慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	炎症性疾患におけるImmunothrombosisの制御異常と新たな治療法の開発
Sub Title	Investigation of dysregulated immunothrombosis in inflammatory diseases and development of a new therapeutic tool.
Author	平橋, 淳一(Hirahashi, Junichi)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	ヒストンは損傷した宿主細胞から放出され, 炎症に伴う血栓症を惹起する。血小板の活性化はヒストン誘発性血栓症の原因であるが, 好中球依存性メカニズムは未知である。好中球除去およびMac-1欠損は, ヒストンによる肺血栓塞栓症の発症を抑制しマウスの生存を延長した。我々は血漿の存在下で血小板・好中球相互作用によって誘導される血漿凝固産物を推定する濁度測定技術を利用した。ヒストンは, 好中球Mac-1を直接活性化しMac-1依存的に血漿凝塊の産生を増大させ血小板・好中球複合体形成を増強した。これらのデータは, ヒストンが好中球- 血小板相互作用を介してMac-1依存性の血栓塞栓症を誘導することを示している。 Histones are released from damaged host cells and act as mediators of inflammation-related thrombosis. Platelet activation and aggregation is responsible for histone-induced thrombosis, but neutrophil-dependent mechanisms are still unclear. Immunodepletion of neutrophils and genetic ablation of Mac-1 protected mice from histone-induced pulmonary thromboembolism and prolonged survival. We utilized turbidimetric technic which estimates plasma clot production induced by interaction between human platelets and neutrophils in the presence of plasma in vitro. Histones augmented the plasma clot production in Mac-1-dependent manner and enhanced platelet-neutrophil complex formation which is inhibited by anti-Mac-1 antibody. Furthermore histones could directly activate Mac-1 besides through platelets . In conclusion, histones induces Mac-1-dependent thromboembolism through neutrophil-platelet interaction, which is a new therapeutic target for inflammation-induced thrombosis.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2015 ~ 2017 課題番号 : 15K09459 研究分野 : 炎症と血栓
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K09459seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　２０　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2015～2017
課題番号：　１５Ｋ０９４５９

研究課題名（和文）炎症性疾患におけるImmunothrombosisの制御異常と新たな治療法の開発

研究課題名（英文）Investigation of Dysregulated Immunothrombosis in inflammatory diseases and development of a new therapeutic tool.

研究代表者

平橋　淳一（Hirahashi, Junichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：７０２９６５７３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒストンは損傷した宿主細胞から放出され、炎症に伴う血栓症を惹起する。血小板の活性化はヒストン誘発性血栓症の原因であるが、好中球依存性メカニズムは未知である。好中球除去およびMac-1欠損は、ヒストンによる肺血栓塞栓症の発症を抑制しマウスの生存を延長した。我々は血漿の存在下で血小板・好中球相互作用によって誘導される血漿凝固産物を推定する濁度測定技術を利用した。ヒストンは、好中球Mac-1を直接活性化しMac-1依存的に血漿凝塊の産生を増大させ血小板・好中球複合体形成を増強した。これらのデータは、ヒストンが好中球-血小板相互作用を介してMac-1依存性の血栓塞栓症を誘導することを示している。

研究成果の概要（英文）：Histones are released from damaged host cells and act as mediators of inflammation-related thrombosis. Platelet activation and aggregation is responsible for histone-induced thrombosis, but neutrophil-dependent mechanisms are still unclear. Immunodepletion of neutrophils and genetic ablation of Mac-1 protected mice from histone-induced pulmonary thromboembolism and prolonged survival. We utilized turbidimetric technic which estimates plasma clot production induced by interaction between human platelets and neutrophils in the presence of plasma in vitro. Histones augmented the plasma clot production in Mac-1-dependent manner and enhanced platelet-neutrophil complex formation which is inhibited by anti-Mac-1 antibody. Furthermore histones could directly activate Mac-1 besides through platelets . In conclusion, histones induces Mac-1-dependent thromboembolism through neutrophil-platelet interaction, which is a new therapeutic target for inflammation-induced thrombosis.

研究分野：　炎症と血栓

キーワード：　ヒストン　好中球　血小板　Mac-1　CD40L　PSGL-1

１．研究開始当初の背景

炎症性疾患において血栓は疾患の重症化を示唆し迅速な治療を必要とする臨床的に重要な病態である。血栓形成には主として血液凝固因子と血小板の活性化が関与することが知られているが、最近、“Immunothrombosis”という概念が提唱された。Immunothrombosis とは自然免疫担当細胞と血栓特異的分子の相互作用により、血管内で病原体を認識して封じ込め、破壊する足場としての微小血管内血栓形成を行う自然免疫機構であり、その制御不全は各種の病的血栓をもたらすという概念である。しかし，Immunothrombosis が制御できなくなると，心筋梗塞，脳梗塞，深部静脈血栓症，播種性血管内凝固（disseminated intravascular coagulation：DIC）などの血栓症の発症につながる。糖尿病において血栓症が誘発されやすい原因としては，以前から，血管内皮細胞障害，血小板機能異常，血栓形成に関わる因子の血液中での上昇，線溶活性の低下などが報告されているが，最近，血栓形成の急性期には糖尿病による高血糖状態により活性化された好中球の機能異常が関与していることが分かってきた。

Immunothrombosis は，単球，好中球のような自然免疫細胞，また，生体防御機構の一つとして近年報告されている，活性化した好中球から放出されるクロマチン線維と顆粒蛋白から成る網目状構造物（好中球細胞外トラップ：Neutrophil Extracellular Traps ; NETs)，血小板，血栓特異的な分子により形成されるが, NETs の構成因子の一つに histone がある。histone はクロマチンの構成因子で DNA を収納していることで知られているが，臓器障害を起こした際に全身に散布される DAMPs（damage-associated molecular pattern molecules)としても知られている。炎症と血栓を結ぶメカニズムとしてヒストンの DAMPs としての機能に注目が集まってきた。

２．研究の目的

“Immunothrombosis”という自然免疫学の新しい概念に着目し、炎症性疾患における血栓形成メカニズムの解明およびその治療法の開発に着手する。Histone による好中球、血小板および血液凝固系の活性化メカニズムの解明およびその新規制御法の開発を行う。さらに、Histone を用いて高脂肪食糖尿病マウスにおける血栓モデルを構築し、糖尿病における血栓形成を Immunothrombosis 制御異常の立場から解析することにより、糖尿病における心血管合併症の予防および治療法の糸口を探索する。

３．研究の方法

（１）Histone 誘発 DIC モデル: Histone を投与したマウスは、臓器への好中球の遊走、播種性血管内凝固（DIC）を呈し、肺血栓塞栓を誘発して死亡するモデルである。C57BL6 mice（10～12wk、Male）80 mg/kg BW の Histone Calf thymus（Sigma H9250）を静注投与し、投与後 96 時間までの生存率を観察する。また、Histone 静注投与 10 分後の血液を採取して血小板数の測定に供する。その後肺組織を採取し、パラフォルムアルデヒド固定し HE 染色および PTAH 染色により肺血栓塞栓を評価する。NETs 産生が抑制される Mac-1 KO マウス（Harvard 大学 Tanya Mayadas 教授から供与）での解析も行う。また、ウシ Lf 200 mg/kg を Histone 投与前 30 分に尾静脈から投与し同様に表現型を観察する。

（２） DIO (diet-induced obesity)マウスにおける血栓モデル: C57BL/6 j mice（6wk、Male）60%高脂肪食餌を 2 週間投与した後、さらに少量 (10-20mg/kgBW)の Histone を静注することにより誘導される、肺血栓モデルを構築し Mac-1 KO マウスでの効果を観察する。

（３） 好中球と血小板の抽出

定期内服のない健常人から，ヒト末梢血(7ml)を EDTA 含有採血管で採取し，Mono-Poly Resolving Medium (DS Pharma Biochemical, Co.Ltd)を用いて多形核好中球(polymorphonuclear neutrophil：PMN)を分離した。採取した PMN は HEPES 中に 8 度に保存した。ヒト末梢血(5 ml)を 3.2%クエン酸 Na (3.2%クエン酸 Na:血液＝9:1)を入れたシリンジに採血を行い，15 mL チューブに回収して 180 g，10 min で遠心し，上清を採取し，血小板含有血漿を得た。上清を 800g で 10 分間遠心分離した。得られた上清の上位 3 分の 2 は Platelet-poor plasma (PPP)として採取し下位 3 分の 1 は Platelet-rich plasma（PRP）として採取した。洗浄血小板単離のために、75nM プロスタサイクリン：PGI2 を得られた PRP に加え、800g で 10 分間遠心分離した。得られたペレットを HEPES 緩衝液に散布した。血小板を細胞計数器で計数し、血小板の数を 3.0×10^{5} 細胞/μl に調整した。全ての方法は，慶應義塾大学医学部倫理委員会の許可を得た上で施行した。

（４） Histone による活性化血小板および好中球による血漿クロットの混濁度の評価

PRP，PMN に対してそれぞれ 200 μg/ml，2000 μg/ml Lactoferrin from human neutrophil (Sigma Aldrich)を 37 度，5%CO_2 で 30 分間，もしくは，500 μg/ml，1000 μg/ml AGE-BSA，BSA (Millipore)を 37 度，5% CO_2 で 2 時間，または 10 mM, 15 mM methylglyoxal (MG)を 37 度，5% CO_2 で 2 分間前処置した。その後，HEPES buffered saline with 5 mM glucose に PRP (12.5 μl/well) PMN ($2x10^{5}$ cells/well)，250 μg/ml histone，calf thymus，type IIIS (Sigma-Aldrich)，2 nM thrombin，12.5 mM $CaCl_2$ を加え，37□で 60 分かけて，96 well plate 内で血漿クロットを作成した。血漿クロットの混濁度は，10 分毎に 60 分後まで Synergy4 (Bio Tek)を用いてクロットの混濁度を 340 nm で測定した。なお，thrombin，histone，$CaCl_2$ を加える直前で吸光度を測定し，0 分とした。

（5） フローサイトメトリーによる好中球細胞表面タンパクの発現解析と、好中球―血小板複合体の検出

ヒト PMN、洗浄血小板、または PPP / PRP をヒストンにより 10 分間刺激した。 抗 Mac-1 抗体（ICRF44）または活性化 Mac-1 抗体（CBRM1 / 5）、CD61 抗体、CD40 抗体、または CD40L 抗体、PSGL-1 抗体（BD Pharmingen）を用いて、これらの細胞の懸濁液を染色した。次いで、サンプルを FACScan フローサイトメーター（Gallios、Beckmancoulter）で分析した。

４．研究成果

Histone 誘発血栓症モデルマウスに抗 Gr-1 抗体を投与し好中球を枯渇させたマウス，また，白血球上に発現する Mac-1 を欠損したマウスにおいて生存が改善したことから、本モデルでは Mac-1 を介した血小板・好中球相互作用が重要であると考えられた。

ここで，C57BL/6j マウスに高脂肪食 high fat diet (HFD)を投与すると肥満，脂質異常症，またインスリン抵抗性を来す。これは 2 型糖尿病自然発症モデルとして有用であり，DIO (diet induced obesity)マウスとして古くから知られている。我々は，60%HFD を 8 週間 C57BL/6j マウスに投与し，肥満型 2 型糖尿病を発症させ DIO マウスとした. 通常飼料投与マウス，DIO マウスに histone70 mg/kg 投与したところ，DIO 投与マウスにおいて，生存率の著明な低下を認めたため，これは糖尿病における易血栓性を示していると考えた。この HFD+histone 投与モデルを用いて，糖尿病患者における血栓症モデルを構築し，その治療法についての検討を行ったところ，C57BL/6j マウスと比べ，Mac-1 KO マウスで生存が改善した。

ヒストン誘発血栓症のメカニズムをさらに調べるために、血漿の存在下にヒト血小板と好中球との相互作用によって誘導される血漿凝固産物を定量化する濁度測定技術を利用した。従来の報告では，$CaCl_2$ を加えた乏血小板含有血漿 (PPP)，thrombin を用いて，96 well plate 内で血漿クロットを作成し，その混濁度により血栓形成の定量的指標としている。今回，我々は，好中球・血小板相互作用による血栓形成への影響を見るために $CaCl_2$ を加えた多血小板含有血漿 (PRP)，多形核好中球 (PMN) ，少量の thrombin を用いて同様の実験を試みた。PRP に PMN を作用させると，PPP に PMN を作用させた場合に比べ，吸光度の増強が見られ，好中球・血小板相互作用による血栓形成の増強と考えられた。次に，histone の存在下で PRP+PMN 群の吸光度を検証したところ，吸光度の増幅効果が見られ，これは抗 Mac-1 抗体によりブロックされた。histone により活性化した好中球・血小板による血栓形成の増強効果が確認でき、この増強効果は Mac-1 を介することが示された。

ヒストンは、血漿存在下に両細胞の共培養による血漿凝塊生成を増大させた。また共培養系におけるフローサイトメトリー分析により、ヒストンは血小板/好中球複合体形成を増強し、これは抗CD40L、抗Mac-1抗体によって阻害された。また、抗CD40Lにより好中球のMac-1の活性化が抑制された。一方、好中球をヒストンにより刺激するとMac-1が活性化し、好中球上のToll様受容体（TLR)-2および4の発現を誘導した。 Mac-1活性化は、TLR-2および4の阻害剤によって抑制され、ヒストンが血小板TLRを介して直接的に好中球を活性化することができることを示唆している。これらのデータは、ヒストンは血小板だけではなく好中球にも直接作用し、CD40 / CD40Lを介して好中球・血小板相互作用が増強しMac-1依存性血栓塞栓症を誘発することを示しており、これは炎症誘発性血栓症の新たな治療標的となりうることを示唆した。

以上のように、これまでの報告ではヒストンによる血栓形成は、ヒストンの直接的な血小板凝集作用の結果と考えられてきたが、ヒストンは好中球をも直接活性化し、血栓形成過程には好中球活性化が介在することが新たに判明した。従って、炎症性疾患における血栓症、すなわちImmunothrombosis制御異常に対する治療標的としては、Mac-1を主とした好中球活性化が重要であることが示された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

(1) Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, Urano Y,Suzuki A, Yamamoto K, Hase K, Homma K, Sasaki J, Miyauchi H, Hoshino T, Hayashi M, Mayadas TN, Hirahashi J. Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. Nat Med. 2018(2):232-238. doi: 10.1038/nm.4462 **査読有**

(2) Okubo K, Kamiya M, Urano Y, Nishi H,Herter JM, Mayadas T, Hirohama D, Suzuki K, Kawakami H, Tanaka M, Kurosawa M, Kagaya S, Hishikawa K, Nangaku M, Fujita T, Hayashi M, Hirahashi J. Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. EBioMedicine. 2016, 10:204-15. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.07.012 **査読有**

〔学会発表〕（計 3 件）

(1) **平橋 淳一、ANCA 関連血管炎の内科的治療の実際：免疫学的メカニズムと新規治療選択肢、口頭、第 116 回日本皮膚科学会総会 教育講演** 2017 年

(2) Miho Kurosawa , Koshu Okubo , Osamu Yamazaki , Matsuhiko Hayashi , Junichi Hirahashi Histone requires Mac-1

(CD11b/CD18)-mediated neutrophil-platelet interaction to induce thromboembolism
The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop　2017 年

(3) 黒澤美穂、大久保光修、山崎 修、下澤達雄、南学正臣、林 松彦、平橋淳一　糖尿病における易血栓性はhistone感受性の亢進を背景としたImmunothrombosis制御異常に起因する　第 59 回日本腎臓学会総会.　2016 年

〔図書〕
(1) 大久保光修・平橋　淳一
新膠原病・血管炎の腎障害
2016 年 10 頁(168-177)　東京医学社

６．研究組織
(1) 研究代表者
平橋　淳一　（HIRAHASHI, Junichi）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師
研究者番号：70296573