

論文の内容の要旨

論文題目 糖尿病における血栓症と immunothrombosis 制御異常に関する研究

氏名 黒澤 美穂

糖尿病患者において、血栓症は生命予後を左右する重篤な病態である。血栓症のメカニズムとして最近、“immunothrombosis“という概念が提唱されている。Immunothrombosis は、単球、好中球をはじめとする自然免疫細胞や血小板および凝固因子などが関与する生体防御機構の一つとされ、血管内で病原体を認識、封じ込め、破壊するための足場をつくり、感染防御を促進するという有益な側面がある。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と考えられている。

一方、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。

Histone はクロマチンの構成因子で DNA を束ねていることが知られているが、臓器障害を起こした際に全身に散布される Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs)としても知られている。Histone の由来は apoptosis または necrosis に陥った細胞や、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) などと考えられている。実際に NETs の制御不全が種々の炎症性疾患や自己免疫疾患に関与し、血栓症の病態にも深く関わっていることが分かってきた。NETs の主要構成成分である histone の DAMPs とし

ての血栓形成機序を解明することは「炎症と血栓」の研究において極めて重要な意義を持つ。マウスへ histone を投与することで肺血栓及び肺出血により死亡するモデルにおいて、抗 GPIIb/IIIa 抗体によって血小板を枯渇させることにより生存が改善することは過去に報告されている。我々の検討から、本モデルにおいて抗 Gr-1 抗体により好中球を免疫学的に枯渇させたマウス、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ため、histone による血栓形成には 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。

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、高血糖、また、インスリン抵抗性を来し、2型糖尿病を自然発症する 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 histone 70 mg/kg 投与したところ、DIO 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 投与モデルは野生型マウスと比べ、Mac-1 KO マウスにおいて生存が改善した。これらの結果から、糖尿病患者では histone 感受性が亢進しており、そのメカニズムとして Mac-1 を介した血小板・好中球相互作用が考えられた。

実地臨床で使用されている抗血栓薬は多数あるが、必ずしも根本的治療に結びつかず出血傾向が背景に立つ場合も多い。炎症による血栓形成メカニズムを制御する物質として我々は生体内物質ラクトフェリン (Lactoferrin : Lf)に注目した。Lfはヒトの母乳や涙液、唾液などの外分泌液に含まれている物質であり、好中球の二次顆粒中にも含まれており、抗菌活性を始めとする多機能性蛋白として報告されている。Lfが新生児において副作用を起こすことなく、敗血症の予防や致死率の低下に寄与したという報告が複数ある。また、炎症性腸疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE)などの自己免疫疾患でも Lfと疾患の病態の関連についての報告があり、Lfは炎症性疾患や自己免疫疾患における内因性の抗炎症物質としても認識されている。我々の研究室は、最近の研究において、血栓症と深く関わっている NETs が Lf の作用により、顕著に制御されることを見出した (論文投稿中)。また、血栓症の発症率が高い2型糖尿病患者では血中 Lf 値が低値であることが報告されている。Lfは血小板機能・好中球機能を制御する物質として考えられ、histone 誘発血栓症モデルマウス、HFD 投与 histone 誘発血栓症モデルマウスに Lf を投与したところ、生存が著明に改善した。

以上の in vivo での実験結果を踏まえ、in vitro の実験により Mac-1 を介した好中球・血小板相互作用、また糖尿病における histone 感受性の亢進のメカニズムについて検証を行った。従来の報告では、CaCl₂を加えた乏血小板含有血漿 (platelet-poor plasma : PPP), thrombin を用いて、96 well plate 内で血漿クロットを作成し、その混濁度によりフィブリン血栓形成を定量化している。この方法を応用し、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定量化するために CaCl₂を加えた多血小板含有血漿 (platelet-rich plasma : PRP), 多形核好中球 (polymorphonuclear neutrophil : PMN), 少量の thrombin を用いて同様の実験を試みた。過去の報告では、thrombin を PPP に対して作用させ、生体内の thrombin burst と同じ病態を惹起している。一方、本実験では PRP に少量の thrombin 及び PMN を作用させており、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 群の吸光度を比較したところ、histone による吸光度の増幅効果が見られ、histone により活性化された好中球・血小板による血栓形成の増強効果が確認できた。Histone, thrombin はともに血小板を活性化させ、活性化した血小板が好中球に作用し NETs を放出することが過去に報告されており、histone, thrombin はともに好中球・血小板相互作用

を活性化する物質としての作用を持つ。そのため、本実験においては PRP+PMN 群で観察された thrombin により惹起される血栓形成が histone による好中球・血小板相互作用を介して亢進していると考えられた。

一方、糖尿病の病態は血液、細胞内において最終糖化産物 (advanced glycation end products : AGEs) の形成を促進する高血糖状態に特徴づけられる。In vitro で AGEs, その前駆体の一つである methylglyoxal (MG) は好中球に Mac-1 を発現させ、好中球・血小板相互作用に関与することが報告されている。In vitro において AGEs のモデル物質として使用されている AGE-BSA は PRP+PMN の血栓形成を増強した。一方、histone による血栓誘導の実験については、AGE-BSA を用いた実験では albumin による histone 中和効果を考えなくてはならないため、より系に干渉しない MG を用いて検証した。その結果、MG は PRP+PMN+histone による血栓誘導の増強効果を認めた。このことは、糖尿病において histone 感受性が亢進している要因として MG が関与していることが示唆された。

Histone は TLR2, 4 を介して血小板を活性化し、血小板上に P-selectin を発現することが報告されている。PRP 群と比較し PRP+PMN 群において、histone 存在下で吸光度の著明な増幅効果が見られたことから、血栓形成において histone による血小板に対する作用だけでなく、好中球・血小板相互作用が重要であると考えられた。血栓形成において、好中球・血小板相互作用に好中球上の Mac-1 と血小板上の GPIIb/IIIa の結合が重要であることは以前から報告されている。また、histone 誘発血栓症モデルにおいて Mac-1 KO マウスの生存が改善したことから、histone による好中球・血小板相互作用に Mac-1 が関与していると考えられる。以上のことから、histone により活性化し P-selectin を発現した血小板が PSGL-1 を発現した好中球と接着し、それに引き続いて好中球上の Mac-1 と血小板上の GPIIb/IIIa の相互作用により血栓形成を起こすというメカニズムが想定された。Lf は in vivo の実験で histone 誘発性血栓モデルの生存を改善し、in vitro の実験で好中球・血小板相互作用による血栓形成を改善させたことから、Lf が Mac-1 を標的として好中球・血小板相互作用を制御する可能性が考えられる。本研究により、「糖尿病では血栓症の発症が助長される要因として、Mac-1 を介した血小板・好中球相互作用に代表される histone 感受性が亢進している」という新たなメカニズム解明の糸口を掴んだ。この histone 感受性を制御する新たな治療薬の候補として Lf の効果が期待される。