

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19587

研究課題名(和文) Cellular and molecular mechanism of blood sludging/skimming. Causative role of cancer exosomes and their pathophysiological view points

研究課題名(英文) Cellular and molecular mechanism of blood sludging/skimming. Causative role of cancer exosomes and their pathophysiological view points

研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：20082282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはこれまでに、血流のダイナミズムを定性・定量的に診断する方法として、T-TAS (Total Thrombus-Formation Analysis System)を開発し、“blood skimming/sludging”という、従来の血栓・塞栓、そして出血とは異なる新しい異常な血流動態の把握に成功してきた。そこで本研究では、この異常な血流動態：blood skimming/sludgingの発生病理について研究し、癌細胞由来のexosomeが上記の異常な血流動態の誘因の一つであることを検証し得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液の円滑な循環はダイナミックな生命活動の最重要基盤機能で、その異常病態は「血栓・塞栓」と「出血」であり循環領域最大のテーマである。本研究では申請者らが共同開発したTotal Thrombus Formation Analysis System(T-TAS)を用い、“Blood sludging, skimming”について研究した。この病的循環動態はこれまでも知られていたが、T-TAS法で初めて可視化され、定量・定性的解析と診断が可能となった。この“Blood sludging, skimming(血流の上清化と泥流化)”は、血栓・塞栓、出血と並び、新たな血流動態の異常であると結論した。

研究成果の概要(英文)：We have previously created a total-Thrombus-Formation Analysis system(T-TAS), as a pre-, and prothrombotic states diagnostic instrument. This enabled that blood thrombotic ability not only by quantitatively but also qualitatively with the visualization of clot forming dynamics. under the microscope. Using this, we showed that blood skimming/sludging as a novel circulatory abnormality besides thrombosis/embolism and bleeding. The blood skimming is a rapid blood flow like as a skimmed liquid. The sludging flow is a peripheral flow of the red blood-rich fraction. Thus, we defined this blood flow with a skimming/sludging as a novel abnormal flow beside thrombosis/embolism and bleeding. These novel types of abnormal blood flow might play roles for such blood disturbances as shock, DIC, dehydration and so on.

研究分野：血栓止血学

キーワード：血流動態異常 Skimming Sludging T-TAS 血栓・塞栓 出血 血漿成分 血球成分

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血流ダイナミズムの異常は、血栓・塞栓と出血が代表的である。これらの病態は、脳血管障害あるいは虚血性心疾患など、発症してから死の転帰、あるいはそれを免れても重篤な後遺症を来す危険性が高い。従って、発症前に発症を予知予測して予防策を立てることが望まれる。しかし上記の血管障害を、“発症前あるいは準備状態段階で、定性かつ定量的に予測する”ことには多くの困難性、問題があり、正確性に欠け、不可知の難問であるのが現状である。

そこで我々は、血栓・塞栓症を preclinical stage で予知、把握することを目的として、まだよく解明されていない exosome の影響を検討することとした。方法としては、藤森工業(株)の細川和也氏らと共同研究した新規方法；T-TAS (Total Thrombus Formation Analysis (図1))を用いた。本法は、具体的にはキャピラリー内に全液を流し、全血の flow 状態を顕微鏡下に可視化しつつ、かつ閉塞状況を内部圧の上昇で定量化するという方法であり、一部に狭窄という圧負荷発生部位も設置してある。この T-TAS は、従来の凝固検査法と比較して、鋭敏に定性的のみならず定量的にも凝固能を把握しうる方法として、内外で注目されつつある。

T-TAS (Total Thrombus-formation analysis system)の原理とあらまし

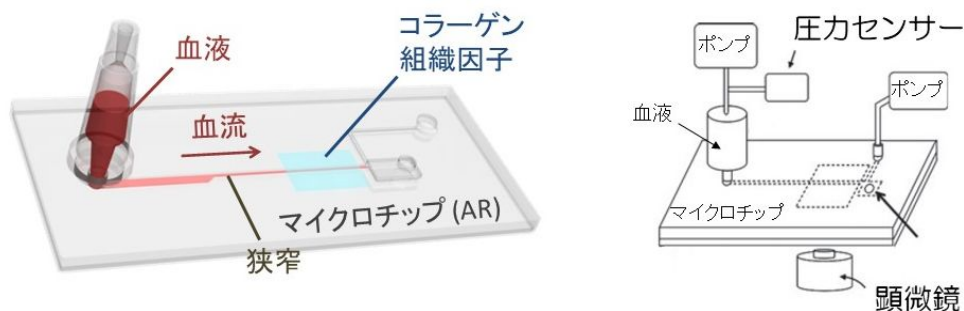


図1. 本研究で使用した T-TAS (Total Thrombus-Formation Analysis System) の原理図

2. 研究の目的

細胞外小胞: Exosome (以下 Exo) が種々の病態に関係することがわかり始めてきているので、本研究では、凝血系に及ぼす影響を、上述の T-TAS 法に加え、他の種々な方法を駆使して解明することを目的とした。具体的には以下の通りである。

(1) まず従来から凝固検査法として広く使用されている方法で、Exo の凝血系に及ぼす影響を解析する。

(2) この結果をさらに詳細に解析するため、T-TAS を使い、Exo が血流というダイナミズム下では、どのような影響を与えるかを解析する。これは、より生体内に近い環境下、すなわち血流下での挙動と結果を解析するため、これまで Exo が、血流動態下でどのような影響を与えるのかに関して全く不明なためである。

3. 研究の方法

(1) Exo の調整: これまで悪性腫瘍の Exo としてはメラノーマ細胞株 A375 を、正常細胞の Exo としては培養ヒト内皮細胞を使用してきたのでそれを踏襲利用し、培養上清を超遠心して調整した。

メラノーマ細胞由来の Exo を使用する理由は、メラノーマが血栓や DIC を併発しやすい悪性腫瘍であるという臨床的理由からであり、培養ヒト内皮細胞由来の Exo を使うことは、そもそも研究するテーマ; “blood sludging” と “blood skimming” という病理・病態自体が血管内の events であり、血管最内層の内皮細胞は、広く血管内の凝血動態を制御しているからである。

(2) 解析には T-TAS のほかに、全血の凝固検査としてよく使われている Rotational Thromboelastmetry (ROTEM) を使用した。

(3) ROTEM で得られた結果に T-TAS で得られた結果を加え、総合的に blood sludging、blood skimming 発生機構とその制御法に関して考察した。これらの解析には遺伝子組み換えトロンボモジュリン (rTM) や、組織因子抗体、F.XII 抗体なども加え評価した。

4. 研究成果

(1) ROTEM 解析の結果

ROTEM で解析すると、図2に示すように、A375-Exo の添加依存性 (終濃度 0 ~ 90ng) に全血凝固過程は加速 (凝固開始の早期化) 増大された (振幅) (図2)。Exo 添加量 90ng/ml で、増大度はほぼ頭打ちとなっていることから、少量で効果を呈し始め、100 ng/ml 程度で飽和されるもの

と考えられる。

ROTEM (測定系:NATEM)

添加試料: Exosome 0.9ug/ul・A375ヒトメラノーマ細胞由来・培養mediumの1000倍の濃度でPBSに溶解
 添加量: 血液に対し1%添加、インキュベーション時間:無し、濃度: 血中濃度

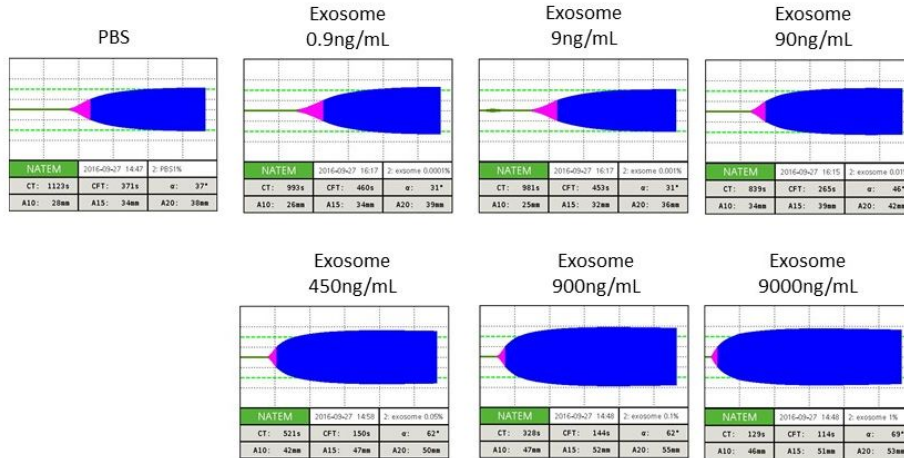


図2 . A375 田来エクソソームの添加濃度依存的に、全血の凝固促進した

(2) T-TASでの解析: blood skimmingとsludging

T-TAS を用いて流動下に Exo 添加の影響を可視化すると、癌細胞由来の Exo 添加で、血流は奇異な流れ (bizarre flow) すなわち血流泥状化 (blood sludging) と上清化 (blood skimming) と呼ばれる現象の惹起を観察した (図3)。これは血栓・塞栓、出血などの、従来から認識されてきた血管病変、血流動態の異常とは別種の異常であると考えられ、その発生病理、臨床病態との関連の解明が今後の課題である。

また、上記の異常な血流動態は、正常細胞として用いた内皮細胞由来 Exo では観察されなかった。今後は、他の悪性腫瘍、内皮細胞以外の正常細胞由来の Exo を使って検討する必要がある。

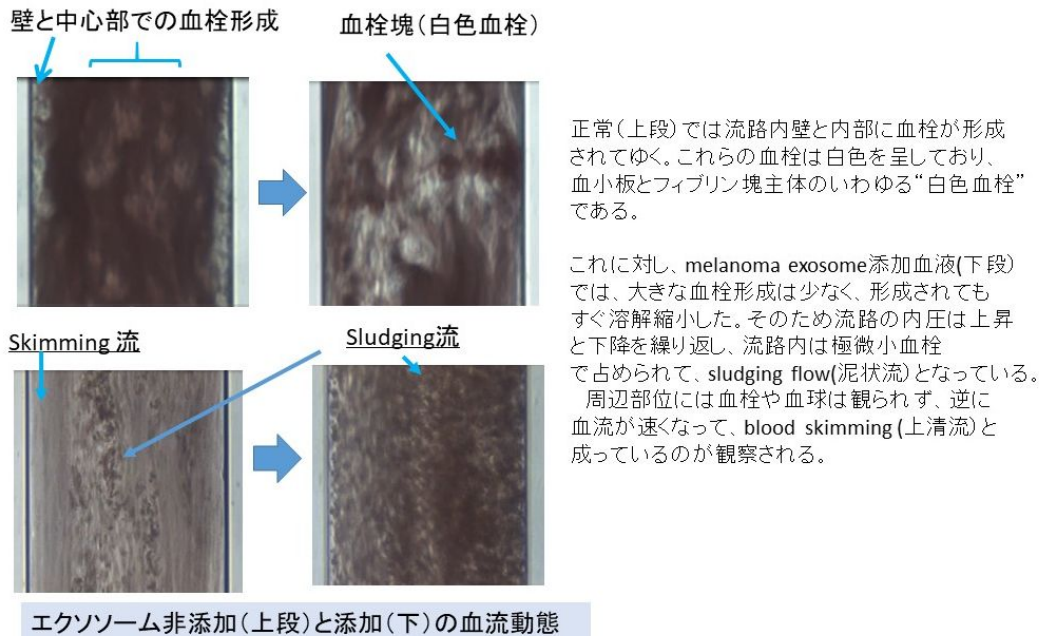


図3 . melanoma exosome により惹起される奇異な血流: blood sludging と skimming (下段)

(3) この抑制の本態はトロンボモジュリンであり、遺伝子組み換えトロンボモジュリンにより、癌細胞由来の Exo 添加による血流動態の異常は抑制された。

(4) 組織因子抗体では抑制されたが、F.XII 抗体では抑制し得なかったので、内因系接触相は関与していないものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yashima Nozomi, Ito Takashi, Kajiyama Kenji, Maeda Hiroyuki, Kakahana Yasuyuki, Maruyama Ikuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Leukocyte-derived extracellular DNA contributes to abnormal pressure elevation in the extracorporeal circulation circuit	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) 10.1038/s41598-019-57173-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Takashi, Totoki Takaaki, Yokoyama Yayoi, Yasuda Tomotsugu, Furubeppu Hiroaki, Yamada Shingo, Maruyama Ikuro, Kakahana Yasuyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Serum histone H3 levels and platelet counts are potential markers for coagulopathy with high risk of death in septic patients: a single-center observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Intensive Care	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/s40560-019-0420-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shrestha Binita, Ito Takashi, Kakuuchi Midori, Totoki Takaaki, Nagasato Tomoka, Yamamoto Mika, Maruyama Ikuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Recombinant Thrombomodulin Suppresses Histone-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2019.02535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Mika, Harada Yoichiro, Suzuki Takehiro, Fukushima Tomoko, Yamakuchi Munekazu, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Hori Kanji, Maruyama Ikuro	4. 巻 580
2. 論文標題 Application of high-mannose-type glycan-specific lectin from <i>Oscillatoria Agardhii</i> for affinity isolation of tumor-derived extracellular vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 21 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2019.06.001	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 Harada Yoichiro, Kizuka Yasuhiko, Tokoro Yuko, Kondo Kiyotaka, Yagi Hirokazu, Kato Koichi, Inoue Hiromasa, Taniguchi Naoyuki, Maruyama Ikuro	4. 巻 593
2. 論文標題 N glycome inheritance from cells to extracellular vesicles in B16 melanomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 942 ~ 951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Yoichiro, Suzuki Takehiro, Fukushige Tomoko, Kizuka Yasuhiko, Yagi Hirokazu, Yamamoto Mika, Kondo Kiyotaka, Inoue Hiromasa, Kato Koichi, Taniguchi Naoyuki, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Maruyama Ikuro	4. 巻 1863
2. 論文標題 Generation of the heterogeneity of extracellular vesicles by membrane organization and sorting machineries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 681 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.01.015	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山 征郎
2. 発表標題 急性血液浄化の新視点 : exosomeとRAMPs
3. 学会等名 第29回日本急性血液浄化学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山 征郎
2. 発表標題 病態拡大の新しい使者 : exosomeが参画した新しいショック病像
3. 学会等名 第33回日本Shock学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 癌の診断デバイス	発明者 堀貴治、平山真、丸山征郎、田口好弘、黒川洋、水口博義、	権利者 広島大学、鹿児島大学、アルプスハイ、京都モテック
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-92557	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	山口 宗一 (YAMAKUCHI Munekazu) (20325814)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	原田 陽一郎 (HARADA Yoichiro) (80464147)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・その他部局等・糖鎖オンコロジー部主任研究員 (84409)	変更：2019年4月1日
研究分担者	伊藤 隆史 (ITO Takashi) (20381171)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師 (17701)	
研究分担者	山本 美佳 (YAMAMOTO Mika) (70791507)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任研究員 (17701)	削除：2019年4月11日