

小委員会名 : **Vascular Biology** 血管生物学

報告者名 : 藤井 聡

連絡先 :

〒060-8648 札幌市北区北 14 条西 5 丁目

北海道大学病院検査・輸血部 藤井 聡

電話 011-706-7784 / FAX 011-706-7784

E-mail: sfujii@huhp.hokudai.ac.jp

開催日 : 2024 年 6 月 25 日 (火曜日)

開催時間 : 1630-1830

委員会構成

Chair (New) Kimberly Martinod (Belgium)

Co-Chair Coralie Guerin (France)

Co-Chair Yohei Hisada (USA)

Co-Chair Chloe James (France)

Co-Chair Constantino Martinez (Spain)

Co-Chair Ruben Bierings (Netherland)

Co-Chair Shrey Kohli (Germany)

Co-Chair Adela Constantinescu-Bercu (United Kingdom)

Vascular Biology (血管生物学) のセッションは 2024 年 6 月 25 日火曜日 1630-1830 (日本時間 6 月 25 日火曜日 1830-2030) に現地会場で開催された。はじめに Chair の Kimberly Martinod (Center for Molecular and Vascular Biology, Department of Cardiovascular Sciences - KU Leuven, Belgium)が、「新たに Co-Chair を募っており、そのうち 1 名は Reach the world 枠である。該当する国々の研究者は積極的に応募してほしい。」とアナウンスした。その後、Martinod は活動報告として ISTH 機関誌である The Journal of Thrombosis and Haemostasis (JTH)に SSC vascular biology から、2023 年 SSC 以降に新しく 2 編の論文が発行されたことを紹介した。1 編は Results of an international survey about methods used to isolate human endothelial colony-forming cells (ECFCs): Guidance from the Scientific and Standardization Committee on Vascular Biology of the International Society of Thrombosis and hemostasis で

著者は Adeline Blandinieres らである (J Thromb Haemost 2023; 21: 2611-2619)。血管内皮コロニー形成細胞 (endothelial colony-forming cell, ECFC) を定量し脈管形成の特徴を評価することは血管疾患の研究や再生医療の戦略策定に重要である。Vascular biology SSC はこれまで ECFC の培養方法について扱ってきたが標準化はなされていなかった。今回、SSC で ECFC の分離と培養に関する専門家間の意見の一致をみた。2019 年 ISTH で提案された質問票を用いて世界 10 か国 21 人の専門家の調査を行った。ECFC の分離と培養の技術的側面を中心に一般的な言明の一致をみた。一方で ECFC のコロニーの定義、定量、培養期間や継代数などによる細胞の加齢の推定については専門家の意見は広く分散した。今回の調査は、臨床研究を行い得られた結果の頑健性を担保するための、厳密な標準化、得られる結果の多施設による比較、分離と培養の作業の妥当性確認に関する未だ対処されていないニーズがあることを示している。この目的で、臍帯や成人末梢血からの ECFC の分離と増殖の標準化されたプロトコールを提案している。もう一編は Comparison of assays measuring extracellular vesicle-tissue factor in plasma samples: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Vascular Biology で著者は Amandine Bonifay らである (J Thromb Haemost 2024 Jun 24;S1538-7836(24)00367-2. doi: 10.1016/j.jth.2024.05.037.)。組織因子 (tissue factor, TF) を発現する細胞外小胞 extracellular vesicle (EV) は凝固第 VII/VIIa 因子と結合し凝固を開始できる。TF を発現する凝固促進性 EV は敗血症、新型コロナウイルス感染症、がん患者等の循環血中に検出される。EV の TF 活性/抗原を測定するために研究室内のアッセイあるいは市販のアッセイを使用可能である。しかし、これらのアッセイ間の比較はほとんどなされてこなかった。SSC はこれらのアッセイの感度、特異度、再現性を比較した。健常人から乏血小板血漿を調製し、ヒト母乳から調製した EV、ないし TF 陽性あるいは陰性の培養細胞から調製した EV を添加した。また、リポ多糖体で刺激したヒト血液より調製した血漿を作製した。これらの血漿の EV の TF 活性/抗原を 21 の研究室で測定した。EV の TF 活性/抗原測定値はアッセイ法により大きなばらつきがあった。活性測定法は抗原測定法に比べ感度および特異度は高かった。さらにアッセイ内やアッセイ間に大きなばらつきを認めた。抗 TF 遮断抗体や免疫捕獲を用いた機能測定法はもっとも感度と特異度が高かった。免疫捕獲を用いた活性測定法は、高速遠心分離で単離した EV を用いた測定法よりも変動係数は小さかった。したがって EV の TF 測定には、抗 TF 抗体存在下の機能測定法を推奨するとした。Martinod は SSC 活動の現況として、冠動脈疾患における in vivo での血小板活性化のバイオマーカーのメタ解析の結果の報告、およびヒト血漿検体での好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular trap,

NET) の測定法に関する報告が SSC よりなされるとした。内皮機能障害 (Shrey Kohli 担当) および心血管疾患での microRNA (Constantino Martinez 担当) についての調査も進行中であり、今回の SSC では内皮機能障害の調査について取り上げるとアナウンスした。

引き続き NET セッションとなり、米国の Frederik Denorme (Washington University, St. Louis, Missouri) が Intravascular contributions of NETs in acute stroke という演題名で講演した。脳卒中にはたす NET の役割の観点より、動物実験の結果から脳卒中の病態解明に挑んでいる研究の一端を紹介した。脳血管疾患の病態において、微生物を殺菌する防御機構として血栓形成など止血メカニズムが病原体の捕獲などに寄与する場合をまとめた immunothrombosis (免疫血栓) のはたす役割が注目されている。動物実験では、血流の保たれた脳組織に好中球は少量しか存在しない。脳虚血により血流が梗塞域で停止し、再灌流時に虚血領域に血流の回復と共に多くの好中球が浸潤する。好中球浸潤により微小循環血流量は低下し脳組織の障害は悪化する。虚血傷害により内皮細胞はフォンビルブランド因子 von Willebrand factor (VWF) を放出し、血小板は補足され活性化される。活性化した血小板は P-セレクチンやホスファチジルセリンを発現し好中球-血小板の相互作用は増加する。活性化血小板は high mobility group box-1 (HMGB-1) を放出する。HMGB-1 は好中球と結合して NET 放出に至る。血管内の NET はさらに好中球や血小板、免疫担当細胞を捉え、微小血栓形成に至り神経障害を加速する。ヒトにおいても、虚血性脳卒中患者の組織で NET を形成する好中球を脳組織に認める。また患者血漿中の NET のバイオマーカーの上昇は予後不良と関係しているという。脳卒中患者ではさらに、血漿や血小板表面の HMGB-1 が増加していた。脳卒中急性期には血小板が、NET をもたらす HMGB-1 の主要な源である。マウスでは血小板の枯渇ないし血小板特異的 HMGB-1 ノックアウトにより血漿の HMGB-1 や NET レベルは低下した。次に近年報告された neonatal NET-inhibitory factor (nNIF) の効果を検討した。nNIF 投与マウスでは脳梗塞の領域は縮小し、神経運動機能は長期的に改善した。nNIF は NET 形成を特異的に低下させたものの、脳梗塞にみられる好中球浸潤は抑制しなかった。nNIF は糖尿病マウスや高齢マウスで脳梗塞の予後を改善した。また、脳卒中発症 1 時間後に投与しても効果を認めた。これらのことより脳卒中で NET は重要な役割を果たし、nNIF の脳卒中における治療薬としての検討を期待するとした。フロアからは将来展望について質問があった。まだ少数患者での検討なので症例数を増やすこと、脳卒中患者での NET 形成の時系列を明らかとし、nNIF 投与が有効となる時間ウインドウを明らかにしたいと回答していた。また、nNIF につ

いて大動物での検討も必要となると回答していた。脳卒中において NET が治療標的となる可能性を示したことで今後の展開が楽しみである。また、Martinod と Denorme のグループは 2023 年に蛋白質やペプチド内のアルギニンシトルリンに置換する酵素である protein arginine deiminase 4 (ペプチドアルギニン脱イミノ化酵素 PAD4) が好酸球による細胞外トラップ (eosinophil extracellular traps, EET) に関与し、PAD4 阻害は EET 形成を抑制することを報告している。PAD4 抑制薬の抗血栓作用にも期待がもてると感じた。防御機構として血栓形成など止血メカニズムが病原体の捕獲などに寄与する免疫血栓というポジティブな概念について、今後の研究の成果がおおいに期待できる。

次に循環血管内皮細胞 (circulating endothelial cells, CEC)/ ECFC のセッションに移った。Ruben Bierings (Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands) が ECFC 不均一性についてコメントした。患者由来 ECFC を用いてフォンビルブランド病 (VWD) のような血管疾患の病態を調べることができる。一方、健常人由来の ECFC でも形態、VWF の産生能や分泌能、細胞増殖能などで不均一性は認められている。したがって ECFC を用いて病態を解析するには不均一性についての認識が必要となる。したがってオランダの Sebastiaan Laan らの研究 (SYMPHONY consortium) では健常人由来の ECFC の表現型と遺伝子発現の違いを検討している。16 名の健常人より得られた 34 個の ECFC クローンを解析している。増殖能、遊走能、炎症にかかわる遺伝子の発現や上皮-間葉細胞分化転換の観点から 2 個の大きな集団に分類された。小型の ECFC では Weibel-Palade body (バイベル・パラデー小体) の数は多く、形態も異なり、遊走能も高かったという。SSC では転写プロファイルにもとづいて健常人由来 ECFC の標準化をはかる計画であるとした。

Stijn Groten (Sanquin Research, Amsterdam, the Netherlands) は Unbiased whole proteome analysis in ECFCs and endothelial cells というテーマで ECFC や内皮細胞の機能的特徴を明らかにするための全プロテオーム解析について発表した。血管内皮細胞は血管炎症の進展に重要な役割を果たしている。血管内皮細胞のサイトカイン産生反応を統合的に解析した。TNF α と IFN γ 刺激は炎症プロテオームに特異的なシグネチャーを誘導したという。これらには補体蛋白質、主要組織適合性複合体、分泌型サイトカインなどがあつた。発表内容は未だ途中のもので、整理すべき点の多い印象で、今後の展開を期待させる内容であつた。

Shrey Kohli (Leipzig University, Leipzig, Germany) は Overview of EC dysfunction characteristics and introduction to survey という演題で発表した。内皮機能障害は心血管系の表現型や形態に関与している。これまで内皮機能障害の研究は一酸化窒素に情報伝達やレドックス状態の調節に焦点をあててきた。しかし、内皮の表現型や炎症状態は器官や疾病特異的に異なると考えられる。さらに、内皮細胞の単一細胞トランスクリプトームアトラスは不均一性を明らかにした。オミックスのデータやマイクロ流体工学の方法も内皮細胞の表現型の多様性や不均一性を強く示している。したがって、内皮機能の特徴を明らかにするための多重パラメーターによるアプローチに対する意見の一致が必要となる。患者診療においては内皮機能検査、リスク評価のバイオマーカー、治療指針などで合意声明がある。同様に、インビトロやインビボで内皮機能障害を研究するために、多重パラメーターによるアプローチに適した最低限の報告ガイドラインの標準化が必要である。SSC では研究者の経験に基づいた結果報告のガイドラインを作成することを目的として調査を行うことにした。世界中で使われている技術、およびその技術による種々の器官の内皮機能障害研究の再現性を概観する。調査項目として

○ 内皮機能研究対象としている器官は何か。腎臓、肝臓、心臓、脳、大血管、舌、胃腸、脾臓、膵臓、肺、骨、リンパ系、筋、眼、睪丸・精巣、精囊、前立腺、脂肪、胎盤などが選択肢にある。

○ 多重パラメーターによるアプローチが内皮機能障害研究に必要であり、かつ適していると同意するか。

○ 研究は分子マーカーの評価、機能の解析のいずれか。

○ 研究方法はいずれか。遺伝子発現、蛋白発現、ELISA、フローサイトメトリー-FACS 解析、密着結合 (タイトジャンクション tight junction) 解析、経内皮電気抵抗 (TEER) 測定を用いた機能評価、バリア機能の評価、大動脈リングを用いた生体外での解析、血管新生アッセイ、内皮-間葉細胞分化転換、一酸化窒素 NO アッセイ、商用ベースの内皮機能評価、細胞粘着アッセイ、血小板活性化と凝固パラメーターなどが選択肢にある。

○ 以下のいずれの方法が包括的で実行可能な内皮機能評価方法と考えるか。

分子マーカー評価のみ

機能評価のみ

分子マーカー評価を主体として機能評価の情報を少なくとも一方法

機能評価を主体として分子マーカー評価を少なくとも一方法

分子マーカー評価と機能評価は同様に重要

○ 内皮機能障害を評価する下記のアッセイを重要と思う順番に並べなさい。

遺伝子/蛋白質発現、ELISA、フローサイトメトリーFACS、密着結合の解析、経内皮電気抵抗測定、バリア機能の透過性アッセイ、生体外での大動脈リングの解析、血管新生のアッセイ、内皮-間葉細胞分化転換の評価、比色法による一酸化窒素のアッセイ、一酸化窒素アッセイ以外の市販の内皮機能アッセイ、細胞接着アッセイ、血小板活性化や凝固パラメーターが選択肢にある。

○ 内皮機能障害を評価する下記のアッセイを実行が容易と思う順番に並べなさい。選択肢は上記と同じ。

○ 内皮機能障害を評価する下記のアッセイを安価と思う順番に並べなさい。選択肢は上記と同じ。

○ 内皮機能障害を評価する下記のアッセイを高価で略したいと思う順番に並べなさい。選択肢は上記と同じ。

○ 上記以外の内皮機能障害評価に有用な方法をあげてください。

Q&A では転写プロフィールにもとづいた ECFC 標準化の計画への reach the world 国からの調査へ参加希望する場合の経済的負担について質問があった。

「Reach the world 枠は 2 枠あり、これらの研究室が標準化作業に参加する場合は、試薬代や輸送費などに ISTH からの補助があるので応募してほしい」と回答された。インターネット上の調査は 2024 年末まで継続予定であり、回答した研究室から実際の内皮機能障害に関わるアッセイ報告の標準化作業に参加する施設が選ばれるという。

次に EV に関するセッションが行われ、Dakota Gustafson (Queen's University, Ontario, Canada)が MISEV2023 and MIBlood-EV update というテーマで MISEV2023 ガイドラインのアップデートと International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)との共同研究である MIBlood-EV 研究の最近の状況について報告した。MIBlood-EV は Minimal information to enhance the quality and reproducibility of blood extracellular vesicle research を表す技術ノートである。血液は EV 研究で最も頻繁に使用される体液である。血液サンプルや、血漿ならびに血清などの派生物の組成はドナーに依存するだけでなく、収集方法や製剤方法にも影響される。また、リポ蛋白、残存する組織や血小板は測定の実現性に影響する。EV 研究でも測定前プロセスを含め標準作業手順の開発が重要である。血液 EV 研究の実現性を改善するため ISEV の血液 EV 作業部会は 研究結果の報告の標準化のために採血方法と血液製剤作成手順、血漿と血清サンプルの質に関する報告が必要である。詳細な情報収集により作業手順の有効性や、作成された血漿や血清サンプルの交絡因子を明らかにすることが出来る。情報収

集のため ISEV の血液 EV 作業部会は Minimal Information for Blood EV research (MIBlood-EV) というツールを作成した。このツールは測定前プロセスでの血漿や血清の作成に使用されたプロトコルや血液製剤の質の評価に使われたアッセイの情報を記録し報告する。このツールは各研究室で作成された作業手順書の変更を必要とせず、既存のデータベースに実装可能である。したがってメタ分析を介して測定前プロセスの最適化をエビデンスに従って達成できるようになる。血漿や血清サンプルの質向上により、(1) EV 研究のためのバイオバンクの質を高め、(2) バイオバンクや研究室間の血漿や血清サンプルの交換を促し、(3) 研究室間の EV 研究の協働を促進し、(4) 相互評価の質向上に繋がるという。

MISEV2023 は Minimal information for studies of extracellular vesicles: From basic to advanced approaches を表す。EV は由来となる細胞の状態を反映し、他の細胞の機能や表現型を変更する。バイオマーカーや治療目的での可能性があり近年盛んに研究されている。一方 EV の分類や他の細胞外分子との分離、特性評価や機能の研究に課題が残り、ISEV は MISEV2014 and MISEV2018 で EV 研究に必要な情報を提供してきた。MISEV2023 では細胞培養液、体液、組織からの EV の単離や特性評価に関する研究方法とその利点と欠点を研究者に伝えることを目的に作成された。MISEV2023 は EV の放出や取り込み、生体内での EV 研究方法にも踏み込んでいる。ISEV のタスクフォースや 1,000 名以上の研究者からのフィードバックを集めている。

Eric Boilard (Université Laval, Quebec, Canada) は Megakaryocytes as a source of extracellular vesicles in an immune response というタイトルで血小板や巨核球由来の EV と免疫応答の関わりについて、特に新型コロナウイルス感染症 Coronavirus disease 2019 (COVID-19) に焦点をあてて講演した。新型コロナウイルス Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) に感染した細胞はウイルス粒子と EV を同時に放出する。またホストの感染細胞由来の組織因子は血小板を活性化するとした。COVID-19 では血小板は過剰に活性化する。SARS-CoV-2 によって血小板が活性化する機構については、ウイルス粒子によるものか、感染した細胞によるものか不明点が多かった。Boilard らのグループは SARS-CoV-2 そのもの、ないし感染した肺上皮細胞が健常人血小板を活性化するか、また EV を放出するかを検討した。SARS-CoV-2 および精製したスパイク蛋白質は血小板を活性化しなかった。一方、感染した細胞由来の組織因子は血小板を活性化した。活性化には、凝固因子 FX, FII, FVII を含む血漿を少量必要とした。トロンビン生成、および血小板に発現するプロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor, PAR)-1 および PAR-4 の活性化を伴った。また、ウ

ウイルス粒子と EV を電子顕微鏡で認めた。サイズ排除クロマトグラフィーでは組織因子活性はウイルス粒子か EV に関連して見つかった。マウスの COVID-19 モデルでは組織因子の mRNA の上昇を肺で認め、重症の COVID-19 患者の血漿では組織因子活性の亢進を認めた。これらの結果をもとに Boilard は SARS-CoV-2 に感染した細胞の組織因子活性はトロンビンを活性化させ、トロンビンが血小板の PAR に情報を伝達すると結論した。この経路を阻害することにより COVID-19 患者の血小板活性化や凝固系活性化を調節できる可能性があるとした。また、巨核球は骨髄に存在して血小板産生に関与するだけでなく、肺、胎児の肝臓、卵黄嚢、脾臓、さらに循環血中にも認められる。単一細胞の遺伝子発現解析により、巨核球は不均一な集団で、血小板産生に関わる細胞、免疫に関わる細胞、また幹細胞が組織中に局在する微小環境で幹細胞の維持や機能制御に関わる細胞などから構成されることが明らかになってきたという。特に肺の巨核球は免疫にかかわるものが多く、トル様受容体 Toll-like receptor (TLR)2, TLR4, CD74, 主要組織適合性遺伝子複合体 Major histocompatibility complex II (MHCII) などが高発現しており、刺激によりサイトカインを産生する。肺が微生物叢や環境ストレスの影響を受けることに関わっているという。特に重症の COVID-19 患者では循環血中の巨核球はカルプロテクチン (S100A8, A100A9)、TLR2, TLR4 や炎症性サイトカインの発現が亢進しているという。SARS-CoV-2 陽性の巨核球はウイルス陽性の血小板を産生している可能性があるとした。

EV の Proteomics の多様性について Luisa Weiss (University College Dublin, Dublin, Ireland) が講演した。直接作用型経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulant, DOAC) のリバロキサバンは抗凝固作用に加え、抗炎症作用や心血管系保護作用を有することが知られているものの、詳細な機序は不明である。EV は静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism, VTE) や炎症に関連することが知られている。したがって VTE 患者でバロキサバンが循環血液中の EV に及ぼす影響を検討した。発表者らは既に、リバロキサバンあるいはワーファリンを投与されている非弁膜症性心房細動患者において EV のバイオシグニチャーが異なっていることを見出している。そこで VTE 患者で循環血中 EV のプロテオームの分析結果が異なるかを検討した。リバロキサバンあるいはワーファリンを投与されている VTE 患者の血漿 EV よりタンデム質量分析法によりプロテオーム解析を実施した。定量された 182 個の蛋白質で、6 個の蛋白質はリバロキサバンを投与されている患者のみに見出されるか、リバロキサバンを投与されている患者で増加していた。これらの蛋白質は興味深いことに、炎症経路や凝固系の負のフィードバックに関与する蛋白質であった。したがって EV のプロテオームのシグネチ

ヤーはリバロキサバンの抗凝固作用と抗炎症作用の可能性を反映すると考えられるという。ワーファリンと比較してリバロキサバンには多面的な効果があると考えられるとした。EVのプロテオーム解析はリキッドバイオプシーに用いられうる可能性を示唆する。発表は魅力的な説を含んでいたが、対象患者を増やして更なる研究を必要とする印象であった。

2024年度の血管生物学のSSCの発表では2編のJTH論文というアウトプットが示された。若い研究者らによって、NET、内皮細胞、細胞外小胞について最新の成果が発表され、活発な討論がみられた。粗削りや未整理なデータも散見されたものの会場には活気がみられ、各種測定法や評価手順の標準化にもとづいたこれからの研究の発展がおおいに期待できる内容であった。2025年米国ワシントンDCのISTHでの血管生物学SSCのさらなる発展が楽しみである。