にみられるように、細菌に対する強い炎症反応自体も重篤化の要因となりうる。感染防御機構の1つ

として Toll-like receptor (TLR) が同定され、マクロファージやリンパ球が病原体を認識する分子として機能していることが明らかにされてきた。しかし、これら免疫担当細胞以外での TLR の発現や機能についての研究は極めて少ない。我々は、以前から、血小板膜蛋白受容体の機能解析を行ってきたが、血小板は全身血管内皮の統合性変化を常時監視している細胞であり、我々は血小板も病原体認識細胞の候補になるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

血小板に発現している TLR の役割を明らかにすることを目的として、血小板 TLR と各リガンドとの結合が血小板機能におよぼす影響を検討し、また、重症感染症である敗血症患者の血清および血小板 TLR を解析することによって、血小板 TLR の機能的役割と臨床的意義を探索する。

## 3. 研究の方法

### 1) 血小板 TLR 刺激による血小板機能解析

血小板に発現している TLR を同定する。次いで TLR リガンドで刺激した血小板においてインテグリン $\alpha$ IIB $\beta$ 3 の活性化を調べ、その活性化経路について細胞内シグナル伝達分子阻害剤を用いて探索する。また、TLR 刺激血小板において、まず静的条件下での血小板粘着および凝集活性を検討する。他の TLR についても同様の検討を進め、また、より生理的な条件である流動状態下での細胞外マトリックスへの血小板粘着に対する各 TLR リガンドの影響を検討する。さらに、血液凝固反応を促進する組織因子結合マイクロパーティクルの集積と炎症関連蛋白である CD40L, P-selectin の発現に対する影響を検討し、TLR に共通する反応と、各 TLR に特異的な反応を区別する。

### 2) 血小板減少マウスにおける TLR 依存性反応の変化

TLR 刺激血小板の *in vivo* での役割と臨床的意義を検討するため、あらかじめ抗血小板抗体を投与して血小板減少を惹起させたマウスに TLR を投与して、正常血小板数のマウスと比較検討する。

### 3) 敗血症患者における血小板 TLR 活性化と血小板輸血の影響

敗血症患者の血清が血小板粘着活性を亢進させる作用のあることを見出した。そこで、敗血症患者から血小板を分離し、TLR リガンド占有率と血小板活性化反応を健常人と比較検討する。さらに血小板減少症を合併している敗血症患者に血小板輸血前後で血小板 TLR 反応を比較する。

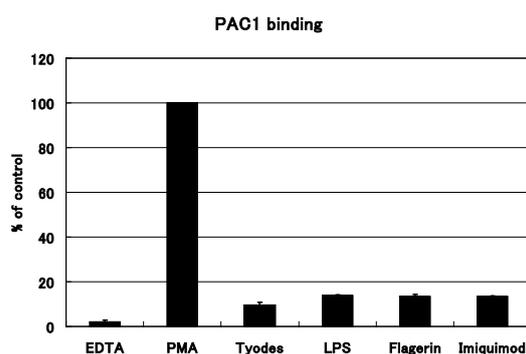
## 4. 研究成果

まず、RT-PCR 法を用いて血小板に発現している TLRs の種類を同定した。血小板には TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 TLR8 が発現していた(図 1)。

図 1 血小板における TLR の発現

次いで、血小板に発現している TLRs が  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 を活性化するか否かについて検討した。TLR4 のリガンドである Lipopolysaccharide(LPS)、TLR5 のリガンドである Flagerin、TLR7 のリガンドである Imiquimod を血小板と incubation した後、 $\alpha$ IIB $\beta$ 3 活性化型リガンド類似抗体 PAC1 との結合ならびに固層化した Fibrinogen との血小板粘着、血小板凝集を測定した。さらに、敗血症患者の血清を健常人血小板と incubation した後、固層化した Fibrinogen との血小板粘着を測定した。その結果、LPS および Flagerin、Imiquimod は PAC1 結合を増加させたが、ADP などの血小板アゴニストによる PAC1 結合量に比べて少なく、血小板凝集を惹起できなかった(図 2)。

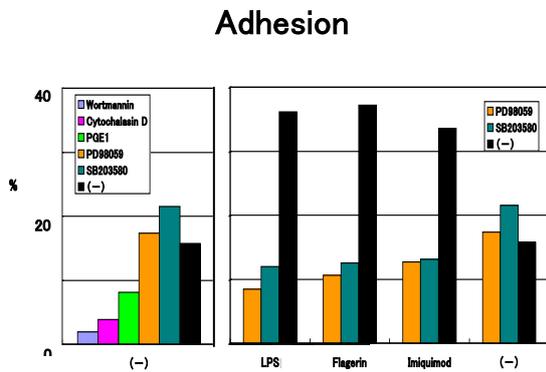
図 2 TLR リガンドによる  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 活性化



一方、固相化した Fibrinogen への血小板粘着は増加した。また、MAP キナーゼ阻害剤である PD98059 と SB202190 は、LPS や Flagerin、Imiquimod 非存在下での血小板粘着には影響しなかったが、これら TLRs リガンド存在下での血小板粘着の増加反応を抑

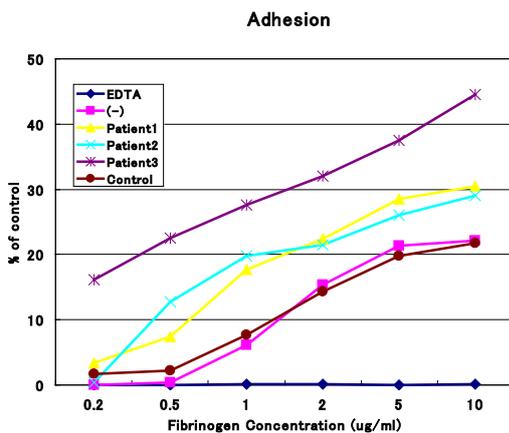
制した(図3)。

図3. 血小板 TLR 刺激による MAP kinase 依存性血小板粘着能亢進作用



また、敗血症患者の血清は固層化した Fibrinogen との血小板粘着を増加させた(図4)。

図4. 敗血症患者血清の血小板粘着活性亢進作用



以上の成績から、血小板に発現している TLR4、TLR5 と TLR7 へのリガンド結合は、MAP キナーゼ経路を介して  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を活性化し、血小板粘着を増加させることが示唆された。さらに、敗血症患者の血清は血小板粘着を促進したが、この知見は血小板が様々な病原体と接触することで  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 が活性化され、血小板粘着性が高まることを示唆しており、血小板も自然免疫応答で何らかの役割を担っている可能性があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Nakagawa K, Kumon Y, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation assay for platelet response to cilostazol. Platelets, 査読有、22: 135-142, 2011.
2. 新家敏之、吉岡ゆき、岡本康二、坂東史郎、村瀬光春、西宮達也、東太地、羽藤高明、安川正貴、大澤春彦 巨核球に形態異常を呈した CML の一症例 愛媛臨検技会誌 査読有、30:79-85, 2011.
3. Azuma T, Yamanouchi J, Inoue K, Kohno M, Narumi H, Fujiwara H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Derivative (1:18)(q10;q10) in essential thrombocythemia. Cancer Genet Cytogenet, 査読有、199:62-64, 2010
4. 山之内純、羽藤高明: プレドニゾロンが著効した後天性凝固第 V 因子インヒビターの症例 日本血栓止血学会誌 査読有、21:391-394, 2010.
5. Yamanouchi J, Hato T, Tamura T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Compound heterozygous mutations in the *PROS1* gene responsible for quantitative and qualitative protein S deficiency. Int J Hemato, 1, 査読有、90:537-539, 2009.
6. Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Azuma T, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M: Identification of a novel epitope derived from CML66 which is recognized by anti-leukaemia cytotoxic T lymphocytes. Br J Haematol, 査読有、46:115-118, 2009.
7. Tanimoto K, Yakushijin Y, Fujiwara H, Otsuka M, Ohshima K, Sugita A, Sakai A, Hato T, Hasegawa H, Yasukawa M: Clinical significance of co-expression of CD21 and LFA-1 in B-cell lymphoma. Int J Hematol, 査読有、89:497-507, 2009
8. Ochi T, Fujiwara H, Suemori K, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Kuzushima K, Yasukawa M: Aurora-A kinase: a novel target of cellular immunotherapy for leukemia. Blood, 査読有、113:66-74, 2009.
9. Matsubara E, Sakai I, Yamanouchi J, Fujiwara H, Yakushijin Y, Hato T, Shigemoto K, Yasukawa M: The role of zinc finger protein 521/early hematopoietic zinc finger protein in erythroid cell differentiation. J Biol Chem, 査読有、284:3480-3487, 2009.
10. Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Azuma T, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Hasegawa H, Yasukawa M: Identification of an epitope derived from CML66, a novel tumor-associated antigen

expressed broadly in human leukemia, recognized by human leukocyte antigen-A\*2402-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Sci*, 査読有、99:1414-1419, 2008.

11. 山之内純、阿部圭見、東太地、成見弘、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴 ノカルジアによる多発性筋膿瘍を併発した後天性血友病 *臨床血液* 査読有、50:495-498, 2009.

12. 村上雄一、山之内純、東太地、池田祐一、成見弘、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴 治療中に病的骨折を起こした骨原発悪性リンパ腫 *臨床血液* 査読有、50:187-191, 2009

13. Hato T, Yamanouchi J, Tamura T, Yakushijin Y, Sakai I, Yasukawa M: Cooperative role of the membrane-proximal and -distal residues of the integrin  $\beta 3$  cytoplasmic domain in regulation of talin-mediated  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  activation. *J Biol Chem*, 査読有、283:5662-5668, 2008.

[学会発表] (計6件)

1. Yamanouchi J, Hato T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: The  $\beta$  tail domain ( $\beta$ TD) in the integrin  $\beta 3$  subunit regulates  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  activation. 第72回日本血液学会学術集会 横浜、2010.9.24

2. 山之内純、羽藤高明 Toll-like receptors を介した血小板インテグリン  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  の活性化 第32回日本血栓止血学会学術集会 北九州、2009.6.5

3. Yamanouchi J, Hato T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Compound heterozygous mutations in the PROS1 gene responsible for quantitative and qualitative Protein S deficiency The 22<sup>nd</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Boston, USA 2009.7.13

4. Yamanouchi J, Hato T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Integrin  $\beta 3$  membrane-proximal and -distal residues cooperatively regulate talin-mediated  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  activation. The 22<sup>nd</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Boston, USA 2009.7.15

5. Yamanouchi J, Hato T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Integrin  $\beta 3$  membrane-proximal and -distal residues cooperatively regulate talin-mediated  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  activation. The 50<sup>th</sup> ASH annual meeting, San Francisco, USA 2008.12.6

6. 羽藤高明、山之内純、田村達司郎、薬師神芳洋、酒井郁也、藤原弘、安川正貴 インテグリン $\beta 3$  細胞内領域の膜近位部位と遠位

部位は $\alpha \text{IIb}\beta 3$  の活性化を協調制御している 第70回日本血液学会総会 京都、2008.10.10

[図書] (計2件)

1. 羽藤高明 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2009-2010, 南江堂 2009 pp116-122

2. 羽藤高明 HLA 検査 今日の臨床検査 2009-2010 南江堂, 2009 pp123-127

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽藤 高明 (HATO TAKAAKI)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30172943

(3) 連携研究者

山之内 純 (YAMANOUCHI JUN)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10423451

安川 正貴 (YASUKAWA MASAKI)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60127917