

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07361

研究課題名(和文) 輸血関連急性肺傷害病態解明のための基礎的研究 - CTL2分子間ネットワークの解明 -

研究課題名(英文) Fundamental studies for elucidating the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury - Elucidation of the CTL2 intermolecular network -.

研究代表者

岡崎 仁 (OKAZAKI, HITOSHI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80261973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：輸血関連急性肺障害 (TRALI) は輸血副反応の中でも致死的になりうる重篤な副反応である。中でもドナーの持つ抗HNA3a抗体によって起こる肺障害は重篤になる可能性が極めて強く、この反応の生体内での機序を解明することはTRALIの病態解明に欠かせない。HNA3a/CTL2の細胞内でのシグナル伝達については解明がなされておらず、細胞を用いた系でその機序を解明し、TRALIの特異的な治療への端緒となる可能性を追求した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

輸血関連急性肺障害 (TRALI) はその機序が未だ未解明であり、特異的治療が判明していない。非感染性もしくは非溶血性輸血副反応の中でも致死的になりうるTRALIの治療に結びつく機序の解明は輸血の安全性に大きく寄与する。

研究成果の概要(英文)：Transfusion-related acute lung injury (TRALI) is one of the most serious and potentially fatal adverse reactions of transfusion. The in vivo mechanism of HNA3a/CTL2 signaling has not yet been elucidated, and elucidation of this mechanism in a cell-based system is essential to the understanding of the pathogenesis of TRALI. We sought to elucidate the mechanism of HNA3a/CTL2 signaling in cells, which may lead to a specific treatment for TRALI.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：輸血医学

キーワード：輸血関連急性肺障害

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

安全かつ効果的な輸血療法を実現するために、輸血副反応の病態解明とその低減策の確立は喫緊の課題である。輸血は生体由来の血液という治療材料をそのまま患者に投与するもっとも初歩的な移植医療の一種であり、それに伴う多様な副反応の制御が治療上の重要な課題となってきた。輸血副反応のうち、輸血後肝炎やHIV 輸血感染など輸血伝播感染症のリスクは、献血時の問診強化、最新の検査技術導入、製造・在庫管理上の工夫などにより、飛躍的に向上した。また溶血性副反応についても、ガイドラインの整備、安全ルールや電子照合システムの普及により、重篤なABO 不適合輸血事故は激減、またABO、RhD 以外の血液型不適合による遅発性溶血反応についても、不規則抗体検査・患者携帯カードの普及や製剤側の抗原検索システムの開発・運用により、その頻度は低減されつつある。

一方、あらたな輸血副反応として注目されているのが、輸血関連急性肺傷害 (Transfusion Related Acute Lung Injury; TRALI) である。これは輸血後亜急性に発症する非心原性の肺水腫で、輸血後の心不全である輸血後循環過負荷 (Transfusion Associated Circulatory Overload; TACO) とともに、重篤な輸血副反応や輸血関連死の主要な原因となっている。TRALI の発症機序として、ドナー血漿中の抗 HLA 抗体や抗 HNA (human neutrophil antigen) 抗体を介した免疫反応による好中球の活性化とそれに続発する肺泡毛細血管内皮の透過性亢進が想定されている。しかしながら典型的な TRALI の臨床像を呈しても特異的な抗 HLA 抗体や抗 HNA 抗体が同定されないケースも多く、また発症リスクをあげる要素として、高齢、喫煙、アルコール過剰摂取、人工呼吸器装着、ICU 入室などの重症患者、敗血症など患者側の要因も関与するなど、その病理学的な背景は複雑で未解明な点が多く残る。また TRALI と TACO は病因が異なるため、その鑑別が重要であるが、輸血後の亜急性の呼吸不全という共通の症状をもつこと、発症における患者素因が共通していること、BNP 以外に有用な診断マーカーが存在しないこと、などの理由により鑑別は容易ではない。抗 HLA 抗体のリスク低減のため男性由来血漿をメインに用いる現在の低減策は有効ではあるが、このような背景から、いったん TRALI を発症した患者には確実な早期診断法や特異的治療法は存在せず、支持療法に終始せざるを得ないのが現状である。

本研究では、輸血副反応のうちとくに病態に未解明な部分の多い輸血関連急性肺傷害 (TRALI) を対象に、その重症化に中心的な役割を果たすことが想定される CTL2/HNA3 を標的とした分子生物学的なアプローチを用いて、病態解明、診断マーカーの開発、あらたな低減策の構築や特異的治療法開発につながる基礎的な知見を得ようと試みるものである。

具体的には、以下の3項目について検討を行う。

- 1) CTL2/HNA3 強制発現系と抗 HNA3 抗体を用いた in vitro TRALI 細胞モデルの構築
- 2) CTL2/HNA3 結合蛋白の検索と CTL2/HNA3 細胞膜コンプレックスの解明
- 3) In vitro TRALI 細胞モデルと患者血清を用いた TRALI 発症時の活性化分子の検索 (診断マーカー・重症化マーカーの開発を目指して)

2. 研究の目的

臨床研究や動物モデルにより CTL2/HNA3 の不適合を原因とする TRALI の重症化・死亡リスクが高いことが知られているが (Storch E Ketal, Blood 2014) その具体的な重症化のメカニズムは不明である。これは従来、TRALI の研究が、臨床研究や抗 HNA 抗体を用いた動物モデルの構築に偏り、特異的標的分子を対象にした基礎的研究がほとんど実施されていないことにも、一因がある。CTL2 (choline transporter like protein2) は HNA3 の構成分子で、Q154R の多型がそれぞれ HNA3a, HNA3b 抗原の原因エピトープを構成する。このうち抗 HNA3a 抗体を原因とする好中球の活性化が重症型の TRALI の原因となることが知られている。CTL2/HNA3 はその名の通りドメイン構造上コリントランスポーターに類似した構造を持つ膜蛋白である。TRALI の原因となる抗 HNA 抗体が結合する HNA の機能として HNA-2a/CD177 が顆粒球の活性化や遊走に強く関与すること、HNA-1 はそもそも免疫グロブリンの Fc 領域分子であり免疫反応に強く関与すること、HNA-2 と HNA-4/CD11B が細胞膜上で signaling complex を形成することなどが知られている。一方、CTL2/HNA3 については、構造予測通りコリントランスポーターとしての機能を持つのかを含め、その機能はほとんど未解明である。そこで CTL2/HNA3 に着目し、その分子間ネットワークや抗体結合時の活性化シグナルについて、分子生物学的手法を用いて明らかにしていくことで、新たな治療標的分子や診断・重症化マーカーを開発するための端緒を得ることが可能と考え、本研究計画を作成した。本研究の結果、TRALI の病態について分子レベルの新たな基礎的知見が得られれば、TRALI の診断・治療のみならず、現在 TRALI 同様に特異的な重症化マーカーや治療法の存在しない SARS-CoV-2 の重症感染例を含め、多様な病因による急性肺傷害 (ALI)・ARDS の治療に、幅広く応用できるものと期待される。

3. 研究の方法

研究全体で明らかにしようとする CTL2/HNA3 の分子間ネットワークのイメージを、図1に示す。

(1) In vitro TRALI 細胞モデルの構築

NIH3T3 や ATDC5 などヒト CTL2/HNA3 を抗原としてもともと発現していないマウス由来の未分化細胞株にレトロウイルス強制発現系で CTL2/HNA3a および CTL2/HNA3b を安定導入、これに抗 HNA3 抗体を作用させる。抗体としては市販の抗 CTL2 抗体のほか、国内外の顆粒球ワークショップのメンバーより供与を受けた抗 HNA3a のモノクローナル抗体・抗血清なども利用する。好中球 / 顆粒球活性化の指標としてミエロペルオキシダーゼ活性の測定を行うほか、顆粒球活性化マーカーである CD11b の発現をフローサイトメトリーで評価する。通常の未分化細胞株でのモデル構築が困難な場合は顆粒球分化能を有するマウス白血病由来細胞株 M1 を用いて同様の検討を行う。

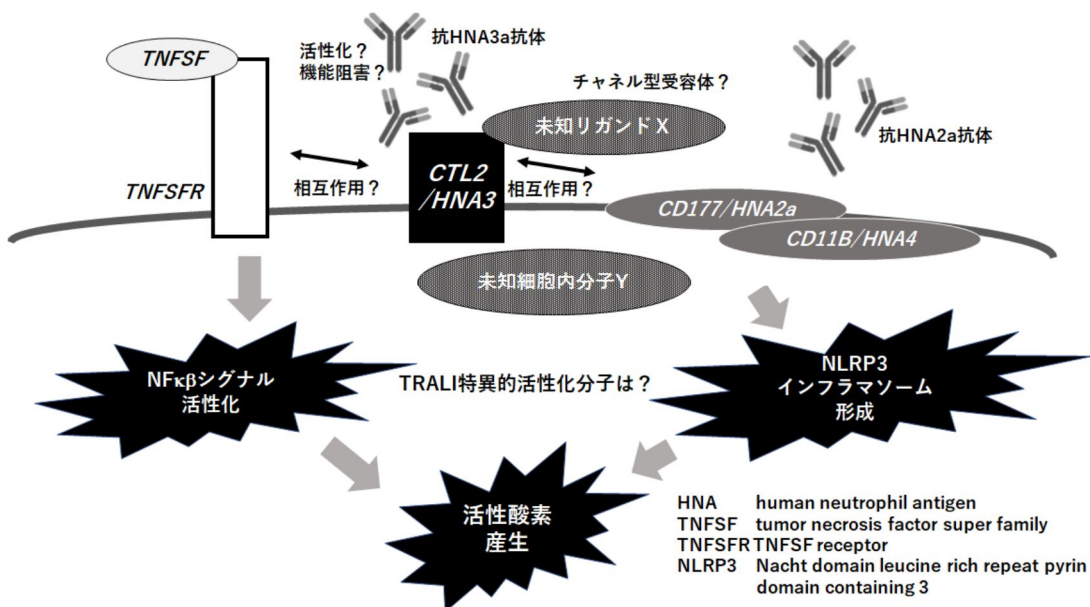
(2) CTL2/HNA3 細胞膜コンプレックスの解明

研究代表者らの事前検討では、293 細胞に CTL2/HNA3 を強制発現すると通常の還元剤を用いた SDS-PAGE/Western blotting 解析では分離しない巨大なコンプレックスを形成することがわかっている。この構成成分を解明する。まず候補分子として CD177/HNA2a、CD11B/HNA4 や炎症にかかわる TNF- α などのシグナル伝達系のリガンド・レセプターである TNFSF (tumor necrosis factor superfamily) / TNFSFR との結合を Co-IP や哺乳類細胞内ツーハイブリッドシステムを用いて検証する。ついで、Halo-tag 付きの CTL2 の強制発現系を作成し 293 細胞や好中球へ分化可能な HL60 細胞株へ一過性に導入し、Halo-tag システムを用いた蛋白の pull-down assay を実施する。得られた沈降蛋白について LC-MS/MS による質量分析を行い pull-down 前の lysate の分析結果と比較して沈降蛋白のリストを得る。リストアップされた蛋白に対する in silico 解析を行い、CTL2 と結合しリガンドとして作用する可能性のある分子や細胞内シグナル伝達系を担う下流分子などの相互作用候補遺伝子を絞り込む。候補遺伝子については強制発現系を作成し、1) で樹立した in vitro TRALI 細胞モデルにおいて抗 HNA3 抗体のかわりに作用させ、機能的に重要な意義を持つか検証を行う。

(3) 活性化シグナル分子の検索

(1) で樹立した in vitro 細胞モデルの活性化前後の細胞溶解液や TRALI を含む輸血副反応患者および健康人ボランティア由来の血漿を用いて、活性化シグナル分子の発現を比較・検討し、TRALI の際に活性化しているシグナル伝達系を検索する。検討する細胞内シグナルのメインターゲットは NF- κ B シグナルと NLRP3 インフラマソームを想定している。スクリーニングは市販の抗体・ELISA kit のほかフローサイトメトリーを応用した蛍光ビーズベースアッセイである Luminex system を用い効率的に検討をすすめる。まず in vitro TRALI 細胞モデルで予備解析を実施し、活性化が確認されたシグナル伝達物質のみ患者・ボランティア由来血清を用いて検討することで、検証に必要なコストと時間を節約することを予定している。最終的に TRALI 患者のみで特異的に活性化されて分子が診断および重症化マーカーの候補となる。

図1. CTL2/HNA3の分子間ネットワーク解明のイメージ



CTL2/HNA3 の Q154R 多型 (HNA3a/b) をもつレトロウイルス発現系では CTL2/HNA3 の発現量が不十分であったことが判明したため、マウス由来の細胞株 ATDC5, NIH3T3 にプラスミド発現系を用いて Q154R 多型 HNA3a/b それぞれの CTL2/HNA3 を強制発現させる高発現クローンの作出に成功した。現在これらに抗 CTL2 抗体を作用させ *in vitro* の TRALI 細胞モデルとしてワークさせるための条件検討を行っているが、市販の抗 CTL2 抗体にはマウスの内在性 CTL2 と交差反応するものが多く、高発現細胞特異的かつ HNA3a 優位にミエロペルオキシダーゼ活性を上昇させる系の確立には、さらなる検証が必要な状況である。

HL60 細胞に C 末端 Halo-tag および Myc-tag 付きの CTL2 発現プラスミドを一過性に導入して発現を確認したが、導入効率が悪く十分な量の CTL2 蛋白を発現させることはできなかった。そこでアデノウイルス発現系を作成し HL60 細胞とヒト末梢血由来多形核細胞(好中球を含む分画)に導入し、十分な量の発現系を作成した。この系であらためて大量調製系の検討を行っている。細胞への発現系の作成に手間取ったため、CTL2/HNA3 の結合蛋白同定のため、並行して酵母を用いたツーハイブリッドシステムによるライブラリースクリーニングを行った。結果として、特異的に結合する蛋白の同定に成功した。現在 CTL2 の機能にどのような影響を与えるのか、作成中の *in vitro* TRALI 細胞モデルを用いて検証中である。

輸血副反応患者の残余血清の収集を継続した。症例数・検体量とも限られるため、症例数の蓄積を待って最終年度に解析に移行する予定であったが、想定していたより、呼吸不全の症例が少なかったことより症例数の蓄積が思うように進まず、解析に少し時間がかかる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 岡崎 仁	4. 巻 51
2. 論文標題 技術講座 輸血 輸血関連急性肺障害/輸血関連循環過負荷の検査	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 検査と技術	6. 最初と最後の頁 4~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1543208868	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 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松岡大介、日野郁生、石野田正純、後藤智哉、岡崎仁、谷慶彦、永井正、澤村佳宏、宮田茂樹、後藤直子
2. 発表標題 新基準におけるTRALI及びTACOの評価結果について
3. 学会等名 第71回日本輸血細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田敏之、寺田類、藤井玲子、小林佳子、岡崎仁
2. 発表標題 その自己血漿製剤は本当に必要ですか？～周術期輸血療法における分離自己血漿の役割についての実態調査～
3. 学会等名 第36回日本自己血輸血・周術期輸血学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡崎仁
2. 発表標題 輸血分野とHLAとのかかわり～輸血副反応を中心に～
3. 学会等名 第31回日本組織適合性学会大会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡崎仁
2. 発表標題 輸血副反応と安全対策
3. 学会等名 第47回日本血液事業学会総会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡崎仁
2. 発表標題 TRALIとTACO
3. 学会等名 第157回日本輸血細胞治療学会関東甲信越支部例会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医学部附属病院 輸血部 ホームページ http://square.umin.ac.jp/traf-ky/ 東京大学医学部附属病院 輸血部 ホームページ http://square.umin.ac.jp/traf-ky/</p>

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	池田 敏之 (ikedataoshiyuki) (80322759)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	三島 由祐子 (mishima yuko) (90815771)	杏林大学・保健学部・講師 (32610)	

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