

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590694

研究課題名(和文)血管内皮細胞由来マイクロパーティクルによるDIC病態早期診断法の研究

研究課題名(英文)New method of evaluation and diagnosis for DIC using endothelial cell-derived microparticles

研究代表者

野村 昌作(NOMURA, Shosaku)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20218358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロパーティクル(MP)による樹状細胞(DC)活性化能を検討した。トロンビン・レセプター刺激ペプチド(TRAP)で刺激した血小板は、DC亜群の成熟活性化度合いを示す各種マーカーの発現を増強した。またこれらの増強の程度は、MPの追加によってさらに顕著であった。次に、造血器腫瘍に合併したDIC患者を対象に、HMGB1とサイトカイン・ケモカイン・血管内皮由来MP(EDMP)を測定したところ、それぞれに有意な相関関係がみられた。さらにrTM療法により、HMGB1とEDMPの有意な改善が観察された。DIC早期診断法として、HMGB1とEDMPの測定は重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found that, although TRAP-stimulated platelets could induce up-regulation of some molecules such as CD40, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR to some extent, the addition of MPs further increased this expression compared with expression induced by TRAP-stimulated platelets. In addition, the enhancement of expression of these molecules in response to TRAP-stimulated platelets or MPs was completely inhibited by anti-CD154 antibody. For DIC patients with hematologic malignancy, univariate analysis showed that PT, fibrinogen, CRP, PDMP, EDMP, sCD40L, IL-6, TNF-alpha, RANTES and MCP-1 were significantly associated with HMGB1. DIC patients exhibited significant decrease in HMGB1 levels after rTM therapy. In addition, the levels of platelet activation markers and cytokines were significantly decreased after rTM therapy in DIC patients. Our findings indicate the role of EDMP and HMGB1 in DIC patients with hematologic malignancy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：血管内皮細胞由来マイクロパーティクル HMGB1 リコンビナントトロンボモジュリン SIRS DIC 造血器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

手術や生体の組織障害あるいは感染症などの際には、主として TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  等の炎症性サイトカインが産生され、これにより SIRS の状態が引き起こされる。炎症性サイトカインは、また単球・マクロファージ、好中球、血管内皮細胞に組織因子の発現を誘導しながら、トロンピンを生成する。生成されたトロンピンは、各種細胞に存在するトロンピン受容体(PAR-1)を活性化し、細胞からの MP 生成を誘導する。やがてこれらは、凝固線溶系の異常を増幅しながら DIC の状態へと進んでいく。このように、過剰な炎症性サイトカインの生成は、MP に依存した過剰凝固の危険性を秘めている。また、高サイトカイン血症を伴った SIRS において、過剰免疫反応や組織障害の原因として最近最も注目されている物質が high mobility group box 1 protein (HMGB1) である。HMGB1 は核内に豊富に含まれるタンパク質であり、核内で DNA と結合して NF- $\kappa$ B など様々な転写因子の活性を間接的に調節しているが、細胞が壊死に陥ると細胞外に放出され炎症反応を促進するという新たな役割を果たすことになる。したがって、HMGB1 もまた MP を誘導する可能性があるが、これらがどのようなプロセスを経ておこるのかほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

播種性血管内凝固(DIC) は、従来の血栓・出血傾向の概念から、最近では、全身性炎症反応(SIRS)に関連する広範な疾患概念へと変わりつつある。DIC はできるだけ早期に治療すべきであるが、残念ながら有効な早期診断法は未だ確立されていない。我々は、細胞が活性化された際に生成されるマイクロパーティクル (MP) とよばれる凝固促進物質の構造と機能についてこれまでに明らかにしてきた。本研究では、主に血管内皮細胞から生成される数種類の MP の機能を多角的に解析することにより、DIC 初期における炎症から凝固系の異常に至る分子メカニズムを明らかにし、MP を主軸とした新しい DIC 早期診断法の確立を目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) EDMP の構造上の特徴解析: 内皮細胞上の抗原に対するモノクローナル抗体を使用し、FACS で解析する。

(2) DIC における EDMP の標的細胞の研究: TF・TM・APC を個々に発現した EDMP を作成し、標的細胞のシグナリングを解析する。標的細胞は、正常単球、単球

系細胞株、血管内皮細胞を用いる。細胞表面接着分子の発現と各種キナーゼの活性を測定する。アポトーシス誘導後の Caspase-rich の EDMP を FACS にて解析する。

(3) EDMP に DC の免疫誘導に関する研究: 純化した 2 種類の人 DC 亜群と EDMP を組み合わせ、それぞれを培養する。刺激活性化物質を加えた後に DC 表面マーカー、活性化シグナル分子および誘導サイトカインについての解析を行う

(4) DIC 患者におけるマーカー測定と DIC 治療薬の影響: DIC 症例における EDMP、HMGB1、炎症性サイトカイン、可溶性接着分子の測定および rTM 療法の影響について検討する。

4. 研究成果

(1) MP の構造的特徴

3 種類の MP の構造的特徴としては、PDMP が血小板膜糖蛋白の代表である GPIIb/IIIa と P セレクチンを強く発現していたが、組織因子(TF)の発現は軽度であった。一方、MDMP と EDMP は、健常人血清中の検出率は、PDMP の 30~50 分の 1 以下であったが、いずれの MP も TF の発現は高度であった。この結果より、それぞれの細胞に由来する MP が異なった作用を有していることが示唆された(図 1)。

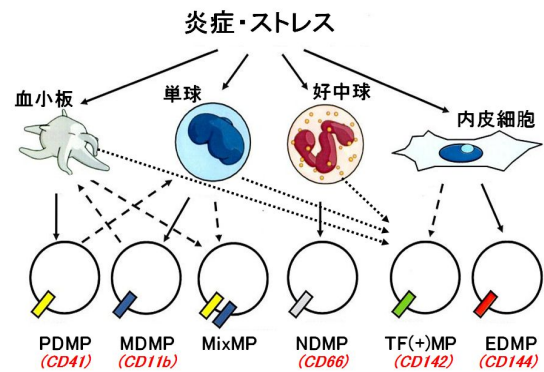


図 1 各種細胞由来の MP の組成の違い

(2) DC による炎症関連の免疫誘導効果

TRAP で刺激した血小板は、DC 亜群の成熟活性化度合いを示す CD40、CD80、CD86、CD83、HLA-DR の発現を増強した。またこれらの増強の程度は、PDMP の追加によってさらに顕著であった。一方、TRAP 刺激に先行して、抗 CD154 抗体を加えておくと、CD40、CD80、CD86、CD83、HLA-DR のいずれの発現も明確に抑制さ

れた(表 1)。これらの反応結果は、同時に測定した上清中の各種サイトカイン量と有意な相関結果が認められた。

表 1 MP による樹状細胞の活性化

	pDC			mDC		
	+Plt	+Act Plt	+ PDMP	+Plt	+Act Plt	+ PDMP
CD40	NC	↑	↑↑	NC	↑	↑↑
CD80	NC	↑	↑↑	NC	↑	↑↑
CD83	NC	↑	↑↑	NC	↑	↑↑
CD86	NC	↑	↑↑	NC	↑	↑↑
HLA-DR	NC	↑	↑↑	NC	↑	↑↑

pDC: plasmacytoid dendritic cell mDC: myeloid dendritic cell  
Plt: unstimulated platelets Act Plt: TRAP-activated platelets  
PDMP: platelet-derived microparticles  
NC: no change ↑: enhancement (10-30%) ↑↑: enhancement (> 31%)

また、活性化シグナル分子の実験結果からは、血小板および PDMP で刺激された pDC において、炎症関連の免疫誘導効果が確認された。

これまでの報告では、T 細胞に由来する CD154 分子が、生体における付加的な免疫機構の変調を誘導させることが示されている。例えば、CD4 陽性の T リンパ球に依存した B リンパ球の活性化は、数種類の costimulating tract の関与が指摘されているが、その中でも特に CD154 に依存した部分が最も重要であることが報告されている。しかしながら、これまで血小板に関連した CD154 依存性の免疫調整メカニズムに関する検討はほとんど行われておらず、唯一 Sprague らの報告(Blood, 2008)があるのみである。彼らは、PDMP に由来する CD154 が T リンパ球および B リンパ球の活性化に寄与していることを示しているが、今回の我々の検討のように pDC の活性化メカニズムについての検討は行われていない。多くの免疫の分野において CD154 の重要性が指摘されているが、血小板と DC 機能との関連はこれまでほとんど検討されていなかった。今回の検討で、我々は血小板および PDMP が DC 機能の発現に大きく関わっていることをみだし、特に PDMP の効果が活性化血小板よりもより強度であった点は、極めて興味深い結果であると思われる。

### (3) EDMP と DIC 早期診断法

造血管腫瘍に合併した DIC 患者 38 例を対象とした臨床研究を実施した。内訳は、非急性白血病症例 27 例および急性白血病症例 11 例である。血小板数・C-反応性蛋白 (CRP)はいずれの群においてもリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)治療後に有意な改善がみられたが、特に CRP は非急性白血病症群において顕著であった。プロトロンビン時間 (PT)・活性化部分トロン

ボラスチン時間 (APTT)も治療後に有意に改善したものの、両群の間で相違はみられなかった。一方、フィブリノゲンは、非急性白血病症群では治療後に低下したのに対し、急性白血病症群では治療後に上昇傾向を示した。しかしいずれの群も、治療後にフィブリノゲンはほぼ正常範囲内に回復した。またフィブリノゲン・フィブリン分解産物 (FDP)・D-dimer およびアンチトロンビン III (ATIII)に関して、いずれの群も治療後に有意な改善が認められた。血小板数の改善に関しては、rTM 投与前に比べて投与後に血小板数が 1 万以上増加した症例が、非急性白血病症群では 27 例中 12 例、急性白血病症群では 11 例中 9 例で、両群を平均すると 55.3%であった。一方、出血症状に関しては、非急性白血病症群では 12 例中 7 例、急性白血病症群では 9 例中 6 例であり、両群を平均すると 71.4%であった。さらに、これら造血管腫瘍患者を対象に、HMGB1 とサイトカイン・ケモカイン・EDMP を測定したところ、これらの測定値に有意な相関関係がみられ、造血管腫瘍 DIC においては、HMGB1 と EDMP が重要な役割を果たしていると考えられた(表 2)。

表 2 HMGB1 と各種因子との相関性

Analysis	Univariate		Multivariate	
	β	p value	β	p value
Age (years)	0.0533	0.21824		
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	-0.0395	0.25213		
WBC ( $\mu\text{l}$ )	-0.0240	0.30808		
PT (%)	-0.1125	0.04915*	-0.0784	0.34423
APTT (sec)	0.0037	0.74391		
Fbg (mg/dl)	0.4396	0.00014*	0.3251	0.00251*
FDP (mg/dl)	-0.0654	0.23196		
D-dimer (mg/dl)	-0.0356	0.37801		
ATIII (mg/dl)	-0.0034	0.78381		
LDH (mg/dl)	0.1702	0.31774		
CRP (mg/dl)	0.6506	<0.00001*	0.4366	0.00007*
PDMP (U/ml)	0.3971	0.00049*	0.2182	0.00892*
sCD40L (ng/ml)	0.4826	0.00004*	0.3378	0.00076*
IL-6 (pg/ml)	0.4071	<0.00001*	0.4781	0.00005*
TNFα (pg/ml)	0.4303	0.00019*	0.3145	0.00354*
RANTES (ng/ml)	0.3896	0.00062*	0.2813	0.00976*
MCP-1 (pg/ml)	0.2295	0.03615*	0.1588	0.18773

また rTM 療法により、HMGB1 を含めサイトカイン・ケモカイン・EDMP の有意な改善が観察された。以上より、本研究テーマの最終目標である DIC 早期診断法として、HMGB1 と EDMP の測定が極めて重要であるという結論に至った。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 8 件)

Makoto Ogata, Tomoki Ito, Keiko Shimamoto, Takahisa Nakanishi, Naoko Satsutani, Rie Miyamoto, Shosaku Nomura, Plasmacytoid

dendritic cells have a cytokine-producing capacity to enhance ICOS ligand-mediated IL-10 production during T-cell priming, *International Immunology*, vol.25, no.3, 2013, 171-182,

doi: 10.1093/intimm/dxs103

Keiko Shimamoto, Tomoki Ito, Yoshio Ozaki, Hideki Amuro, Akihiro Tanaka, Tohru Nishizawa, Yonsu Son, Muneo Inaba, Shosaku Nomura, Serum interleukin 6 before and after therapy with tocilizumab is a principal biomarker in patients with rheumatoid arthritis, *The Journal of Rheumatology*, vol.40, no.7, 2013, 1074-1081.

doi: 10.3899/jrheum.121389.

Hidekazu Moriya, Shuzo Kobayashi, Takayasu Ohtake, Daimu Tutumi, Yasuhiro Mochida, Kunihiro Ishioka, Machiko Oka, Kyoko Maesato, Sumi Hidaka, Shosaku Nomura, Aliskiren, a direct rennin inhibitor, improves vascular endothelial function in patients on hemodialysis independent of antihypertensive effect-a pilot study-, *Kidney & Blood Pressure Research*, vol.37, no.2-3, 2013, 190-198.

doi: 10.1159/000350144.

Shinya Fujita, Takahisa Nakanishi, Hideaki Yoshimura, Masaaki Hotta, Naoto Nakamichi, Tekeshi Tamaki, Kazuyoshi Ishii, Tomoki Ito, Shosaku Nomura, TGF $\beta$ 1 and sCTLA-4 levels are increased in thrombopag-exposed patients with ITP, *Thrombosis Research*, vol.130, no.3, 2012, 415-419.

doi: 10.1016/j.thromres.2012.06.002.

Shosaku Nomura, Takehito Taniura, Akira Shouzu, Seitarou Omoto, Norihito Inami, Shinya Fujita, Takeshi Tamaki, Takashi Yokoi, Toshiki Shimizu, Tomoki Ito, Effects of pitavastatin on plasminogen activator inhibitor-1 in hyperlipidemic patients, *International Journal of General Medicine*, vol.2012.:5, 2012, 535-540.

doi: 10.2147/UGM.S31346.

Shosaku Nomura, Shinya Fujita, Takahisa Nakanishi, Takashi Yokoi, Keiko Shimamoto, Rie Miyamoto, Tomoki Ito, Platelet-derived microparticles cause CD154-dependent activation of dendritic cells, *Platelets*, vol.23, no.1, 2012, 81-82.

doi: 10.3109/09537104.2011.595850.

Shosaku Nomura, Seitarou Omoto,

Takashi Yokoi, Shinya Fujita, Ryotaro Ozasa, Noritaka Eguchi, Akira Shouzu, Effects of miglitol in platelet-derived microparticle, adiponectin, and selectin level in patients with type 2 diabetes mellitus, *International Journal of General Medicine*, vol.2011.:4, 2011, 539-545.

doi: 10.2147/UGM.S22115.

Shosaku Nomura, Shinya Fujita, Ryotaro Ozasa, Takahisa Nakanishi, Michihiko Miyaji, Shinichiro Mori, Tomoki Ito, Kazuyoshi Ishii, The correlation between platelet activation markers and HMGB1 in patients with disseminated intravascular coagulation and hematologic malignancy, *Platelets*, vol.22, no.5, 2011, 396-397.

doi: 10.3109/09537104.2011.553970.

〔学会発表〕(計3件)

1) Kazuyoshi Ishii, Shosaku Nomura, Shinya Fujita, Tomoki Ito, Effects of recombinant thrombomodulin for cytokines, chemokines and soluble molecules after allogeneic stem cell transplantation, 第75回日本血液学会学術総会, 2013年10月11日、ロイトン札幌(札幌市)

2) 石井一慶, 魚嶋伸彦, 前田裕弘, 堀田雅章, 吉村英晃, 藤田真也, 中道尚人, 宮地理彦, 伊藤量基, 桂田達也, 浦瀬文明, 林邦雄, 野村昌作, 慢性骨髄性白血病患者におけるサイトカイン・ケモカイン・可溶性分子・止血凝固系マーカーの評価, 第74回日本血液学会学術集会, 2012年10月19日、国立京都国際会館(京都市左京区)

3) Takahisa Nakanishi, Ryotaro Ozasa, Masaaki Hotta, Shinya Fujita, Naoto Nakamichi, Michihiko Miyaji, Shinichiro Mori, Tomoki Ito, Kazuyoshi Ishii, Shosaku Nomura, Preventive effects of recombinant thrombomodulin for veno-occlusive disease after allogeneic stem cell transplantation, 第73回日本血液学会学術集会, 2011年10月14日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計4件)

1) Shosaku Nomura, et al, Nova Science Publishers, Inc. New York, ADIPONECTIN, Effects of losartan/hydrochlorothiazins on adiponectin and angiopathy-related markers in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus, 2012, pp.121-132.

2) Yoshio Ozaki, Shosaku Nomura, Nova Science Publishers, Inc. New York, LUPUS, APRV (airway pressure-release ventilation)

as supportive management for diffuse alveolar hemorrhage with systemic lupus erythematosus, 2012, pp.197-203.

- 3) Shosaku Nomura, et al, Nova Science Publishers, Inc. New York, Cell Transplant., New therapeutic strategy for veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation, 2012, pp.105-117.
- 4) Norihito Inami, Shosaku Nomura, et al, Nova Science Publishers, Inc. New York, Cor Art Dis Cardiac Arr Bypass Surg, Significance of CD142-positive cell-derived microparticles after percutaneous coronary intervention in patients with coronary artery disease, 2012, pp.261-270.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

## 6 . 研究組織

- (1)研究代表者 野村 昌作  
( NOMURA , Shosaku )  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号： 20218358
- (2)研究分担者 伊藤 量基  
( ITO , Tomoki )  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号： 70434826