

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670764

研究課題名(和文) DAMPs/PAMPs 応答の“場と適切化”：活性化血小板の役割

研究課題名(英文) Localization and regulation in reactive sites of DAMPs/PAMPs. Role of ATP from the activated platelets

研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)

鹿児島大学・医歯(薬)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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：PAMPs、DAMPs双方のシグナル入力で一挙に炎症が惹起される。この時には NF- $\kappa$ B活性化とインフラマソームの活性化がシンクロナイズされる。PAMPsの代表としてLPSを、DAMPsの代表としてHMGB1,あるいはATPを選び、同時に刺激すると、一挙にIL-1 $\beta$ (beta), IL-18が産生された。in vivoでは炎症巣が形成された。血小板は代表的ATPソースであるが、インフラマソームアッセンブライも存在する。このインフラマドームを阻害すると、血小板凝集も阻害された。このように血小板はATPソースとしてばかりでなく、インフラマソームも配給することで、炎症巣を形成するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Dual signalings from PAMPs/DAMPs play crucial role in inflammation, immunity and hemostasis. It has been listed more than 1000 of molecules as PAMPs, and DAMPs each other. In this study, we took LPS as PAMPs, and HMGB-1 and ATP as DAMPs, and stimulated macrophages or dendritic cells. We showed that dual signaling from LPS and HMGB1 or ATP stimulated the release of IL-1 $\beta$ (beta) and IL-18. Thus dual signaling plays crucial role in inflammation, immunity and hemostasis. It has been described that platelet contains inflammasome, however the role of platelet-inflammasome has been not known. We examined the role of platelet inflammasome. An inflammasome inhibitor, 1,5-anhydrofructose inhibited platelets aggregation with decreased release of IL-1 $\beta$ (beta). Thus ATP from activated platelets might play important role for the hemostasis/inflammation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：ATP DAMP PAMP platelet inflammation

## 1. 研究開始当初の背景

炎症の開始と増幅に Pathogen Associated Molecular Patterns(PAMPs)からのファースト刺激と Damage Associated Molecular Patterns(DAMPs)からのセカンド刺激の dual signaling が重要であることは我々を含む内外の研究者の研究により次第に定着した概念となりつつある。この場合、DAMPs からのシグナルがファースト刺激でも同様である。すなわち PAMPs 刺激で NF- $\kappa$ B が活性化されて、プロフォームの IL-1、IL-18 が産生されて細胞質内に蓄積され、ついで DAMPs からのシグナルでインフラマソームの活性化とカスパーゼ 1 の活性化が起きると、一挙に pro-IL-1 と pro-IL-18 が mature な IL-1、IL-18 となり、細胞外に放出される。これらは樹状細胞、マクロファージを当該部位に集簇させて炎症が成立する。代表的 DAMPs 分子は ATP である。この ATP のソースとしては、侵襲部位の活性化細胞、破壊された細胞が想定されているが、血小板も活性化に伴い、大量の ATP を産生し、周囲に放出する。いわゆる放出反応である。これらの PAMPs, DAMPs はそれぞれ、TLRs(Toll Like Receptors)を主たる受容体として、侵襲部位に免疫細胞を遊走・集簇して、「生体防御的炎症」を惹起し、自然炎症、止血、修復を誘導するという意味では、重要な初期反応である。

しかしこの PAMPs, DAMPs dual signaling は敗血症性ショック、多臓器不全、ARDS(Acute Respiratory Distress Syndrome)、劇症肝炎などの重症病態、あるいは痛風関節の重症発作、パーキンソン病、アルツハイマー病などの慢性進行性疾患などの進行、重症化などの病態にも広く関係することが判明してきて、そのメカニズム、とりわけ治療法の開発が緊急の課題の一つとなってきた。とくに DAMPs として ATP が重要な役割を果たすことが判明してきている。ATP は細胞内ではエネルギーの通貨

であるが、細胞崩壊に伴い、細胞外に放出されると DAMPs として作用しうる。細胞外では ATP は P2X7 受容体を介して DAMPs として働きうる。

そこで本研究では、血小板由来の ATP が DAMPs と成りうるか、否かを検討した。

## 2. 研究の目的

本研究では ATP のソースとして活性化血小板を選び、活性化血小板が DAMPs、PAMPs の反応の場、すなわち侵襲部位の止血、(自然)免疫、修復にどのように関与するのかを明らかにすることを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

PAMPs からのファーストヒットに、DAMPs からのセカンドヒットが時間的、空間的に重複するとインフラマソームがどのように活性化されるのかを、インフラマソームの immunoblot と IL-1、IL-18 産生能で調べた。ファーストヒットとしては LPS を選び、DAMPs からのセカンドヒットとしては ATP, High Mobility Group Box-1 protein(HMGB1)を選んだ。

実験は

### (1) *in vitro*:

ラットの腹腔マクロファージ、骨髄マクロファージ、ヒト末梢血単核球(PBMC)を選んだ。すなわちこれらの細胞を各種濃度のエンドトキシンで数時間から 24 時間培養し、エンドトキシンを洗浄除去して、HMGB1, ATP を加え、経時的に IL-1、IL-18, TNF- $\alpha$ , HMGB1 を ELISA 法にて測定した。

### (2) *in vivo*

マウス、ラットの腹腔内にエンドトキシンを前投与して、60分~3時間後に HMGB1, ATP を投与した(腹腔内投与、尾静脈投与、あるいは経気道的に投与した)。

評価は死亡率と臓器(肺、腎臓)の病理像を観察した。なお死亡率は学内動物倫理委員

会の指針に従った。

#### 4. 研究成果

(1) PAMPs 刺激を先行して、DAMPs 刺激を加えると、インフラマソームの活性化とともに IL-1 , IL-18 が大量に産生、放出された。HMGB1, TNF も産生、放出されたが、IL-1 , IL-18 程ではなかった。DAMPs 刺激としては ATP が有効に作用して、ATP が有力な DAMP の一つであることが証明された。

(2) 申請者らはグルコーゲン代謝第3の経路：リアーゼ経路の産物 1,5-anhydrofructose (1,5-AF) がヒト血小板のトロンビン凝集、ADP, コラーゲン召集を  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で抑制することを先に見出していたが、今回新たに、1,5-AF は炎症を抑制することを見出した。すなわち、1,5-AF は、樹状細胞、マクロファージからの IL-1 , IL-18 の産生と放出を強く抑制する。一方、血小板にもインフラマソームが存在するので、侵襲部位、血管損傷部位では血小板が凝集し、インフラマソームも活性化されること、ここで血小板は IL-1 、IL-18、ATP を放出し、樹状細胞やマクロファージを集簇させて、炎症を惹起し、当該部位で止血 + 自然免疫 (+ 感染防御) そして修復反応が惹起されることが考えられた。この場合、血小板由来の ATP が DAMPs として反応を増幅することも判明した。すなわち血小板も侵襲部位で活性化され、凝集と放出反応が惹起される。この放出反応で ATP も放出されて、当該部位での生体反応、すなわち自然免疫、止血、炎症、修復などを誘導することが推定された。

1,5-AF が血小板活性化制御と炎症細胞のインフラマソーム抑制を介して、過度の炎症や細胞組織障害や止血反応を制御しうるか否かが今後へのこされた課題である。

抗血小板剤治療が広く抗炎症にもつながり、逆に抗炎症剤が積極的に病的血栓形成をも抑制する可能性も考えられる。

#### 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 4 件)

(1) Comparative evaluation of direct thrombin and factor Xa inhibitors with antiplatelet agents under flow and static conditions: an in vitro flow chamber model.

Hosokawa K, Ohnishi T, Sameshima H, Miura N, Koide T, Maruyama I, Tanaka KA.

PLoS One. 2014 Jan 31;9(1):e86491. doi: 10.1371/journal.pone.0086491. (査読有)

(2) Antithrombotic effects of PAR1 and PAR4 antagonists evaluated under flow and static conditions.

Hosokawa K, Ohnishi T, Miura N, Sameshima H, Koide T, Tanaka KA, Maruyama I.

Thromb Res. 2014 Jan;133(1):66-72. doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.037. (査読有)

(3) Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism.

Nakahara M, Ito T, Kawahara K, Yamamoto M, Nagasato T, Shrestha B, Yamada S, Miyauchi T, Higuchi K, Takenaka T, Yasuda T, Matsunaga A, Kakihana Y, Hashiguchi T, Kanmura Y, Maruyama I.

PLoS One. 2013 Sep 30;8(9):e75961. doi: 10.1371/journal.pone.0075961. (査読有)

(4) Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: a possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis.

Shrestha C, Ito T, Kawahara K, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Maruyama I.

Biochem Biophys Res Commun. 2013 Aug 9;437(4):573-8. doi:

10.1016/j.bbrc.2013.06.117. (査読有)

[学会発表](計 2 件)

(1) Ikuro Maruyama, Regulation of Danger Signals from HMGB1 and Histones by Endothelial or Circulating Thrombomodulin. The Merinoff World Congress 2013: HMGB1. October 9-11, 2013 Manhasset, NY

(2) Ikuro Maruyama, Takashi Ito, Yoshio Azuma, Mayumi Nakahara, Teruto Hashiguchi, Shingo Yamada

Assay method of des-HMGB1, N-terminus cleaved out HMGB1 by thrombin-thrombomodulin, and its clinical significance XX congress of the ISTH, June 29-July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands

〔図書〕(計 0 件)

〔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

丸山 征郎 (MARUYAMA Ikuro)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
特任教授  
研究者番号：20082282

### (2) 研究分担者

伊藤 隆史 (ITO Takashi)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
特任講師  
研究者番号：20381171

### (3) 連携研究者 なし