

氏名	大石 沙織
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第65号
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	Heme activates platelets and exacerbates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via CLEC-2 and GPVI/FcR γ (ヘムは CLEC-2 及び GPVI/FcR γ を介して血小板を活性化し、横紋筋融解症誘発急性腎障害を増悪させる)
論文審査委員	委員長 教授 波呂 浩孝 委員 准教授 中村 勇規 委員 准教授 澤田 智史

学位論文内容の要旨

【目的】

横紋筋融解症は、骨格筋の壊死により筋由来成分が血中に流入する疾患で、急性腎障害を合併する。近年、横紋筋融解症で誘発される急性腎障害の増悪に、血小板が関与していることが報告された。その機序は、「骨格筋由来のヘムが血小板を活性化し、活性化した血小板がマクロファージ細胞外トラップ（macrophage extracellular traps : METs）を誘導し、腎障害を増悪させる」というものであるが、ヘムが血小板を活性化させる機序は不明である。今回、横紋筋融解症誘発急性腎障害において、ヘムが血小板を活性化するメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】

以下の実験を行った。

- ① ヘムによるヒト血小板の活性化を、透過光法による血小板凝集試験及びウエスタンブロット法で解析し、阻害剤により活性化経路、受容体を推定した。
- ② 受容体として推定されたCLEC-2及びGPVIのリコンビナント蛋白とヘムの直接的な結合の有無を、表面プラズモン共鳴法で評価した。
- ③ CLEC-2欠損、GPVI欠損、及び二重欠損のマウス血小板を使用し、ヘムによる活性化を透過度法による血小板凝集試験で比較した。
- ④ CLEC-2またはGPVIを発現させた細胞株に、ヘム存在下で既存のリガンド（podoplaninまたはcollagen related peptide）を作用させ結合レベルを評価することで、ヘムの結合部位を推定した。
- ⑤ 既知のリガンドの結合を阻害する物質（cobalt hematoporphyrinまたは抗GPVI抗体）によって、ヘムによる血小板凝集が阻害されるか検証した。
- ⑥ 野生型及びCLEC-2/GPVI二重欠損マウスにグリセロールを筋注することで横紋筋融解症モデルを作製し、腎障害の程度とMETs形成を生化学的、組織学的に評価した。

- ⑦ ヒト単球細胞株から分化させたマクロファージと、ヘムにより活性化させた血小板を共培養しMETs形成を誘導した。CLEC-2及びGPVIの下流のシグナルを阻害することで、ヘミンを起点とした血小板活性化がMETs誘導に関与しているかin vitroで検証した。

【結果】

- ① ヘムが濃度依存的にヒト血小板を凝集させ、その凝集は SFK 阻害剤、SYK 害剤で阻害された。また、ヘムによる刺激に伴い、血小板の SYK 及び PLC γ 2 のリン酸化が亢進しており、リン酸化は SFK 阻害剤で阻害された。以上から、ヘムが SFK-SYK-PLC γ 2 経路を介して血小板を活性化させていることが明らかとなり、同経路を下流のシグナルとして有する CLEC-2 または GPVI がヘムの受容体であると推定した。
- ② 表面プラズモン共鳴法により、CLEC-2 及び GPVI とヘムが直接結合することを確認した。
- ③ CLEC-2 単独または GPVI 単独欠損のマウス血小板ではヘムによる凝集反応が減弱し、CLEC-2/GPVI 二重欠損血小板ではほぼ完全に凝集が抑制された。
- ④ ヘム存在下では CLEC-2 及び GPVI への既知のリガンドの結合レベルが低下した。
- ⑤ ヘムによる血小板凝集は、cobalt hematoporphyrin または抗 GPVI 抗体で阻害された。
- ⑥ CLEC-2/GPVI 二重欠損の血小板を有するマウスの横紋筋融解症モデルでは、有意に血清クレアチニン値が低く、腎臓における障害尿細管の割合、METs 様構造が少なかった。
- ⑦ 血小板の SFK を阻害すると、ヘムを起点とした METs の誘導は減弱した。

【考察】

横紋筋融解症で誘発される腎障害において、ヘムが血小板を活性化させるメカニズムを検証した。①、②及び③の実験から、ヘムは CLEC-2 と GPVI の両者に直接結合し、SFK-SYK-PLC γ 2 経路を介して血小板を活性化することが明らかになった。また、④及び⑤により、ヘムは CLEC-2 及び GPVI の既知のリガンドと結合部位を共有している可能性があることを示した。さらに、⑥では、CLEC-2 及び GPVI が、横紋筋融解症誘発急性腎障害の増悪に関与していることが in vivo で示された。⑦では、CLEC-2 及び GPVI の下流の経路を阻害し血小板活性化を抑制すると、in vitro での METs 形成が抑制されることが確認された。

二重欠損血小板での血小板凝集、SFK 阻害剤使用下での血小板凝集が完全には抑制されなかったことから、ヘムによる血小板活性化には、今回明らかにしたメカニズム以外の要素がわずかに存在している可能性が示唆された。また、活性化血小板が METs を誘導するメカニズムは明らかになっていない。この 2 点は今後の課題である。

【結論】

ヘムは、CLEC-2 と GPVI に直接結合し、SFK-SYK-PLC γ 2 経路を介して血小板を活性化する。これらの受容体は実際に横紋筋融解症に併発する腎障害や METs の誘導に関与しており、ヘム-CLEC-2/GPVI の結合やその下流のシグナルの阻害が腎障害軽減につながる可能性がある。

論文審査結果の要旨

【目的】

横紋筋融解症は、骨格筋の壊死により筋由来成分が血中に流入する疾患で、急性腎障害を合併する。近年、横紋筋融解症で誘発される急性腎障害の増悪に、血小板が関与していることが報告された。そ

の機序は、「骨格筋由来のヘムが血小板を活性化し、活性化した血小板がマクロファージ細胞外トラップ (macrophage extracellular traps : METs) を誘導し、腎障害を増悪させる」というものであるが、ヘムが血小板を活性化させる機序は不明である。今回、横紋筋融解症誘発急性腎障害において、ヘムが血小板を活性化するメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】

以下の実験を行った。

- ① ヘムによるヒト血小板の活性化を、透過光法による血小板凝集試験及びウエスタンブロット法で解析し、阻害剤により活性化経路、受容体を推定した。
- ② 受容体として推定された CLEC-2 及び GPVI のリコンビナント蛋白とヘムの直接的な結合の有無を、表面プラズモン共鳴法で評価した。
- ③ CLEC-2 欠損、GPVI 欠損、及び二重欠損のマウス血小板を使用し、ヘムによる活性化を透過法による血小板凝集試験で比較した。
- ④ CLEC-2 または GPVI を発現させた細胞株に、ヘム存在下で既存のリガンド (podoplanin または collagen related peptide) を作用させ結合レベルを評価することで、ヘムの結合部位を推定した。
- ⑤ 既知のリガンドの結合を阻害する物質 (cobalt hematoporphyrin または抗 GPVI 抗体) によって、ヘムによる血小板凝集が阻害されるか検証した。
- ⑥ 野生型及び CLEC-2/GPVI 二重欠損マウスにグリセロールを筋注することで横紋筋融解症モデルを作製し、腎障害の程度と METs 形成を生化学的、組織学的に評価した。
- ⑦ ヒト単球細胞株から分化させたマクロファージと、ヘムにより活性化させた血小板を共培養し METs 形成を誘導した。CLEC-2 及び GPVI の下流のシグナルを阻害することで、ヘミンを起点とした血小板活性化が METs 誘導に関与しているか *in vitro* で検証した。

【結果】

- ① ヘムが濃度依存的にヒト血小板を凝集させ、その凝集は SFK 阻害剤、SYK 害剤で阻害された。また、ヘムによる刺激に伴い、血小板の SYK 及び PLC γ 2 のリン酸化が亢進しており、リン酸化は SFK 阻害剤で阻害された。以上から、ヘムが SFK-SYK-PLC γ 2 経路を介して血小板を活性化させていることが明らかとなり、同経路を下流のシグナルとして有する CLEC-2 または GPVI がヘムの受容体であると推定した。
- ② 表面プラズモン共鳴法により、CLEC-2 及び GPVI とヘムが直接結合することを確認した。
- ③ CLEC-2 単独または GPVI 単独欠損のマウス血小板ではヘムによる凝集反応が減弱し、CLEC-2/GPVI 二重欠損血小板ではほぼ完全に凝集が抑制された。
- ④ ヘム存在下では CLEC-2 及び GPVI への既知のリガンドの結合レベルが低下した。
- ⑤ ヘムによる血小板凝集は、cobalt hematoporphyrin または抗 GPVI 抗体で阻害された。
- ⑥ CLEC-2/GPVI 二重欠損の血小板を有するマウスの横紋筋融解症モデルでは、有意に血清クレアチニン値が低く、腎臓における障害尿細管の割合、METs 様構造が少なかった。
- ⑦ 血小板の SFK を阻害すると、ヘムを起点とした METs の誘導は減弱した。

【考察】

横紋筋融解症で誘発される腎障害において、ヘムが血小板を活性化させるメカニズムを検証した。

①、②及び③の実験から、ヘムは CLEC-2 と GPVI の両者に直接結合し、SFK-SYK-PLC γ 2 経路を介して血小板を活性化することが明らかになった。また、④及び⑤により、ヘムは CLEC-2 及び GPVI の既知のリガンドと結合部位を共有している可能性があることを示した。さらに、⑥では、CLEC-2 及び GPVI が、横紋筋融解症誘発急性腎障害の増悪に関与していることが in vivo で示された。⑦では、CLEC-2 及び GPVI の下流の経路を阻害し血小板活性化を抑制すると、in vitro での METs 形成が抑制されることが確認された。

二重欠損血小板での血小板凝集、SFK 阻害剤使用下での血小板凝集が完全には抑制されなかったことから、ヘムによる血小板活性化には、今回明らかにしたメカニズム以外の要素がわずかに存在している可能性が示唆された。また、活性化血小板が METs を誘導するメカニズムは明らかになっていない。この2点は今後の課題である。

【結論】

本研究は挫滅による横紋筋から遊出したヘムによって腎障害が生じ急性腎不全を発症する、臨床上的の問題点をテーマとし、血小板活性化受容体とコラーゲン受容体がヘムの受容体となって血小板を活性化し、マクロファージの活性化を通して尿細管の障害を起こすことを明らかにした、臨床的価値の高い研究である。本研究は Blood Advance 誌 (IF 7.637) に掲載されており、国際的にかつ専門領域でも十分に評価されている。

また、今回の学位審査を通して、マクロファージのみの関与ではなく、好中球や単球の関与についての検討が提案された。さらに、本研究を背景にした臨床への展開についても議論となった。今後の研究の継続で、この点が明らかになれば臨床に向けた新たな展開が期待される。

以上より、本学の博士(医学)の学位論文に相応しい研究であると審査委員全員一致で判断した。今後の研究のさらなる発展が期待できる。