

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 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：32409
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2011
課題番号：22791454
研究課題名（和文） ニューロキニン1受容体刺激によるマイクロパーティクル放出の血液凝固に対する影響
研究課題名（英文） Effects of microparticles on monocyte-derived procoagulant activity provoked via SP:NK1R pathway
研究代表者 星島 宏 (HOSHIJIMA HIROSHI) 埼玉医科大学・医学部・助教 研究者番号：90536781

研究成果の概要（和文）： サブスタンス P（SP）は白血球ニューロキニン1受容体（NK1R）を介して血液凝固を亢進するがその分子機構は不明である。この現象に対する単球由来の組織因子活性を有するマイクロパーティクルの影響を検討した。CC chemokine ligand 5（CCL5）はヒト血漿の存在下に発生する単球由来マイクロパーティクルを増加させた。SPはCCL5によるマイクロパーティクル発生を増強した。単球に構成的には発現していないfull-length NK1Rを強制発現させると、単球由来マイクロパーティクルの発生は増加した。

研究成果の概要（英文）： Substance-P（SP）enhances whole blood coagulation through neurokinin-1 receptors（NK1R）in leukocytes while the precise mechanisms of this phenomenon remains to be established. Thus the effects of microparticles associated with tissue factor on monocyte-derived procoagulant activity provoked via SP:NK1R pathway were evaluated. CC chemokine ligand 5（CCL5）increased microparticles released from monocytes. SP enhanced CCL5-dependent release of microparticles from these cells. Forced expression of the full-length NK1R that is not constitutively expressed in monocytes also enhanced the release of microparticles from these cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理学・マイクロパーティクル・単球・ニューロキニン1受容体・サブスタンスP・血液凝固・組織因子

1. 研究開始当初の背景

血小板には、損傷血管に粘着・凝集して一次止血に関与するばかりでなく、血液凝固を促進し、血栓を強化するなど凝固活性を亢進

させる作用がある（血小板凝固活性）。アポトーシスに関連して細胞表面に表出するリン脂質（ホスファチジルセリン）が、血小板凝固活性の本態として重要であることが知

られている(Blood 1997;89:1121-1132). 同様に白血球にも凝固活性が認められており、たとえば単球は組織因子を放出して血液凝固を亢進することが知られている(血栓止血誌 2007;18:646-652). 研究代表者の所属する研究室では、数年前から血小板凝固活性を定量評価するための測定系を構築し、疼痛の神経伝達や神経原性炎症を惹起するサブスタンス P (SP) と血小板凝固の関連を評価してきた。これまで得られた知見から、(1)SP は血小板凝固活性を亢進すること。(2)その亢進作用はニューロキニン 1 受容体 (NK1R) を介して起こること。(3)そこに白血球が関与すること、などが示唆された(侵襲と免疫 2007;16:123-130, J Thromb Thrombolysis 2009;27:280-6). しかしながら、いかなる作用機序で白血球の NK1R を介する血液凝固の亢進が起こるのかは不明である。

白血球のなかで、凝固活性亢進への関与が強く示唆されている単球は、選択的スプライシングにより NK1R の遺伝情報をコードするエクソンの一部が欠落した mRNA を構成的に発現し、アミノ酸配列が一部欠損した truncated NK1R を発現している。しかし、なんらかの活性化刺激を受けると全ての遺伝情報が転写された完全長 mRNA から full-length NK1R の発現が誘導される(Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:7771-6)。

白血球依存性凝固活性に関与する分子の最有力候補のひとつとして組織因子が挙げられる。組織因子は細胞表面に存在する状態で機能すると考えられているため、どのような状態の単球に発現するかを検討することは、血管内凝固反応を制御するための方策を立案するために重要と考えられる。

そこでわれわれは、細胞死の一形態であるアポトーシスに関連して発生するマイクロパーティクル上に組織因子が発現しているものと想定し、それらの発現調節に対する上記二種類の NK1R の役割を検討した。

2. 研究の目的

ヒト単球系細胞の持つ血液凝固活性と単球由来マイクロパーティクルの関連を評価し、組織因子がその責任活性物質のひとつであることを確認する。また NK1R を介する SP による刺激が単球由来凝固活性を調節する分子機構のひとつであることを確認し、その共刺激物質を特定する。さらに、NK1R の選択的スプライシングにより発現する full-length NK1R の凝固活性調節作用を評価する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

単球を、血液凝固活性を有する白血球系細胞の最有力候補と考え、 $1\sim 10\times 10^5$ cells/ml の細胞密度で継代培養中のヒト単球系無限

寿命化細胞株 THP-1 をマイクロパーティクルの発生源として利用した。

継代培養中の THP-1 は選択的スプライシングによる自然発生が報告されている NK1R の二つのアイソフォームのうち、エクソン情報が一部欠落した truncated NK1R を構成的に発現している。一方、すべての遺伝情報が転写された完全長スプライスバリエントは発現していない。

そこで、full-length NK1R ならびにレポーターとして赤色蛍光蛋白 (DsRed2) の両遺伝子が組み込まれたバイディレクショナル発現ベクター (pBI-CMV4, Clontech) をエレクトロポレーションにより THP-1 に導入し、両蛋白を THP-1 に強制発現させ実験に供与した。

(2) フローサイトメトリー (FCM) を用いた凝固活性を有するマイクロパーティクルの定性的・定量的分析

1×10^5 cells/ml の細胞密度で継代した THP-1 を 3 日後に培養液で遠心洗浄し、 2×10^6 cells/ml に調整した細胞浮遊液を実験に供与した。96 穴細胞培養プレートにこの細胞浮遊液を 0.1 ml 加え、さらに同量の各種試薬を混合した緩衝塩類 (BSS) を加え、加湿された 5%CO₂ 環境下で 37°C に加温した。

凝固活性を有する細胞やマイクロパーティクルは、細胞周囲でフィブリノーゲンを基質としてフィブリンを発生すると考えられる。そこで、フィブリノーゲン・フィブリンが結合した細胞やマイクロパーティクルを定量するため、BSS にはクエン酸化ヒト血漿 (Citrated Human Plasma, CHP, 1%) ならびにフルオレセインイソチオシアネート (FITC) を結合し蛍光標識したヒトフィブリノーゲン (3 μg/ml) を混合した。また細胞刺激物質として、ケモカインのひとつ CC chemokine ligand 5 (CCL5) と痛みに関連する神経伝達物質である SP を BSS に加えた。

試薬による THP-1 の負荷を開始して一定時間加温した後、細胞浮遊液を試験管に回収し、フローサイトメーター (BD FACS Canto II, 日本ベクトン・ディッキンソン) を利用して細胞ならびに刺激により発生した粒子を定性的・定量的に分析した。

また、発生した粒子の相対的な比重を確認するため、細胞浮遊液を遠心分離した後に FCM を行った。各種処理を行った THP-1 の細胞浮遊液を 15-ml コニカルチューブに回収し、100 g で 2 分間遠心してペレットを回収した。100 g で得られた上精はさらに 1000 g で 5 分間遠心した。1000 g で得られた上精を別のチューブに移すことで 100 g 上精に浮遊する粒子を濃縮した後 FCM で分析した。

(3) 組織因子活性の定量

上記 (2) の方法で比重分離により回収された 100 g ペレット、100 g 上精、1000 g 上

精に含まれる組織因子を定量測定キット (human tissue factor chromogenic activity assay kit, Assaypro) を使用して分光光度法により測定した。

4. 研究成果

継代から3日間培養した THP-1 の細胞浮遊液に赤色蛍光核染色試薬 SYTO61 を混合し FCM 分析を行うと、蛍光強度に従って三種類の粒子群を確認できた。また粒子の大きさの指標となる前方散乱 (FSC) と赤色蛍光強度に正の相関が認められた。FSC が最大の粒子群は SYTO61 に強染した。一方、最小の粒子群からは対照 (SYTO61 を加えない細胞浮遊液から得られたデータ) と比較して有意な蛍光強度は検出されなかったため、これらは核を持たない粒子群であると考えられた。FSC が中間の粒子群は SYTO61 に弱く染色された。

この細胞浮遊液に CHP と FITC フィブリノーゲンを加えると、SYTO61 に強染する最大の粒子群を除き、側方散乱 (SSC) が増加した。SSC は細胞内顆粒や細胞表面の突起の存在により増加すると考えられているため、凝固活性を有する粒子に CHP とフィブリノーゲンが吸着しフィブリンが析出することで、細胞表面の構造が変化し SSC が増加したと考えられた。ここで FITC に関連する緑色蛍光を測定すると、SYTO61 に強染した粒子群を除いて蛍光強度の有意な増加が認められた。この緑色蛍光の増加は、細胞浮遊液に抗凝固薬ヘパリンを加えると抑制された。これらのことから、単球系細胞である THP-1 由来の凝固活性は、脱核した小細胞や、一般的にアポトーシス小体と定義される小型化した核を有する細胞など、マイクロパーティクルとして存在する正常の細胞より小さな細胞が有していると考えられた。

細胞核の有無や FSC の大小と凝固活性との関連をさらに検討するため、細胞浮遊液に遠心操作を加えた後、FCM 解析を行った。SYTO61 を加えた細胞浮遊液を 100 g で遠心して得られたペレットには、遠心前の細胞浮遊液と比較して SYTO61 に強染する粒子が多く認められた。一方、100 g の上精には SYTO61 強陽性の粒子はほとんど認められなかったが、SYTO61 陰性の最小粒子群ならびに SYTO61 弱陽性の中間サイズの粒子群の比率が増加した。これらのことから、FSC が最小ならびに中間の粒子群は、SYTO61 に強陽性となる正常な有核細胞よりも低比重の小型化細胞ないし細胞デブリだと考えられた。ここで、比重分離された細胞群の組織因子活性を測定したところ、正常な有核細胞を含む 100 g で得られたペレットからは、組織因子活性が検出されなかった。一方、濃縮された 100 g 上精には組織因子活性が検出されたが、1000 g 上精からは組織因子活性が検

出されなかった。これらの結果から、100 g 上精の画分に含まれる、FSC が最小ならびに中間の粒子群が組織因子活性を持つことが示された。このことは、後者の粒子群が凝固活性を持つことを示した FCM の結果を支持しており、凝固活性の少なくとも一部は組織因子に由来することが示唆された。

細胞浮遊液に CCL5 を加えて加温すると、FSC が最小の粒子群と中間の粒子群で FITC 陽性の粒子が増加した。このことから、単球系細胞である THP-1 は特定のケモカイン刺激により、細胞デブリや脱核細胞に依存した凝固活性を亢進すると考えられた。一方、SYTO61 に強染する通常の細胞は凝固活性の亢進にほとんど寄与しなかった。

この細胞浮遊液に SP を単独で加えても FITC 陽性粒子の有意な増加は確認できなかった。しかしながら SP を CCL5 と同時に細胞浮遊液に加えると、CCL5 による FITC 陽性顆粒の増加がさらに亢進した。継代培養中の THP-1 は truncated NK1R を構成的に発現する一方、full-length NK1R を発現していない。これらのことから、truncated NK1R を介する刺激は単球由来の凝固活性を単独では変化させないが、一部のケモカインなど共刺激の存在下に凝固活性を亢進させる作用を持つと考えられた。

単球系細胞は full-length NK1R を構成的には発現していないが、なんらかの刺激が加えられるとこの受容体の発現が誘導されることが知られている。そこでエレクトロポレーションにより full-length NK1R を THP-1 に強制発現させ、同受容体が単球由来の凝固活性に及ぼす影響を検討した。レポーターとして DsRed2 を共発現させ、赤色蛍光を指標に full-length NK1R が発現した細胞の比率を FCM で確認した。有意な赤色蛍光は、FSC が最大の粒子群の 57%、中間の粒子群の 91%、最小の粒子群の 10% に認められた。一方、FSC が最大の粒子群では 67% が SYTO61 に強染したが、中間の粒子群では 15% であり、最小の粒子群では 0% であった。

Full-length NK1R を強制発現させた THP-1 の細胞浮遊液に CHP と FITC フィブリノーゲンを加え加温すると、FSC が最小の粒子群で FITC 依存性の蛍光強度が最も増大した。FSC が中間の粒子群も、FITC 依存性の蛍光強度は有意に増加したが、FSC が最大の粒子群では、蛍光強度の増大は認められなかった。これらの full-length NK1R を導入した細胞浮遊液に含まれる FITC 蛍光を有する粒子の比率は、遺伝子を導入せずエレクトロポレーションのみ施行した細胞浮遊液や、DsRed2 のみ導入し、full-length NK1R を導入しなかった細胞浮遊液のそれと比較して有意に多かった。

これらのことから、THP-1 に full-length

NK1R が発現すると、凝固活性の高い脱核粒子やアポトーシス小体の発生が増加すると考えられた。

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 1 件)

- ① Azma T, Sugimoto Y, Kinoshita H, Ito T, Tsukamoto M, Hoshijima H, Nakao M, Kikuchi H, Detection of the full-length transcript variant for neurokinin-1 receptor in human whole blood associated with enhanced reinforcement of clot by substance-P, *J Thromb Thrombolysis* 33:329-337, 2012, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 東 俊晴, 星島 宏, 伊藤大真, 塚本真規, 土井克史, 松本延幸, ヒト単球系細胞の組織因子活性発現に対する完全長ニューロキニン 1 受容体 (NK1R) 発現の影響, 日本麻酔科学会第 59 回学術集会, 2012 年 6 月 7 日~9 日, 神戸
- ② 東 俊晴, 伊藤大真, 星島 宏, 塚本真規, 土井克史, 松本延幸, プピバカインによるヒト単球系細胞の NADPH オキシダーゼ活性増強には PI3K 経路が関与する, 日本ペインクリニック学会第 45 回大会, 2011 年 7 月 22 日~23 日, 松山
- ③ 東 俊晴, 杉本由紀, 伊藤大真, 星島 宏, 塚本真規, 菊地博達, サブスタンス P による白血球依存性血小板凝固活性亢進に影響を与える完全長イソ型 NK1 受容体ならびにその他の周術期要因の解析, 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 2011 年 5 月 19 日~21 日, 神戸
- ④ 伊藤大真, 東 俊晴, 塚本真規, 星島 宏, 杉本由紀, 菊地博達, プピバカインが惹起するヒト単球系細胞 THP-1 の細胞障害, スーパーオキシド産生, NADPH オキシダーゼ活性の時間的推移の相違, 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 2011 年 5 月 19 日~21 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星島 宏 (HOSHIJIMA HIROSHI)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：90536781