

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08339

研究課題名（和文）血小板-白血球コンタクトの免疫学的解析による炎症メカニズムの解明と新規治療の開発

研究課題名（英文）Elucidation of inflammatory mechanism and development of new treatment by immunological analysis of platelet-leukocyte contact

研究代表者

平橋 淳一（HIRAHASHI, Junichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：70296573

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：炎症における急性期蛋白のひとつである細胞外ヒストンは血栓を形成することにより臓器障害の重症化をもたらすことが知られている。我々は、細胞外ヒストンが接着因子Mac-1を介して好中球と血小板を活性化して両者を凝集させ、血管障害に寄与することを証明した。また、この病態は糖尿病においてさらに増悪するが、糖尿病では細胞外ヒストンに対する好中球の感受性が増幅し、ヒストン刺激により末梢血に動員される活性化好中球が顕著に増加することが判明した。以上より、急性炎症において細胞外ヒストンは、Mac-1をkey mediatorとして血小板-好中球凝集を来し血管障害の重症化に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫学的機序による血栓形成メカニズムであるImmunothrombosisの制御異常により、敗血症やCOVID-19の重症化をもたらされる。Immunothrombosisのメディエータとして、傷害された細胞から放出される細胞外ヒストンは極めて重要な役割を果たす。我々は細胞外ヒストンが、接着因子Mac-1を介して好中球と血小板を凝集させて血管障害を起こすことを証明した。また、糖尿病において細胞外ヒストンに対する好中球の感受性が亢進してImmunothrombosisが増幅されて重症化することを証明し、Mac-1によるImmunothrombosisが治療の標的となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：It is known that extracellular histones, which is one of the acute phase proteins in inflammation, causes aggravation of organ damage by attacking endothelial cells and forming a thrombus. We demonstrated that extracellular histones activate neutrophils and platelets via the adhesion factor Mac-1 and aggregate them, contributing to thromboinflammation. It was also found that this condition is exacerbated in diabetes, in which the sensitivity of neutrophils to extracellular histones is amplified and activated neutrophils mobilized to peripheral blood by histone stimulation are significantly increased. These results suggest that extracellular histones may contribute to the aggravation of acute organ damage by causing platelet-neutrophil aggregation using Mac-1 as a key mediator in acute inflammation. In conclusion, extracellular histones transmit signals through Mac-1-dependent pathway by directly stimulating both neutrophils and platelets and promote blood coagulation and thrombosis.

研究分野：免疫学、炎症学、血栓、腎臓学

キーワード：炎症 細胞外ヒストン Immunothrombosis 好中球 血小板 Mac-1 糖尿病 血管障害

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性疾患において血栓は疾患の重症化を示唆し迅速な治療を必要とする臨床的に重要な病態である。血栓形成には主として血液凝固因子と血小板の活性化が関与することが知られているが、最近、“Immunothrombosis”という概念が提唱された(Massberg S et al. Nat Rev Immunol. 2013)。Immunothrombosisとは好中球や単球・マクロファージなどの白血球細胞、血小板などの自然免疫担当細胞と血栓特異的分子の相互作用により、血管内で病原体を封じ込め破壊する足場としての微小血管内血栓形成を行う自然免疫機構であり、その制御不全は各種の病的血栓をもたらすという概念である。一方、2004年好中球がクロマチン線維 (DNA+Histone蛋白) から成る網目状構造物 (Neutrophil Extracellular Traps ; NETs)を細胞外に放出し、外来微生物を捕捉する新たな生体防御メカニズムが報告(Brinkmann Vet et al. Science 2004)され、NETs機構の制御不全は自己免疫疾患や敗血症を含む炎症性疾患および脳梗塞、心筋梗塞、深部静脈血栓症などの主要な発症メカニズムであることも分ってきた。しかし、このような病態におけるImmunothrombosis制御異常の中でNETsおよびその主たる構成成分であるHistoneを制御することによる治療法はまだ開発されていない。

Histoneは核内においてDNAを束ねクロマチンの構成成分として主要な役割を果たしているが、細胞の破壊により細胞外に放出されると敗血症や外傷をはじめ炎症による多臓器障害の増悪因子となることが知られDAMPs (Damage-associated molecular patterns) と称される分子群に属する。最近、細胞外Histoneが血小板凝集や血管内皮細胞障害を引き起こし、敗血症における死因に関与することが報告された (Xu J et al. Nat Med 2009)。Histoneを投与されたマウスは、臓器への好中球の遊走、微小血管の血栓症を起こして播種性血管内凝固 (DIC) を呈し、肺塞栓あるいは肺出血により死亡する。敗血症やDICを呈した患者の血液中のHistone H3値も上昇している (Nakahara et al. PLOS ONE 2013)。これまで、Histoneは血小板上の受容体TLR-2.4 を介して血小板凝集を起こすことにより血栓症をもたらすと考えられてきた (Xu J et al. Nat Med 2009)。しかし、我々はHistone静注モデルマウスの生存が、好中球を除去することにより顕著に延長することを見出した。以上のことから、Histoneによる臓器障害と好中球-血小板の相互作用の間には密接な関係があると考えられた。

最近、COVID-19の重症化に基礎疾患としての糖尿病や高血圧が関与することが疫学的に明らかとなり、その剖検例の病理学的解析から肺血栓塞栓症や心筋梗塞などの致死的な血栓症が頻発していることが判明し、ImmunothrombosisがCOVID-19において多臓器不全をもたらす重要なメカニズムであることが提唱された。また、興味深いことにCOVID-19の重症化による臓器障害と末梢血細胞外Histoneのレベルの間に相関があることが報告された。しかし、糖尿病患者においてImmunothrombosisが亢進する機序については十分解明されていない。

## 2. 研究の目的

敗血症や外傷の病態において、臓器障害を起こした際に全身に散布されるDAMPs として細胞外に出たHistoneが好中球の遊走、血小板凝集、血管内皮細胞障害を引き起こし、生命予後を左右することが報告されている。細胞外Histoneの由来はapoptosisまたはnecrosisに陥った細胞や、活性化した好中球から放出される好中球細胞外トラップ : Neutrophil Extracellular Traps (NETs)と考えられており、放出されたHistoneは細胞を傷害し、さらなるHistoneが放出され、positive feedback loopが形成される。特に「糖尿病患者では心血管病や癌に対して脆弱である」ことは良く知られた臨床的知見であるが、我々はHistoneなどのDAMPsに対する反応性が糖尿病で亢進している可能性を考え、その反応性として特に好中球-血小板相互作用に焦点をあてて解析し、新たな治療標的を見出すことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Histone 静注によるマウス急性肺障害 (ALI) の病理組織学的観察

細胞外 Histone は、野生型 C57BL/6j マウスで用量依存的に致死的な血栓出血性肺損傷を引き起こすが、これは血小板依存性であることは以前に報告されている。本研究では、抗 Gr-1 モノクローナル抗体を投与し予め好中球を免疫学的に除去したマウス、Mac-1KO マウスに 100 mg/kg のウシ胸腺由来 Histone を静脈内注射し、肺の血栓出血性炎症を HE 染色にて観察した。さらに Histone を静注した野生型マウスと Mac-1KO マウスの肺組織において、免疫組織化学的に好中球と血小板を検出するために、それぞれミエロペルオキシダーゼ (MPO) と CD42b 抗体で二重染色した。

### (2) ヒト末梢血由来好中球(hPMN)と洗浄血小板 (hPlt) の電子顕微鏡的観察

ヒト末梢血由来好中球(hPMN)と洗浄血小板 (hPlt) を用いて、in vitro で Histone 刺激し、電子顕微鏡観察下に観察した。また、この現象が抗 Mac-1 抗体の前処置によりいかなる影響を受けるかを観察した。

### (3) hPMN と Platelet-rich plasma (PRP)、によるフローサイトメトリー分析

血小板表面抗原 CD61 と好中球表面抗原 CD11b に対する抗体を用いて、CD61 陽性 CD11b 陽性細胞として検出された血小板-好中球複合体 (PNC) 形成をフローサイトメトリーにより定量した。コントロールとして Platelet-poor plasma (PPP)を用いた。また、Histone の受容体と考えられている TLR-2 と TLR-4 の発現が Histone 刺激によりいかなる影響を受けるかを TLR-2 と TLR-4 に対する抗体を用いたフローサイトメトリーにより解析した。

### (4) タービジメトリー(濁度測定)によるフィブリン血餅形成の検出

血小板-好中球共培養系における *in vitro* での血漿血餅形成を定量するため、既報の方法を改変したタービジメトリー(濁度測定)技術を採用した。フィブリン血餅形成に対する Histone 誘発性好中球-血小板相互作用の影響を定量化するために、CaCl<sub>2</sub> 添加 PPP または PRP、hPMN、Histone、および少量のトロンビンを使用して血餅を調製し、340nm での濁度を測定した。

### (5) 高脂肪食 (HFD) 誘発糖尿病 (DIO) マウスにおける Histone 投与による ALI の観察

糖尿病患者は敗血症や外傷、COVID-19 等による急性炎症に対して脆弱であることは臨床的によく知られる。我々は、DIO (diet induced obesity)マウスに Histone を投与することにより糖尿病患者における血栓形成を再現するモデルを構築し、Mac-1 を介した好中球・血小板相互作用について検証した。また、白血球の細胞外 Histone に対する免疫応答が糖尿病により修飾を受けるという仮説をたてた。これを検証するため金属同位体標識抗体を用いて細胞内外のタンパク質を検出する CyTOF (cytometry by time-of flight) 技術を応用し、ウシ胸腺由来ヒストンを投与したマウスの末梢血白血球を細胞表面マーカーで識別し、同時に細胞内リン酸化シグナルを単一細胞ごとに検出した。

## 4. 研究の成果

### (1) 細胞外 Histone による急性肺障害 (ALI) は好中球および接着因子Mac-1 依存性である。

細胞外 Histone は、野生型 C57BL/6j マウスで用量依存的に致死的な血栓出血性肺損傷を引き起こすが、これは血小板依存性であることは以前に報告されている。本研究では、このモデルにおける好中球とその機能の関与を調べるために、好中球を免疫学的に除去したマウスおよび Mac-1 KO マウスに Histone を静脈内注射したところ、両者とも肺の血栓出血性炎症から保護され、生存期間が延長した。また、Histone は野生型マウスで重度の血小板減少症を引き起こしたが、Mac-1KO マウスでは有意に血小板減少が回避されたことから、Histone は Mac-1 依存性の血栓形成による消費性の血小板減少を誘発することが示唆された。

### (2) Histone による血小板-好中球複合体 (Platelet-Neutrophil Complex; PNC) 形成は、Mac-1 依存性である。

Histone 刺激による血小板と好中球の複合体 (Platelet-Neutrophil Complex; PNC) 形成は、野生型マウスの肺で豊富に検出されたが、Mac-1KO マウスの肺ではほとんど検出されなかった。このことから、Histone による PNC 形成が Mac-1 に依存することが示唆された。そこで、この現象を *in vitro* で検証するために、ヒト末梢血由来好中球(hPMN)とヒト洗浄血小板 (hPlt) を用いて電子顕微鏡観察下に観察した。hPlt 単独では、ヒストンを加える前には円盤状を示しているが、Histone 刺激により 1 分以内に凝集した。一方、hPMN 単独ではヒストンを添加する前は球形で細胞質には典型的な葉状核と細胞小器官の存在が豊富に確認できるが、Histone 刺激により hPMN の細胞質オルガネラは 1 分で減少しはじめ、膨張して互いに接着し、細胞内オルガネラは刺激後 5 分で消失し 10 分で崩壊した。Histone を hPlt+hPMN 混合物に加えると、凝集した hPlt が、核クロマチンが 30 分で濃く染色された hPMN にしっかりと付着して凝集体を形成し、hPMN は 60 分で膨張して崩壊を示した。この現象は、抗 Mac-1 抗体の前処置により顕著に抑制された。フローサイトメトリー分析を使用して、CD61 + CD11b +細胞として検出された PNC 形成の量は Histone 刺激で顕著に増加したが、10 $\mu$ g/ml の抗 CD11b 抗体の処理で部分的に抑制された。

### (3) Histone は好中球の TLR-2 および TLR-4 の発現を増幅して、Mac-1 の発現を誘導する。

過去の報告によると、好中球は Toll-like receptor (TLR)-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 および 10 を発現している。これまで Histone の受容体と考えられている TLR-2 と TLR-4 の発現は Histone 刺激により顕著に増加した。また Histone 刺激により誘導される好中球上の活性化型 Mac-1 の発現は、TLR-2 および TLR-4 阻害剤によって用量依存的に抑制された。このことから、Histone は TLR-2 および TLR-4 を介して好中球 Mac-1 を活性化することが判明した。

### (4) 好中球 PSGL-1 は、Histone 誘発性の PNC 形成において重要な役割を果たす

Histone を Platelet-rich plasma (PRP)存在下で好中球に添加すると、好中球に結合する血小板の量が明らかに増加した。これは抗 PSGL-1 抗体によって完全にブロックされたことから、PNC の形成が PSGL-1 依存性であることを示唆している。しかし、血小板の存在下 (PRP) に Histone による好中球 Mac-1 の活性化は抗 PSGL-1 抗体によって有意には抑制されなかった。これらの結

果は、PSGL-1 が主に PNC 形成に関与しているが、Mac-1 の活性化には深く関与していないことを示している。これらの結果は、Histone 刺激中の好中球での Mac-1 の活性化は、主に TLR-2/4 を介した Histone の直接効果に起因することを示している。

(5) 細胞外 Histone は、血小板および好中球の存在下でフィブリン血餅形成を促進する。

血小板-好中球共培養系における *in vitro* での血漿血餅形成を定量するため、既報の方法を改変したタービジメトリー(濁度測定)技術を採用した。Histone を PRP+hPMN に添加すると、濁度が明らかに増強され、好中球-血小板相互作用で Histone 刺激による血栓形成が促進されることが示された。さらに Histone によるフィブリン血餅増強効果は、抗 Mac-1 抗体の前処置で解除されたことから、この系における血栓形成の促進が Mac-1 依存性であることが示唆された。

(6) DIO マウスでは Histone 投与による ALI が増悪し生命予後が悪化した。

通常飼料を投与したマウスと比べ、DIO マウスでは Histone 投与により顕著に ALI が増悪し致死率が上昇することが判明した。また、Mac-1 KO マウスに HFD を投与した糖尿病モデルにおいては、野生型 C57BL/6j マウスに比べ、生存率、肺組織所見の改善が見られ、血小板減少が改善する傾向が見られた。このことから、糖尿病における Histone 誘発性急性肺障害の増悪は Mac-1 に依存する可能性が示唆された。

(7) DIO マウスでは Histone 投与により末梢血に IκBα や STAT1, 3, 5 のリン酸化が亢進した好中球細胞群が動員された。

我々は上記を説明しうるメカニズムの候補として、白血球の細胞外 Histone に対する免疫応答が糖尿病により修飾を受けるという仮説をたてた。これを検証するため CyTOF 技術を応用し、ウシ胸腺由来ヒストンを投与したマウスの末梢血白血球を細胞表面マーカーで識別し、同時に細胞内リン酸化シグナルを単一細胞ごとに検出した。その結果、ヒストン投与後一過性に CD11b+Ly6G+細胞が増加し、HFD12 週間投与により作成した糖尿病マウスでは、IκBα および STAT1, 3, 5 のリン酸化が亢進した好中球細胞の末梢血への動員が増加した。このことから糖尿病において好中球に属する一部細胞群での炎症免疫応答が亢進している可能性が示唆された。以上の結果から、好中球 Mac-1 に依存する Immunothrombosis の亢進が糖尿病における炎症性疾病への脆弱性のメカニズムの一つであると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 平橋 淳一	4. 巻 32
2. 論文標題 NETsと自己免疫疾患	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本血栓止血学会誌	6. 最初と最後の頁 679-686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.32.679	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Monti S, Craven A, Klersy C, Montecucco C, Caporali R, Watts R, Merkel PA, Luqmani R and Hirahashi J as a collaborator.	4. 巻 60
2. 論文標題 Association between age at disease onset of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and clinical presentation and short-term outcomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 617-628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishizaki J, Takemori A, Horie K, Hiraoka D, Suemori K, Matsumoto T, Sada KE, Amano K, Harigai M, Arimura Y, Makino H, Takenaka K, Takemori N, Hasegawa H, and Hirahashi J as a collaborator..	4. 巻 23
2. 論文標題 Usefulness of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as a predictor of sustained remission in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-021-02471-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sada KE, Ohashi K, Asano Y, Hayashi K, Morishita M, Watanabe H, Matsumoto Y, Fujimoto S, Takasaki Y, Yamagata K, Banno S, Dobashi H, Amano K, Harigai M, Arimura Y, Makino H and Hirahashi J as a collaborator.	4. 巻 22
2. 論文標題 Treatment-related damage in elderly-onset ANCA-associated vasculitis: safety outcome analysis of two nationwide prospective cohort studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-020-02341-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Mototsugu, Kinoshita-Daitoku Ryo, Kiga Kotaro, Sanada Takahito, Zhu Bo, Okano Tokuju, Aikawa Chihiro, Iida Tamako, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Okubo Kosu, Kurosawa Miho, Hirahashi Junichi, Suzuki Toshihiko, Nakagawa Ichiro, Nangaku Masaomi, Mimuro Hitomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Group A Streptococcus establishes pharynx infection by degrading the deoxyribonucleic acid of neutrophil extracellular traps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平橋 淳一	4. 巻 89巻4号
2. 論文標題 【腎疾患コンサルテーション】急性腎障害(AKI) 横紋筋融解症/クラッシュシンドロームへの対応 (解説/特集)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 546-549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大久保 光修、平橋 淳一	4. 巻 88巻4号
2. 論文標題 【腎臓と運動・スポーツ】運動後急性腎不全 横紋筋融解症による腎不全(解説/特集)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 526-532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平橋 淳一	4. 巻 4
2. 論文標題 NETsに対する治療戦略	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Medicine	6. 最初と最後の頁 325-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大久保 光修、平橋 淳一	4. 巻 10
2. 論文標題 圧挫症候群における腎障害のメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 260-265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平橋 淳一	4. 巻 268
2. 論文標題 横紋筋融解症による急性腎障害発症の新たなメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 587 - 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平橋 淳一	4. 巻 27
2. 論文標題 急性腎障害におけるMETsの関与とその制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 284 - 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大久保光修、平橋 淳一	4. 巻 86
2. 論文標題 横紋筋融解症・腎臓専門医の視点より	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 491 - 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平橋 淳一
2. 発表標題 災害大国日本における横紋筋融解症 AKI とラクトフェリン
3. 学会等名 日本ラクトフェリン学会第9回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平橋 淳一、黒澤 美穂、大久保 光修
2. 発表標題 糖尿病では急性期傷害関連タンパクHistoneに対する白血球の炎症免疫応答が亢進している
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平橋 淳一
2. 発表標題 糖尿病における心血管病への脆弱性を白血球の急性期タンパクヒストンへの反応性から解析する
3. 学会等名 第10回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平橋 淳一
2. 発表標題 炎症急性期タンパクHistoneに対する感受性とThromboinflammation
3. 学会等名 第25回MPO研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平橋 淳一
2. 発表標題 糖尿病では急性期傷害関連タンパクHistoneに対する白血球の炎症免疫応答が亢進している
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------