

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：37116

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21738

研究課題名（和文）COPD早期発見のための簡便法開発を目指したクロットバイオプシーの確立

研究課題名（英文）Establishment of clot biopsy aiming at development of a simple method for early detection of COPD

研究代表者

吉田 安宏（Yoshida, Yasuhiro）

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10309958

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：現在、定期健康診断時の血液検査によって多くの健康状態の情報が得られているが、その限界もあるのが現状である。そこで申請者は健康診断採血時に同時に行うことのできる、血餅溶解液を使ったクロットバイオプシーという新しい検査方法を開発した。この方法により、従来、血漿成分や細胞の特徴にとどまっていた情報を、細胞内タンパク質の情報まで拡げることができ、より詳細な個人の状態や病態を把握できる可能性がでてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、健康診断時には通常、産業廃棄物として廃棄されていた血餅（クロット）を利用した、新規の検査方法「クロットバイオプシー法」の開発に成功した。この新規手法により、血清だけでは得られなかった様々な健康状態に関する詳細な情報を収集することも可能になると考えられる。研究報告では、将来的なハイスループット法への転用にも可能性があることを示している。これらの試料を継続的に収集し、血清からの生化学検査情報と組み合わせることで、酸化ストレスなど健康寿命に関係する情報を数値化することも視野に入ってきた。それ故、健康立国を目指す日本社会への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：Currently, a lot of information about health conditions can be obtained through blood tests during regular health checkups, but there are limitations to this. Therefore, the applicant developed a new testing method called clot biopsy, which uses a clot lysate and can be performed at the same time as blood samples are taken for health checkups. This method makes it possible to expand the information obtained from the conventional method, which was previously limited to plasma components and cell characteristics, to information about intracellular proteins, making it possible to understand an individual's condition and pathology in more detail.

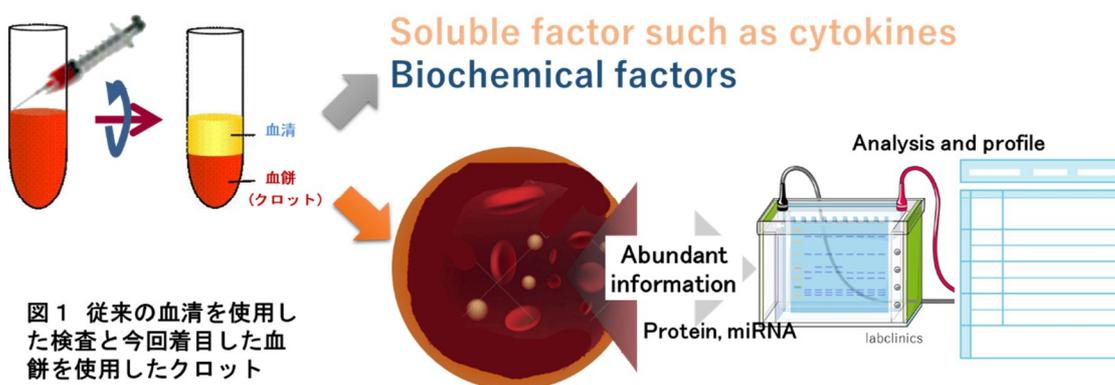
研究分野：免疫学

キーワード：クロットバイオプシー法 肺炎症モデル 血餅 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

2019年に日本初の免疫アレルギー疾患研究10か年戦略が発表され話題となった(厚生労働省HP: https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000172968_00005.html)。この戦略は、2030年を見据えた健康立国を目指すという大きな目標である。このような国策の中で、健康寿命の維持が大切であるという概念が社会的に定着してきている。健康と一言で表現しても、その要素は多岐にわたる。先の戦略の中でも、「疾患活動性や生活満足度の見える化」を謳っているものの、実際にそれらの状態を数値化することは容易ではない。こうした健康に関する情報を得る手段として長年貢献してきたのが定期健康診断である。その中でも、血液検査は簡便で多くの医療機関で主要なヒトの健康状態を知る情報取得手段として使用されている。しかしながら、検査に使用するサンプル量には限りがあり、また解析対象は液性因子や細胞の特徴に限られるため、得られる情報も必然的に限られてくる。

そこで申請者は、健康診断時における採血の汎用性を広げるために、血清調整時に沈殿物として廃棄されていた血餅(クロット)に焦点を当てた検査方法を提案した(図1)。



2. 研究の目的

健康状態の把握として、現在では簡便で有用な採血を利用する機会が多い。これは試料の収集のしやすさや、複雑なステップ・大掛かりな装置を必要としない利点があげられる。その際、血清或いは血漿が検査に用いられるが、血清を調整した残りの血餅は産業廃棄物となる。血清も量的に限界があり、また液性因子を標的にしかできない弱点がある。加えてサンプルの収集時に様々な制約がかかることも少なくなく、繰り返しの同一人物(患者)からの試料収集は容易ではないのが現状である。

そこで申請者は、血清調整時に沈殿物として捨てられていた血餅(クロット)に着目し(図1)、それを有効利用することで新たな情報を得ることができないか、という発想に至った。昨今、がんの診断では血清からの情報を得るリキッドバイオプシーの研究が盛んに行われているが、本研究課題ではその残りの部分をも利用する方式で、言い換えればクロット(血餅)バイオプシーによる、より多くの情報収集を目指すという、新規のアプローチを提唱している。クロットバイオプシーを用いる利点は、上記の廃物利用的な部分の他に、血餅に含まれるタンパク質や mRNA の両方を利用できる点が挙げられる。これらの組み合わせで、血清では収集できなかった種々の健康状態の詳細な情報を検討することが可能になると考えられる。本研究では、肺の炎症を誘導したマウスモデルを用い、クロットバイオプシーによる種々の炎症マーカーが検出されるかを検討した。

3. 研究の方法

まず、野生型マウスからクロットを調整し、クロット溶解液で実際にタンパク質が検出できるかをウエスタンブロット法で検討する。

次に、クロットバイオプシー法の有用性を確認するため、2種類の肺炎モデルマウスを確立した。

[モデルマウス]

肺の炎症モデルとして汎用されているプレオマイシン誘導肺炎モデルマウスを作成する。肺線維症モデルの場合、通常長い期間の投与をするが、急性の炎症モデルを確立するため、プレオマイシン 0.5 mg を気管内投与し、3日後に解剖を行った。

[モデルマウス]

タバコ成分抽出物として一般的に使用されている 3R4F Research Cigarette の生食抽出物(1%、バブル法にて調整)を、マウスに気管内投与し COPD モデルマウスを作成した。対照群には溶媒である DMSO (0.05%) を用いた。投与後、24 時間で解剖した。

[血液サンプルの収集] 麻酔後、マウスの心臓から採血を行う。その後開腹し、生体の情報を得

るため、肺胞洗浄液を調整する。血液を静置し遠心分離後、血清と血餅に分ける。その血餅を使用し、血餅溶解液を調整する。

[解析項目] 血餅を種々の界面活性剤 (NP40, Triton, SDS など) を含む溶解液で処理後、PBS で段階希釈系列を準備する。電気泳動後、タンパク質をウエスタンブロット法で解析し血餅由来物質の検出感度を評価する (図 2)。



図2 クロットバイオプシーの流れ 採取した血液は遠心することで血清と血餅に分離される。その後、一定の重量濃度になるように血餅溶解液でクロットを溶解し、タンパク質解析用の試料とする。

[炎症の有無の確認] 肺胞洗浄液を採取し、細胞数をカウントする。また、炎症の確認として血清成分または肺胞洗浄液を用いた炎症指標サイトカイン IL-6 や TNF- α を ELISA 法で解析する。加えて、肺胞洗浄液中の細胞のクロット溶解液を用い、活性化マーカーである nuclear factor-kappa B (NF- κ B, p65) をウエスタンブロット法で調べる。転写因子の活性を確認するために、ゲルシフト法を行う。

以上から血餅成分と血清・肺胞洗浄液由来物質との比較で相関が見られるかを検討する。

4. 研究成果

(1) クロット溶解液の調整

まず、クロット溶解液でウエスタンブロット法によるタンパク質の検出ができるかを検証した。図3に示すように、細胞溶解液(5 mg/mL 溶解液に調整)で観察される、クリアなバンドが検出された。レーンEでは対象として血清サンプルを電気泳動しているが、このサンプルではバンドは観察されなかった。

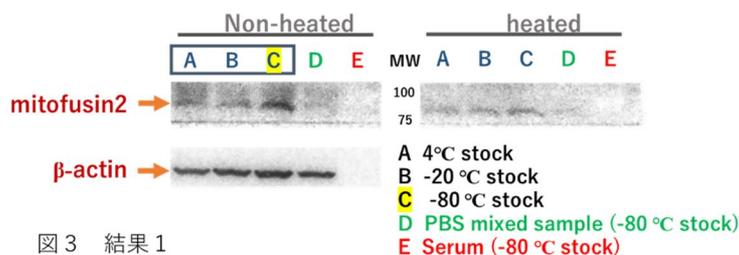


図3 結果1

次に、クロットの保存状況が検出感度に及ぼす影響を調べた。図3A~Cのように3種類の保存状態のものを準備した。結果はどのサンプルも検出されたものの、-80 保存サンプルで最も良い結果が得られた。レーンDではクロットを調整する際、PBS で希釈したものを-80 で保存したサンプルを電気泳動している。こちらも冷蔵保存の場合と同程度の検出感度であった。また、ウエスタンブロットを行う際に、通常タンパク質を煮沸してローディングするが、図3のように、煮沸をしないほうが、クリアなバンドが検出された。これは、クロット中に細胞由来の様々なタンパク分解に関わる物質が存在することが影響しているのかもしれない。

(2) クロットバイオプシーによる肺炎症の解析

肺炎症を確立したマウスモデル(プレオマイシン誘導肺炎症モデル)からクロットバイオプシーを実施し、その試料から炎症反応に関わる分子的基盤を分析した。

まず、炎症が確立されているかを、肺胞洗浄液中の細胞数とサイトカイン量を測定し、検討した。図4に示すように、肺胞洗浄液中の細胞数は、プレオマイシン投与により上昇し、IL-6 の産生も認められた(図はマウス2匹の結果)。IL-6 産生の上昇は、肺胞洗浄液で血

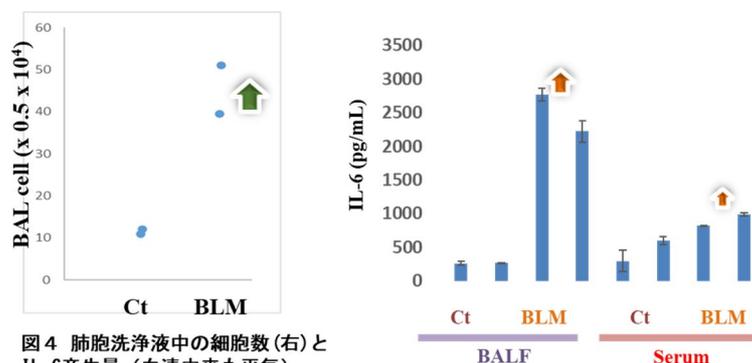


図4 肺胞洗浄液中の細胞数(右)とIL-6産生量(血清由来も平気)

漿の上昇し、IL-6 の産生も認められた(図はマウス2匹の結果)。IL-6 産生の上昇は、肺胞洗浄液で血

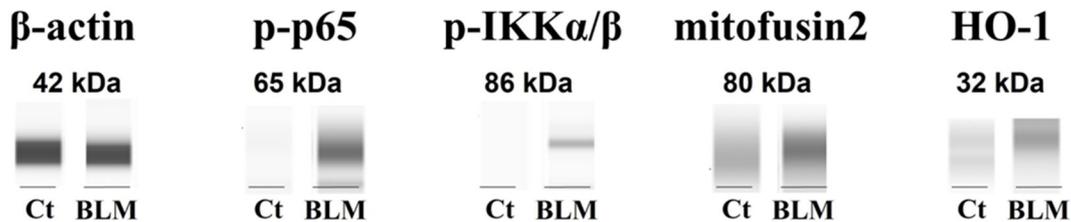


図5 クロットバイオプシー溶解液によるイムノブロット βアクチンを内在参照タンパク質とし、NF-κBシグナルに関連したリン酸化p65、そのリン酸化を担うIKKα/β、ミトコンドリアタンパク質マイトフュージン2 (mitofusin2)、酸化ストレスマーカーHO-1の発現をウエスタンブロット法で検出した。Ct:対照群、BLM:ブレオマイシン処理群

清のものより顕著であった。次に、マウス血液から調整した血餅を用いクロット溶解液を調整した。このクロット溶解液を用いて、イムノ（ウエスタン）ブロットを行った結果が図5である。これらの結果から種々のタンパク質の検出が可能であることが示唆された。特に炎症反応が起きている場合に観察されるNF-κBの構成因子であり、活性化型であるリン酸化p65を検出できることは興味深い。このことはリン酸化の状態を保持したままタンパク質をクロットバイオプシーで調整できることを示している。加えて、そのp65をリン酸化するキナーゼであるIKKα/βのリン酸化も検出され、肺炎モデルで亢進していることが確認された。試料中からはミトコンドリア由来のタンパク質であるマイトフュージン2も検出されており、細胞内小器官由来のタンパク質も解析可能であることが示された。炎症時に観察される酸化ストレスの代表的なマーカーであるHeme Oxygenase (HO)-1も検出され、クロットバイオプシー試料を用いた肺炎分子基盤解析の可能性が強く示唆される結果となった。

また特筆すべき点は、クロットバイオプシー試料を調整する際に、タンパク質の活性を保持したまま試料を調整できる点である。先に述べたように、NF-κBの構成因子p65のリン酸化が観察されているが、p65がリン酸化されるとNF-κB複合体はDNA結合能を獲得する。その結果、転写活性を有する。そこでDNA結合能を調べるゲルシフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay法)を行った。転写因子NF-κBに特異的なプローブ (DNA) に結合しているクロット溶解液由来のタンパク質が観察された (図6)。即ち、クロットバイオプシー試料中に転写活性を持つタンパク質を保持したまま保存できることを意味しており、このことから、クロットバイオプシーは量的変化に加え、質的变化の解析の可能性も秘めていることが示された。

これらクロットバイオプシーで得られた試料は、-80℃で保存可能である。このことは、少量のクロットバイオプシー後に試料を保存し、必要になった時に随時解析を行える利点を示している。

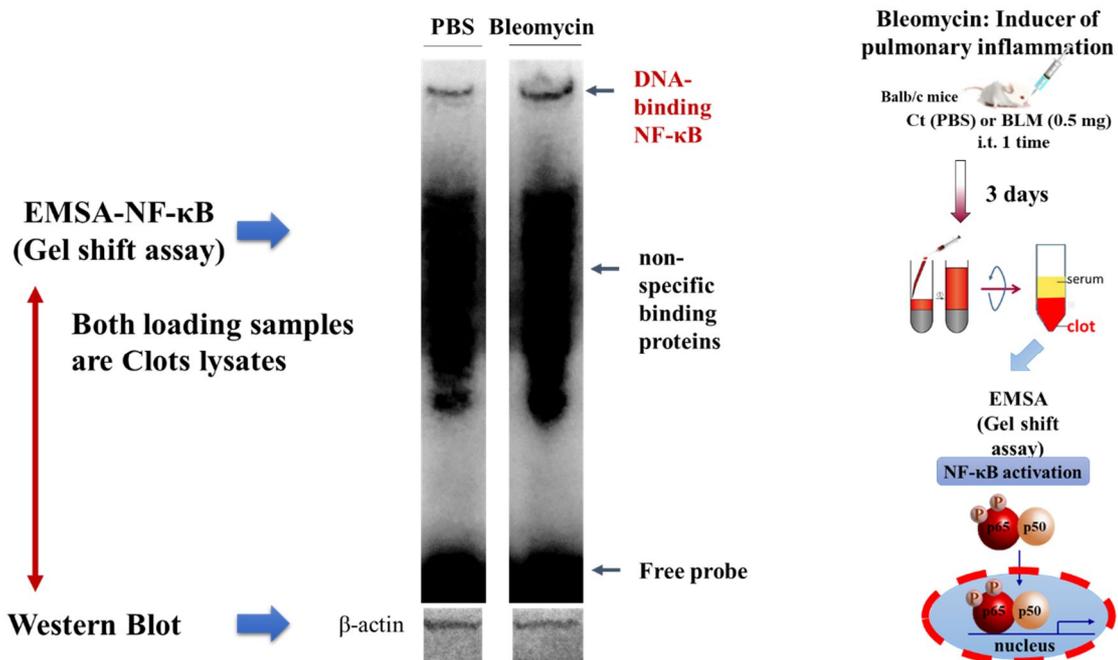


図6 ゲルシフト法による活性化NF-κBとDNA複合体の検出

次に、違う肺炎モデルマウスを作成し、クロットバイオプシーの有用性を検証した。喫煙が健康に及ぼす様々な影響は枚挙にいとまがない。そこで、タバコ成分抽出物の標準物質として

汎用されている 3R4F Research Cigarette の生食抽出物（1%、バブル法にて調整）を用い、マウス気管内投与による COPD モデルマウスを作成した。対照群には溶媒である DMSO（0.05%）を用いた。

まず、炎症が確立されているかを、肺胞洗浄液中の細胞数とサイトカイン量を測定し、検討した。図7が示すように、肺胞洗浄液中の細胞数は、3R4F 投与により上昇傾向がみられるものの、統計的優位差は認められなかった。

次に、マウス血液から調整した血餅をクロットバイオプシー用の溶解液で懸濁し、クロット溶解液を調整した。このクロット溶解液を用いて、ウエスタブロットを行った。酸化ストレスマーカーである HO-1 の増強傾向が示された。

以上から、特定のモデルだけでなく、種々のマウスモデルにクロットバイオプシーが応用できることが示された。

[おわりに]

近年、がんの診断において、リキッドバイオプシーから得られる情報を利用した研究が確立しつつある。本研究では、そのリキッドではなく、残りのクロットをも利用するクロットバイオプシーという新規の手法を提唱した。この新規手法で、血清では得られなかった様々な健康状態に関する詳細な情報を収集することが可能になると考えられる。これらの試料を継続的に収集し、血清の生化学検査情報と組み合わせることで、酸化ストレスなど、健康寿命に関する情報を数値化することができるかもしれない。

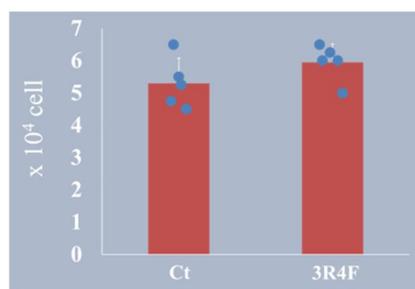


図7 肺胞洗浄液中の細胞数

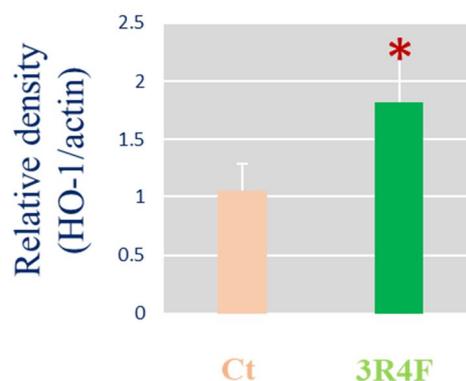
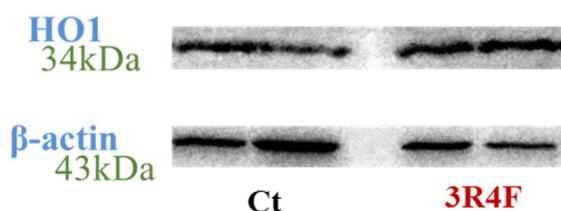


図8クロットバイオプシー溶解液によるイムノブロット β アクトチンを内在参照タンパク質とし、酸化ストレスマーカーHO-1の発現をウエスタブロット法で検出した（左図）。4匹の相対検出バンドの結果 Ct:対照群 3R4F:タバコ抽出液

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Shen Mengyue, Wang Duo, Sennari Yusuke, Zeng Zirui, Baba Ryoko, Morimoto Hiroyuki, Kitamura Noriaki, Nakanishi Tsukasa, Tsukada Junichi, Ueno Masanobu, Todoroki Yasuyuki, Iwata Shigeru, Yonezawa Tomo, Tanaka Yoshiya, Osada Yoshio, Yoshida Yasuhiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Pentacyclic triterpenoid ursolic acid induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in adult T-cell leukemia MT-4 cells to promote surrounding cell growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 118-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-022-01707-x	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 Yuan Song, Ryuji Okazaki, Yasuhiro Yoshida	4. 巻 122
2. 論文標題 Senescence-associated secretory phenotype and activation of NF- B in splenocytes of old mice exposed to irradiation at a young age	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dev Comp Immunol	6. 最初と最後の頁 104124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2021.104124	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 Zeng Zirui, Yoshida Yasuhiro, Wang Duo, Fujii Yuri, Shen Mengyue, Mimura Tatsuya, Tanaka Yoshiya	4. 巻 13
2. 論文標題 Inflammatory Cytokines and Chemokines Are Synergistically Induced in a ROS-Dependent Manner by a Co-Culture of Corneal Epithelial Cells and Neutrophil-like Cells in the Presence of Particulate Matter	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox13040467	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 Wang Duo, Zeng Zirui, Shen Mengyue, Okazaki Ryuji, Miyata Hironori, Yonezawa Tomo, Yoshida Yasuhiro	4. 巻 24
2. 論文標題 ATP Consumption Is Coupled with Endocytosis in Exudated Neutrophils	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9039 ~ 9039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24109039	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 吉田安宏	4. 巻 6
2. 論文標題 肺炎症を検出するクロットバイオプシー法の確立	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 62-65
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 吉田安宏	4. 巻 43
2. 論文標題 クロットバイオプシー法を利用した新規診断法確立への試み	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 77-80
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 吉田安宏	4. 巻 43
2. 論文標題 クロットバイオプシー法のご紹介 新規診断法確立への試みー	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 83-86
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 吉田安宏	4. 巻 44
2. 論文標題 炎症反応検出を目指したクロットバイオプシー法のご紹介 新規診断法確立への挑戦	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 48-51
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 吉田安宏	4. 巻 39
2. 論文標題 炎症反応検出を目指したクロットバイオプシー法のご紹介 新規診断法確立への挑戦	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 65-68
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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yasuhiro Yoshida, Duo WANG, Zirui ZENG, Mengyue SHEN
2. 発表標題 ClotBiopsy:New methods for lung inflammation
3. 学会等名 CBI学会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Yoshida
2. 発表標題 Establishment of lung inflammation model evaluation method by clot biopsy
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (ワークショップ招待講演、幕張) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田安宏、王鐸、曾子ゼイ
2. 発表標題 Clot biopsy is useful for evaluating lung inflammation
3. 学会等名 第22回分子予防環境医学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田安宏
2. 発表標題 新規炎症マーカー探索手法としてのクロットバイオプシー開発
3. 学会等名 第14回JBFシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshida Y
2. 発表標題 Established imaging analysis for endocytosis of particulate matters
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Duo Wang, Yasuhiro Yoshida
2. 発表標題 粒子状物質の生体影響を測定するレポーター細胞の開発
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida Y
2. 発表標題 Cellular senescence and inflammaging in the splenocytes of old mice exposed to irradiation at a young age
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Duo Wang, Yasuhiro Yoshida
2. 発表標題 粒子状物質の生体影響を測定するレポーター細胞の開発
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Duo Wang, Ryuji Okazaki, Yasuhiro Yoshida
2. 発表標題 The NF- B involved in metallothionein regulatory endocytosis of neutrophils.
3. 学会等名 第30回金属の関与する生体関連反応シンポジウムSRM2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王?, 三宅伸完, 岡崎龍史, 吉田安宏
2. 発表標題 好中球をモチーフにした環境汚染物質の生体影響評価法の開発
3. 学会等名 第39回産業医科大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Duo Wang, Yasuhiro Yoshida
2. 発表標題 Dynamin inhibitor can inhibit neutrophil endocytosis of particulate matter (PM) but not affect macrophage endocytosis
3. 学会等名 第52年回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Yoshida, Song Y, Ryuji Okazaki.
2. 発表標題 SASP and activation of NF- B in splenocytes of old mice exposed to irradiation
3. 学会等名 The 6th ICOSA Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida Y
2. 発表標題 Established imaging analysis for endocytosis of particulate matters
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Yoshida
2. 発表標題 Triterpenoid Antitumor Agents on ATL Cells and their Mechanism
3. 学会等名 The 19th Annual Congress of International Drug Discovery Science &Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Yoshida
2. 発表標題 血清診断代替法を目指したクロットバイオプシー法の確立
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Yoshida
2. 発表標題 タバコ副流煙を含むPM2.5を使った炎症モデルマウスの樹立とその解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Yoshida, Zirui Zeng, Duo Wang
2. 発表標題 Inflammatory cytokines and chemokines are synergistically induced by co-culture of corneal epithelial cells and neutrophils in the presence of particulate matter.
3. 学会等名 European Congress of Immunology (ECI)（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 血液由来血餅（クロット）を用いたタンパク質およびエンドソーム解析のための試料調整法の確立	発明者 吉田安宏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-041239	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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