

氏名（本籍）	中島大樹	（愛知県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1156号	
学位授与日付	令和3年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Synergistic effect of collagen and CXCL12 in the low doses on human platelet activation	
審査委員	（主査）教授	中川 敏幸
	（副査）教授	土井 潔
		教授 原 明

論文内容の要旨

CXCL12はCXCファミリーに分類されるケモカインの一つであり、その特異的受容体であるCXCR4およびCXCR7を介し作用する。CXCL12は白血球の炎症部位への遊走誘導に加え、造血、胚発生および血管新生などの生理的プロセスに関与していることが知られている。造血機構、特に血小板形成において、CXCL12は、巨核芽球の巨核球への分化および成熟血小板の血中への誘導に必須であることが明らかにされている。

血小板は止血において中心的な役割を果たしている。血管内皮の障害により露出したコラーゲンは、Glycoprotein (GP) VI および $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン等のコラーゲン受容体を介して血小板の凝集を促進する。血小板の凝集に伴って、細胞増殖因子であるplatelet-derived growth factor AB (PDGF-AB)の分泌および炎症惹起物質であるsoluble CD40 ligand (sCD40L)の遊離が惹起される。一方、血小板機能の亢進は冠動脈及び脳血管等の血栓性疾患の引金となると考えられている。コラーゲンはp38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) およびp44/p42 MAPKの活性化を介し、血小板機能を活性化することが明らかにされている。

Heat shock protein (HSP)はストレス応答の際に誘導されるタンパク質であり、分子シャペロンとして機能すると考えられている。HSP27は低分子量HSPの一つであり、血小板を含む様々な細胞に恒常的に発現していることが知られている。また、HSP27はリン酸化による翻訳後修飾を受けることが知られている。近年、HSP27は細胞内のみならず、細胞外で炎症反応の制御因子の一つとしても機能することが明らかにされている。コラーゲン刺激によるPDGF-ABの分泌およびsCD40Lの遊離に伴って、p44/p42 MAPKを介したHSP27のリン酸化が惹起されること、また、糖尿病患者において、HSP27はコラーゲン刺激によってリン酸化された後、血小板から血漿中へ遊離されることが明らかにされている。

ヒト成熟血小板においてCXCL12は弱い血小板凝集を生じる低用量のコラーゲン刺激による血小板凝集作用を増強することが報告されているが、その分子機序の詳細は明らかではない。本研究において、低用量コラーゲンによるヒト血小板作用に対するCXCL12の影響を明らかにすることを目的とし、解析を行った。その結果、低用量コラーゲンと低用量CXCL12は、血小板凝集、PDGF-AB分泌、sCD40L遊離、HSP27リン酸化およびリン酸化HSP27遊離を、p38 MAPKの活性化を介して相乗的に促進することを明らかにした。

【対象と方法】

健常者の同意取得後、静脈血を採取し、遠心分離法により多血小板血漿（PRP）を調整した。PRPをCXCR4中和抗体、CXCR7中和抗体およびSB203580（p38 MAPK 阻害薬）で前処理したのちに、コラーゲン、CXCL12、トロンビン受容体活性化ペプチド（thrombin receptor-activating peptide: TRAP）、ADPおよびコンバルキシン（選択的GPVIアゴニスト）で刺激し、光透過法及びレーザー光散乱システムを用いて血小板凝集を測定した。血小板からのPDGF-ABの分泌、sCD40Lの遊離およびリン酸化HSP27

の遊離はELISA法で測定した。ウエスタンブロット法により p38 MAPK, p44/p42 MAPK および HSP27 のリン酸化レベルを解析した。

【結果】

- 1) コラーゲン (0.2 $\mu\text{g/ml}$) と CXCL12 (10 ng/ml) は、それぞれ単独では、ほとんど血小板凝集を促進しなかったが、同時刺激によって有意に血小板凝集を促進した。一方、TRAP (7 μM) あるいは ADP (0.5 μM) と CXCL12 (10 ng/ml) の同時刺激では血小板凝集を促進しなかった。
- 2) コンバルキシシン (20 ng/ml) と CXCL12 (10 ng/ml) は、それぞれ単独では、ほとんど血小板凝集を促進しなかったが、同時刺激によって血小板凝集を促進した。
- 3) コラーゲン (0.2 $\mu\text{g/ml}$) と CXCL12 (10 ng/ml) の同時刺激によって促進された血小板凝集は CXCR4 中和抗体によって有意に抑制されたが、CXCR7 中和抗体では抑制されなかった。
- 4) コラーゲン (0.05-0.3 $\mu\text{g/ml}$) と CXCL12 (10 ng/ml) は、それぞれ単独では PDGF-AB 分泌と sCD40L 遊離を促進しなかったが、同時刺激によって有意に PDGF-AB 分泌および sCD40L 遊離を促進した。
- 5) コラーゲン (0.4 $\mu\text{g/ml}$) と CXCL12 (10 ng/ml) は、同時刺激によって p44/p42 MAPK のリン酸化を促進しなかったが、p38 MAPK のリン酸化を促進した。
- 6) SB203580 により、コラーゲン (0.1-0.3 $\mu\text{g/ml}$) と CXCL12 (10 ng/ml) の同時刺激によって促進された血小板凝集、p38 MAPK のリン酸化、PDGF-AB 分泌および sCD40L 遊離は有意に抑制された。
- 7) コラーゲン (0.4 $\mu\text{g/ml}$) と CXCL12 (10 ng/ml) は、それぞれ単独では HSP27 のリン酸化を促進しなかったが、同時刺激によって HSP27 のリン酸化を促進した。
- 8) SB203580 により、コラーゲン (0.1-0.2 $\mu\text{g/ml}$) と CXCL12 (10 ng/ml) の同時刺激によって促進された HSP27 のリン酸化およびリン酸化 HSP27 遊離は有意に抑制された。

【考察】

低用量コラーゲンないし低用量コンバルキシシンと低用量 CXCL12 の同時刺激によって血小板凝集が促進され、CXCR4 中和抗体によって、その血小板凝集が抑制されたことから、低用量コラーゲンと低用量 CXCL12 の同時刺激による血小板凝集は、受容体としてそれぞれ GPVI と CXCR4 を介していることが示唆された。また、低用量コラーゲンと低用量 CXCL12 の同時刺激は p38 MAPK のリン酸化を促進すること、また、SB203580 によって、血小板凝集、PDGF-AB 分泌、sCD40L 遊離、HSP27 リン酸化およびリン酸化 HSP27 遊離が抑制されたことから、低用量コラーゲンと低用量 CXCL12 は、p38 MAPK の活性化を介して血小板機能を促進していることが示唆された。本研究で示された血小板活性化機序は、本研究に使用した低用量に比し低い健康者の血中 CXCL12 レベルより高値の患者における血栓形成の機序の一つと考えられ、血栓症に対する新たな治療開発の一助となる可能性が示唆された。

【結論】

ヒト血小板において、低用量コラーゲンと低用量 CXCL12 は、血小板凝集、PDGF-AB 分泌、sCD40L 遊離、HSP27 リン酸化およびリン酸化 HSP27 遊離を、p38 MAPK の活性化を介して相乗的に促進することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 中島大樹は、ヒト血小板において、低用量コラーゲンと低用量 CXCL12 が、それぞれコラーゲン受容体 GPVI と CXCL12 受容体 CXCR4 を介し p38 MAPK を活性化し、相乗的に血小板機能を促進することを明らかにした。本研究の成果は、血栓形成にいたる病態の機序を示唆するものであり、血栓止血学ならびに麻酔科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Daiki Nakashima, Takashi Onuma, Kumiko Tanabe, Yuko Kito, Kodai Uematsu, Daisuke Mizutani, Yukiko Enomoto, Masanori Tsujimoto, Tomoaki Doi, Rie Matsushima-Nishiwaki, Haruhiko Tokuda, Shinji Ogura, Toru Iwama, Osamu Kozawa, Hiroki Iida: Synergistic effect of collagen and CXCL12 in the low doses on human platelet activation

PLoS One 15: e0241139 (2020), doi: 10.1371/journal.pone.0241139.