

令和 6 年 4 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09064

研究課題名(和文)敗血症性DICにおけるマイクロパーティクルの動態およびその病態生理学的役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the dynamics and pathophysiological role of microparticles in septic DIC

研究代表者

齋藤 浩二 (Saito, Koji)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10359515

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)：COVID-19関連凝固障害の診断・評価マーカーの確立のために他施設前向き研究を行い、COVID-19患者血漿中のマイクロパーティクルを測定した。凝固障害(D-ダイマー $1 \mu\text{g/mL}$)群ではCD41+MPsが健常ボランティアよりも上昇しており、またCD41+MPsはトロンビン生成能と弱い相関を認めた。敗血症患者のMPsを評価したところ、敗血症性DIC患者ではCD62P+MPsとCD14+MPsが上昇しており、敗血症性DICの発症に血小板活性化と単球が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19関連凝固障害や敗血症性播種性血管内凝固症候群(DIC)は、様々な因子が関与する複雑な病態を呈するが、病態を反映するマーカーが確立されていない。本課題では、COVID-19関連凝固障害では血小板由来のCD41+microparticles(MPs)が、敗血症性DICでは活性化血小板由来のCD62P+MPsと探求由来のCD14+MPsが上昇していることを報告した。細胞外小胞がこれらのあらたな病態マーカーとなりえることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To establish a diagnostic and evaluation marker for COVID-19-related coagulation disorders, we conducted a multi-center prospective study and measured microparticles in the plasma of COVID-19 patients. CD41+MPs were elevated in the coagulopathy (D-dimer $1 \mu\text{g/mL}$) group compared to healthy volunteers, and CD41+MPs was weakly correlated with thrombin generation capacity. Evaluation of circulating microparticles in septic patients showed that CD62P+MPs and CD14+MPs were significantly elevated in patients with septic DIC compared that without DIC, suggesting the involvement of platelet activation and monocytes in the development of septic DIC.

研究分野：集中治療

キーワード：細胞外小胞 マイクロパーティクル 敗血症 播種性血管内凝固症候群 COVID-19

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation: DIC)の原疾患として最も多い疾患であり、DICの合併は臓器障害の原因となる。敗血症性DICは複雑な病態を呈しており、血管内皮や血小板、炎症担当細胞が互いに関与しながら、凝固亢進・線溶抑制を促進させて微小血栓形成に進んでいくが、その病態を臨床的に把握できるマーカーはない。

COVID-19は感染力と重症度から社会問題に発展し、重症患者の治療戦略確立が急務である。特に血栓塞栓症はCOVID-19感染症の死亡との高い因果関係が指摘されており、その機序解明・病態マーカー確立が望まれる。われわれはこれらの重症病態における凝固障害の重症度評価の確立および病態解明のために microparticles (MPs) に着目した。

マイクロパーティクル(microparticles:MPs)は、細胞が傷害、活性化、apoptosisの際に細胞膜から放出される膜小泡であり、細胞傷害性マーカーとしても用いられる。本課題では、敗血症性DICおよびCOVID-19感染における凝固能障害の進展に関する内皮細胞、血小板、炎症担当細胞由来の各種MPsを同時に測定することで、敗血症性DICおよびCOVID-19感染における凝固能障害の複雑な病態を把握できるのではないかと仮説を立てた(図1)。

MPsは細胞間伝達にも関与すると考えられており、特に炎症・凝固促進反応はMPsの生理的作用としてよく知られている。MPsに含まれる細胞膜のリン脂質成分である phosphatidylserine (PS)は強力な凝固活性を有する。また、敗血症では炎症反応により放出されたMPsが血中を微量に循環する組織因子(tissue factor:TF)に結合し、凝固系が活性化される。このようにMPsは

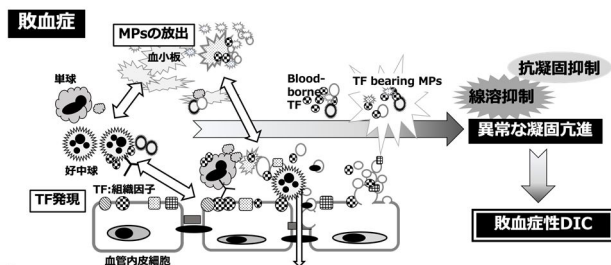


図1. 敗血症では血管内皮、血小板、炎症担当細胞が傷害・活性化され、組織因子の発現・MPsの放出などを介して、互いに相互関与しながら凝固活性を亢進させ、敗血症性DICに至る

敗血症性DICおよびCOVID-19感染における凝固能障害の病態形成に関与していることが示唆されており、MPsの動態や生理学的役割の解明は、病態マーカーの構築のみならず、敗血症性DICおよびCOVID-19感染における凝固能障害のさらなる病態解明・新規治療戦略の開発につながると期待できる。

2. 研究の目的

本課題の目的は、敗血症性DICおよびCOVID-19感染による凝固能障害における各種細胞由来MPsの動態を解明し、細胞外小泡に着目した新たな病態マーカーを開発することである。

3. 研究の方法

(1) 敗血症性DIC患者におけるMPsの動態の解明

敗血症性DIC患者のMPsの動態を検証するために、敗血症患者を対象に前向き観察研究を行なった。これは東北大学大学院医学系研究科の倫理委員会の承認を得て行なっている(2020-1-660)。対象は東北大学病院集中治療部へ入院加療が必要な敗血症患者であり、敗血症および敗血症性ショックの診断はSepsis-3に則って集中治療医が診断した。DICの有無によりDIC群、非DIC群の2群に分け、各種MPsを検証する。DICの診断は日本救急医学会急性期DIC診断基準(急性期基準)によって診断した。対象敗血症患者はICU入室時、第3日目、第7日目に末梢血採血を行い、血漿(platelet free plasma: PFP)を精製し、フローサイトメーターBDLSRFortessa (Becton Dickinson and Company)を用いてPFP中のMPsを測定した。

本研究では、PFP 中に含まれる直径 100-1000 nm のサイズで、細胞膜のリン脂質である PS を発現している小胞を MPs と定義した。内皮細胞由来 MPs は CD31⁺CD41⁺MPs(PECAM⁺ EMPs) および CD62E⁺MPs(CD62E⁺ EMPs)、血小板由来 MPs は CD41⁺MPs(CD41⁺ PMPs), CD62P⁺MPs(CD62P⁺ PMPs)、好中球由来 MPs を CD16b⁺MPs(NMPs), 単球由来 MPs を CD14⁺MPs(MMPs)と定義した。さらに組織因子 (tissue factor: TF) と結合した MP (TF bearing MPs) は CD143⁺ MPs(TF⁺ MPs)と定義した。

(2)COVID-19 患者の各種 MPs の動態の解明

COVID-19 患者の凝固障害における MPs の動態を検証するために、健常人、COVID-19 患者を対象に他施設前向き研究を行った。本研究は、東北大学医学部施設審査委員会および倫理委員会の承認を得た (2020-1-660) 本研究は東北大学病院、研究協力施設 (済生会宇都宮病院、札幌医科大学附属病院、湘南鎌倉総合病院) の合計 4 つの三次医療病院でおこなった。対象患者は 20 歳以上の酸素投与を必要とする中等度以上の COVID-19 患者で、COVID-19 の確定診断はポリメラーゼ連鎖反応、抗原検査またはループ媒介等温増幅法のいずれかにて陽性と定義した。COVID-19 患者は、血漿 D-dimer 1 μ g/mL 未満の非凝固障害群と D-dimer 1 μ g/mL 以上の凝固障害群に振り分けられた。健常ボランティアは、20 歳以上で COVID-19 感染歴のない男女 5 名ずつを東北大学病院で募集し組み入れた。

COVID-19 患者は、入院後 72 時間以内、第 5~7 病日、第 12~14 病日に全血採血を行い、PFP を精製した。検体確保は東北大学病院を含む 4 施設で行い、各研究協力施設からの検体は冷凍保存の後、専門の輸送業者により東北大学大学院医学系研究科災害感染症分野教室の BSL3 の研究室に集合させ、解析まで冷凍保存した。研究当時、COVID-19 患者の検体使用に関する東北大学の規則に則り、MPs 解析前に COVID-19 患者の PFP をパラホルムアルデヒド (PFA) によるウイルス不活化処置を行った。不活化処置後に PFA による蛍光の影響を排除するために、洗浄を行い、20,000 g での 45 分の遠心を行い MPs を沈降させて回収した。沈降させた MPs を再懸濁し、MPs 懸濁液中の MPs の測定をおこなった。この研究における MPs の定義および測定した各種細胞由来 MPs は(1)と同様である。

この研究では 100 名の COVID-19 患者を用いて、凝固障害群、非凝固障害群間で解析を行う予定であったが、COVID-19 における凝固能障害の MPs に関しては先行研究が存在せず、COVID-19 患者 10 名と健常ボランティア 10 名で中間解析を行った。

(3)COVID-19 患者血漿の内因性トロンビン生成能

COVID-19 患者 PFP の内因性トロンビン生成能 (Endogenous thrombin potential:ETP) を Calibrated automated thrombography (CAT, フィンガルリンク社)を用いて測定した。健常ボランティア、非凝固障害群、凝固障害群間で ETP を比較検討し、MPs との相関関係も検証した。

(4)統計解析

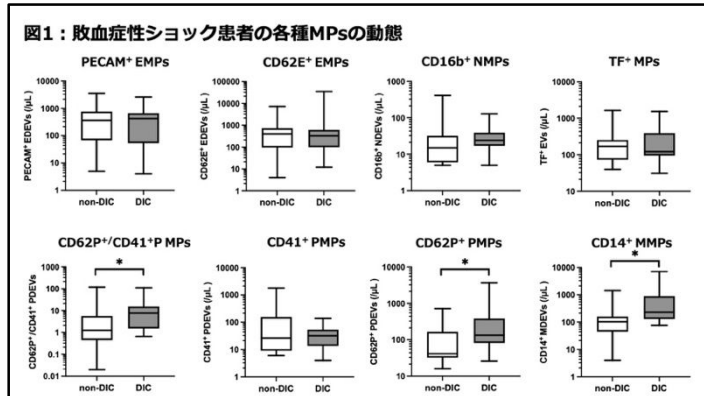
非正規分布の連続データの解析にはマン・ホイットニー U 検定を用いた。カテゴリー変数は、Fisher の正確検定を用いて評価した。(1)の非 DIC 群と DIC 群間の比較、(2)の COVID-19 の凝固障害群と非凝固障害群間の比較にはマン・ホイットニー U 検定にて行った。二群比較においては両側検定で p 値 < 0.05 を有意とした。(2)の健康ボランティア群、COVID-19 凝固症群、COVID-19 非凝固症群での 3 群比較は追加解析として施行した。まずは Kruskal-Wallis 検定を行い、 $p < 0.05$ で有意差があるものに関して追加の比較を施行した。この際 Bonferroni 補正を用いて有意水準は p 値 < 0.017 と設定することで、多重検定を補正しながらどの 2 群間で MPs 産生量に有意差が

あるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 敗血症性 DIC 群では、CD62P⁺PMPs, MMPs が上昇する。

2021 年 12 月から 2023 年 12 月まで 41 名の敗血症患者が登録され、うち 19 名は非 DIC 群、22 名が DIC 群に振り分けられた。非 DIC 群では 9 名(47%)が、DIC 群では 19 名(86%)が敗血症性ショックを呈していた。入院時の各種 MPs を比較検討すると、血小板マーカである CD41 を発現する CD41⁺ PMPs は両群間で有意差はなかったが、活性化血小板マーカである CD62P を発現する血小板由来 MPs(CD62P⁺ PMPs) は非 DIC 群に比較し、DIC 群で有意に増加していた ($p = 0.009$)。活性化血小板由来 MPs と非活性化血小板由来 MPs の非である CD62P⁺ PMPs/CD41⁺ PMPs も DIC 群で



有意に上昇していた($p = 0.013$)。また単球由来の CD14⁺ MMPs も DIC 群で有意に増加していた($p = 0.013$)。TF⁺ MPs および内皮由来 MPs や好中球由来 MPs は両群間で有意差はなかった(図.1)。敗血症性 DIC の初期には、血小板および単球の活性化が関与していることが示唆される。

(2) 凝固障害を呈する COVID-19 患者では CD41⁺ PMPs が上昇する

2020 年 11 月から 2021 年 4 月の間で、計 110 名の COVID-19 患者が組み入れ基準を満たした。うち 10 名の患者から家族は研究同意が得られなかったため、100 名の患者を対象とした。1 名の患者の D dimer の値が欠損していたため、最終的には 99 名の患者(非凝固障害群は 51 人、凝固障害群は 48 人)解析を行った。同じ研究期間中に、10 名の健常ボランティアも組み入れされた。非凝固障害群では、酸素吸入療法を必要としない患者が 70%を占め、凝固障害群では酸素投与のみならず、人工呼吸管理、ECMO を必要とする患者が多く、凝固障害群では重症度が高かった。

まず、健常ボランティア群(10 名)と COVID-19 凝固障害群(10 名)の比較を行った。CD41⁺ PMPs (184.33 counts/ μ L [IQR: 150.12-254.06] vs 1079.85 counts/ μ L [IQR: 957.35-4030.22], p 値 = 0.002) と CD14⁺ MMPs(116.61 counts/ μ L [IQR: 71.39-241.40] vs 268.65 counts/ μ L [IQR: 192.45-643.05], p 値 = 0.034), TF-bearing MPs(TF-bearing EV(44.29 counts/ μ L [IQR: 36.18-72.99] vs 112.72 counts/ μ L [IQR: 63.88-160.96] , p 値 = 0.008) は統計的に有意に COVID-19 凝固障害群で上昇していた(表 1)。

表1. 健常ボランティアとCOVID-19凝固障害群の各種MPsの比較

	健常ボランティア群 (n = 10)	凝固障害群 (n = 10)	p 値
CD31 ⁺ CD41 ⁺ MPs	123.32 [62.38-178.71]	162.90 [103.97-223.73]	0.226
CD31 ⁺ CD41 ⁺ CD142 ⁺ MPs	3.52 [0.00-7.25]	0.00 [0.00-6.90]	0.62
CD31 ⁺ MPs	184.33 [150.12-254.06]	1079.85 [957.35-4030.22]	0.002
CD41 ⁺ CD142 ⁺ MPs	11.92 [6.31-21.60]	16.25 [8.40-31.15]	0.405
CD62P ⁺ MPs	203.23 [157.48-349.14]	470.60 [184.40-695.50]	0.199
CD62P ⁺ CD142 ⁺ MPs	24.81 [20.73-58.17]	32.85 [19.83-81.17]	0.571
CD16b ⁺ CD142 ⁺ MPs	45.90 [26.05-141.44]	92.20 [45.65-360.20]	0.199
CD62E ⁺ MPs	10.94 [0.00-49.18]	12.00 [6.68-32.73]	0.818
CD62E ⁺ CD142 ⁺ MPs	193.36 [116.00-271.04]	327.75 [292.97-641.45]	0.082
CD14 ⁺ MPs	28.47 [23.11-36.33]	41.10 [27.00-181.72]	0.257
CD14 ⁺ CD142 ⁺ MPs	116.61 [71.39-241.40]	268.65 [192.45-643.05]	0.034
CD142 ⁺ MPs	35.70 [21.28-42.40]	60.95 [20.70-102.80]	0.384

counts/ μ L of plasma, 中央値 [IQR]

表2. COVID-19非凝固障害群と凝固障害群の各種MPsの比較

	非凝固障害 (n = 51)	凝固障害群 (n = 48)	p 値
CD31 ⁺ CD41 ⁺ MPs	72.60 [28.45-123.80]	62.00 [13.88-103.97]	0.37
CD31 ⁺ CD41 ⁺ CD142 ⁺ MPs	0.00 [0.00-0.00]	0.00 [0.00-0.00]	0.617
CD31 ⁺ MPs	419.80 [152.70-949.85]	549.90 [255.05-984.65]	0.433
CD41 ⁺ CD142 ⁺ MPs	6.40 [0.00-21.40]	5.90 [0.00-28.00]	0.833
CD62P ⁺ MPs	252.40 [152.30-346.60]	197.90 [144.05-333.92]	0.519
CD62P ⁺ CD142 ⁺ MPs	18.40 [7.30-31.20]	16.70 [5.88-35.35]	0.602
CD16b ⁺ CD142 ⁺ MPs	133.20 [64.90-243.30]	115.05 [52.25-274.88]	0.889
CD62E ⁺ MPs	6.80 [0.00-17.10]	7.35 [5.42-20.08]	0.159
CD62E ⁺ CD142 ⁺ MPs	223.80 [125.60-565.80]	203.35 [77.28-515.45]	0.421
CD14 ⁺ MPs	73.10 [21.40-147.50]	43.85 [24.02-150.62]	0.609
CD14 ⁺ CD142 ⁺ MPs	234.20 [88.35-373.00]	186.35 [110.15-319.28]	0.642
CD142 ⁺ MPs	72.60 [28.45-123.80]	62.00 [13.88-103.97]	0.37

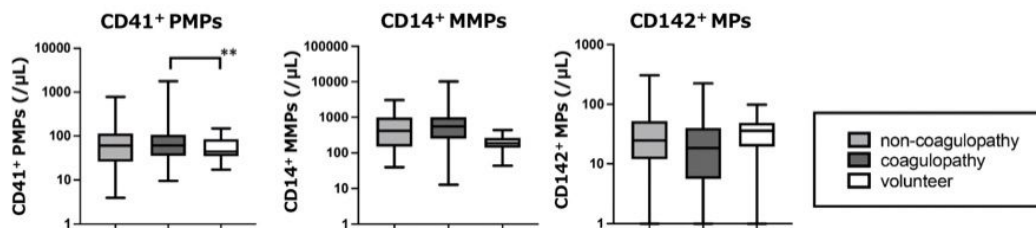
counts/ μ L of plasma, 中央値 [IQR]

表 2 に COVID-19 非凝固障害群と凝固障害群の MPs 測定量を示す。凝固障害群では非凝固障害群に比べ、CD41⁺ MPs 数の上昇している患者の割合が高かったが、両群間で CD41⁺ MPs 数に統

計学的な有意差は認められなかった (CD41⁺EVs 419.80 counts/ μ L [IQR: 152.70-949.85] vs 549.90 counts/ μ L [255.05-984.65], p 値 = 0.433)。

健常ボランティア群、COVID-19 非凝固障害群、COVID-19 凝固障害群の 3 群間で、予備実験において有意に上昇の認められた 3 種の MPs に関し、Kruskal-allis 検定を行った。血中 CD41⁺ MPs 値のみに 3 群間に有意差があり、各群でボンフェローニ補正を行い比較を行った。健常ボランティア群と非凝固群間 ($p = 0.114$)、非凝固群と凝固群間で有意差は認められなかった ($p = 1$) が、健常ボランティア群と凝固能障害群で有意差を認めた ($p = 0.014$) (図 2)。

図 2 : 健常ボランティア、COVID-19非凝固群、COVID-19凝固群の3群比較



(3) 凝固障害を有する COVID-19 患者ではトロンビン生成能が上昇する

対象患者のうち、ETP を測定できた患者は、健常者ボランティア群 9 名、非凝固障害群 43 名、凝固障害群 29 名であった。各群の ETP 値は、健常ボランティア群で 1315.82 nMmin (IQR: 986.78 - 1390.04)、非凝固障害群で 1515.55 nMmin (IQR: 1266.20 - 1658.14)、凝固障害群で 1561.92 nMmin (IQR: 1041.24, 1719.56)であった。Kruskal-Wallis 検定において、健常者群と非凝固障害群で有意にトロンビン産生量に差があり ($p = 0.038$)、健常者群と凝固障害群では産生量の差は認められたが統計学的有意差は見いだせなかった ($p = 0.059$)。ETP と CD41⁺ MPs には、相関係数 0.31 ($p < 0.01$) と弱いものの正の相関を認めた。

マイクロパーティクルを含む細胞外小胞は、敗血症性 DIC および COVID-19 感染による凝固能障害の病態マーカーになりうることを示された。今後、これらの細胞外小胞の生理学的作用について検証を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yudai Iwasaki, Yusuke Takei, Mitsuhiro Yamada, Shigekazu Sugino, Koji Saito, Tetsuji Aoyagi, Kengo Oshima, Hajime Kanamori, Hiroaki Baba, Kentarou Takei, Koichi Tokuda, Eichi N. Kodama, Tetsuro Kamo, Tadashi Kamio, Takehiko Kasai, Satoru Ogawa, Masanori Yamauchi.	4. 巻 12
2. 論文標題 Circulating Extracellular Vesicle Levels in Patients with Coronavirus Disease 2019 Coagulopathy: A Prospective Cohort Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm12103460.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武井 祐介、岩崎 夢大、紺野 大輔、入間田 大介、関根 智宏、齋藤 秀悠、杉野 繁一、山内 正憲
2. 発表標題 細胞外小胞に着目した人工呼吸関連肺傷害の内皮傷害マーカーの探索
3. 学会等名 第50回 日本集中治療医学会 学術集会
4. 発表年 2023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
研究分担者	山田 充啓 (Yamada Mitsuhiro) (00396483)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	武井 祐介 (Takei Yusuke) (80822890)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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
---------	---------