

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592249

研究課題名(和文) 過大侵襲に対する凝固線溶系におけるストレス応答の分子基盤の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of responses to stress in blood coagulation and fibrinolysis system

研究代表者

赤松 繁 (AKAMATSU, Shigeru)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：20167828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：DICに対する治療薬としてアンチトロンビンIII(AT-III)が使用されている。そのトロンビン分解作用はよく知られているが、血小板に直接作用することが報告されたが、その詳細は明らかではない。リストセチン(GPzb/IX/D活性化因子)による血小板活性化に対するAT-IIIの抗炎症作用を検討した。AT-IIIはvWFのGPIb結合を阻害すること、その結果、AT-IIIはTXA2産生の抑制を介し、炎症惹起物質の一つであるsCD40Lの遊離を阻害することを明らかとした。本解析により、AT-IIIによる抗炎症作用の分子機序の一端が明らかとなり、DICにおける新たな予防法・治療法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that ristocetin, an activator of GPIb/IX/V, induces release of sCD40L via TXA2 production from human platelets. In the present study, we investigated the effect of antithrombin-III (AT-III), an anticoagulant, on the ristocetin-induced GPIb/IX/V activation in human platelets. AT-III inhibited ristocetin-stimulated platelet aggregation. The ristocetin-induced production of 11-dehydro-TXB2, a stable metabolite of TXA2, and the release of sCD40L were suppressed by AT-III. AT-III also reduced the ristocetin-stimulated secretion of PDGF-AB. AT-III failed to affect the U46619-, a TP receptor agonist, induced levels of p38 MAP kinase phosphorylation or sCD40L release. AT-III reduced the binding of SZ2, a monoclonal antibody to the sulfated sequence in the alpha-chain of GPIb, to the ristocetin-stimulated platelets. These results strongly suggest that AT-III reduce ristocetin-stimulated release of sCD40L due to inhibiting TXA2 production in human platelets.

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：心血管 血栓 血小板 凝固 綿溶

1. 研究開始当初の背景

手術、外傷、ショックなどの過大な侵害刺激から、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) が惹起され、SIRS から周術期心筋虚血や敗血症、多臓器不全に陥る病態において過去 10 年にわたりサイトカインの役割が注目され研究されてきた。しかし、敗血症、多臓器不全の病態において、surviving sepsis campaign guidelines による活性化プロテイン C の有用性の指摘のように、トロンピンを中心とした血液凝固・線溶系物質の病態への関与、治療薬の有用性が再認識されてきている。

生体は手術、外傷、ショックなどの侵襲を受けると様々なストレス反応を示すことが知られている。過大な侵害刺激を受けると、容易に SIRS が惹起される。そして SIRS から周術期心筋虚血や敗血症、多臓器不全に陥ることが知られている。循環虚脱を招くことのある過大な侵襲に対して、生体は心血管系、血液凝固系におけるストレス反応を起こすがその詳細は明らかではない。また、敗血症の進展において、血液凝固系反応と炎症反応が相互に作用して増幅し進行するクロストーク現象が中心的役割を果たすことが考えられる。

侵害刺激は生体に心血管反応・血液凝固反応や神経内分泌反応をひき起こすが、生体防御反応と臓器障害は表裏一体と考えられる。侵襲によって組織破壊が起こると高サイトカイン血症が発現し、組織を修復するための生体防御系が作動する。血中には種々のサイトカインが分泌され、サイトカイン・ストームと呼ばれる状態となる。サイトカインは、好中球を重要臓器に集積し SIRS の状態を惹起する。この状態でセカンドアタックが加わると播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation: DIC) を発症し、臓器内に微小血栓が産生され臓器不全に陥ると考えられる。近年下垂体後葉ホルモンであるバソプレシン (AVP) は、心肺蘇生時や血管拡張性ショックに対して有効であると報告されており、私共は、これまで心肺停止や敗血症性ショック時の AVP の有用性とその作用メカニズムの検討を行ってきた。そして、AVP やトロンピンなどの血管作動物質と生体防御機構 (heat shock protein: HSP) との関連について明らかにしてきた。

一方、敗血症性ショックに対して、本邦で開発されたポリミキシン B 固定化カ

ラムを用いた血液吸着療法 (PMX-DHP) の有用性が、昨年、欧州での臨床研究で EUPHAS Trial として JAMA に報告された。EUPHAS Trial においては、直接的な PMX-DHP の有用性を評価しているが施行時に投与される高容量の抗凝固薬の影響、すなわち凝固系の関与も考えられるが、その本態は解明されていない。

敗血症に伴う急性炎症反応が血液/血小板・凝固線溶系に及ぼす作用を相互作用については、単球や血管内皮からの Tissue factor (TF) 発現による凝固活性亢進、プロテイン C、トロンボモジュリン、アンチトロンピン-III などの凝固 pathways の活性化障害、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 産生亢進による線溶系活性の低下が挙げられる。一方、血液/血小板・凝固線溶反応が急性炎症反応に及ぼす影響については十分に解明されていない。凝固因子 Xa、トロンピン、TF-VII 複合体は、炎症反応を惹起することは確認されており、トロンピンは、凝固因子 IIa としておよび血小板凝集刺激因子としてのみならず、単球、上皮細胞の monocyte chemotactic protein-1 や interleukin-6 産生を引き起こし、血管内皮においても interleukin-6、interleukin-8 産生を刺激するとされている。このように、敗血症の進展において血液凝固線溶系反応と炎症反応は相互に作用して増幅し病態が進行するクロストーク現象を起こすことが、その進展の中心的役割を果たすことが考えられる。

2. 研究の目的

生体は手術、外傷、ショックなどの侵襲を受けると様々なストレス反応を示すことが知られている。過大な侵害刺激を受けると、容易に SIRS が惹起される。そして SIRS から周術期心筋虚血や敗血症、多臓器不全に陥ることが知られている。循環虚脱を招くことのある過大な侵襲に対して、生体は心血管系、血液凝固系におけるストレス反応を起こすがその詳細は明らかではない。本研究では、この過大な侵害刺激に反応する生体の血液/血小板・凝固線溶系におけるトロンピンを中心としたアンチトロンピン III、プロテイン C 活性、トロンボモジュリン、
□2 プラスミンインヒビター、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 等の役割を解明し、血液/血小板・凝固線溶系におけるストレス応答の分子基盤の解析を介し、臨床上的治療への応用に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) レーザースキャタリング法による血小板凝集能解析装置 (PA-200 aggregometer) を用い、ADP、コラーゲンおよびリストセチンによる血小板凝集能を検討した。

(2) ADP、コラーゲンおよびリストセチンにより刺激され活性化される細胞内情報伝達系 [アデニル酸シクラーゼ /cAMP、プロテインキナーゼ A、プロテインキナーゼ C、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-キナーゼ)、Akt/protein kinase B、MAP キナーゼスーパーファミリー (p44/p42 MAP キナーゼ、p38 MAP キナーゼ、SAPK/JNK)、Ca⁺⁺動員等] と HSP27 のリン酸化を Western blot 法で検討した。

(3) フィブリン活性化抑制物質であるアンチトロンビン III の ADP、コラーゲンおよびリストセチンによる血小板活性化への影響を検討した。

(4) SZ2 (von Willebrand factor の glycoprotein Ib 結合部位を認識する抗体) を用いて免疫沈降法を行い、アンチトロンビン III によるリストセチンの glycoprotein Ib 結合への影響を検討した。

(5) ADP、コラーゲンおよびリストセチンにより刺激される血小板顆粒分泌物質である platelet-derived growth factor-AB を ELISA 法で検討した。

(6) ADP、コラーゲンおよびリストセチンにより刺激され遊離される物質である soluble CD40 ligand を ELISA 法で検討した。

4. 研究成果

(1) 過大な侵害刺激から、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome : SIRS)、敗血症、敗血症性ショック、多臓器不全に陥る臨床例において、播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation : DIC) を呈した症例の凝固・線溶系の検討を行った。急性期 DIC スコア 4 点以上の症例 (血小板は 80,000/□1 以下に減少または 24 時間で 50%以上減少) の臨床的検討を行った。重症例では SOFA スコアは 10 点を超え、血中トロンボモジュリン値は上昇、活性化プロテイン C 値は低下していた。これに対して、遺伝子組み換えトロンボモジュリン投与例は、活性化プロテイン C が上昇した。Fulminant purpura を呈した重症敗血症における投与例では活性化プロテイン C は上昇とともに、SOFA スコア、DIC スコア、APACHE II スコア

は改善し、臓器不全症状の改善を認めた。活性化プロテイン C およびプロテイン S は、過大侵害刺激による重症播種性血管内凝固症候群に対する治療薬のとしての有用性が示唆された。

(2) リストセチン (糖蛋白 Ib/V/IX 活性化因子) による血小板活性化に対するアンチトロンビン-III の作用を検討した。その結果、アンチトロンビン-III はトロンボキサン A2 産生の抑制を介し、リストセチンによる炎症惹起物質の一つである soluble CD40 ligand の遊離を阻害することを明らかとした。

(3) 私共は既に、強力な血小板凝集の促進因子であるコラーゲンが p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) キナーゼを介し、低分子量ストレス蛋白質の一つである HSP27 のリン酸化すること、およびその情報伝達機構の活性化を介して細胞増殖因子である PDGF-AB の分泌および炎症惹起物質の一つである soluble CD40 ligand の遊離を促進することを明らかとしている。コラーゲン刺激による血小板活性化における低分子量 GTP 結合蛋白質の一つである Rac の関与を検討した。その結果、血小板において Rac は p44/p42 MAP キナーゼの上流で機能しその活性化を促進し、HSP27 のリン酸化を制御することおよび、コラーゲンによる PDGF-AB の分泌および soluble CD40 ligand の遊離を促進していることを明らかとした。

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 10 件)

1. Iida Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Ogura S, Kozawa O and Iida H. (-)-Epigallocatechin gallate selectively inhibits ADP-stimulated human platelet activation: suppression of HSP27 phosphorylation via p38 MAP kinase. Mol. Med. Rep. 査読有 in press
2. Kageyama Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Iida Y, Akamatsu S, Kondo A, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Iida H, Kozawa O and Ogura S. Involvement of Rac in thromboxane A2-induced human platelet activation: regulation of sCD40 ligand release and PDGF-AB secretion. Mol. Med. Rep. 査読有 2014;10:107-112.
3. Cuong TN, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S,

- Kuroyanagi G, Kondo A, Mizutani J, Wada I, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O and Ogura S. Thrombopoietin amplifies ADP-induced HSP27 phosphorylation in human platelets: importance of its pre-treatment. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 2013;31:1291-1297.
4. Kageyama Y, Doi T, Akamatsu S, Kuroyanagi G, Kondo A, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O and Ogura S. Rac regulates collagen-induced HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase in human platelets. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 2013;32:813-818.
 5. Akamatsu S, Kojima A, Tanaka A, Hayashi K, Hashimoto T. Symmetric Peripheral Gangrene. *Anesthesiology.* 査読有 2013;118:1455.
 6. Doi T, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Cuong NT, Kageyama Y, Iida Y, Kondo A, Akamatsu S, Otsuka T, Iida H, Kozawa O and Ogura S. Effect of antithrombin III on glycoprotein Ib/IX/V activation in human platelets: suppression of thromboxane A₂ generation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 査読有 2012;87:57-62.
 7. Tokuda H, Kato K, Kasahara S, Matsushima-Nishiwaki R, Mizuno T, Sakakibara S and Kozawa O. Significant correlation between the acceleration of platelet aggregation and phosphorylation of HSP27 at Ser-78 in diabetic patients. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 2012;30:1387-1395.
 8. Takeyama N, Noguchi H, Hirakawa A, Kano H, Morino K, Obata T, Sakamoto T, Tamai F, Ishikura H, Kase Y, Kobayashi M, Naka T, Takahashi Y; Japan Sepsis Study Group (Akamatsu S). Time to initiation of treatment with polymyxin B cartridge hemoperfusion in septic shock patients. *Blood Purif.* 査読有 2012;33:252-256.
 9. Enomoto Y, Adachi S, Doi T, Natsume H, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Tokuda H, Yoshimura S, Otsuka T, Ogura S, Kozawa O and Iwama T. cAMP regulates ADP-induced HSP27 phosphorylation in human platelets. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 2011;27:695-700.
 10. Akamatsu S, Kondo Y, Ueda N, Kojima A, Fukuoka N, Takada M, Dohi S, Hashimoto T. Continuous cardiac output measurement with a Doppler-equipped pulmonary artery catheter. *Anesth. Analg.* 査読有 2011;112:851-857.
- 〔学会発表〕(計 19 件)
1. 赤松 繁.安全に TEE を施行するために. 日本心臓血管麻酔学会第 18 回学術大会, 2013 年 9 月 28 日 北九州市
 2. Doi T, Kozawa O, Ogura S. Analysis of the anti-inflammatory effects of antithrombin III on human blood. Thirty-Sixth Annual Conference on Shock. 2013 年 6 月 4 日 San Diego, USA
 3. 赤松 繁.左室拡張機能を考える. 日本麻酔科学会第 60 回学術集会, 2013 年 5 月 25 日, 札幌市
 4. 小牧千人, 赤松 繁. 間質性肺炎による急性呼吸不全に対する PMX-DHP と HF-HV HDF の併用効果の検討. 第 40 回日本集中治療医学会学術集会. 2013 年 3 月 2 日, 松本市
 5. 土井智章, 小澤 修, 加藤久晶, 小倉真治. アンチトロンビン III の血小板に対する抗炎症作用の基礎的解析. 第 40 回日本集中治療医学会学術集会. 2013 年 2 月 28 日 松本
 6. 土井智章, 小澤 修, 小倉真治. アンチトロンビン III の血小板に対する抗炎症作用の基礎的解析. 第 40 回日本救急医学会総会・学術集会. 2012 年 11 月 13 日 京都
 7. Doi T, Kozawa O, Enomoto Y, Ogura S. Analysis of the anti-inflammatory effects of antithrombin III on human platelets. Thirty-Fifth Annual Conference on Shock. 2012 年 6 月 12 日 Florida, USA
 8. 鄧 本祥, 赤松 繁, 林 慶州, 田中 亜季, 橋本 慎介, 松波紀行. 原子力発電停止による突然の停電に対応するための麻酔・手術部門における対策: 手術部稼働の設定での停電訓練. 日本麻酔科学会第 59 回学術集会. 2012 年 6 月 9 日, 神戸市
 9. 赤松 繁, 福岡尚和, 飯田美紀, 小島明子, 橋本慎介, 飯田宏樹. 腹部大動脈手術に TEE は必須? 日本麻酔科学会第 59 回学術集会. 2012 年 6 月 8 日, 神戸市
 10. 小島明子, 赤松 繁, 鄧 本祥, 林 慶州, 田中 亜季, 橋本 慎介, 野垣 晴彦. パルス CO オキシメトリによる非侵襲的ヘモグロビン測定値にビリルビンが与える影響. 第 39 回日本集中治療医学会学術集会. 2012 年 3 月 1 日, 千葉市
 11. Akamatsu S, Deng B, Hayashi K, Tanaka A, Kojima A, Hashimoto S, Nogaki H, Hashimoto T. Complete

- power outage drill in a tertiary care hospital. The 12th Joint Scientific Congress of JSICM and KSCCM. 2012年2月29日 Chiba, Japan
12. 土井智章、小澤 修、榎本由貴子、小倉真治. アンチトロンビン III (AT-III) の血小板に対する抗炎症作用の解析. 第39回日本集中治療医学会学術集会. 2012年2月28日 幕張
 13. 小牧千人, 丹羽 崇, 赤松 繁. 間質性肺炎による急性呼吸不全に対するPMX-DHPとHF-HV-HDFの併用経験. 第39回日本集中治療医学会学術集会. 2012年2月28日, 千葉市
 14. Doi T, Adachi S, Kato H, Kozawa O, Ogura S. Molecular mechanism of antithrombin III in the anti-inflammatory effects on human platelets. Thirty-Fourth Annual Conference on Shock. 2011年6月11日, Norfolk, USA
 15. 小牧千人, 丹羽 崇, 赤松 繁. 高度の肺高血圧を制御し得なかった肺動脈性肺高血圧症の1剖検例. 第38回日本集中治療医学会. 2011年2月26日, 横浜市
 16. 田邊 淳, 小島明子, 田中亜季, 丹羽 崇, 橋本慎介, 野垣晴彦, 赤松 繁. トロンボモジュリンを投与し救命した電撃性紫斑病を呈した敗血症性ショック症例. 第38回日本集中治療医学会. 2011年2月25日, 横浜市
 17. 丹羽 崇, 林 慶州, 田邊 淳, 小島明子, 田中亜季, 橋本慎介, 小牧千人, 野垣晴彦, 赤松 繁. ヘルメット型NPPVマスク使用時の加湿についての検討. 第38回日本集中治療医学会. 2011年2月25日, 横浜市
 18. 土井智章、小澤 修、加藤久晶、足立政治、小倉真治. アンチトロンビン III の血小板に対する抗炎症作用の解析. 第38回日本集中治療医学会学術集会. 2011年2月24日, 横浜
 19. 野垣晴彦, 小島明子, 田中亜季, 橋本慎介, 赤松 繁. ミカファンギン投与後に発症した重篤な急性溶血反応. 第38回日本集中治療医学会. 2011年2月24日, 横浜市

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤松 繁 (AKAMATSU, Shigeru)
岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号: 20167828

(2) 研究分担者

小澤 修 (KOZAWA Osamu)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 90225417

(3) 連携研究者

()

研究者番号: