

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860869

研究課題名(和文) 深部静脈血栓症におけるsling関連分子の機能解析

研究課題名(英文) Function of sling associated molecules in deep venous thrombosis

研究代表者

桑野 嘉弘 (Kuwano, Yoshihiro)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：60625044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Gai2 subunitを欠損する好中球ではarrestが抑制され、Gai3 subunitを欠損するとtransmigrationとchemotaxisが抑制されることが分かった。これにより、深部静脈血栓症においては、Gai3 subunitの抑制やGai2 subunitの活性化により、好中球が血管壁についたまま、血管外に移動していかない、つまりは症状の増悪に働く可能性があり、今後、これらの分子を特異的に抑制もしくは活性化することにより、副作用を抑えつつ深部静脈血栓症をコントロールしていくことが可能となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils arrest in Gai2 deficient neutrophils is defective. Gai3 deficient neutrophils showed reduced transmigration but normal arrest. Gai3, but not Gai2, deficient neutrophils showed significantly reduced migration and directionality also in a microfluidic device. This suggest that the activation of Gai2 subunit or the inhibition of Gai3 subunit in deep venous thrombosis may cause the inhibition of transmigration of neutrophils from the venous wall and the exacerbation of the disease activity. The specific control of the activity of these molecules may lead to the improvement of the symptom in deep venous thrombosis with less side effects.

研究分野：皮膚科学

キーワード：好中球 シグナル伝達 Gai subunit

1. 研究開始当初の背景

深部静脈血栓症は静脈内に血栓を生じることにより、腫脹、疼痛、皮膚の色調変化を生じる疾患である。一部の病態は術後合併症、エコノミークラス症候群として社会的にも広く認知されている。外科的血栓摘除術、血栓溶解療法や抗凝固療法といった治療が行われているが、合併症である肺血栓塞栓症が発症した場合の死亡率は依然 14%と高率であり、新規治療法及び、新規予防法の開発が急務である。血栓溶解療法や抗凝固療法は強力な治療手段ではあるが、ともに出血傾向をもたらすという副作用があり、薬剤の効果を増強することには限界がある。そのため、抗凝固療法とはまったく別のアプローチによる疾患コントロール方法が発見されれば、治療、予防法に飛躍的な発展をもたらす可能性が高い。近年、深部静脈血栓症では、炎症細胞浸潤が生じており、この細胞浸潤が重要な役割を果たしていることが示されている。このような、免疫学的、炎症細胞学的な観点よりみた、深部静脈血栓症の病態生理の解明と、それに基づいた新規治療のターゲットとなる分子の同定が切に望まれている。

深部静脈血栓症において、血栓の形成、増大には炎症細胞が重要な役割を果たすと考えられているが、モデルマウスを使った実験においては、特に好中球と単球の役割が重要であることが示唆されている。

白血球や血管内皮細胞に発現する細胞接着分子は炎症細胞浸潤に重要な働きを担っており、炎症モデルによって、どのセレクチンやインテグリンがどの程度関与するかが詳細に解明されている。感染症を含む多くの炎症病変において、炎症細胞浸潤は主にまだ流速の遅い後毛細血管細静脈においてローリングを含めた一連のステップによって生じるのに対して、深部静脈血栓症の病変である比較的大きな静脈では流れが速くなるため、ずり応力、つまり細胞を押し流す力が強く働く。好中球はこうした高ずり応力下でもローリングできるが、なぜ速い血流に抵抗できるのか、テザー形成等の既知のメカニズムのみでは説明が困難であった。

最近、我々は、好中球がローリング中に細胞の前方に *sling* と呼ばれる突起状の構造物を形成していることを発見し、その突起上の PSGL-1 と P-selectin との結合が安定したローリングに寄与し、炎症細胞浸潤に重要であることを明らかにした。細胞接着分子は *sling* 上にも分布するが、その発現量や分布は分子により異なる。例えば PSGL-1 は *sling* 上を斑状かつ飛び飛びに存在するが、LFA-1 は均一全体に分布する。*sling* は比較的流速の速いところで特異的に形成されるが、後毛細血管細静脈を場とする他の多くの炎症病変と違い、深部静脈血栓が形成されるのはまさにこの血管径が比較的太く流速の速い血管である。そのため、深部静脈血栓症においては

sling の形成が病態に重要な役割を果たしていることが予想される。従って *sling* 上に発現している細胞接着分子が深部静脈血栓症の形成において重要な役割を担っていることが予想される。最近新しく開発された静脈狭窄症モデルでは、血流が保たれるため、*sling* の解析が可能である。そのため、まず、*sling* 上に発現する細胞接着分子の関与について、静脈狭窄による深部静脈血栓症マウスモデルを各細胞接着分子欠損マウスに用いることにより解析を行ったが、これについては有意な差を認めなかった。接着分子の活性化にはケモカインからのシグナル伝達が重要であることが分かっているため、このシグナル伝達分子について更なる検討を加えることにした。

2. 研究の目的

ケモカインからのシグナル伝達分子の機能を解析することにより、深部静脈血栓症の治療において、従来の治療と比較して、副作用を抑えつつ効果を発揮するような標的分子の候補を見出すことにある。

3. 研究の方法

Gai2 欠損マウスもしくは Gai3 欠損マウスから好中球を単離し、トランスウエルアッセイ、マイクロ流体装置を使用したケモタクシスアッセイ、Fluo3 によるカルシウムアッセイ、ウエスタンブロット法による AKT リン酸化の測定を施行した。また、Gai2 欠損マウスもしくは Gai3 欠損マウスの *in vivo* の実験として、精巣挙筋に対して生体顕微鏡による直接観察を行い、CXCL1 の静脈内投与によるアレストの観察と CXCL1 の血管外への注射投与による好中球の遊走の観察を行った。

4. 研究成果

まず、Gai2 と Gai3 が、好中球のトランスマイグレーションに必要などうかを調べるために、Gai2 と Gai3 欠損マウスの好中球を単離し、トランスウエルによるマイグレーションアッセイを行った。Gai3 欠損マウス由来の好中球では CXCL1 へのマイグレーションが有意に減少していることが分かった。これに対して、Gai2 欠損マウスでは、マイグレーションの低下は認められなかった。チェッカーボードアッセイも行ったが、Gai3 欠損マウス由来の好中球では、ケモタクシスが 50%程度低下していることが分かった。

次に、Gai3 欠損マウスの好中球においてトランスマイグレーション以外の好中球リクルートメントに影響する機能が抑制されていないか調べるために、アレストを調べることとした。生体顕微鏡検査を行うことにした。具体的にはマウスの精巣挙筋を露出し、精巣挙筋内の血管内に存在する好中球を *in vivo*

で観察した。CXCL1 を投与すると、通常血管内で転がっている好中球は急に血管壁にしっかりとくっついて動かなくなり、転がっていくのが止まるが、これがアレストである。Gai3 欠損マウスにおいては、CXCL1 を投与後のアレストは正常に起きることが分かった。Gai2 欠損マウスではアレストは抑制されることが分かっているため、Gai3 欠損マウスにおいて、アレストは抑制されず、トランスマイグレーションが抑制されるのは Gai2 欠損マウスでの挙動の丁度反対となっていることが分かった。

トランスウエルアッセイは簡便な方法で広く使用されてはいるが、トランスマイグレーションの低下が、移動の方向性が正しくなくなったために起きたのか、移動する距離自体が低下してしまい起きたのかは分からないといった点など問題点も多い。そのため、今度は近年開発されたマイクロ流体装置での解析に好中球が適合されるような工夫をすることにより、好中球の遊走能を測定できるようにした。具体的にはマイクロ流体装置内を ICAM-1 というたんぱく質でコートすることにより、好中球がマイクロ流体装置内を自由に遊走できるようにした。マイクロ流体装置内では、ケモカインの濃度を低濃度から高濃度まで徐々に濃度を変えたような場を形成することができるため、その中に、Gai2 欠損マウスや Gai3 欠損マウス由来の好中球を入れてビデオで撮影することにより、その遊走を直接確認した。Gai2 欠損マウス由来の好中球はマイクロ流体装置内で CXCL1 の濃度勾配を形成すると何も異常なく遊走したのに対して、Gai3 欠損マウス由来の好中球では、まず、移動の距離が少し低下することが分かった。また、移動する際の方向性、つまり、CXCL1 の低濃度の場所から高濃度の場所の方向へまっすぐ移動できるかどうかについては、Gai3 欠損マウス由来の好中球は大きくその機能が欠損しており、全くランダムに移動した場合と有意な差がないレベルにまで方向性が欠如していることが分かった。

Gai2 や Gai3 欠損マウスの好中球における機能異常が、本当にシグナル伝達の欠損によって起こっているのかどうかを調べるために、まずは、細胞内カルシウム濃度を測定することとした。アレストは、細胞内シグナル伝達の観点でいえば、G プロテインの下流にある PLCb2/PLCb3 を介して行われるとされている。PLCb の活性化により細胞内カルシウム濃度は上昇するため、カルシウム濃度を計測することにより、より測定の困難な PLCb の活性化を調べることにした。Fluo-3 を用いてカルシウム濃度を測定したが、Gai3 欠損マウス由来の好中球では特に異常は検出されなかったが、Gai2 欠損マウス由来の好中球では、ケモカインを好中球に作用させた際のカルシウム濃度の上昇が抑制されることが分かった。これにより、Gai2 欠損マウス由来の好中球においては PLCb の活性化というシグナル

伝達経路の活性化の抑制によって、アレストが抑制されていると考えることができた。次にケモタクシスについても、シグナル伝達の抑制によって、Gai3 欠損マウス由来の好中球における抑制が起こっているのか調べた。ケモタクシスは PI3K というシグナル伝達分子を介して起こっていることが知られている。この活性化を調べるために、この分子の下流にある AKT という分子が活性化(リン酸化)されるのかをウエスタンブロット法を使用し調べた。その結果 Gai3 欠損マウス由来の好中球に CXCL1 を作用させた時には、AKT の活性化が抑制されていることが分かった。これに対して、Gai2 欠損マウス由来の好中球に CXCL1 を作用させると、むしろ AKT の活性化が亢進していることが分かった。これにより、Gai3 欠損マウス由来の好中球におけるケモタクシスの低下は、PI3K の活性化抑制によって起きていることが示唆された。

Gai3 欠損マウス由来の好中球の機能低下は、今回の実験ではこれまで全て *in vitro* での観察であったため、生体内つまり *in vivo* でも機能低下が観察されるか実験を行った。具体的には、LysM - GFP マウス (Gai3 は正常) からの骨髄と Gai3 欠損マウス由来の骨髄を混ぜて、放射線照射したマウスに移植し、同一マウス内に、Gai3 欠損マウス由来の好中球と LysM - GFP マウス由来の好中球 (Gai3 は正常で、この好中球は GFP による蛍光を発することにより Gai3 欠損マウス由来の好中球と区別できる) が共存するようにした。このマウスの精巣挙筋を露出させ、生体顕微鏡にて観察しながら、精巣挙筋に CXCL1 を直接注射し、血管内の好中球が CXCL1 の注射された血管外へ遊走してくるところをビデオで記録した。この実験により、Gai3 欠損マウスの好中球は Gai3 が正常な LysM-GFP マウス由来の好中球と比較して、遊走してくる細胞数が少ないことが分かった。これにより、Gai3 欠損マウス由来の好中球が生体内でも機能を低下させていることが確認された。

この一連の実験により、Gai2 subunit を欠損すると好中球ではアレストが抑制され、Gai3 subunit を欠損するとトランスマイグレーションとケモタクシスが抑制されることが分かった。これは深部静脈血栓症においては、Gai3 subunit の抑制や Gai2 subunit の活性化により、好中球が血管壁についたまま、血管外に移動していかない、つまりは症状の増悪に働く可能性があることを示唆している。今後、これらの分子を特異的に抑制もしくは活性化することにより、副作用を抑えつつ深部静脈血栓症をコントロールしていくことが可能となることも示唆された。

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6件)

Kuwano Y, Adler M, Zhang H, Groisman A, Ley K: G i2 and G i3 Differentially Regulate Arrest from Flow and Chemotaxis in Mouse Neutrophils. J Immunol. 196(9):3828-33. 2016. doi: 10.4049/jimmunol.1500532. 査読有

Saigusa R, Asano Y, Nakamura K, Miura S, Ichimura Y, Takahashi T, Toyama T, Taniguchi T, Noda S, Aozasa N, Akamata K, Sumida H, Miyazaki M, Tamaki Z, Yanaba K, Kuwano Y, Sato S: Association of anti-RNA polymerase III antibody and malignancy in Japanese patients with systemic sclerosis. J Dermatol. 42(5):524-7. 2015 doi: 10.1111/1346-8138.12827. 査読有

Sumida H, Asano Y, Tamaki Z, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Toyama T, Ichimura Y, Noda S, Akamata K, Miyazaki M, Kuwano Y, Yanaba K, Sato S: Successful experience of rituximab therapy for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease with concomitant systemic lupus erythematosus. J Dermatol. 41(5):418-20. 2014 doi: 10.1111/1346-8138.12461. 査読有

Sumida H, Asano Y, Hatano M, Aozasa N, Toyama T, Akamata K, Miyazaki M, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Noda S, Kuwano Y, Yanaba K, Sato S: Effect of ambrisentan on peripheral circulation in patients with systemic sclerosis. Mod Rheumatol. 26(3):454-7. 2016 doi: 10.3109/14397595.2014.885377. 査読有

Ichimura Y, Asano Y, Akamata K, Takahashi T, Noda S, Taniguchi T, Toyama T, Aozasa N, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T: Fli1 deficiency contributes to the suppression of endothelial CXCL5 expression in systemic sclerosis. Arch Dermatol Res. 306(4):331-8. 2014 doi: 10.1007/s00403-013-1431-9. 査読有

Masui Y, Asano Y, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T: Serum resistin levels: a possible correlation with pulmonary vascular involvement in patients with systemic sclerosis. Rheumatol Int. 34(8):1165-70. 2014 doi: 10.1007/s00296-013-2880-3. 査読有

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/der/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

栗野 嘉弘 (KUWANO Yoshihiro)
東京大学・医学部附属病院・登録研究員
研究者番号 : 60625044