

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462335

研究課題名(和文)敗血症の進展における凝固・線溶系と炎症反応のクロストークの分子基盤

研究課題名(英文) Cross-talk regulation by platelets, coagulation system and fibrinolysis system in response to sepsis

研究代表者

赤松 繁 (akamatsu, shigeru)

岐阜大学・大学院医学系研究科・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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：活性化第X因子(FXa)阻害薬は新たな経口抗凝固薬として注目されている。しかし、血小板機能に対するFXa阻害薬の直接作用の詳細は未だ明らかではない。本研究ではコラーゲンによる血小板の活性化に対するFXa阻害薬の直接作用を検討した。ヒト血小板において、FXa阻害薬はコラーゲン刺激によるp44/p42 MAP キナーゼを介したHSP27のリン酸化を阻害し、リン酸化HSP27の遊離を抑制することを明らかとした。本解析では、これまで明らかとなっていなかったコラーゲン刺激による血小板活性化にFXa阻害薬が直接影響を及ぼすことを示した。

研究成果の概要(英文)：Selective inhibitors of factor Xa (FXa) are widely recognized as useful therapeutic tools for stroke prevention in non-valvular atrial fibrillation or venous thrombosis. Thrombin generated by the activation of factor X to FXa, acts as a potent activator of human platelets. However, little is known whether FXa inhibitors directly affect the function of human platelets. We previously demonstrated that collagen induces the phosphorylation of heat shock protein 27 (HSP27), a small-molecular weight HSP via p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase in human platelets, eventually resulting in the release of HSP27. In the present study, we investigated the direct effect of FXa inhibitors (edoxaban and rivaroxaban) on the collagen-induced human platelet activation. Our results strongly suggest that FXa inhibitor reduces the collagen-stimulated release of phosphorylated HSP27 from human platelets due to the inhibition of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase.

研究分野：麻酔学分野

キーワード：血小板 凝固因子 線溶系 血栓 PDGF-AB 可溶性 CD40 ligand HSP27

### 1. 研究開始当初の背景

重症敗血症の生命予後は悪く、Society of Critical Care Medicine により surviving sepsis campaign guidelines (SSCG)が2004年に提唱された。その後 SSCG は、2008年に続き2012年 SSCG2012として改訂され、敗血症の生命予後改善に向けた努力がなされている。従来、本疾患におけるサイトカインの役割が注目され研究されてきた。しかし、近年、トロンピンを中心とした血液凝固・線溶系の病態への関与の重要性およびその治療薬の有用性が再認識されてきている。SSCG2008までは敗血症に対する治療として活性化プロテインCが推奨されていたが、活性化プロテインC製剤は出血性合併症の問題から2011年10月に市場撤退となった。一方、私共はアンチトロンピンIIIには、従来のトロンピンと結合して分解を促進する作用以外に、直接血小板に作用しトロンボキサンA2を介した血小板凝集を抑制するという新たな作用を有することを明らかとした。また、敗血症性ショックから電撃性紫斑病に陥りSymmetric peripheral gangreneを呈した重症例をアンチトロンピンIIIとトロンボモジュリンに加えて、本邦で開発された急性血液浄化法を用いた治療法で救命したことを報告している。さらに最近、播種性血管内凝固症候群(DIC)の治療薬であるアンチトロンピンやトロンボモジュリン等の抗凝固薬が急性呼吸促迫症候群(ARDS)に著効した症例、一方、ARDS治療薬であるシベレスタットなどの好中球エラスターゼ阻害薬が敗血症性DICに効果を示し病態が改善する症例を臨床経験している。以上より、従来の凝固カスケードのみでは説明できない、凝固・線溶系因子の新たな作用機序の存在が示唆されるがその詳細は未だ明らかとされていない。

生体は過大な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。過大な侵襲刺激を受けると、容易にSIRSが惹起され、SIRSから敗血症や多臓器不全に陥ることが知られている。最近、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が重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。侵襲刺激は生体に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ている。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、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抗凝固薬は高用量であり、凝固系への影響も考えられるが、その詳細は明らかとされていない。また、私共は敗血症性ショックに対してPMX-DHPの早期導入が効果的であることを報告している。敗血症に伴う急性炎症反応と血液/血小板・凝固・線溶系との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、アンチトロンピンなどの凝固系因子の活性化障害、PAI-1産生亢進による線溶系活性の低下が考えられる。凝固因子Xa、トロンピン、TF・VII複合体が、炎症反応を惹起することは報告されている。さらに、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(IL)-6産生を引き起こし、血管内皮においてもIL-6、IL-8産生を刺激することが明らかとされている。以上のように、敗血症の進展において血液凝固・線溶系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を起こし、その病態を増悪させると考えられ、炎症下の凝固・線溶系には、血小板、好中球や血管内皮細胞に対する新たな作用機序の存在が推測されるが、しかしその詳細は明らかとされていない。

### 2. 研究の目的

過大な侵襲刺激から、全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome:SIRS)、敗血症、多臓器不全に陥る病態における炎症反応の役割の重要性はよく知られている。最近、炎症反応と血液凝固系との相互作用がその病態を重症化させると考えられるようになってきた。敗血症は、従来、生体への侵襲を起点とした炎症性サイトカインの過剰産生が主因と考えられ解析が進められてきた。临床上、凝固・線溶系治療薬が抗炎症作用を有することが報告され、凝固・線溶系因子の重要性が再認識されてきており、これらの因子が新たな作用を有すると考えられているが、その病態および機序の詳細は明らかとされていない。本研究は、敗血症から多臓器不全に陥る病態における、トロンピンを中心とした凝固因子およびその関連凝固系因子(プロテインC活性、アンチトロンピン、トロンボモジュリン等)の新たな作用と炎症反応との相互作用の分子機序を解明し、重症敗血症の治療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、U46619(thromboxane A2受容体アゴニスト)、TRAP

(トロンビン受容体活性化ペプチド)およびリストセチン(糖蛋白Ib/VI/IX活性化因子)による血小板凝集能を検討した。

(2) ADP、コラーゲン、U46619、TRAP 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[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)]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、U46619、TRAP 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) 活性化第 X 因子阻害薬 (rivaroxaban および edoxaban) の ADP、コラーゲン、U46619、TRAP 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。

(5) 脂質メディエーターである sphingosine 1-phosphate の ADP、コラーゲン、U46619、TRAP 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。

(6) ADP、コラーゲン、U46619、TRAP およびリストセチン刺激により $\alpha$ 顆粒から分泌される PDGF-AB を ELISA 法で検討した。

(7) ADP、コラーゲン、U46619、TRAP およびリストセチン刺激により遊離される可溶性 CD40 ligand を ELISA 法で検討した。

(8) ADP、コラーゲン、U46619、TRAP およびリストセチン刺激によりリン酸化され、遊離されるリン酸化 HSP27 を ELISA 法で検討した。

#### 4. 研究成果

(1) thromboxane A2 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 p38 MAP キナーゼの上流で機能し、その thromboxane A2 による血小板凝集反応において促進的役割をすることおよび、thromboxane A2 による PDGF-AB の分泌および可溶性 CD40 ligand の遊離を促進していることを明らかとした。

(2) 私共は既にコラーゲン刺激による血小板の活性化において p44/p42 MAP キナーゼを介する HSP27 のリン酸化が血小板顆粒からの PDGF-AB の分泌に促進的に作用していることを明らかとしている。さらに、血小板内の HSP27 のリン酸化に伴い、リン酸化 HSP27 が血小板外へ遊離されることを明らかとした。一方、活性化第 X 因子 (FXa) 阻害薬はワルファリンに替わる新たな経口抗凝固薬とし

て注目されている。本研究ではコラーゲン刺激による血小板の活性化に対する FXa 阻害薬の直接作用を検討した。その結果、ヒト血小板において、FXa 阻害薬はコラーゲン刺激による p44/p42 MAP キナーゼを介した HSP27 のリン酸化を阻害し、リン酸化 HSP27 の遊離を抑制することを明らかとした。

(3) 私共は既に血小板をコラーゲンで刺激すると、p38 MAP キナーゼの活性化を経て HSP27 のリン酸化が誘導されること、そのリン酸化に伴い血小板から細胞増殖因子である PDGF-AB および炎症惹起物質である可溶性 CD40 ligand が分泌・遊離されること、加えて、細胞内でリン酸化された HSP27 も遊離されることを明らかとしている。一方、脂質メディエーターである sphingosine 1-phosphate は、血小板が巨核球から産生されるときに sphingosine 1-phosphate 1 受容体並びに sphingosine 1-phosphate 4 受容体の活性化を介し、重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、成熟血小板での sphingosine 1-phosphate の役割の詳細は明らかとされていない。今回、コラーゲン刺激による血小板活性化に対する sphingosine 1-phosphate の影響の検討を行った。その結果、ヒト血小板において sphingosine 1-phosphate はコラーゲン刺激による血小板凝集、HSP27 のリン酸化、血小板からの PDGF-AB 分泌、可溶性 CD40 ligand 遊離およびリン酸化 HSP27 遊離を sphingosine 1-phosphate 1 受容体ではなく、sphingosine 1-phosphate 4 受容体を介し制御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9件)

1. Takagi T, Imai T, Mishiro K, Ishisaka M, Tsujimoto M, Ito H, Nagashima K, Matsukawa H, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Kozawa O, Iwama T and Hara H. Cilostazol ameliorates collagenase-induced cerebral hemorrhage by protecting the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 査読有 2017;37:123-139.
2. Tokuda H, Kuroyanagi G, Tsujimoto M, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Enomoto Y, Iida H, Otsuka T, Ogura S, Iwama T, Kojima K and Kozawa O. Thrombin receptor-activating protein (TRAP)-activated Akt is involved in the release of phosphorylated-HSP27 (HSPB1) from platelets in DM patients. *Int. J. Mol. Sci.* 査読有 2016;17:737.

3. Tsujimoto M, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Kito Y, Enomoto Y, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O and Iwama T. Factor Xa inhibitor suppresses the release of phosphorylated HSP27 from collagen-stimulated human platelets: inhibition of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase. *PLoS One* 査読有 2016;11:e0149077.
  4. Tsujimoto M, Tokuda H, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Kainuma S, Matsushima-Nishiwaki R, Onuma T, Iida Y, Kojima A, Sawada S, Doi T, Enomoto Y, Tanabe K, Akamatsu S, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Kozawa O and Iwama T. AICAR reduces collagen-stimulated secretion of PDGF-AB and release of soluble CD40 ligand from human platelets: suppression of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase. *Exp. Ther. Med.* 査読有 2016;12:1107-1112.
  5. Tokuda H, Kuroyanagi G, Tsujimoto M, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Onuma T, Kojima A, Doi T, Tanabe K, Akamatsu S, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Iwama T, Tanikawa T, Ishikawa K, Kojima K and Kozawa O. Release of phosphorylated HSP27 (HSPB1) from platelets is accompanied with the acceleration of aggregation in diabetic patients. *PLoS One* 査読有 2015;10:e0128977.
  6. Iida Y, Doi T, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Tsujimoto M, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Enomoto Y, Tanabe K, Otsuka T, Iwama T, Ogura S, Kozawa O and Iida H. Rho-kinase regulates human platelet activation induced by thromboxane A<sub>2</sub> independently of p38 MAP kinase. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 査読有 2015;94:73-81.
  7. Tsujimoto M, Doi T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Iida Y, Enomoto Y, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O and Iwama T.  $\alpha$ B-crystallin reduces ristocetin-induced soluble CD40 ligand release in human platelets: suppression of thromboxane A<sub>2</sub> generation. *Mol. Med. Rep.* 査読有 2015;12:357-362.
  8. 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 2014;10:1383-1388.
  9. 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 A<sub>2</sub>-induced human platelet activation: regulation of sCD40 ligand release and PDGF-AB secretion. *Mol. Med. Rep.* 査読有 2014;10:107-112.
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. 第 44 回日本集中治療医学会学術集会  
2019 年 3 月 9 日札幌  
早期からのエポプロステノール併用 Upfront Combination Therapy が有効であった重症肺高血圧症の一例  
森下健太郎, 勝木竜介, 三鴨 肇, 森 茂, 道野朋洋, 赤松 繁, 香田雅彦, 鷹津久登
  2. Anesthesiology 2016 Annual Meeting  
2016 年 10 月 22 日 Chicago, USA  
Sphingosine-1-phosphate suppresses collagen-induced human platelet activation.  
Takashi Onuma, Kumiko Tanabe, Osamu Kozawa, Hiroki Iida
  3. 第 31 回日本 Shock 学会総会  
2016 年 10 月 6 日 東京  
血小板の炎症誘導作用における Rac の役割  
土井智章, 陰山康成, 小澤 修, 小倉真治
  4. 日本心臓血管麻酔学会第 21 回学術大会  
2016 年 9 月 16 日 横浜  
心機能を TEE でどう捉えるか . TEE セミナー  
「心機能と TEE」  
赤松 繁
  5. 日本麻酔科学会東海北陸支部第 14 回学術集会  
2016 年 9 月 10 日 津  
20 種類以上の多剤を内服していた長期透析患者の麻酔経験  
山本恭介, 道野朋洋, 杉本純子, 河村三千香, 赤松 繁
  6. 日本麻酔科学会東海北陸支部第 14 回学術集会  
2016 年 9 月 10 日 津  
Tracheal Bronchus のためダブルルーメンチューブの適切位置への留置に難渋した肺腫

瘍症例

杉本純子, 道野朋洋, 赤松 繁

7. 第 18 回日本救急医学会中部地方会

2015 年 12 月 12 日 福井

急激な経過で破裂したサルモネラ菌による  
感染性腹部大動脈瘤の一例

関谷憲晃, 湯本和也, 三鴨 肇, 森 茂, 赤  
松 繁, 景山聡一郎.

8. 第 20 回日本心臓血管麻酔学会

2015 年 10 月 10 日 福岡

非心臓手術における TEE の役割

赤松 繁

9. Thirty-eight Annual Conference on Shock

2015 年 6 月 9 日 Denver

The role of Rac in human platelets: An  
analysis of the molecular mechanism  
underlying Rac-effects on the activation  
Doi T, Kozawa O, Kageyama Y, Ogura S

10. 第 42 回日本集中治療医学会学術集会

2015 年 2 月 11 日 東京

重症レジオネラ肺炎に対し ECMO を導入した  
一例

丹羽 崇, 森 珠美, 田口聡久, 前田純依,  
鄧 本祥, 南 悦子, 小島明子, 田中亜季,  
小牧千人, 赤松 繁

11. 第 42 回日本集中治療医学会学術集会

2015 年 2 月 10 日 東京

新館開設に伴う重症入院患者の搬送につ  
いて

小島明子, 赤松 繁, 鄧 本祥, 田中亜季,  
南 悦子, 佐藤玲子, 丹羽 崇, 野垣 晴彦

12. 第 42 回日本集中治療医学会学術集会

2015 年 2 月 10 日 東京

内頸動脈ステント留置術施行中に心肺停止  
となり, 緊急開胸術で救命できた大動脈弁狭  
窄症の周術期管理

田口聡久, 田中亜季, 丹羽 崇, 小島明子,  
南 悦子, 野垣 晴彦, 熊田佳孝, 赤松 繁

13. 日本心臓血管麻酔学会第 19 回学術大会

2014 年 9 月 20 日 吹田

TTE 経胸壁心エコーによる測定のための画像  
オリエンテーション

赤松 繁

14. 岐阜集中治療カンファレンス . 2014 年 6

月 27 日 岐阜

集中治療における DIC の病態と治療 .

赤松 繁

15. 第 29 回日本 Shock 学会

2014 年 5 月 17 日 松山

血小板機能における Rac の役割 : 抗炎症作用

の分子機序解析

土井智章、陰山康成、小澤 修、小倉真治

〔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 Sigeru)

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：

(4)研究協力者 ( )