

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17328

研究課題名（和文）低体温症において血小板が活性化される真の意義 -生理学的機能解析と生体への影響-

研究課題名（英文）The true significance of platelet activation in hypothermia - physiological functional analysis and biological effects.

研究代表者

堀岡 希衣 (HORIOKA, KIE)

国際医療福祉大学・医学部・助教

研究者番号：20897730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、低体温症における活性化血小板の機能を明らかにすることを目的とし、低体温時の活性化血小板が放出する血小板由来細胞外小胞（platelet-derived microvesicles; PDMVs）やそれに内包される分子を解析し、以下の結果を得た。(1)脾臓および末梢血中血小板の網羅的遺伝子から、低体温によって活性化された血小板は組織修復に関わる因子を放出することが判明した。(2)低体温時にはPDMVが脾臓内血小板から放出されることを証明した。(3)低体温の脾臓内血小板から放出されたPDMVには組織修復因子を内包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

本研究成果から、低体温時の脾臓内血小板活性化がPDMVsを放出すること、さらにPDMVsに組織修復因子を内包するという新たな知見を得ることができた。今後、低体温時に生じる生体へのダメージや活性化血小板やPDMVsの作用対象臓器を解析することによって、活性化血小板やPDMVsが生体に与える組織修復作用機序を解明できる可能性がある。これらの成果は、救急医学における低体温症治療の一助になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the function of activated platelets in hypothermia by analysing platelet-derived microvesicles (PDMVs) released by activated platelets during hypothermia and the molecules encapsulated in them, with the following results. (1) A comprehensive genetic analysis of platelets in the spleen and peripheral blood revealed that platelets activated by hypothermia release factors involved in tissue repair. (2) PDMV was demonstrated to be released from platelets in the spleen during hypothermia. (3) PDMV released from hypothermic intrasplenic platelets contained tissue repair factors.

研究分野：法医学

キーワード：低体温症 血小板 脾臓 PDMV

1. 研究開始当初の背景

低体温症は、深部体温が 35°C以下に低下することで惹き起こされる症状の総称であり、その最悪の転帰が死（凍死）である。本邦の凍死者数は年々増加しており、その原因として登山中の遭難事故等の増加だけではなく、独居高齢者や老老介護者の増加といった社会的要因を背景に低体温症から死に至るケースが多く、社会医学として法医学分野での研究は必須である。偶発性低体温症の重症例は死亡率が約 40%と高く、Hypothermia STUDY, 2011（日本救急医学会）では、低体温症の約 10%に脳梗塞や脳出血といった血液凝固能障害を起因とする血管障害の合併により、二次的に救命困難となる例が問題となっている。しかし、低体温症に関する分子病態を明らかにした報告はごく限られており、血液凝固機能障害の機構は不明な点が多い。

血液凝固機構の重要な因子の1つが、血小板である。血小板は、障害を受けた血管内皮細胞と接着し、集簇した血小板同士が次々と活性化することで、血栓形成を促進する（Meijden P. *et al.* *Nat Rev Cardiol.* 16: 166-179, 2019）。一方で、血小板は血液凝固機能の他にも、血管新生や器官形成・再生といった機能を有しており、創傷の治癒過程において重要な役割を果たすことが報告されている（Etulain J. *Platelets.* 29: 556-568, 2018）。

図1に、活性化血小板から放出される様々な分子について示す。血小板の多様な機能は、これらが有する顆粒内から放出される分子の作用に由来するものであり、α顆粒に存在する vascular endothelial growth factor (VEGF) や platelet-derived growth factor (PDGF)、platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)、

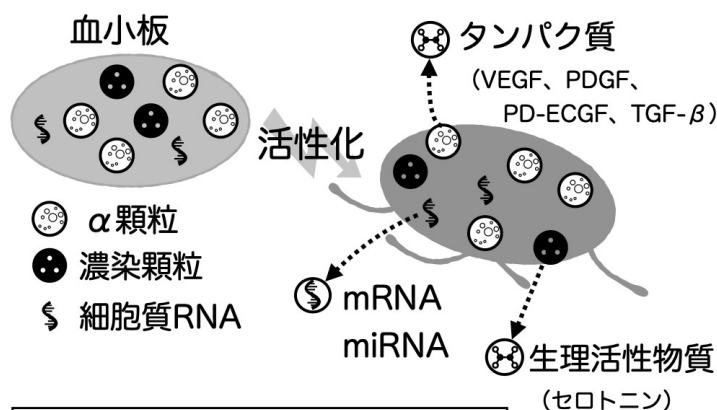


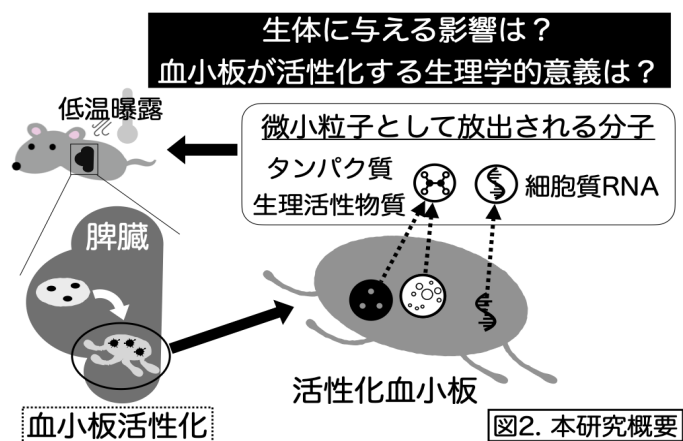
図1. 血小板活性化における種々の放出分子

transforming growth factor-beta (TGF-β) といった血小板由来増殖関連蛋白や、濃染顆粒に存在する生理活性物質のセロトニンなどが関与している。また、血小板は、タンパク質の合成を行う細胞質 mRNA や miRNA を保有している。これらのタンパク質や生理活性物質、RNA といった血小板内の分子は、エクソソームや微小小胞体内に包まれ、血小板由来細胞外小胞 (platelet-derived microvesicles; PDMVs) として、血小板が活性化した際に血液中に放出される。近年、凝固障害などの生体内の変化に伴い、PDMVs に内包される分子や RNA のプロファイルに変化が生じることが報告された（Pergoli L, *et al.* *Part Fibre Toxicol.* 14: 32, 2017）。

これまでの申請者の検討では、マウス低体温症モデルにおける脾臓内の血小板活性化は、マウス低体温症モデルを復温した際の血栓形成を促進することが判明した（Horioka K, *et al.* *J Thromb Haemost.* 17:1762-1771, 2019）。一方で、血小板の多機能性を考慮すると、『低体温時に起こる様々な障害から生体を防御するために、血小板が活性化する』可能性が考えられ、生体にとって有益な作用があるのではないかと考えた。そこで本研究では、低体温によって誘導された活性化血小板から放出される PDMVs 内容物の変化に着目し活性化血小板が低体温症の生体内で果たす役割を解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、低体温時の活性化血小板が放出する PDMVs やそれに内包される分子が低体温症に伴う障害に対して与える影響について解析することで、低体温症における活性化血小板の機能を明らかにする。これらの結果から、低体温時に脾臓内で血小板が活性化されることの生物学的意義を解明することを目的とし、以下の2点を検討する(図2)。



- ① 低体温時に活性化した血小板内では どのような分子動態の変化が起きているのか?
- ② 活性化血小板から放出された分子が 生体内にどのような作用を示すのか

3. 研究の方法

(1) 低体温時の活性化血小板由来RNAの発現プロファイル

低体温症モデルマウスおよびコントロールマウスから脾臓および末梢血液から血小板を分離し、mRNA を抽出して、cDNA マイクロアレイによる網羅的発現解析を行う。血小板は無核細胞のため DNA を有さず、低体温によって RNA の発現が増加することがない。この特徴を利用して、末梢血液中の血小板 RNA および脾臓内の血小板 RNA の発現量の差から、活性化により脾臓内の血小板から放出された RNA を特定する。

次に mRNA の発現プロファイルからパスウェイ解析を行って、生物学的意義を推察する。これらの RNA の中で発現変動が大きいものについてはリアルタイム RT-PCR 法で発現量を定量する。

(2) 脾臓内血小板の形態変化および PDMVs の放出

脾臓内の血小板が、低体温によって活性化されることによって生じる血小板の形態および血小板内小器官の変化を捉えるため、ホルマリン固定した脾臓を検体として、透過型電子顕微鏡による形態観察をおこなった。またコントロール群および低体温症群マウスから採取した血漿を超速心し、PDMVs を収集した。これらの PDMVs は走査型電子顕微鏡により、粒子を観察した。また、PDMVs を検体として CD41 (血小板マーカー)、CD63 (細胞外小胞マーカー)、CD62P (活性化血小板由来細胞外小胞マーカー)、CLEC-2 (活性化血小板由来細胞外小胞マーカー) の各種抗体を用いたウェスタンブロットを行い、血小板由来小胞であることを確認した。

(3) PDMVs に内包されたタンパク質の定量

低体温時の活性化血小板由来 RNA の発現プロファイルから特定された因子が、脾臓内活性化血小板から放出された PDMVs に内包されているかどうかを確認するため、PDMVs から RNA を抽出し、Real-time RT-PCR によって RNA 量を定量した。

4. 研究成果

(1) 低体温によって活性化された血小板は組織修復に関わる因子を放出する

cDNA マイクロアレイにおいて 23,473 個の転写産物が検出され、これらの各転写物のレベルを比較したところ、低体温群では脾臓内血小板の転写産物量が有意に変化した (図 3A)。mRNA が脾臓血小板で残存しているのか、減少しているのかを確認するために、低体温症の脾臓血小板と末梢血血小板中の mRNA 量を比較し、量が減少した遺伝子産物を抽出したところ、5,777 個の遺伝子産物が同定された。この遺伝子セットを用いて、パスウェイ解析により関連する分子生物学的意義を推定した。その結果、細胞骨格リモデリング、および細胞接着に関連するパスウェイが上位に抽出され、Wnt/ β -catenin シグナルに関連する複数のパスウェイが亢進することが判明した (図 3B)。また、これらのパスウェイでは、ミオシンやトロポニンといった筋形成に関わるタンパク質をコードする転写産物が含まれていることがわかった。

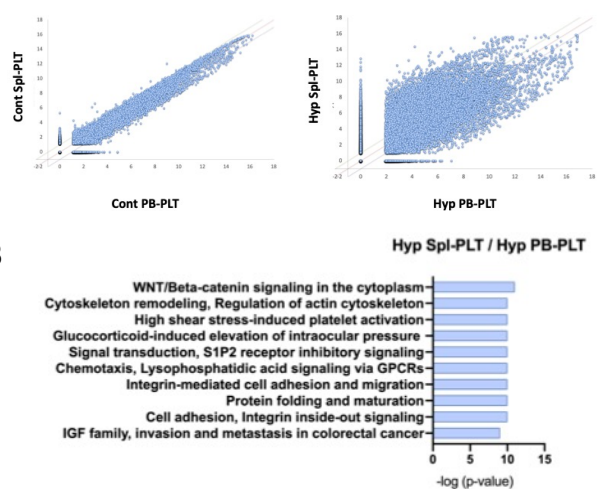


図3.低体温時の活性化血小板由来RNAの発現プロファイル

(2) 低体温時には PDMV が脾臓内血小板から放出される

低体温によって脾臓血小板が活性化されることによって細胞内成分を放出するのかどうかを透過型電子顕微鏡によって評価した。正常マウスおよび低体温マウスの末梢血小板では、細胞内成分に変化はなかったが、脾臓血小板では α 顆粒はごく少量しか認められず、空胞が多くを占めた (図 4A)。また、脾臓血小板では微粒子が表面に存在しており、微粒子が放出されているような状態が多く確認されたことから、低体温時では脾臓活性化血小板から PDMVs が放出されている可能性が高いことがわかった (図 4B)。次に、低体温時に脾臓活性化血小板から PDMVs が放出されたことを証明するため、脾摘マウスを作成し、同様の低温刺激を与えた。これらのマウスから血漿検体を超遠心して PDMVs を収集し、ウェスタンブロットによって活性化血小板由来細胞外小胞マーカーを確認したところ、低体温マウスのみで活性化血小板由来細胞外小胞タンパク質の増加を認めた (図 4C)。

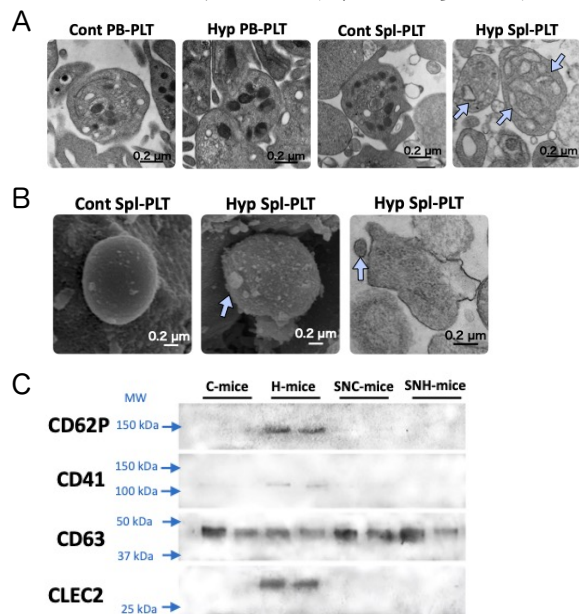


図4.脾臓内血小板の形態変化およびPDMVsの放出

(3) 低体温の脾臓内血小板から放出された PDMV には組織修復因子を内包する

低体温時の活性化血小板由来 RNA の発現プロファイルにより、Wnt/ β -catenin シグナルに関

連する複数のパスウェイが亢進したことから、超遠心によって収集された PDMVs より抽出した RNA を用いて、Wnt3a および Ctnnb1 mRNA を定量した。これらの因子はいずれも低体温群で有意に高く、低体温によって活性化された脾臓内血小板は両因子を PDMV に内包し、放出していることが明らかとなった (図 5)。

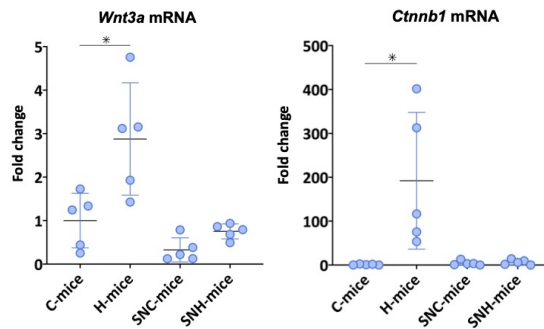


図5.PDMVに内包される組織修復因子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Isozaki Shotaro, Tanaka Hiroki, Horioka Kie, Konishi Hiroaki, Kashima Shin, Takauji Shuhei, Fujiya Mikihiro, Druid Henrik	4. 巻 1868
2. 論文標題 Hypoxia-induced nuclear translocation of β -catenin in the healing process of frostbite	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166385 ~ 166385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2022.166385	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 該当する
1. 著者名 Tanaka Hiroki, Horioka Kie, Hasebe Takumu, Sawada Koji, Nakajima Shunsuke, Konishi Hiroaki, Isozaki Shotaro, Goto Masanori, Fujii Yumiko, Kamikokura Yuki, Ogawa Katsuhiko, Nishikawa Yuji	4. 巻 150
2. 論文標題 Treatment of hepatocellular carcinoma with autologous platelets encapsulating sorafenib or lenvatinib: A novel therapy exploiting tumor platelet interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1640 ~ 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33915	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 該当する
1. 著者名 Takauji Shuhei, Tanaka Hiroki, Hayakawa Mineji, Horioka Kie, Isozaki Shotaro, Konishi Hiroaki	4. 巻 587
2. 論文標題 Soluble thrombomodulin ameliorates aberrant hemostasis after rewarming in a rat accidental hypothermia model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.086	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 該当する
1. 著者名 Horioka Kie, Tanaka Hiroki, Okaba Keisuke, Yamada Shinnosuke, Ishii Namiko, Motomura Ayumi, Inoue Hiroyuki, Alkass Kanar, Druid Henrik, Yajima Daisuke	4. 巻 205
2. 論文標題 Hypothermia causes platelet activation in the human spleen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 47 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2021.06.023	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 該当する

1. 著者名 Horioka Kie, Tanaka Hiroki, Okaba Keisuke, Yamada Shinnosuke, Hayakawa Akira, Ishii Namiko, Motomura Ayumi, Inoue Hiroyuki, Takauji Shuhei, Isozaki Shotaro, Ogawa Katsuhiro, Yajima Daisuke, Druid Henrik, Pakanen Lasse, Porvari Katja	4. 巻 223
2. 論文標題 Bioprotective role of platelet-derived microvesicles in hypothermia: Insight into the differential characteristics of peripheral and splenic platelets	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 155 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2023.01.006	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 田中 宏樹, 堀岡 希衣, 後藤 正憲, 人見 淳一, 藤井 裕美子, 上小倉 佑機, 孟 玲童, 小川 勝洋, 西川 祐司
2. 発表標題 自己血小板を用いたドラッグデリバリーシステムの肝細胞癌に対するターゲティング効果
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀岡 希衣, 田中 宏樹, 岡馬 恵介, 石井 名実子, 本村 あゆみ, 井上 博之, 矢島 大介
2. 発表標題 低体温症における血小板変化と血液凝固機能異常
3. 学会等名 日本血栓止血学
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 宏樹, 堀岡 希衣, 後藤 正憲, 人見 淳一, 藤井 裕美子, 上小倉 佑機, 孟 玲童, 小川 勝洋, 西川 祐司
2. 発表標題 自己血小板を利用したドラッグデリバリーシステム 肝癌・血小板相互作用を利用した新たな治療戦略
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀岡 希衣, 田中 宏樹, 岡馬 恵介, 石井 名実子, 本村 あゆみ, 井上 博之, 矢島 大介
2. 発表標題 低体温症に対する復温療法時の活性化血小板動態と血栓形成
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Horioka K, Tanaka H, Isozaki S, Henrik D
2. 発表標題 Activation of intra-splenic platelets as a pathologic feature during deep hypothermia.
3. 学会等名 International society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Horioka K, Tanaka H
2. 発表標題 Rewarming from accidental hypothermia enhances whole blood coagulation in a mouse model
3. 学会等名 International society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Horioka K, Tanaka H, Ikuta K
2. 発表標題 Role of Platelet-Derived Microvesicles in Hypothermia Insights from the Differential Characteristics of Peripheral and Splenic Platelets
3. 学会等名 American Society of Hematology (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
スウェーデン	Karolinska Institutet			
フィンランド	University of Oulu			