

スフィンゴシン 1-リン酸に注目した HDL の抗血栓作用の解明

蔵野 信

東京大学医学部附属病院 検査部

【研究の背景】

未だエビデンスは十分ではないが、臨床研究、基礎研究から HDL は凝固カスケードの阻害作用、専用カスケードの亢進作用、血小板凝集抑制作用があるという報告がある。私は、HDL の多面的効果を担うスフィンゴシン 1-リン酸(S1P)およびその運搬体であるアポ蛋白 M(ApoM)について研究をしているが、その中で、ApoM/S1P は、リポポリサッカライド誘導敗血症モデルマウスに対して臓器保護作用、生存率改善作用を持つことを報告した(Thromb Haemost. 2018 Jun;118(6):1021-1035.)。その機序として、ApoM/S1P には抗アポトーシス作用があることが考えられたが、血小板数や PTAH 染色、PAI-1 濃度を検討したところ、ApoM/S1P には、抗血栓作用がある可能性も示唆された。

【目 的】

本研究では、私の先行論文(Thromb Haemost. 2018 Jun;118(6):1021-1035.)より示唆された、ApoM/S1P の抗血栓作用の可能性について、「HDL の抗血栓作用は ApoM/S1P に(少なくとも部分的には)依存する」という仮説を立て、それを検証し、さらには血栓症、DIC の分野において医療応用する架け橋を作ることを目的とした。

【方 法】

① ApoM/S1P の凝固機能に対する影響
② ApoM/S1P と Netosis の関係
③ ApoM を血栓症(特に DIC)の病態に治療的に応用できる可能性について、主に疾患モデルマウスを用いた動物実験により、検討した。

【結 果】

① ApoM/S1P の凝固機能に対する影響
ApoM 欠損マウス、ApoM を、アデノウイルスを用いた過剰発現させた ApoM 過剰発現マウスでは、コントロールマウスと比較して、定常状態では PT、APTT、血小板数が相違なかった。リポポリサッカライド誘導敗血症モデルマウスにおいては、ApoM 欠損マウスにおいて血小板数の減少が進み、ApoM 過剰発現マウスにおいて血小板数の減少が抑えられていたが、一方で、PT、APTT は、ApoM 欠損マウスにおいて延長が阻害され、ApoM 過剰発現マウスにおいて延長が亢進するという一見矛盾した結果が得られた。そこで、より純粋な DIC モデルである組織因子誘導 DIC モデルマウスを用いて検討したところ、ApoM 欠損マウスにおいては、PT、APTT の延長が亢進し、血小板数減少も進行するという、ApoM は抗 DIC 作用があることを示唆する結果が得られた。

リポポリサッカライド誘導敗血症モデルマウスにおける PT、APTT の奇異的な変化について、凝固因子自体を測定することにより検討した。その結果、トロンビン、プロトロンビン濃度が、リポポリサッカライド投与有無に関わらず、ApoM 欠損マウスでは増加し、ApoM 過剰発現マウスでは減少していることが分かった。

② ApoM/S1P と Netosis の関係

ApoM の抗 DIC 効果の機序として、DIC の発症機序として注目されている Netosis と ApoM/S1P の関係に着目して研究を行った。その結果、ApoM 欠損マウス、ApoM 過剰発現マウスでは、リポポリサッカライド誘導敗血症モデルマウスにて、Netosis マーカーである血漿 DNA 濃度、血漿ヒストン H3 濃度が、それぞれ上昇、低下しており、ApoM は Netosis を抑制する可能性が示唆された。さらにその詳細の機序として、ApoM は S1P 依存的にヒストン H3 のシトルリン化を抑制することが考えられた。

また、ApoM 欠損マウスに、ヒストンを静注して、Netosis を引き起こし、その後の生存率、臓器障害について検討したところ、ApoM 欠損マウスでは、ヒストン投与後の生存率が大幅に悪化しており、血小板数のさらなる低下がみられた。また、AST、ALT、クレアチニンといった臓器障害マーカーの上昇が増長されていた。

③ ApoM を血栓症 (特に DIC) の病態に治療的に応用できる可能性

最後に、ApoM が DIC に対して治療的応用ができるか、リコンビナント ApoM をリポポリサッカライド誘導敗血症モデルマウスに投与することにより検討した。その結果、リコンビナント ApoM 群ではコントロール群と比較して、血小板数の低下抑制、凝固因子の低下抑制、腎障害、肝障害の軽減、血漿 DNA の上昇抑制といった、抗 DIC 作用、抗多臓器不全作用がみられた。

【考 察】

本研究結果より、ApoM/S1P には、抗 DIC 作用があることが示唆された。また、その一方で、定常状態においては、ApoM/S1P は、トロンビン、プロトロンビンを負に制御している可能性が示唆された。このことは、定常状態では、ApoM/S1P は抗血栓作用を持つ可能性を示唆しており、今後の静脈血栓モデルなどを用いた検討が必要である。

また、ApoM/S1P はヒストンのシトルリン化を抑制することにより、Netosis を抑制する可能性が分かった。なぜ、ヒストンのシトルリン化が抑制されるか、については現在検討を継続中ではあるが、蛋白質のシトルリン化は自己免疫疾患との関係も報告されており、本研究成果が DIC、血栓症のみでなく、広範囲の疾患に応用できる可能性がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の臨床的意義は、HDL の多面的効果のうちの抗血栓作用を ApoM/S1P に着目することにより、臨床応用できる可能性を示唆できたことである。すなわち、さらなる臨床研究などが必要であるが、ApoM を測定することにより、DIC およびそれに続発する多臓器不全の予後について、さらには治療方針についての情報が得られる可能性、さらにはリコンビナント ApoM を用いることにより、HDL の抗血栓作用を未だアンメットニーズの大きい DIC の分野において、治療医学的に応用できる可能性が示唆された。

【参考・引用文献】

Kurano M, Tsuneyama K, Morimoto Y, Shimizu T, Jona M, Kassai H, Nakao K, Aiba A, Yatomi Y. Apolipoprotein M Protects Lipopolysaccharide-Treated Mice from Death and Organ Injury. *Thromb Haemost.* 2018 Jun;118(6):1021-1035.