

令和元年5月9日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19015

研究課題名(和文)血小板P2Y受容体ヘテロ多量体は敗血症病態形成の新たな創薬標的となるか？

研究課題名(英文) Are platelet P2Y receptor heteromers a novel drug target for sepsis pathogenesis?

研究代表者

鈴木 登紀子 (Suzuki, Tokiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：10415531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症進行過程で播種性血管内凝固が発症すると予後不良となるが、その発症に関与する血小板の活性化にはP2Y1受容体、凝集にはP2Y12受容体が働いている。申請者はこれら受容体間でのヘテロ多量体形成を報告した。抗血小板薬であるP2Y12受容体遮断薬は、敗血症の症状緩和にも効果があることが示唆されている。本研究では、新たな敗血症治療創薬の突破口を開くため、敗血症病態におけるP2Y1-P2Y12受容体の関係を解析した。ヒト血小板前駆体細胞において、炎症刺激や抗血小板薬添加でこれらの受容体発現制御を発見した。またその研究過程で派生した、肺微小血管内皮細胞の炎症刺激誘発性シグナル伝達変化の論文を発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症の患者数は世界で年間約2700万人であり、そのうち約800万人が死亡していると報告されている。特に進行の過程で血小板の活性化を促進することが引き金となって播種性血管内凝固症候群(DIC)が発症し、全身性炎症症状の激化につながることが知られている。本研究により、血小板活性化や凝集能に大きく関係するP2Y1、P2Y12受容体の発現がヒト血小板前駆体由来細胞において炎症刺激や抗血小板薬によって制御されていることが初めて明らかになった。これは、効果的な治療法のないDICに対する創薬の第一歩となり、学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The development of disseminated intravascular coagulation during the course of sepsis leads to a poor prognosis. Activation and aggregation of platelets are affected by P2Y1 and P2Y12 receptors, respectively. I reported heteromerization between these receptors. It has been suggested that P2Y12 receptor blockers as antiplatelet drugs are also effective in alleviating the symptoms of sepsis. In this study, I analyzed the relationship between P2Y1-P2Y12 receptors in the pathogenesis of sepsis in order to open up new drug discovery for sepsis treatment. In human platelet precursor cells, we have found that these receptors are regulated by stimulation with inflammation and addition of antiplatelet drugs. I also published a paper on inflammatory stimulation-induced signal transduction changes in lung microvascular endothelial cells, which was derived in the course of this research.

研究分野：薬理学

キーワード：敗血症 シロスタゾール P2Y受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は細菌感染を起因とする全身性の炎症反応症候群であり、高齢者人口の増加、悪性腫瘍や移植時の化学療法などによる免疫機能の低下、多剤耐性菌の出現などにより、現在においてもなお高い死亡率を有している。2016年に敗血症は「感染に対する制御不能な宿主反応による生命に関わる臓器不全」と再定義され、敗血症性ショックや多臓器不全への進展を回避するための時宜を得た治療法を見出すことが現在救命救急領域で求められているニーズである。今日までにさまざまな敗血症の動物実験モデルが作られ、抗炎症薬による加療が試されてきたが、未だに劇的な効果を示すものは開発されていない。発症から全身症状進行のメカニズムとしては、グラム陰性菌の細胞壁主成分であるLPS(リポ多糖)が血小板膜上のToll様受容体に結合し、血小板の活性化を促進することが引き金となって播種性血管内凝固症候群(DIC)が発症し、全身性炎症症状の激化につながるということが知られている(Semple JW et al., Nat Rev Immunol, 2011)。DICの臨床症状が出現すると予後不良となり、その致死率は50%を超えるため、臨床症状がない時点でいかにDICの発症を予防するかが重要な課題となっている。

2. 研究の目的

DICを引き起こす血小板には種々の受容体が発現しているが、そのうち血小板活性化にはP2Y1受容体、凝集反応にはP2Y12受容体が大きな役割を担っている。申請者は、これらの受容体間でヘテロ多量体が形成され、シグナル伝達に相互作用があることを報告した(Suzuki T et al., Methods Enzymol 2013; Suzuki T et al., FEBS lett, 2011)。一方で、P2Y12受容体の遮断薬であるクロピドグレルは抗血小板薬として虚血性心疾患の治療に使用されており、敗血症の症状緩和にも効果的であることが示唆されている(Akinosoglou K et al., Thromb Res, 2014)。しかしDICを引き起こす血小板活性化を担うのはP2Y12受容体ではなくP2Y1受容体であることから、クロピドグレルによる治療効果はP2Y12受容体そのものの遮断だけでは説明がつかない。本研究は、P2Y1-P2Y12受容体ヘテロ多量体形成阻害効果を明らかにし、P2Y1-P2Y12受容体ヘテロ多量体を標的とした敗血症治療創薬の新たな突破口を開くことを目的として開始した。

3. 研究の方法

(1) 血小板前駆細胞 MEG-01 における敗血症様刺激と P2Y1, P2Y12 受容体発現変化の解析

血小板は前駆細胞である巨核球の細胞質が血流によりちぎれてできた無核の細胞であるため、そのものを培養することはできない。よって血小板前駆体である巨核芽球の培養細胞であるMEG-01が代替材料として広く用いられている。本研究でもJCRB細胞バンクよりそれを入力し、用いることにする。MEG-01細胞を12well dishに播種し、LPS刺激を行うことで敗血症様感染状態を模し、代表的な炎症性サイトカインであるIL-6及びIL-1 β 、本研究の対象であるP2Y1, P2Y12受容体のmRNA発現を定量PCR法にて、タンパク質発現をウェスタンブロッティング法にて解析した。

(2) 血小板前駆細胞 MEG-01 における高血糖様刺激、インターフェロン 刺激、高血小板薬シロスタゾールと P2Y1, P2Y12 受容体発現変化の解析

糖尿病患者では心血管疾患を合併することが多いが、クロピドグレルやカングレオールといった汎用されている抗血小板薬(P2Y12受容体遮断薬)は非糖尿病に比べて効果が低いことが知られている(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26: 417-422)。その機序の一つとして、糖

尿病患者の血小板では健常者に比べて P2Y12 受容体の発現量が高く、転写因子 NFκB の関与が報告されている (Circulation. 2017; 136: 817-833)。一方で抗血小板薬プレタールとして広く繁用されているシロスタゾールは、ホスホジエステラーゼ 阻害活性があり、細胞内 cAMP を増加させることで血小板凝集を抑制するとされているが、近年それ以外にも NFκB 制御作用があることが報告された(Thromb Res. 2015; 136: 456-464)。本研究では血小板での高血糖による P2Y 受容体発現制御にシロスタゾールの関与を考え、MEG-01 細胞に高血糖を模した高グルコース刺激及びシロスタゾール処理を施し、P2Y1, P2Y12 受容体 mRNA 発現量を定量 PCR 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) MEG-01 細胞をより血小板に近づけるために 1 nM PMA(ホルボール-12-ミリスタート-13-アセタート)で刺激し、分化マーカーであるβ1-tubulin 及び P-selectin mRNA 発現量が有意に上昇することを確認した。続いて 0.1-5 μg/mL LPS で 1-24h の刺激を行ったが、炎症性サイトカイン IL-6, IL-1βとも有意な変化が見られず、LPS 刺激では十分な炎症刺激とならないことが示唆された。P2Y1, P2Y12 受容体発現にも特筆すべき変化は見られなかった。LPS は Toll 様受容体 4(TLR4)に結合してその作用を表すが、MEG-01 を TLR のサブタイプである TLR1/2 に結合する Pam3CSK4 で刺激することで炎症マーカーである NFκB1 の発現が上昇することが報告されている(Thromb Res. 2004; 113: 379-385)。本研究においてその再現をとることはできたが、P2Y1, P2Y12 受容体の発現量に変化は見られなかった。

これらより、申請者は MEG-01 は TLR リガンドによる反応には乏しいことを見出し、他に血小板での P2Y 受容体の発現や活性に変化を及ぼす炎症刺激や薬剤を探索することにした。このように本研究課題より新たな研究計画を派生させることができたことも、一つの成果であると言えよう。

(2) 文献を参考に、分化させない MEG-01 を 40 mM 高グルコースを含む培地で 24 時間刺激を行ったところ、P2Y12 受容体 mRNA 発現量が無刺激細胞に比べて有意に上昇し、NFκB 阻害薬で有意に抑制されたので、文献の再現をとることができた。シロスタゾールに関しては、抗血小板薬であるので血小板凝集を促進する P2Y12 受容体発現量を抑制することが予想されたが、高グルコースに関わらずその発現を促進的に制御するという、興味深い結果を得た。その発現亢進は NFκB 阻害薬では抑制されず、PDEIII 抑制によって細胞内 cAMP が増加した状態を細胞浸透性 cAMP であるジブチリル cAMP によって模しても P2Y12 受容体発現には変化は見られなかった。よってシロスタゾールによる P2Y12 受容体発現制御にはこれまでに知られている NFκB 経路も PDEIII 抑制も関わっておらず、全く新しい発見であることがわかった。これについて以下の図に概説する。

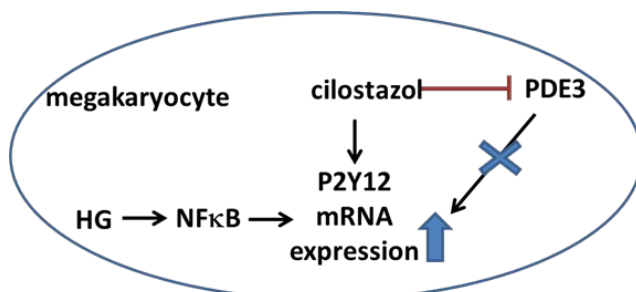


図 1. MEG-01 (megakaryocyte) における高グルコース(HG)とシロスタゾールによる P2Y12 受容体発現制御

また P2Y1 受容体発現制御に関しては現在のところ血小板での報告例はなく、ケラチノサイト
でインターフェロン (IFN- γ)によって発現上昇することが報告されているのみである(J
Invest Dermatol. 2007; 127: 660-667)。それについて MEG-01 を用いて検討したところ、40
ng/mL IFN- γ 刺激 24 時間で P2Y1 mRNA 発現量が無刺激に比べて有意に増加し、巨核球を含
む血球系細胞では初めての発見となった。またその発現亢進はシロスタゾールによって有意に
抑制された。

このように、ヒト巨核芽球由来細胞 MEG-01 における高グルコース、シロスタゾール、IFN- γ
による多角的な P2Y1, P2Y12 受容体発現制御について明らかにした。今後は更にこれら受容
体のシグナル伝達や多量体形成について研究を続ける。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Suzuki T, Sakata K, Mizuno N, Palikhe S, Yamashita S, Hattori K, Matsuda N, Hattori Y.
Different involvement of the MAPK family in inflammatory regulation in human
pulmonary microvascular endothelial cells stimulated with LPS and IFN- γ .

Immunobiology. ; 223: 777-785. 2018 (査読有)

doi: 10.1016/j.imbio.2018.08.003.

Yamashita S, **Suzuki T**, Iguchi K, Sakamoto T, Tomita K, Yokoo H, Sakai M, Misawa H,
Hattori K, Nagata T, Watanabe Y, Matsuda N, Yoshimura N, Hattori Y. Cardioprotective
and functional effects of levosimendan and milrinone in mice with cecal ligation and
puncture-induced sepsis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. ;391: 1021-1032. 2018

(査読有)

doi: 10.1007/s00210-018-1527-z.

Hattori Y, Hattori K, **Suzuki T**, Palikhe S, Matsuda N. Nucleic-acid based gene therapy
approaches for sepsis. Eur J Pharmacol. ;833:403-410, 2018 (査読有)

doi: 10.1016/j.ejphar.2018.06.031

鈴木登紀子、酒井麻里、山下重幸、富田賢吾、服部裕一「敗血症性心筋症の病態形成機構の
解明と新たな治療への応用」日本薬理学雑誌 151 巻 111-116, 2018 (査読有)

doi: 10.1254/fpj.151.111.

Sakai M, **Suzuki T**, Tomita K, Yamashita S, Palikhe S, Hattori K, Yoshimura N, Matsuda
N, Hattori Y. Diminished responsiveness to dobutamine as an inotrope in mice with cecal
ligation and puncture-induced sepsis: attribution to phosphodiesterase 4 upregulation. Am
J Physiol Heart Circ Physiol. 312:H1224-H1237, 2017 (査読有)

doi: 10.1152/ajpheart.00828.2016.

Takashina M, Inoue S, Tomihara K, Tomita K, Hattori K, Zhao QL, **Suzuki T**, Noguchi M,
Ohashi W, Hattori Y. Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on
the type of human cancer cells. Int J Oncol. 50:787-797, 2017 (査読有)

doi: 10.3892/ijo.2017.3859.

Hattori Y, Hattori K, **Suzuki T**, Matsuda N. Recent advances in the pathophysiology and
molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and
challenges. Pharmacol Ther. 177:56-66, 2017 (査読有)

doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.040.

鈴木登紀子、服部裕一「血糖変動と血管内皮機能～糖尿病性血管障害の発症と防止機構への新たなアプローチ～」血管, 40 巻 2 号:69-77, 2017. (査読有)

Abdelzaher LA, Imaizumi T, **Suzuki T**, Tomita K, Takashina M, Hattori Y: Astaxanthin alleviates oxidative stress insults-related derangements in human vascular endothelial cells exposed to glucose fluctuations. Life Sciences 150:24-31, 2016. (査読有)

doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.087.

服部裕一、服部貢士、**鈴木登紀子** : 「Gタンパク質共役型受容体キナーゼ 2(GRK2)の分子病的役割」日本臨牀, 74 巻 10 号:1761-1768, 2016 (査読有)

[学会発表](計 12 件)

Tokiko Suzuki, Sailesh Palikhe, Kimimasa Sakata, Natsumi Mizuno, Yuichi Hattori: Negative regulation of JNK-mediated monocyte adhesion to human pulmonary microvascular endothelial cells by p38 MAPK. WCP2018 18th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 2018, July 1-6, Kyoto.

富田賢吾、山下重幸、**鈴木登紀子**、坂本卓弥、酒井麻里、横尾宏毅、渡邊泰秀、芳村直樹、服部裕一：盲腸結紮穿孔誘発性敗血症マウスにおけるレボシメンダンおよびミルリノンの強心作用と心保護効果。第 47 回日本心脈管作動物質学会 長崎 2018 年 2 月

鈴木登紀子、Palikhe Sailesh、坂田 公正、水野 夏実、服部 裕一：ヒト肺微小血管内皮細胞において 3 種の MAPK サブファミリーは異なる機構で炎症を調節する。第 27 回日本循環薬理学会 名古屋 2017 年 12 月

山下 重幸、**鈴木登紀子**、富田 賢吾、坂本 卓也、酒井 麻里、横尾 宏毅、渡邊 泰秀、芳村 直樹、服部 裕一：盲腸結紮穿孔誘発性敗血症モデルマウスにおけるレボシメンダンおよびミルリノンの心臓の炎症および機能に対する効果。第 27 回日本循環薬理学会 名古屋 2017 年 12 月

鈴木登紀子、Sailesh Palikhe、山下 重幸、坂田 公正、水野 夏実、服部 裕一：ヒト肺微小血管内皮細胞の炎症応答における MAPK ファミリーの関与とその分子機構 第 68 回日本薬理学会北部会 山形 2017 年 9 月

酒井麻里、**鈴木登紀子**、Sailesh Palikhe、山下重幸、服部裕一、芳村直樹：ヒト肺微小血管内皮細胞の炎症応答における MAPK ファミリーの役割 第 45 回日本血管外科学会学術総会 広島 2017 年 4 月

鈴木登紀子、Sailesh Palikhe、服部 裕一：ヒト肺微小血管内皮細胞における炎症応答の分子機構の解明～MAPK ファミリーの役割～。第 90 回日本薬理学会年会 長崎 2017 年 3 月

酒井麻里、**鈴木登紀子**、富田賢吾、山下重幸、芳村直樹、服部裕一：盲腸結紮穿孔誘発性敗血症マウスでの炎症性心筋障害におけるカテコラミン反応性低下の機序 第 46 回日本心脈管作動物質学会 沖縄 2017 年 2 月

Kengo Tomita, Lobna Ali Abdelzaher, Takahiro Imaizumi, **Tokiko Suzuki**, Michinori Takashina, Yuichi Hattori : Glucose sluctuations induce ROS-mediated endothelial dysfunction: Effect of astaxanthin. 第 19 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム 大阪 2017 年 1 月

鈴木登紀子、今泉貴博、富田 賢吾、Abdelzaher LA、服部 裕一：グルコース変動による酸

化ストレスを介した血管内皮細胞障害とアスタキサンチンによる改善効果．第 26 回日本循環薬理学会 松本 2016 年 12 月

酒井 麻里、**鈴木 登紀子**、富田 賢吾、山下 重幸、芳村 直樹、服部 裕一：盲腸結紮穿孔誘発性敗血症モデルマウスにおける心筋傷害とカテコラミン反応性の変化．第 26 回日本循環薬理学会 松本 2016 年 12 月

酒井 麻里、**鈴木 登紀子**、富田 賢吾、山下 重幸、芳村 直樹、服部 裕一：盲腸結紮穿孔誘発性敗血症モデルマウスにおける心機能・形態評価とカテコラミン反応性．第 67 回日本薬理学会北部会 札幌 2016 年 9 月

〔図書〕(計 1 件)

鈴木登紀子：コメディカルのための薬理学 第 3 版．渡邊泰秀、安西尚彦、櫻田香 編集．東京：朝倉書店；第 10 節，代謝性疾患に対する薬物．171-179, 2018．

6．研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。