

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591106

研究課題名（和文）

デングウイルス感染症における血小板貪食クリアランスの分子基盤の解明

研究課題名（英文）

A mechanism of platelet phagocytosis in dengue virus infection

研究代表者

大石 和徳 (KAZUNORI OISHI)

国立感染症研究所・感染症情報センター・センター長

研究者番号：80160414

研究成果の概要（和文）：

デングは熱帯地域の重要な公衆衛生学的な問題であり、その臨床的特徴である血小板減少の機序の詳細は不明である。我々はこれまでに、フィリピンにおいてにデングウイルス二次感染患者の血小板減少と *ex vivo* の測定系による患者血小板の貪食クリアランスの亢進が有意に相関することを報告した(Honda S, et al. Am J Trop Med Hyg, 2009)。今回、我々はデング二次感染患者の急性期にフォスファチジルセリン認識経路を介した血小板アポトーシス貪食クリアランスが亢進することを明らかにした。本症の回復期には、トロンボポエチンによる血小板産生がこのアポトーシス血小板の貪食クリアランスを凌駕し、末梢血小板数の正常化に向かうと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Dengue illness has become a major public health concern particularly in tropical countries and the mechanism of thrombocytopenia remains uncertain. We previously reported from the clinical study in the Philippines a significant association between thrombocytopenia and an increased phagocytosis of platelets in an *ex vivo* setting during acute phase of secondary dengue virus infection (Honda S, et al. Am J Trop Med Hyg, 2009). We report here an increased phagocytosis of DV-induced apoptotic platelets by macrophages via a phosphatidylserine-recognizing pathway in secondary DV infection during the acute phase. Accelerated platelet clearance was overcome by thrombopoietin-induced enhanced thrombopoiesis in these patients (Alonzo T, et al. J infect Dis, 2012).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	90,000	1,090,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	810,000	4,210,000

研究分野：医薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：デングウイルス、血小板減少、血小板アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

デングはデングウイルス (DV) 1-4 の感染による、血小板減少を特徴とする熱性疾患であり、近年はアジア・中南米の熱帯地域における、重要な公衆衛生上の問題の一つである。また、流行地では二次感染 (異なる DV による感染) がその 80%以上を占め、しばしば重症化病態であるデング出血熱 (DHF) を発症し、血小板減少も顕著になる。本症の血小板減少は急性期以降に速やかに正常化するが、しばしば血小板減少状態が遷延し、易出血性となる場合もある。本症の血小板減少機序として、従来から DV 感染による骨髄抑制に伴う血小板産生低下が知られている。

一方、申請者はこれまでに、フィリピン・サンラザロ病院で実施している DV 感染症の臨床研究プロジェクトにおいて、感染急性期に Platelet-associated IgG (PAIgG) が増加し、血小板数と有意な逆相関を示すこと、急性期患者の血小板上には抗 DV IgG 抗体が検出される事実から、本症の血小板減少が血小板上の抗 DV IgG-DV 免疫複合体形成を介した血小板貪食クリアランス促進によるとする仮説を提唱してきた (Saito M, et al. Clin Exp Immunol, 2004)。その後、我々は DV 感染患者由来血小板とマクロファージ細胞を用いたフローサイトメトリー法による *ex vivo* の実験から、本症の急性期にマクロファージによる血小板貪食が亢進し、血小板数と逆相関を示すことを明らかにし、本症におけるマクロファージによる血小板貪食クリアランス促進がその血小板減少機序の一つであることを明らかにした。 (Honda S, et al. Am J Trop Med Hyg, 2009)。しかしながら、我々は平成 21 年 8~10 月に、サンラザロ病院において本症の血小板貪食クリアランス機構の解明を目的として、マクロファージ側のレセプターの関与を FcR (FcγRI, FcγRII, FcγRIII) や CR3 抗体を用いて詳細に検討した結果、現時点で血小板貪食への特定のレセプターの関与は確認できなかった。一方、血小板は核を持たない血球であるが化学的刺激によりアポトーシス様変化を起こす (Tonon, et al. Thromb Res, 2003)。我々はこれまでの研究において、DV 感染患者の急性期の血小

板にも Annexin V 結合活性が亢進しており、血小板表面における “eat me signal” としてのフォスファチジルセリン (PS) 発現亢進の所見を見いだしている。以上の結果から、DV 感染患者の血小板クリアランスが前述の抗 DV IgG を介する経路以外に、血小板がアポトーシスに陥ることでマクロファージの PS レセプターを介する経路で起こる可能性も想定される。

## 2. 研究の目的

DV 曝露により血小板アポトーシス、マクロファージの PS レセプター発現が促進し、また DV 感染症例においてもマクロファージによる血小板貪食クリアランスが PS レセプターを介しているのかを明らかにし、DV 感染症における血小板貪食クリアランスの制御機構を含めた分子基盤を解明する。

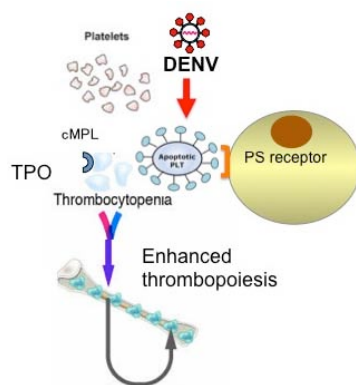
## 3. 研究の方法

2009-2010年の期間に10歳以上の81例のデング二次感染症例を登録した。末梢血血小板数、血中thrombopoietin (TPO)を測定した。また、試験管内で患者の末梢血血小板を Celltracker Orangeで染色し、既報に従って分化させたTHP-1細胞を用いて血小板貪食アッセイを実施し、フローサイトメトリーで貪食率を決定した。この血小板貪食を急性期(発症から4日)、回復早期(発症から8日)、回復期(発症から12-15日)に測定した。また、38例の年齢をマッチした健常者を登録し、同様の検査を実施した。血小板貪食阻害実験にはPSを認識する架橋分子であるmilk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFGES8)の変異蛋白質D89Eを用いた。

## 4. 研究成果

デング二次感染患者の血小板アポトーシス(%)、血小板貪食率、血中 TPO は急性期、回復早期に回復期や健常者より有意に増加した。末梢血アポトーシス血小板数は、急性

期ではなく、回復早期や回復期に、健常者に比較して有意に増加した。急性期と回復期早期の血小板アポトーシス(%)と血小板貪食率は有意に相関した。また、血小板貪食は PS 認識分子である D89E により有意に低下した。In vitro の系でも DV による血小板アポトーシスが認められたが、日本脳炎ウイルスでは認められなかった。本研究において、急性期には末梢血アポトーシス血小板が生体内では PS 認識機構を介して貪食クリアランスされることが明らかになり、回復期においては TPO による血小板産生がこのアポトーシス血小板の貪食クリアランスを凌駕し、末梢血小板数の正常化に向かうと考えられた。



#### 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 3 件)

1. Alonzo MTG, Lacuesta TLV, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LC, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis*, 205(8): 1321-9. 2012

2. Sasaki T, Setthapramote C, Kurosu T, Nishimura M, Asai A, Omokoko MD, Pipattanaboon C, Pitaksajakul P, Limkittikul K, Subchareon A, Chaichana P, Okabayashi T, Hirai I, Leaungwutiwong P, Misaki R, Fujiyama K, Ono K, Okuno Y, Ramasoota P, Ikuta K. Dengue virus neutralization and antibody-dependent

enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection.

*Antiviral Res.* 2013 Jun;98(3):423-31.

3. Noda M, Masrinoul P, Punkum C, Pipattanaboon C, Ramasoota P, Setthapramote C, Sasaki T, Sasayama M, Yamashita A, Kurosu T, Ikuta K, Okabayashi T. Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against Dengue virus capsid protein among four serotypes. *Biologics.* 2012;6:409-16.

[学会発表] (計 4 件)

1. Oishi K. Role of apoptotic platelet clearance in thrombocytopenia in dengue, a reemerging infectious disease. Symposium, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.

2. Oishi K, Alonzo MTG. A role of apoptosis and apoptotic platelet clearance in secondary dengue virus infection. IDSA 49th annual meeting. Boston, USA, October 20-23, 2011.

3. 大石和徳 感染症の将来を考える：臨床と基礎の融合を目指して。日本感染症学会東日本地方会学術集会 2012年10月10日～2012年10月11日

4. 黒須 剛 治療法開発のためのデングウイルス感染マウスモデル 第60回日本ウイルス学会 2012年11月13～15日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 和徳 (KAZUNORI OISHI)  
国立感染症研究所・感染症情報センター・  
センター長

研究者番号：80160414

(2) 研究分担者

黒須 剛 (TAKESHI KUROSU)  
大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70432432