

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592307

研究課題名(和文) 遺伝子ノックダウン手法を用いた血小板細胞死がもたらす敗血症増悪病態の解明

研究課題名(英文) Elucitaion of the mecahisms underlying sepsis deterioration following platelet cell dath

研究代表者

中嶋 康文 (NAKAJIMA, YASUFUMI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70326239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：血小板は止血凝固系の働き以外に、炎症制御にも深く関与している事が最近知られている。敗血症病態において、血小板は好中球との相互作用により好中球よりNETsを産生させる事で炎症消退機構に寄与している。しかし、NETsが過剰に産生されると毛細血管が閉塞することで、臓器不全を来す可能性がある。我々は炎症、細胞死に關与するタンパク質遺伝子のノックダウン血小板細胞を作成し、好中球との共培養を実験を行った。実験結果より、細胞死の過程にある血小板と好中球の共培養ではNETsの産生が抑制されるが、過度な血小板活性化がNETsを過剰に産生させるため、適度な血小板活性化が炎症消退に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although platelets play a major role in controlling hemostasis, they also participate in inflammatory regulation. In septic conditions, platelets interact with neutrophils after recognizing pathogen-associated molecular patterns, which subsequently induce neutrophil etosis and release neutrophil extracellular traps (NETs) to efficiently deactivate pathogens. However, if this phenomenon occurs to a large extent, it might lead to organ failure. Here, we tested the hypothesis that controlling platelet cell death can regulate inflammation. We found that LPS and HMGB1 co-incubation accelerated platelet cell death. Knockdown of platelets by p38 MAPK and Bax inhibited this process. Co-incubation of activated platelets and neutrophils resulted in NETs release. Bax knockdown of platelets accelerated this NET release, while p38 MAPK knockdown of platelets inhibited it. The present findings indicate that an optimal platelet activation is necessary to attenuate inflammation.

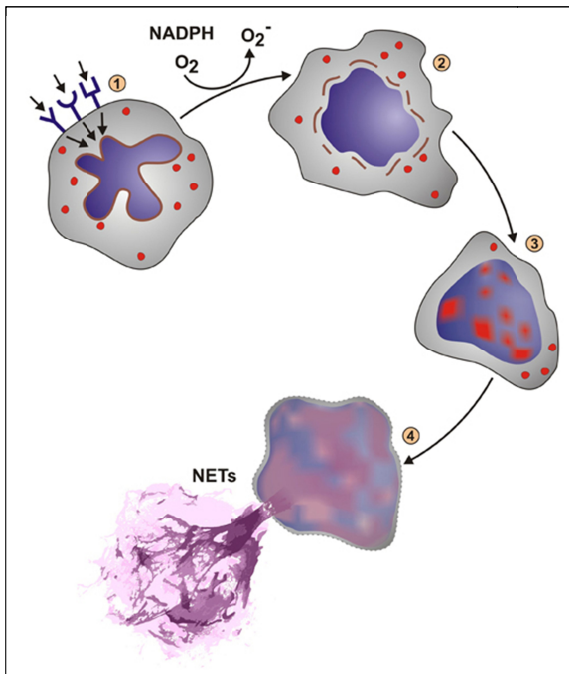
研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：周術期管理学

キーワード：遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、血小板は止血凝固系の本来の役割以外に、免疫系及び炎症系にも関与していることが広く報告されている。敗血症病態においては、血小板が病原微生物由来の PAMPs を認識し、好中球に結合して血小板好中球複合体を形成し、活性化血小板との相互作用により好中球が apoptosis をおこし、自らを犠牲にして、Neutrophil extracellular traps (NETs) と呼ばれる粘着性の網を放出し、効率的に病原体を捕捉・殺菌することが知られている。(下図)しかし、この現象が極度に起これば好中球より産出されるその他の物質により臓器障害を来す可能性がある。また以前より敗血症の病態において血小板減少が患者予後不良因子として深く関与していることが広く知られている。



(2) 活性化血小板と引き続き起こる血小板細胞死の際にホスファチジルセリンが露出する血小板膜表面上でトロンピンが大量に生成されることや、血小板数低下により抗菌能や炎症消退物質産生を低下させることが炎症増悪の要因になると我々は考えている。敗血症時の血小板活性化の具体的な機序に

ついて最近の研究の報告によると、血小板の膜表面において Toll Like Receptor 4 (TLR4) 受容体が発現し、LPS 投与により TLR4 受容体を介して血小板が活性化されることで、粘着性を増した血小板が肺に集積され、流血中の血小板が減少する。(Blood 107:637-41, 2006. J Immunol 182: 7997-8004, 2009)

(3) 今回、我々は予備実験を行った結果、LPS 刺激を血小板に与えることで細胞死 (アポトーシス) の過程が、(特にトロンピンなどの血小板に対するアゴニストを共に投与することで) 進行することが分かった。具体的には健康成人から採取した洗浄血小板溶液に LPS 又は HMGB1 添加により、血小板細胞内ミトコンドリア膜電位の低下と細胞内 Bak, Bax 発現の上昇、膜表面ホスファチジルセリン発現 (Microparticle 数の) 上昇が見られた。また、LPS 刺激を受けた血小板細胞上でトロンピン産生能が高まることが分かった。さらに、これらのホスファチジルセリンを発現する細胞死の過程にある血小板は、好中球に貪食されやすいことが分かった。以上の結果は、LPS 刺激に対する過度の血小板活性化と引き続き起こる血小板細胞の細胞死過程を防御できれば、敗血症時の血小板減少の抑制、並びに予後を改善すると考えた。

## 2. 研究の目的

- 血小板に遺伝子導入によりノックダウン血小板の作成方法の確立。
- 敗血症病態における血小板減少の機序をヒト正常血小板細胞、遺伝子ノックダウン血小板細胞を用いた実験系で解明すること。

## 3. 研究の方法

遺伝子ノックダウン血小板細胞を以下の数種類の方法で作成した、の方法が最も簡便で再現性も良いことが分かった。

- a. siRNA または、miRNA 発現ベクターを、ヒト CD34+ Progenitor Cell に導入後、血小板に分化するために必要なサイトカインを含んだ培養液 (IMDM with 1.5%BSA, Thrombopoietin, IL-6, IL-1b 各 10ug/ml, Stem cell factor 50ng/ml) により、3-4week 培養する方法
- b. ヒト成熟血小板に siRNA オリゴをリポフェクタミン等によるリポ製剤または、エレクトロポレーション法

a. に関しては、遺伝子導入効率が 50%、 に関しては、b. に関しては 遺伝子導入効率が 20%程度であった。

#### 4. 研究結果

a. LPS または、HMGB-1 を洗浄血小板溶液に投与する事で、コントロール群に比べ、血小板表面 CD62P の発現、血小板細胞内 p38MAPK のリン酸化、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア内チトクローム C の低下と Bax 上昇の実験結果を得た。また、培養実験系において、コントロール群に比べ、経時的に血小板数が減少した。これらは、経時的な血小板活性化と細胞死過程が進行している所見であると考えた。

b. LPS または、HMGB-1 による血小板数減少は、Bax ノックダウンまたは、p38MAPK ノックダウン血小板細胞において、Negative Control ノックダウン血小板細胞と比べ、有意に改善した。

c. 活性化血小板と好中球の共培養により、NETs が形成される事を、細胞免疫蛍光染色法で確認した。

d. 活性化 Bax ノックダウンまたは血小板細胞と好中球の共培養により、NETs の形成が促進したが、p38MAPK ノックダウン血小板細胞との共培養では、NETs の形成はコントロール群に比べ抑制された。

以上の結果より、Bax の上流にある p38MAPK は、細胞死以外に炎症の亢進に関与しており、適度に血小板の活性化を抑制する事で、過度な炎症病態を抑制出来る可能性があることを示唆する実験結果となった。

また、実験経過において血小板から放出されるマイクロ RNA がこれらの炎症病態に関与している事が分かったため、今後の研究展開として、旧来のアレイによる包括的な解析より、定量性のある次世代シーケンサーを購入し、血小板に発現している microRNA と、活性化された血小板から血中に放出された miRNA 発現の包括的解析の予備実験を行った。

その方法として mirVana™ miRNA Isolation Kit を用いて Small RNA を生成後、以下の様に行った。

1. Small RNA のライブラリ作成 Ion Total RNA-Seq Kit を用いてフラグメント化
2. cDNA に変換 逆転写酵素を用いる
3. ビース調整 (4時間) エマルジョン PCR 法を用いて、cDNA を増幅
4. シーケンシング (3時間) シーケンサーによる miRNA 発現定量
5. データ解析 (1時間) サーバーに SFF または FASTQ 形式のデータが転送される

発現定量解析には、CLC バイオ社の解析ソフト (Genomic Work Bench) を使用した。これらの実験結果は、今後学会、論文等で報告を予定にしている。

#### 5. 主な発表論文等 (総説)

1. 中嶋康文 麻酔、集中治療領域における体温管理の残された課題について 臨床体温. 29(1): 2 -9, 2011
2. 影山京子\*, 早川由夏, 中嶋康文, 橋本悟: 周術期におけるアナフィラキシー

- 麻酔 60:55-66, 2011, CI 1
3. 中嶋康文 止血・凝固系への低体温の影響 血小板は血液内の温度受容器 (徹底分析シリーズ 周術期の低体温) LiSA 19(1): 24-29, 2012.
  4. 中嶋康文、溝部俊樹 新しい経口抗凝固薬とその適応 臨床麻酔 36(3): 493-500, 2012.
  5. 柴崎雅志, 志馬伸朗, 中嶋康文, 石井祥代, 溝部俊樹, 佐和貞治 小児気管チューブ挿入長決定法の比較 日本臨床麻酔学会誌 32(3): 371 -374 2012
  6. 柴崎雅志\*, 中嶋康文, 志馬伸朗, 佐和貞治: 小児用カフ付き気管チューブ. 麻酔 61:1023-1029, 2012
  7. 小川覚\*, 中嶋康文、溝部俊樹: 周術期出血と希釈性凝固障害 - 止血治療を考えるための“3つの軸”. 臨床麻酔 36:1773-1781, 2012
  8. 止血・凝固機構と周術期の変化 日本心臓血管麻酔学会第17回学術大会 専門医コースレクチャーテキスト 中嶋康文、小川覚、溝部俊樹 P39-42. 2012
  9. 虚血性僧帽弁逆流患者のTEE評価と麻酔管理 日本心臓血管麻酔学会第17回学術大会心エコーワークショップテキスト 中嶋康文、中山力恒、竹下淳、溝部俊樹 P47-48. 2012
  10. 村瀬百子、中嶋康文\*, 中山力恒、柴崎雅志、佐和貞治、溝部俊樹: 止血凝固機構と開心術周術期における止血凝固異常. 日本心臓血管麻酔学会誌 16: 23-30, 2012
  11. 中嶋康文: 麻酔・集中治療領域における体温管理と患者予後. 日本臨床麻酔学会誌 33: 25-31, 2013
  12. 柴崎雅志\*, 志馬伸朗、中嶋康文、佐和貞治: 小児用 RAE チューブ. 麻酔 62:368-375, 2013
  13. 中嶋康文、小川覚、溝部俊樹: 周術期における血栓塞栓症と抗血小板・抗凝固療法(新規抗血栓薬と今後のブリッジング療法). LiSA 20: 240-246, 2013
  14. 小川覚、中嶋康文、平崎祐二、溝部俊樹: 人工心肺におけるヘパリン凝固とそのモニタリング(ACTを活用する) 日本心臓血管麻酔学会誌 17: 43-50, 2013
  15. 中山力恒、中嶋康文、小川覚、飯田淳、溝部俊樹: 特集 慢性腎臓病と麻酔管理 CKD患者の非心臓手術の麻酔管理. 麻酔 62: 1326-1335, 2013.
  16. 小川覚、中嶋康文、溝部俊樹: 洗浄赤血球液-LR「日赤」について、麻酔科領域での適応や禁忌に関して. 臨床麻酔 2013.12  
(英文原著)
1. Shibasaki M, Nakajima Y, Shime N, Sawa T, Sessler DI. Prediction of optimal endotracheal tube cuff volume from tracheal diameter and from patient height and age: a prospective cohort trial. J Anesth. 2012; 26:536-40. 査読有
  2. Nakayama Y, Shibasaki M, Shime N, Nakajima Y, Mizobe T, Sawa T. The RACHS-1 risk category can be a predictor of perioperative recovery in Asian pediatric cardiac surgery patients. J Anesth. 2013; 27:850-4. .
- [学会発表](計8件)
1. 石井祥代、中嶋康文、中山力恒 他 敗血症病態における単球系細胞死と炎症消退脂質による細胞死抑制機序の解明、日本麻酔科学会第58回学術集会、2011年5月20日、神戸

2. 金光 理佐、中嶋 康文、柴崎 雅志、飯田 淳、北川 裕利、松田 直之 冠動脈バイパス手術周術期における長時間及び超短時間作用型 受容体遮断薬による心筋保護作用について 日本麻酔科学会第 58 回学術集会、2011 年 5 月 20 日、神戸
3. 村瀬百子、中嶋康文、中山力恒 他 人工心肺手術周術期の血小板機能低下に関連する細胞内情報伝達系の経時的変化 日本心臓血管麻酔学会 2011 年 10 月 8 日、旭川 (藤田昌夫賞受賞)
4. 中山力恒、中嶋康文、前田祥子 他 トロンボエラストメトリーを用いた周術期止血管理は小児開心術における術後出血量および術後輸血量を減少させる、日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013 年 5 月 23 日、札幌 (循環部門最優秀演題獲得)
5. 中山力恒、中嶋康文、竹下淳、溝部俊樹、佐和貞治 小児患者における新しい超音波ガイド下観血的動脈圧カテーテル留置法 日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013 年 5 月 23 日、札幌
6. 竹下淳、中山力恒、中嶋康文、溝部俊樹、佐和貞治 前腕近位部橈側皮静脈は、小児患者における超音波ガイド下末梢静脈カテーテル留置に適している 日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013 年 5 月 24 日、札幌 (麻酔科関連部門最優秀演題獲得)
7. 飯田淳、中嶋康文、石井祥代、村瀬百子、加藤祐子、佐和貞治 敗血症時における microRNA によるマクロファージ貪食能の制御 日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013 年 5 月 24 日、札幌 (麻酔科関連部門優秀演題)
8. 石井祥代、中嶋康文、飯田淳、村瀬百子、

深澤まどか、佐和貞治 敗血症病態の高糖環境におけるマクロファージ貪食能低下に寄与する細胞内情報伝達機序と炎症消退脂質による抑制効果 日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013 年 5 月 24 日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中嶋 康文 (NAKAJIMA YASUFUMI)  
 京都府立医科大学・医学研究科・講師  
 研究者番号：70326239

### (2) 研究分担者

柴崎 雅志 (SHIBASAKI MASAYUKI)  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：20405319

溝部 俊樹 (MIZOBE TOSHIKI)  
 京都府立医科大学・医学研究科・講師  
 研究者番号：50239266

橋本 悟 (HASHIMOTO SATORU)  
 京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：90167578

佐和貞治 (SAWA TEIJI)  
 京都府立医科大学・医学研究科・教授  
 研究者番号：10206013

### (3) 連携研究者

該当無し

