

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18209020
 研究課題名（和文） 血小板由来生理活性物質の解析：
 血小板生物学の構築とその測定の臨床検査医学的应用
 研究課題名（英文） Analysis of platelet-derived bioactive substances: establishment of
 platelet biology and its application into laboratory medicine
 研究代表者
 矢富 裕（YATOMI YUTAKA）
 東京大学・医学部附属病院・教授
 研究者番号：60200523

研究成果の概要：

血小板活性化上清が惹起する多彩な細胞応答を明らかにし、その構成成分である生理活性脂質の重要性を明らかにした。中でも、血小板に豊富に含まれ、活性化に伴って放出されるスフィンゴシン 1-リン酸（Sph-1-P）に関しては、その詳細な機能的役割を明らかにした。また、血漿、血清中の Sph-1-P の測定の臨床検査医学的应用を進め、その基準値を確定するとともに、慢性肝疾患における低下を明らかにした。

一方、リゾリン脂質として Sph-1-P と構造上の共通性を有するリゾホスファチジン酸（LPA）に関しては、必ずしも血小板がその産生源ではないことが明らかとなったが、血漿 LPA、さらには、血清オートタキシン（ATX；それが有するリゾホスホリパーゼ D 活性により LPA が産生される）の測定の臨床検査医学的应用を進めた。その結果、ATX が悪性リンパ腫、肝線維化のバイオマーカーとなることを明らかにするとともに、将来の臨床応用が期待される ATX 自動測定のを確立した。

以上の研究成果は、多機能性細胞である血小板の機能的役割の解明に貢献するとともに、生理活性脂質の臨床検査医学という新しい研究領域の開拓に寄与するものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
2007 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	24,100,000	7,230,000	31,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

活性化血小板からは多くの生理活性物質が放出されるが、その放出動態や各成分の相対的重要性に関しては不明の部分が多かった。また、生理活性脂質に関しては、その測定の高難しさから、臨床的な観点からの測定がなされていなかった。

2. 研究の目的

活性化血小板上清の解析を通じて、血小板の多機能性の物質的基盤を明らかにするとともに、その構成成分の測定の臨床検査医学的応用を目指す。

3. 研究の方法

生体内における種々の血小板活性化様式に対応した活性化血小板上清を作成し、その中に含まれる生理活性物質の定量解析を行う。活性化血小板上清の種々の細胞・組織に対する作用を観察した上で、その中に含まれる特定の生理活性物質の作用を特異的に制御する処理を施し、個々の生理活性物質の寄与を解析する。さらには、臨床検査への応用を念頭におき、健常人、疾患症例の血漿検体を用いて、種々の血小板由来生理活性物質の測定を行う。

4. 研究成果

血小板活性化上清が惹起する多彩な細胞応答を明らかにし、その構成成分である生理活性脂質の重要性を明らかにした。中でも、血小板に豊富に含まれ、活性化に伴って放出されるスフィンゴシン 1-リン酸 (Sph-1-P) に関しては、その詳細な機能的役割を明らかにした。また、血漿/血清中の Sph-1-P、血漿 LPA/血清 ATX の測定の臨床検査医学的有用性を明らかにした。

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 35 件) 7, 29 以外は査読あり

1. Ikeda, H., Nagashima, K., Yanase, M., Tomiya, T., Arai, M., Inoue, Y., Tejima, K., Nishikawa, T., Watanabe, N., Kitamura, K., Isono, T., Yahagi, N., Noiri, E., Inao, M., Mochida, S., Kume, Y., Yatomi, Y., Nakahara, K., Omata, M., and Fujiwara, K. The herbal medicine inchin-ko-to (TJ-135) induces apoptosis in cultured rat hepatic stellate cells. *Life Sci.* 78: 2226-2233, 2006.

2. Ohkawa, R., Hisano, N., Nakamura, K., Okubo, S., Yokota, H., and Yatomi, Y. Lysophospholipase D activity exists in the urine to catalyze the

formation of lysophosphatidic acid. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21: 3612-3613, 2006.

3. Ohmori, T., Yatomi, Y., Nonaka, T., Kobayashi, Y., Madoiwa, S., Mimuro, J., Ozaki, Y., and Sakata, Y. Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J. Thromb. Haemost.* 4: 1271-1278, 2006.

4. Satoh, K., Yatomi, Y., and Ozaki, Y. A new method for assessment of an anti-5HT(2A) agent, sarpogrelate hydrochloride, on platelet aggregation. *J. Thromb. Haemost.* 4: 479-481, 2006.

5. Tanaka, M., Okudaira, S., Kishi, Y., Ohkawa, R., Iseki, S., Ota, M., Noji, S., Yatomi, Y., Aoki, J., and Arai, H. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 281: 25822-25830, 2006.

6. Yamashita, H., Kitayama, J., Shida, D., Yamaguchi, H., Mori, K., Osada, M., Aoki, S., Yatomi, Y., Takuwa, Y., and Nagawa, H. Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation. *J. Surg. Res.* 130: 80-87, 2006.

7. Yatomi, Y. Sphingosine 1-phosphate in vascular biology: possible therapeutic strategies to control vascular diseases. *Curr. Pharm. Des.* 12: 575-587, 2006.

8. Aoki, S., Osada, M., Kaneko, M., Ozaki, Y., and Yatomi, Y. Fluid shear stress enhances the sphingosine 1-phosphate responses in cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358: 1054-1057, 2007.

9. Aoki, S., Yatomi, Y., Shimosawa, T., Yamashita, H., Kitayama, J., Tsuno, N.H., Takahashi, K., and Ozaki, Y. The suppressive effect of sphingosine 1-phosphate on monocyte-endothelium adhesion may be mediated by the rearrangement of the endothelial integrins alpha(5)beta(1) and alpha(v)beta(3). *J. Thromb. Haemost.* 5: 1292-1301, 2007.

10. Cuyun-Lira, O., Kaneko, M., Takafuta, T., Satoh, K., Ohnishi, M., Yatomi, Y., and Ozaki, Y. Inhibitory effects of ticlopidine on platelet

function as assessed by three different methods. *Eur. J. Pharm. Sci.* 30: 21-25, 2007.

11. Ikeda, H., Kume, Y., Tejima, K., Tomiya, T., Nishikawa, T., Watanabe, N., Ohtomo, N., Arai, M., Arai, C., Omata, M., Fujiwara, K., and Yatomi, Y. Rho-kinase inhibitor prevents hepatocyte damage in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293: G911-917, 2007.

12. Kawanabe, T., Kawakami, T., Yatomi, Y., Shimada, S., and Soma, Y. Sphingosine 1-phosphate accelerates wound healing in diabetic mice. *J. Dermatol. Sci.* 48: 53-60, 2007.

13. Kimura, A., Ohmori, T., Ohkawa, R., Madoiwa, S., Mimuro, J., Murakami, T., Kobayashi, E., Hoshino, Y., Yatomi, Y., and Sakata, Y. Essential Roles of Sphingosine 1-Phosphate/S1P1 Receptor Axis in the Migration of Neural Stem Cells Toward a Site of Spinal Cord Injury. *Stem Cells* 25: 115-124, 2007.

14. Kume, Y., Ikeda, H., Inoue, M., Tejima, K., Tomiya, T., Nishikawa, T., Watanabe, N., Ichikawa, T., Kaneko, M., Okubo, S., Yokota, H., Omata, M., Fujiwara, K., and Yatomi, Y. Hepatic stellate cell damage may lead to decreased plasma ADAMTS13 activity in rats. *FEBS Lett.* 581: 1631-1634, 2007.

15. Nakamura, K., Kishimoto, T., Ohkawa, R., Okubo, S., Tozuka, M., Yokota, H., Ikeda, H., Ohshima, N., Mizuno, K., and Yatomi, Y. Suppression of lysophosphatidic acid and lysophosphatidylcholine formation in the plasma in vitro: Proposal of a plasma sample preparation method for laboratory testing of these lipids. *Anal. Biochem.* 367: 20-27, 2007.

16. Nakamura, K., Ohkawa, R., Okubo, S., Tozuka, M., Okada, M., Aoki, S., Aoki, J., Arai, H., Ikeda, H., and Yatomi, Y. Measurement of lysophospholipase D/autotaxin activity in human serum samples. *Clin. Biochem.* 40: 274-277, 2007.

17. Nakamura, K., Takeuchi, T., Ohkawa, R., Okubo, S., Yokota, H., Tozuka, M., Aoki, J., Arai, H., Ikeda, H., Ohshima, N., Kitamura, T., and Yatomi, Y. Serum lysophospholipase D/autotaxin may be a new nutritional assessment marker: study on prostate cancer patients. *Ann. Clin. Biochem.* 44: 549-556, 2007.

18. Osada, M., Yatomi, Y., Ohmori, T., Aoki, S., Hosogaya, S., and Ozaki, Y. Involvement of sphingosine 1-phosphate, a platelet-derived bioactive lipid, in contraction of mesangium cells. *J. Biochem.* 142: 351-355, 2007.

19. Satoh, Y., Ohkawa, R., Nakamura, K., Higashi, K., Kaneko, M., Yokota, H., Aoki, J., Arai, H., Yuasa, Y., and Yatomi, Y. Lysophosphatidic acid protection against apoptosis in the human pre-B-cell line Nalm-6. *Eur. J. Haematol.* 78: 510-517, 2007.

20. Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Kaneko, M.K., Mishima, K., Yatomi, Y., Yamazaki, Y., Narimatsu, H., and Ozaki, Y. Involvement of the Snake Toxin Receptor CLEC-2, in Podoplanin-mediated Platelet Activation, by Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 282: 25993-26001, 2007.

21. Watanabe, N., Ikeda, H., Nakamura, K., Ohkawa, R., Kume, Y., Aoki, J., Hama, K., Okudaira, S., Tanaka, M., Tomiya, T., Yanase, M., Tejima, K., Nishikawa, T., Arai, M., Arai, H., Omata, M., Fujiwara, K., and Yatomi, Y. Both Plasma Lysophosphatidic Acid and Serum Autotaxin Levels are Increased in Chronic Hepatitis C. *J. Clin. Gastroenterol.* 41: 616-623, 2007.

22. Watanabe, N., Ikeda, H., Nakamura, K., Ohkawa, R., Kume, Y., Tomiya, T., Tejima, K., Nishikawa, T., Arai, M., Yanase, M., Aoki, J., Arai, H., Omata, M., Fujiwara, K., and Yatomi, Y. Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life Sci.* 81: 1009-1015, 2007.

23. Hosogaya, S., Yatomi, Y., Nakamura, K., Ohkawa, R., Okubo, S., Yokota, H., Ohta, M., Yamazaki, H., Koike, T., and Ozaki, Y. Measurement of plasma lysophosphatidic acid concentration in healthy subjects: strong correlation with lysophospholipase D activity. *Ann. Clin. Biochem.* 45: 364-368, 2008.

24. Kimura, A., Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ohkawa, R., Madoiwa, S., Mimuro, J., Shimazaki, K., Hoshino, Y., Yatomi, Y., and Sakata, Y. Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain. *Stroke* 39: 3411-3417, 2008.

25. Masuda, A., Nakamura, K., Izutsu, K., Igarashi, K., Ohkawa, R., Jona, M., Higashi, K., Yokota, H., Okudaira, S., Kishimoto, T., Watanabe, T., Koike, Y., Ikeda, H., Kozai, Y., Kurokawa, M., Aoki, J., and Yatomi, Y. Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma. *Br. J. Haematol.* 143: 60-70, 2008.
26. Nakamura, K., Igarashi, K., Ide, K., Ohkawa, R., Okubo, S., Yokota, H., Masuda, A., Oshima, N., Takeuchi, T., Nangaku, M., Okudaira, S., Arai, H., Ikeda, H., Aoki, J., and Yatomi, Y. Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clin. Chim. Acta* 388: 51-58, 2008.
27. Nakamura, K., Nangaku, M., Ohkawa, R., Okubo, S., Yokota, H., Ikeda, H., Aoki, J., and Yatomi, Y. Analysis of serum and urinary lysophospholipase D/autotaxin in nephrotic syndrome. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46: 150-151, 2008.
28. Ohkawa, R., Nakamura, K., Okubo, S., Hosogaya, S., Ozaki, Y., Tozuka, M., Osima, N., Yokota, H., Ikeda, H., and Yatomi, Y. Plasma sphingosine-1-phosphate measurement in healthy subjects: close correlation with red blood cell parameters. *Ann. Clin. Biochem.* 45: 356-363, 2008.
29. Yatomi, Y. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 606-611, 2008.
30. Ikeda, H., Watanabe, N., Ishii, I., Shimosawa, T., Kume, Y., Tomiya, T., Inoue, Y., Nishikawa, T., Ohtomo, N., Tanoue, Y., Iitsuka, S., Fujita, R., Omata, M., Chun, J., and Yatomi, Y. Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2. *J. Lipid Res.* 50: 556-564, 2009.
31. Iwasawa, Y., Fujii, T., Nagamatsu, T., Kawana, K., Okudaira, S., Miura, S., Matsumoto, J., Tomio, A., Hyodo, H., Yamashita, T., Oda, K., Kozuma, S., Aoki, J., Yatomi, Y., and Taketani, Y. Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *Am. J. Reprod. Immunol.* 62: 90-95, 2009.
32. Nakamura, K., Ohkawa, R., Okubo, S., Yokota, H., Ikeda, H., Yatomi, Y., Igarashi, K., Ide, K., Kishimoto, T., Masuda, A., Yamamoto, T., Tsuji, S., Saito, N., Kurokawa, M., Okudaira, S., and Aoki, J. Autotaxin enzyme immunoassay in human cerebrospinal fluid samples. *Clin. Chim. Acta* 405: 160-162, 2009.
33. Nakazawa, H., Ohnishi, H., Okazaki, H., Hashimoto, S., Hotta, H., Watanabe, T., Ohkawa, R., Yatomi, Y., Nakajima, K., Iwao, Y., Takamoto, S., Shimizu, M., and Iijima, T. Impact of fresh-frozen plasma from male-only donors versus mixed-sex donors on postoperative respiratory function in surgical patients: a prospective case-controlled study. *Transfusion* 49: 2434-2441, 2009.
34. Satoh, Y., Li, X., Yokota, H., Osada, M., Ozaki, Y., Katoh, R., and Yatomi, Y. Regulation by sphingolipids of the fate of FRTL-5 cells. *J. Biochem.* 145: 31-36, 2009.
35. Watanabe, N., Ikeda, H., Kume, Y., Satoh, Y., Kaneko, M., Takai, D., Tejima, K., Nagamine, M., Mashima, H., Tomiya, T., Noiri, E., Omata, M., Matsumoto, M., Fujimura, Y., and Yatomi, Y. Increased production of ADAMTS13 in hepatic stellate cells contributes to enhanced plasma ADAMTS13 activity in rat models of cholestasis and steatohepatitis. *Thromb. Haemost.* 102: 389-396, 2009.
- [学会発表] (計 10 件)
1. Kaneko, M., Takafuta, T., Cuyun-Lira, O., Satoh, K., Arai, M., Yatomi, Y., and Ozaki, Y. Collagen Beads Column - A New Platelet Function Analyzer. The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis. 2006.9.21-23. Suzhou, Jiangsu, China.
2. Imasawa, T., Kitamura, H., Ohkawa, R., Satoh, Y., Miyashita, A., Koike, K., and Yatomi, Y. Altered expression of sphingosine 1-phosphate receptors in glomeruli of diabetic rats. American Society of Nephrology 40th Annual Meeting. 2007. 11. 2-5. San Francisco, CA, USA.
3. Jona, M., Higashi, K., Satoh, Y., Masuda, A., Koike, Y., Yokota, H., and Yatomi, Y. Analysis of S1P1 and S1P2 expression on human blood cells: importance in laboratory hematology. The 20th International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology (ISLH 2007). 2007.5.8-11. Miami, FL, USA.
4. Kaneko, M., Kanno, N., Satoh, K., Ozaki, Y., and Yatomi, Y. Synergism between Gi activation and Ca²⁺ mobilization in platelet thromboxane

A2 formation. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007. 7. 6-12. Geneva, Switzerland.

5. Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Kato-Kaneko, M., Mishima, K., Yatomi, Y., and Ozaki, Y. A novel platelet activation receptor, is involved in podoplanin-mediated platelet activation by cancer cells. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007. 7. 6-12. Geneva, Switzerland.

6. Yatomi, Y. Importance of sphingosine 1-phosphate in vascular biology: its application to laboratory medicine. *Glycobiology and Sphingobiology* 2007. 2007.2.27-3.1. Tokushima, Japan.

7. Ikeda, H., Watanabe, N., Sato, Y., Nagamine, M., and Yatomi, Y. S1P2 antagonism selectively reduces portal pressure in rats with liver cirrhosis. 4th International conference on phospholipase A2 and lipid mediators (PLM2009). 2009.5.25-28. Tokyo, Japan.

8. Yatomi, Y., Ikeda, H. Clinical laboratory medicine of lysophospholipid mediators. 4th International conference on phospholipase A2 and lipid mediators (PLM2009). 2009.5.25-28. Tokyo, Japan.

9. Yatomi, Y. Lysophosphatidic acid and autotaxin assays in clinical medicine. FASEB summer research conferences. 2009.6.28-7.3. Carefree, Arizona, USA.

10. Yatomi, Y. Diagnosis of thrombocytopenia: a novel approach. The 2nd International Scientific Seminar. 2009. 12. 14-15. Ho Chi Minh City, Vietnam.

[英文図書] (計 3 件)

1. Yatomi, Y., Aoki, S., and Igarashi, Y. Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel. *Sphingolipid Biology* (eds., Y. Hirabayashi, Y. Igarashi, and A.H. Merrill, Jr.) pp. 427-439. Springer-Verlag, Tokyo. 2006.

2. Yatomi, Y. Sphingosine 1-phosphate as a platelet-derived bioactive lipid. *Recent advances in Thrombosis and Hemostasis 2008* (eds., K. Tanaka and E.W. Davie) pp. 265-276. Springer, Japan. 2008.

3. Yatomi, Y. Diagnosis of thrombocytopenia: a novel approach.

Proceedings of the 2nd International Scientific Seminar pp. 21-23.

Sysmex, Japan. 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

特願 2006-212275 「天然形態ヒトオートタキシン特異的抗体及びそのスクリーニング方法」提出日：2006年8月3日。発明者：青木淳賢，新井洋由，矢富裕，池田均，中村和宏，五十嵐浩二，井出和史

特願 2007-092412 「オートタキシン測定による悪性リンパ腫の検査方法および検査薬」提出日：2007年3月30日。発明者：矢富裕，中村和宏，新井洋由，青木淳賢，五十嵐浩二，井出和史

国際出願 PCT/JP 2007/065573，国際公開 W02008/016186 「天然形態ヒトオートタキシン特異的抗体，そのスクリーニング方法，及びオートタキシン測定による悪性リンパ腫の検査方法および検査薬」提出日：2007年8月2日。発明者：青木淳賢，新井洋由，矢富裕，池田均，中村和宏，五十嵐浩二，井出和史

特願 2008-000525，特開 2009-162616 「オートタキシン測定による妊娠および妊娠高血圧症候群の検査方法および検査薬」提出日：2008年1月7日。発明者：矢富裕，中村和宏，藤井知行，五十嵐浩二

特願 2009-298048 「オートタキシン測定による肝線維化の検査方法および検査薬」提出日：2009年12月28日。発明者：矢富裕，中村和宏，池田均，五十嵐浩二

[その他]

ホームページ：<http://lab-tky.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢富裕 (YATOMI YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60200523

(2) 研究分担者

池田均 (IKEDA HITOSHI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80202422

(3) 連携研究者

なし