

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09406

研究課題名(和文)血小板由来細胞外小胞を用いた血管透過性亢進制御に対する新規治療アプローチ

研究課題名(英文) A novel therapeutic approach to control vascular hyperpermeability using platelet-derived products.

研究代表者

高須 修 (Takasu, Osamu)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90236216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症時に血小板の活性化に伴い放出される血小板内在蛋白と細胞外小胞(EVs)の、血管内皮に対する作用は不明である。本研究では、洗浄血小板から内在蛋白、large EVsとsmall EVsの3分画を作成分離し、各作用を検討した。内在蛋白は、傷害血管内皮のjunctionを強化し、敗血症モデルにおいて血管内皮傷害を軽減した。一方、EVsの血管内皮に対する直接作用は明らかにできなかったが、トロンビン産生能を有すlarge EVsは、血漿Gasdermin Dを増加させ、small EVs投与はGasdemim D産生を抑制したことから、炎症の制御を介し間接的に血管傷害を抑制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

高齢化が進む本邦では、今後、敗血症患者数の増加が予測される。敗血症時には血小板の活性化に伴い、内在する様々な蛋白や細胞外小胞が放出され、これが敗血症の病態と深く関わっている事が知られている。血小板活性化が敗血症病態の進展悪化に繋がるという考えに立てば、高齢者で服用率が高い血小板凝集抑制薬は、敗血症の予後を変える可能性もある。一方、本研究は、血小板の活性化で放出される物質を、血管内皮傷害に対して正の制御(傷害の進行防止や回復)を示す分画と傷害性を示す分画とに分離できれば、血小板のモジュレートのもと血管内皮傷害の制御や修復をターゲットとする新たな敗血症治療法が生まれる可能性を示したものと考える。

研究成果の概要(英文)：The effects of platelet endogenous proteins and extracellular vesicles (EVs) released with platelet activation during sepsis on the vascular endothelium are unknown. In this study, three fractions: Platelet derived endogenous proteins, Platelet derived large-EVs and small-EVs, were created and separated from washed platelets, and their effects were investigated. The endogenous protein enhanced the junction of the injured vascular endothelium on cultured endothelium and reduced the vascular endothelial injury in the sepsis model. However, although the direct effect of EVs on the vascular endothelium could not be clarified, large-EVs capable of thrombin generation increased plasma Gasdermin D. On the other hand, administration of small EVs suppressed Gasdemim D production, thus controlling inflammation. It was suggested that small EVs have ability to suppress indirectly vascular injury.

研究分野：敗血症、臓器不全、救急集中治療

キーワード：敗血症 血小板 血管透過性亢進 血小板由来蛋白 血小板由来細胞外小胞 EVカドヘリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症は感染を背景として臓器不全を呈す死亡率の高い病態で、全世界的に死亡率の低下を目指した取り組みが行われている。高齢化が進む本邦において、敗血症患者数の増加が予測されるが、高い死亡率だけではなく、敗血症罹患後の生活の質の低下が問題となる。その詳細な病態は未解明であるが、傷害組織や臓器の回復が不十分で遅延している可能性も想定される。

(2) 敗血症の病態形成には多種多様な因子が関与するが、特に、白血球と血小板、血管内皮の3者の相互作用は、臓器障害発症に繋がる血管内皮の傷害を引き起こす重要な病態像ととらえられている。特に血小板は、その活性化に伴って、血小板由来細胞外小胞 Platelet-derived extracellular vesicles (EVs) を放出し、血管内皮の傷害に深く関与する事が知られているが、同時に、血管内皮と白血球の接着を抑制し血管内皮に対して保護的に作用したり、細菌のクリアランスに関与するなど、敗血症病態の制御にも深く関与していることも知られている。さらに、血小板に内在する多様な蛋白には、組織の修復や機能維持、血管内皮の増生に関与する因子も多く含まれており、実際に多血小板血漿 (血小板富血漿, Plate rich plasma) などは、整形外科領域や口腔外科領域などで、傷害組織の修復に臨床応用されている。

(3) 血小板は、血管内皮細胞に対して、傷害の進展と傷害の制御という相反する作用、二面性 (double-edged swords) を有す臓器と言える。血小板の活性化に伴って放出される EVs や蛋白成分のうち、保護的あるいは傷害制御に作用する分画の抽出や、傷害性に働く分画の分離除去ができれば、血管内皮のメンテナンスや修復をターゲットとした新たな敗血症の治療ストラテジーに繋がる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

血小板が活性化する際には、血小板に内在する様々な蛋白成分とともに、マイクロパーティクルを含む血小板由来細胞外小胞が放出される。健常マウスから採取した血小板から、これら血小板由来成分を抽出・分離し、各分画が、敗血症時の血管内皮傷害に対して保護的に働くか否かを、マウス由来の培養細胞とマウス敗血症モデル (盲腸結紮穿孔腹膜炎モデル) 上で検討した。

3. 研究の方法

(1) 洗浄血小板溶液の作成と血小板由来成分の抽出・分離

洗浄血小板溶液の作成： 洗浄血小板の作成は、Aurbach K らの方法¹⁾を一部改変して行った。健常マウスから抗凝固剤 ACD を用いて血小板を活性化しない様採血を行った。これを PGI₂ 入り PBS 溶液で複数回遠心分離して血小板を採取し、洗浄血小板溶液とした。1 匹より採取される血小板を 1U と定義し、1U/200 μ l PBS に調整した。洗浄血小板溶液の血小板濃度は、1.5~1.7 $\times 10^6$ μ l であった。

Platelet lysate の作成： 洗浄血小板から血小板内在蛋白と血小板由来細胞外小胞を採取する方法として、血小板溶解液 (platelet lysate) を作成した。作成にあたり、超音波法、凍結融解法、その他トロンピンやカルシウムイオノフォア刺激による lysate 液を試作、比較検討し、本研究では、最も安定して容易に作成可能であった凍結融解法を採用した。解凍時の温度と時間に関しても、3 種類の異なる温度を検討し、本研究では、-80 で凍結保存した洗浄血小板溶液を、室温解凍 30 分、-80 凍結 30 分を、3 サイクル繰り返す方法とした。細胞細分を遠心除去した

上澄を platelet lysate (以下 Plt lysate) 液とした。

Platelet lysate からの蛋白分画 (以下 Plt lysate-P)、細胞外小胞分画 (以下 Plt-EVs) の分離 Platelet lysate 液から Plt lysate-P と Plt-EVs を分離する目的で、超遠心(UC)法とサイズ排除型クロマトグラフィー (SEC) 法の 2 つを試行し、蛋白ロスが少なく、かつ以下に示す large EVs と small EVs の分離と濃縮が容易であった超音波法を本研究での分離方法とした。

Platelet lysate 液をまず 2 万 G で 30 分遠心。ペレットとして回収された large EVs を PBS に浮遊し、Plt lysate-20K EVs 溶液とした。さらに上澄を 10 万 G、90 分、超遠心機で遠心。ペレットとして回収された small EVs を PBS に浮遊し、Plt lysate-100K EVs 溶液とし、最終上澄を血小板内在蛋白 (以下 Plt lysate-P) として、最終的に 3 つの分画を分離・調整した。

(2) 血小板 lysate 由来 3 分画についての検討項目と方法

検討 1: 抽出 3 分画の性状の検討

Plt lysate-EVs の粒度分布、粒子数の計測: 2 つの異なる Plt lysate-EVs; Plt lysate -20K EVs と Plt lysate-100K EVs の粒度分布と粒子数を、Nanosight LM10 (Malvern) を用いて計測した。

各分画のトロンピン産生能の測定: Plt lysate-P, Plt lysate-20K EVs, Plt lysate-100K EVs のトロンピン産生能を thrombin generation assay kit (TECHNOTHROMBIN, Technoclone GmbH) を用いて測定した。

検討 2: 蛋白成分分画の血管増殖関連因子、その他因子の測定

Plt lysate-P 溶液の総蛋白量を、Pierce 660nm Protein Assay 法(Thermo science)を用いて測定した。血小板内在蛋白として、血管内皮細胞間の junction の制御に關与する Angiotensin-1、その他血小板内顆粒に多く含まれる HGF, DKK-1 濃度を市販の ELISA kit を用いて測定した。

検討 3: 肺毛細血管上皮細胞 (単層培養血管内皮細胞) における Electric cell-substrate impedance sensing system(ECIS)リアルタイム解析

培養した一層のマウス肺毛細血管上皮細胞に、トロンピン 1U/ml を投与し傷害した。2 時間後に、一定量の microparticle free plasma に Plt lysate-P, Plt lysate-EVs, PBS を添加した溶液を各々培養細胞液へ添加し、ECIS を連続測定した。

検討 4: 敗血症モデルにおける抽出 3 分画の血管内皮傷害に対する効果の検討

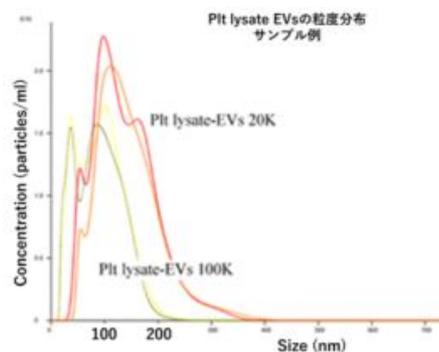
C57BL6 マウスを用いて腹膜炎状態を模倣した盲腸結紮穿孔 (CLP) モデルを作成し、Plt lysate 3 分画 (Protein, large EVs, small EVs) の効果を in vivo で検討した。

1) Plt lysate-P の濃度依存性効果 2) Plt lysate-P, -EVs 20K, -EVs 100K の pre 投与効果について、CLP 作成から 24h 後の体重変化率 (活動性の評価)、血算、血漿中 VE-Cadherin 濃度、Gsdernin-D 濃度、採取した臓器の病理組織像を検討した。

4 . 研究成果

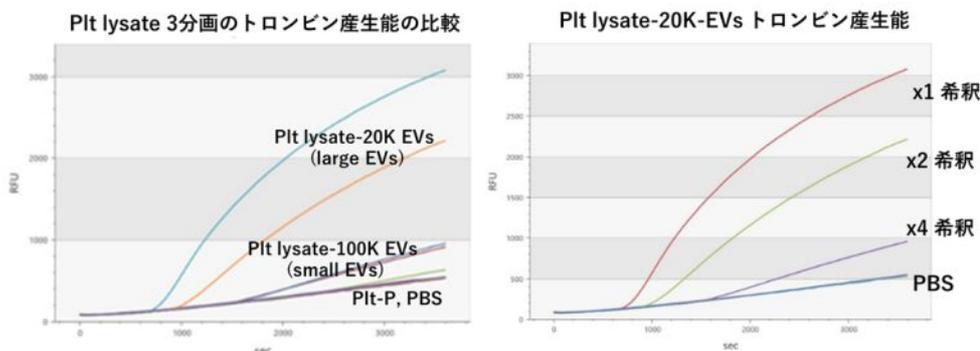
(1) Plt lysate 由来細胞外小胞 (Plt lysate-20K EVs, -100K EVs) の粒度分布

典型的な分布を図に示す。本サンプルの Plt lysate-EVs 20K の particles サイズは、mean $140.9 \pm 4.3\text{nm}$, particle 数は $2.73 \times 10^{12} \pm 1.47 \times 10^{11}$ particles/ml に対し、Plt lysate-EVs 100K の particle サイズは、mean $91.5 \pm 1.4\text{nm}$, particle 数は、 $1.90 \times 10^{12} \pm 5.53 \times 10^{11}$ であった。2 万 G と 10 万 G による遠心で、サイズの異なる EVs (large EVs と small EVs) に分離された。



(2) Plt lysate 3 分画のトロンビン産生能の検討

Microparticle free plasma に Plt lysate-P, Plt lysate-20K, Plt lysate-100K を 0.2U ~ 0.05U 加え、トロンビン産生能を測定した。典型的な測定結果を図に示す。横軸は時間、縦軸はトロンビン産生反映する発光量で示す。Plt lysate-20K EVs にトロンビン産生能が確認されるたが、Plt lysate-P にトロンビン産生能は無く、Plt lysate-100K EVs にトロンビン産生はほぼ認められなかった (左図)。さらに、Plt lysate 20K EVs のトロンビン産生能には、濃度依存性が確認された (右図)。



(3) Plt-lysate 中の蛋白濃度と Ang-1, HGF, DKK-1 濃度

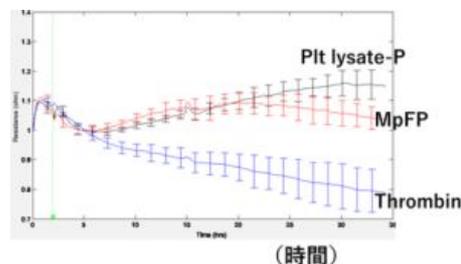
Plt lysate-P サンプルを 3 回作成し測定した蛋白濃度、Angiopoietin-1, HGF, DDK1 濃度を表に示す。

Plt-lysate-P	Pierce 660 nm	Angiopoietin-1	HGF	DDK1
平均	645	44.5	1594	878
単位	$\mu\text{g/ml}$	ng/ml	pg/ml	pg/ml

なお、Plt-lysate EVs は、同量の PBS 溶液に浮遊させた場合、感度以下となった。

(4) トロンビン傷害血管内皮細胞に対する傷害抑制効果の検討

典型的な経過を示した 1 例を図に示す。培養上皮にトロンピンを添加すると、ECIS 上、一過性に Resistance が上昇し、2 時間以内に peak を示し、その後は持続的にゆっくりと低下。細胞間接着障害の状態を反映した。トロンピン添加後 2 時間に Plt lysate-P 溶液を添加すると、Resistance は低下に転じることなく細胞傷害を抑制した。Plt lysate-EVs の添加では、Resistance の上昇 (傷害抑制、回復) はなく低値が持続した。



(5) Plt-P の CLP 前投与による血管傷害抑制効果の検討、濃度依存性の検討

CLP 作成 2.5 時間前に Plt lysate-P を 0.25U, 0.5U, 0.75U 腹腔内投与した場合、24h 後の体重減少率、Ht%濃度、sEVs 濃度は、0.25U では PBS と差はなく、明らかな透過性亢進に対する抑制効果は確認できなかった。0.75U 投与では、最も体重減少率が高く（活動性大）Ht の濃縮も軽度で、24h 後の sVE-Cadherin 濃度も低値であった。

さらに、便量を調整し、侵襲度を高くした CLP モデル(24h 生存率 60%)においては、Plt lysate-P0.75U 投与群において 24h 以内の死亡が回避されるとともに、PBS 投与群よりも明らかに体重減少率が高く（活動性を反映）全身状態が良い状態で活動性を維持できた。

(6) Plt lysate 3 分画の効果の比較

CLP 作成前 2.5 時間に、Plt lysate-P, Plt lysate-20K EVs, Plt lysate-100K EVs を各々0.75U 腹腔内投与し、PBS 群と比較した。最も体重減少率が高く、活動性を維持できたのは、Plt lysate-P 投与群で、24h 後の VE-Cadherin も PBS 群に比べ低値であった。Plt lysate-20/100K EVs の 2 群は、体重減少率、Ht%、EV-Cadherin で PBS 群と差を認めなかったが、Plt lysate-20K EVs では、他のどの群よりも 24h 後の Gasdermin-D の濃度は高く、Plt-lysate-100KEVs 群では最も Gasdermin-D が低値であった。

【研究のまとめと本研究の制限、今後の展望】

本研究において、血小板に内在する蛋白や血小板由来の EVs を採取するための方法として、凍結融解の単一の方法しか検討できていない。またマウスへの投与方法も前投与しか行っておらず、血管内皮傷害後に、今回確認できた作用を発揮できるか否かについては検討できていない。しかし、血小板内在蛋白 Plt lysate-P には、明らかに培養細胞上では、傷害血管内皮の junction 増強作用が確認され、CLP モデル上では、血管透過性亢進の結果生じる血液濃縮が抑制され、24h 後の活動性と生存率を維持する効果が確認された。一方、洗浄血小板由来細胞外小胞のうち、血漿中でトロンピン産生能を有す large EVs は、血管内皮の傷害抑制効果は乏しく、むしろ全身の炎症反応を助長する可能性が推察された。small EVs については、本研究の投与量では、血管内皮の傷害を抑制する効果は確認できなかったが、Gasdermin-D の産生を強く抑制するなど、炎症を制御しうる可能性が示唆された。本研究においては、small EVs の直接的な血管内皮の保護あるいは修復作用を明らかにできなかったが、投与量や投与経路、投与タイミングについて、さらに、plt lysate-EVs の作成・分離方法(血小板の活性化の方法)の変更など、small EVs の血管内皮傷害に対する作用を結論づけるにはさらなる検討が必要である。さらに、本研究においては、Plt lysate-P と Plt lysate-100K EVs の相乗効果の有無に関しては未検討である。

正常血小板をモジュレートし、血小板に内在する蛋白や血小板の活性化に由来する細胞外小胞から、血管内皮に対して保護的・傷害制御性に作用する分画を、選択的に抽出分離することで、あるいは障害性に作用する分画をより選択的に分離除去することで、血管内皮のメンテナンスや修復といった新たな敗血症治療法へ血小板そのものが応用できるものと考えられた。

< 参考文献 >

1. Aurbach K, Spindler M, Haning EJ, et al. Blood collection, platelet isolation and measurement of platelet count and size in mice – a practical guide. *Platelets*. 2019;30(6):698-707.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	平湯 恒久 (Nobuhisa Hirayu) (00647745)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	
研究分担者	鍋田 雅和 (Masakazu Nabeta) (20529523)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	

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