

博士論文

敗血症 DIC 患者におけるバイオマーカーの開発および評価研究

Development and Evaluation of Biomarkers in Sepsis-associated  
Disseminated Intravascular Coagulation

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である

博士（薬学）

2015年9月

内藤 克紀

Development and Evaluation of Biomarkers in Sepsis-associated  
Disseminated Intravascular Coagulation

September 2015

Katsuki Naitoh

## 略号表

本論文中に用いた略号および略記号を以下に示した

BSA	bovine serum albumin
CRP	collagen related peptide
CV	coefficient of variation
DIC	disseminated intravascular coagulation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FcR	Fc receptor
FDP	fibrinogen degradation product
FITC	fluorescein isothiocyanate
GPVI	glycoprotein VI
HRP	horseradish peroxidase
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
LPS	lipopolysaccharide
MFI	mean fluorescence intensities
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDMP	platelet derived microparticle
sCD14	soluble CD14
SD	standard deviation
SE	standard error
sGPVI	soluble glycoprotein VI
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SPR	surface plasmon resonance
sP-selectin	soluble P-selectin
TLCK	N-alpha-tosyl-L-lysiny-chloromethylketone
TMA	thrombotic microangiopathy
TMB	tetramethylbenzidine

Recombinant GPVI の一覧を下に示した

- |                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| ✓ hGPVI-His     | Human GPVI-His                        |
| ✓ hGPVI-Fc      | Human GPVI-human Fc                   |
| ✓ hGPVI-mFc     | Human GPVI-mouse Fc                   |
| ✓ mGPVI-Fc      | Mouse GPVI-human Fc                   |
| ✓ mGPVI(hD1)-Fc | Mouse GPVI (human domain I)-human Fc  |
| ✓ mGPVI(hD2)-Fc | Mouse GPVI (human domain II)-human Fc |

## 目次

緒論.....	1
第1章 Presepsin 測定系の改良	
第1節 序論.....	4
第2節 実験方法.....	6
1-2-1. Materials.....	6
1-2-2. Recombinant presepsin の調製.....	6
1-2-3. Presepsin アッセイ ～two-step ELISA～.....	7
1-2-4. Presepsin アッセイ ～one-step ELISA～.....	7
第3節 結果.....	8
1-3-1. Presepsin 測定系の改良およびバリデーション.....	8
1-3-2. 相関解析 (one-step ELISA vs. two-step ELISA) .....	8
第4節 考察.....	10
第2章 Anti-GPVI antibody (抗 GPVI 抗体) の作製と抗原特異性の解析	
第1節 序論.....	11
第2節 実験方法.....	12
2-2-1. Materials.....	12
2-2-2. Recombinant GPVI の作製.....	13
2-2-2-1. Human GPVI-human Fc (hGPVI-Fc) および Human GPVI-mouse Fc (hGPVI-mFc) の調製.....	13
2-2-2-2. Human GPVI-His (hGPVI-His) の調製.....	13
2-2-2-3. Mouse GPVI-human Fc (mGPVI-Fc) の調製.....	13
2-2-2-4. Human/Mouse chimera GPVI (mGPVI(hD1)-Fc, mGPVI(hD2)-Fc) の調製.....	14
2-2-3. 抗 GPVI 抗体 (7S1, 10S2, 19D1, および 21D1) の作製.....	14
2-2-4. 抗 GPVI 抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング.....	14
2-2-5. ヒト洗浄血小板の調製.....	15
2-2-6. 認識ドメインの解析 (エピトープ解析) .....	15
2-2-7. Flow cytometry による解析.....	15
2-2-8. Surface plasmon resonance (SPR) による解析.....	16

第3節 結果.....	16
2-3-1. 抗 GPVI 抗体 (7S1, 10S2, 19D1, 21D1) の作製.....	16
2-3-2. 認識ドメインの解析 (エピトープ解析) .....	16
2-3-3. 膜型 GPVI に対する結合解析.....	17
2-3-4. 可溶型 GPVI に対する結合解析.....	17
第4節 考察.....	20
第3章 Soluble GPVI (sGPVI) 測定系の樹立	
第1節 序論.....	22
第2節 実験方法.....	23
3-2-1. Materials.....	23
3-2-2. Sandwich ELISA 組合せのスクリーニング .....	23
3-2-3. 標識抗体 (10S2-HRP, 21D1-HRP) の作製 .....	24
3-2-4. sGPVI 測定系 (7S1/10S2-HRP) .....	24
3-2-5. sGPVI 測定系 (19D1/21D1-HRP) .....	24
3-2-6. 血小板由来 sGPVI の調製.....	25
3-2-7. Western blotting による sGPVI の検出.....	25
第3節 結果.....	26
3-3-1. 競合反応による抗体の組合せの検討 .....	26
3-3-2. Recombinant sGPVI に対する反応性の比較.....	27
3-3-3. 血小板由来 sGPVI に対する反応性の比較 .....	27
第4節 考察.....	30
第4章 カニクイザルを用いた sGPVI の評価研究	
第1節 序論.....	31
第2節 実験方法.....	32
4-2-1. Materials.....	32
4-2-2. Recombinant cynomolgus GPVI (cynomolgus GPVI-His) の調製 .....	32
4-2-3. カニクイザル洗浄血小板の調製.....	32
4-2-4. カニクイザル血小板由来 sGPVI の調製 .....	32
4-2-5. LPS 誘発 カニクイザル血小板減少モデル (DIC 様モデル) .....	33
4-2-6. カニクイザルを用いた sGPVI の pharmacokinetics 解析 .....	33

第3節 結果.....	34
4-3-1. カニクイザル GPVI のクローニングとアミノ酸相同性解析.....	34
4-3-2. カニクイザル GPVI の交差反応性.....	34
4-3-3. LPS 誘発カニクイザル血小板減少モデルにおける血小板マーカー の比較.....	36
4-3-4. カニクイザルを用いた sGPVI の pharmacokinetics 解析.....	38
第4節 考察.....	39
総括.....	41
謝辞.....	43
参考文献.....	44

## 緒論

バイオマーカーとは「通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性」と、アメリカ国立衛生研究所(NIH)により定義された。過去にはバイタルサイン（血圧、心拍数等）が主に使用されていたが、近年では、生化学検査、血液検査、腫瘍マーカーなどの各種臨床検査値の他に、画像診断データ等もバイオマーカーとして使用されている [1]。バイオマーカーは目的に応じて複数が存在し（Table 1）、その開発は医療の質の向上、『個別化医療』の実現、および医薬品開発における成功率の改善につながると期待されている [2, 3]。本研究では『敗血症 DIC におけるバイオマーカー』をテーマに、基礎疾患（敗血症）と、重症化（播種性血管内凝固症候群；Disseminated Intravascular Coagulation (DIC)) に移行する際のバイオマーカーの開発および評価を行った。

Table 1 バイオマーカーの種類

種類	特徴・用途
診断マーカー diagnostic marker	疾患の診断
予後マーカー prognostic marker	疾病の経過を予測
薬力学マーカー pharmacodynamics marker	薬剤の作用機序の評価
予測マーカー predictive marker	治療効果の予測
代替マーカー surrogate marker	臨床試験のエンドポイントを代替
モニタリングマーカー monitoring marker	疾患の判断、治療に対する反応を観察
患者層別マーカー stratification marker	特定の標的分子を発現している患者を選別
安全性・毒性マーカー safety/ toxicity marker	薬物の安全性、毒性を評価

敗血症は病原体の感染によって引きこされた全身性炎症反応症候群（Systemic inflammatory response syndrome ; SIRS）である [4]。重症化に伴い、DIC、臓器障害、およびショック症状（敗血症ショック）を引き起こし、やがては死に至る（Figure 1）。重症化後の死亡率は約 6 割と非常に予後が悪く、早期診断および早期治療介入が必須な疾患である。SIRS における感染・非感染の判定は、その後の治療方針を決定する上で重要な役割を果たす。しかしながら、敗血症診断は医師の経験に基づくものが多く、また、診断補助で使用されているバイオマーカー（Procalcitonin、C-reactive protein および IL-6）は炎症由来マーカーであるため、感染の有無を判定することは困難である [5-7]。また、血液培養検査（患者の血液を培養することで感染を判定



する方法)は感染の有無のみならず、病原菌を特定できる有用な方法である。しかしながら、培養操作でのコンタミネーションのリスクと、診断に多大な時間を要するといったデメリットがある。感染の有無を迅速に判定できるバイオマーカーは、適切な治療の選択、治療成績の向上、さらには医療費の軽減にも貢献すると考えられる。そのような状況のなかで、2005年にShirakawaらが初めて報告したpresepsinは、感染特異的なバイオマーカーとして注目されている [20]。PresepsinはCD14 (Lipopolysaccharide 受容体)のN末端断片であり、白血球が細菌を貪食する過程で産生される [8]。その産生メカニズムからも、感染特異的なバイオマーカーであることが示唆されている [8, 9]。

播種性血管内凝固症候群 (DIC)は敗血症、急性白血病、癌を三大基礎疾患とし、全身性で持続性の著しい凝固活性化を引き起こすことで、全身の細小血管内に微小血栓が多発する重篤な病態である [10]。DICの診断は、血小板数の低下、血中のフィブリノゲン分解物 (Fibrinogen degradation product ; FDP および D-Dimer)の濃度、プロトロンビン時間の延長、出血の有無、基礎疾患の有無、臓器症状等をスコアリングすることで行う。そのスコアリング方法の違いにより、旧厚生省 DIC 診断基準 (旧基準)、国際血栓止血学会 DIC 診断基準 (ISTH 基準)、日本救急医学会急性期 DIC 診断基準 (急性期基準)の3種類が知られている [11-16]。現時点では旧基準が最も評価の定まった基準であるが、感染症を基礎疾患としたDICに対して感度が悪く、誤診の多さが指摘されている。一方、ISTH 基準および急性期基準は感度が悪く、全ての基礎疾患に対して適用できないといった問題点がある。全てを充足する診断基準が存在しないのが現状である。また、FDP および D-DimerはDIC診断に汎用される血液バイオマーカーである。しかしながら、これらマーカーは血栓の溶解時に産生されるため、線溶抑制型DICに対して感度が低く、さらに早期診断には不向きである。従ってFDPやD-Dimerのみでは限界があり、早期に凝固系の活性化を捉えるマーカーを組み合わせることで診断精度を上げる検討がなされている。

敗血症を基礎疾患としたDIC (敗血症DIC)の病態は、細菌由来のlipopolysaccharide (LPS)がマクロファージや好中球を介して、または直接血管内皮細胞を活性化させることで開始される。活性化された血管内皮細胞から産生された組織因子や血小板活性化因子は、凝固系や血小板を活性化させることで血管内に過剰な血栓を形成し、DIC症状を引き起こす。また、血小板は炎症に関連する受容体を多く発現し、炎症性モジュレーターを産生する分子であることが、近年の研究より明らかとなった [74, 75]。血小板は血栓形成における単なるレスポンドではなく、炎症のメディエーターとして病態の進展に重要な役割を果たしていると考えられる [76]。つまり、血小板の活性化を鋭敏に捉えるマーカーは血栓の有無を判定するだけでなく、炎症反応と血液凝固反応が複雑に絡み合ったDICの病態において、有用なバイオマーカーになる可能性がある。

本研究では『敗血症DIC患者におけるバイオマーカー』をテーマに、敗血症 (基礎疾患)におけるバイオマーカー『Presepsin』と、敗血症から重症化 (DIC)へ移行する際のモニタリングマーカーとして『Soluble glycoprotein VI ; sGPVI』に着目し、測定系の開発およびバイオマーカーとしての有用性を評価した (Figure 1)。



Figure 1 敗血症 DIC 疾患における病態の変化とバイオマーカー

第1章では、presepsin 測定系の one-step ELISA への改良を行った。第2章では、sGPVI の測定系を構築するために4種類の抗 GPVI 抗体を作製し、抗原認識部位（エピトープ）の解析および抗原特異性を評価した。第3章では2種類の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を作製し、sGPVI の反応性を比較した。そして第4章においては動物実験により sGPVI の血小板活性化マーカーとしての有用性を評価した。

## 第1章 Presepsin 測定系の改良

### 第1節 序論

2005年 Shirakawa らは、敗血症患者の血中に CD14 (LPS 受容体) の N 末端断片が特異的に存在することを見出した [20]。本分子を sepsis の初期に検出されるタンパク質 (Pre+Sepsis+Protein) として、presepsin と名付けた [21]。

一般に敗血症診断マーカーに望まれることは、① 診断の感度および特異度が高いこと、② 感染・非感染を判別できること、③ 病態の重症度を反映すること、④ 産生メカニズムが生物学的に妥当であることが挙げられる。これまでの臨床研究で、presepsin は感染特異的なバイオマーカーであり、その濃度は病態の重症度と相関することが報告された [20, 22-26]。非臨床研究において著者は、presepsin が LPS 惹起ウサギ敗血症モデルでは産生されず、自己の腸内細菌に感染する盲腸結紮穿孔感染モデルにおいて産生されることを見出した [8]。さらに、ウサギ顆粒球に LPS や phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 等の炎症刺激を行っても presepsin の産生は認められないが、zymosan や *Escherichia coli* (*E.coli*) 等の菌体刺激により presepsin の産生が誘導されること。また、この菌体刺激による presepsin の産生は、cytochalasin D (食食阻害剤) や pepstatin A (Lysozomal enzyme 阻害剤) により抑制されることを明らかにした [8]。これらの結果は、presepsin は白血球が細菌を食食・消化する過程で産生されること、さらには、presepsin が炎症マーカーではなく、感染特異的なバイオマーカーであることを示唆している。

しかしながら、初期に開発された presepsin 測定系は two-step ELISA であるため、結果が得られるまで 4 時間を要し、臨床での利用価値は低い [20]。一般に one-step ELISA に改良することでアッセイに要する時間の大幅な短縮が見込めるが、複数のバリエント (Soluble CD14; sCD14) が大量に存在する中で、ある特定のバリエント (Presepsin) のみ認識する one-step ELISA の構築は困難である (Table 2)。通常の two-step ELISA のプロトコールは、① 検体の添加 (抗体-抗原複合体反応)、② 洗浄、③ 検出抗体の添加 (サンドイッチ形成反応)、④ 洗浄、⑤ 検出から成り、サンドイッチされた抗原-抗体複合体を二段階に分けて形成させる。目的のバリエントに対して特異性の高い抗体を①の抗体-抗原複合体形成反応に用いれば、②の洗浄操作で目的外のバリエントは除去されるため、③のサンドイッチ形成反応時には必ずしも特異性の高い抗体を必要とはしない。つまり、特異性の高い抗体 (目的のバリエントのみを認識する抗体) が 1 種類あれば、two-step ELISA は構築可能である。一方、one-step ELISA は、一段階の反応でサンドイッチの形成を行うアッセイ法である。アッセイの途中で洗浄ステップがないため、複数のバリエントが大量に存在するなかで目的のバリエントのみをサンドイッチするためには、特異性の高い抗体 (目的のバリエントのみを認識する抗体) を 2 種類必要とする。本研究では、臨床での利用価値や今後の自動臨床検査機器への搭載を目指し、presepsin 測定系を構成する anti-presepsin 抗体の特異性の解析と、presepsin の one-step ELISA の樹立を検討した。

Table 2 Comparison of one-step ELISA and two-step ELISA.

	One-step ELISA	Two-step Assay
測定原理	固相化抗体の準備 ↓ <u>検体・検出（標識）抗体の添加</u> ↓ 洗浄 ↓ 検出	固相化抗体の準備 ↓ <u>検体の添加</u> ↓ 洗浄 ↓ <u>検出（標識）抗体の添加</u> ↓ 洗浄 ↓ 検出
長所	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 測定に要する時間が短い</li> <li>✓ 臨床測定機器への応用が容易</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 測定系の構築が容易</li> <li>✓ 複数のバリエントが存在する場合、特異性の高い抗体（特定のバリエントのみを認識）は1種類あれば良い。</li> </ul>
短所	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 抗原量が多すぎると反応性が低下する（フック効果）</li> <li>✓ 複数のバリエントが存在する場合、特異性の高い抗体（特定のバリエントのみを認識）が2種類必要。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 測定に要する時間が長い</li> </ul>

## 第2節 実験方法

本章で記載した全ての動物実験は、動物実験倫理委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 承認のもと実施した。

### 1-2-1. Materials

- ✓ Anti-presepsin antibody
  - ◇ F1106-13-3 monoclonal antibody ; (prepared in our laboratory)
  - ◇ S68 polyclonal antibody ; (prepared in our laboratory)
- ✓ C96 MicroWell Plate, Maxisorp ; (Thermo, Cat. No. 430341)
- ✓ Stabilguard ; (SurModics, Cat. No. SG01-1000)
- ✓ TMB One Component HRP Microwell Substrate ; (SurModics, Cat. No. TMBW-1000)
- ✓ COS-1 cell ; (American Type Culture Collection, Cat. No. CRL-1650)
- ✓ pEF-Vector ; (prepared in our laboratory) [27]
- ✓ FuGENE 6. Transfection Reagent ; (Roche, Cat. No. 11 814 443 001)
- ✓ Hybridoma-SFM, powder ; (Life Technologies, Cat. No. 12300-067)
- ✓ Thrombin ; (GE Healthcare, Cat. No. 27-0846-01)
- ✓ Ni-Sepharose High Performance ; (GE Healthcare, Cat. No. 17-5268-02)
- ✓ Q-Sepharose High Performance ; (GE Healthcare, Cat. No. 17-1014-01)
- ✓ Superdex 75 10/300 GL ; (GE Healthcare, Cat. No. 17-5174-01)
- ✓ Interference Check-A Plus kit ; (Sysmex)
- ✓ Interference RF Plus kit ; (Sysmex)
- ✓ Intralipid 20% ; (Frenius Kabi)

### 1-2-2. Recombinant Presepsin の調製

Presepsin (CD14 のアミノ酸配列 1-64 番目までの分子) の組換えタンパク質を調製した。最初にヒトの CD14 をコードする cDNA をクローニングし、アミノ酸配列の 64 番目と 65 番目の間にトロンビン切断サイトを導入した cDNA フラグメント (CD14-Tb) を作製した。次に pEF-Vector における human elongation promoter の下流にあるマルチクローニングサイトに、CD14-Tb をコードする cDNA フラグメントと、His-tag をコードするフラグメントを連続して挿入した。本プラスミドをトランスフェクション試薬 (FuGENE6) で COS-1 細胞に遺伝子導入し、無血清培地 (Hybridoma SFM) にて数日間培養した (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)。上清中に発現した組換えタンパク質 (CD14-Tb-His) は、Ni-カラムを用いた metal chelate affinity chromatography により精製した。引き続き、得られた CD14-Tb-His にトロンビンを反応させ (CD14-Tb-His : thrombin=100 : 1, 22°C, 16

hours)、presepsin 部位と CD14 の C 末部位に切断した。トロンビン処理したサンプルを Q-Sepharose による anion-exchange chromatography と Superdex 75 による size exclusion chromatography に供することで recombinant presepsin を精製した。

#### 1-2-3. Presepsin アッセイ ～two-step ELISA～

Phosphate buffered saline (PBS) で希釈した S68 polyclonal antibody (5 µg/mL) をアッセイプレート (C96 MicroWell Plate, Maxisorp) に固相化し、ブロッキング溶液 (0.1% stabilguard, 0.1% tween20, 3.2% sucrose / PBS) を用いてブロッキング処理を行った。本プレートに、サンプル希釈液 (1% sCD14 吸収血清, 0.1% bovine serum albumin (BSA) / PBS) で希釈調製した recombinant presepsin、sCD14 またはヒト血清を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% tween 20 / saline) にてプレートを洗浄した。次いで、標識抗体希釈液 (2% rat serum、1% mouse serum, 0.1% tween 20 / PBS) で希釈した peroxidase-labeled F1106-13-3 monoclonal antibody を添加し、室温で 2 時間反応させた。反応終了後、洗浄液にて再度プレートを洗浄した。S68 polyclonal antibody と F1106-13-3 monoclonal antibody でサンドイッチされた presepsin は、tetramethylbenzidine (TMB) を基質としたペルオキシダーゼ反応にて検出した。反応は酸を添加することで停止させ、450 nm の吸光度 (対照波長 ; 650 nm) を測定することにより presepsin 量を定量した。

#### 1-2-4. Presepsin アッセイ ～one-step ELISA～

F1106-13-3 monoclonal antibody (5 µg/mL in PBS) をアッセイプレート (C96 MicroWell Plate, Maxisorp) に固相化した後、ブロッキング溶液 (0.1% BSA, 3.2% sucrose / PBS) を用いてブロッキング処理を行った。本プレートにサンプル希釈液 (2% rabbit serum, 0.05% tween 20 in PBS) で適宜希釈した recombinant presepsin、sCD14 またはヒト血清を 25µL 添加し、さらにサンプル希釈液で希釈調製した peroxidase-labeled S68 polyclonal antibody を 75µL 添加した。室温で 1 時間反応させた後、洗浄液 (0.05% tween 20 / saline) にてプレートを洗浄した。S68 polyclonal antibody と F1106-13-3 monoclonal antibody でサンドイッチされた presepsin は、TMB を基質としたペルオキシダーゼ反応にて検出した。反応は酸を添加することで停止させ、450 nm の吸光度 (対照波長 ; 650 nm) を測定することにより presepsin 量を定量した。

## 第3節 結果

### 1-3-1. Presepsin 測定系の改良およびバリデーション

初期に開発された presepsin 測定系は two-step ELISA であるため、結果が得られるまで4時間を要し、救急医療における利用価値は低い。そこで、one-step ELISA の検討を行い、アッセイの改良を行った。また、one-step ELISA の樹立の際に、以下の点を改良した。① アッセイの step 数を変更した (2 step  $\Rightarrow$  1 step)。② 検体の希釈を不要にした。③ 抗 Presepsin 抗体を再検討した。④ 標準品を recombinant presepsin に変更した。検討の結果、アッセイ時間は4時間から1.5時間に短縮することが出来た。

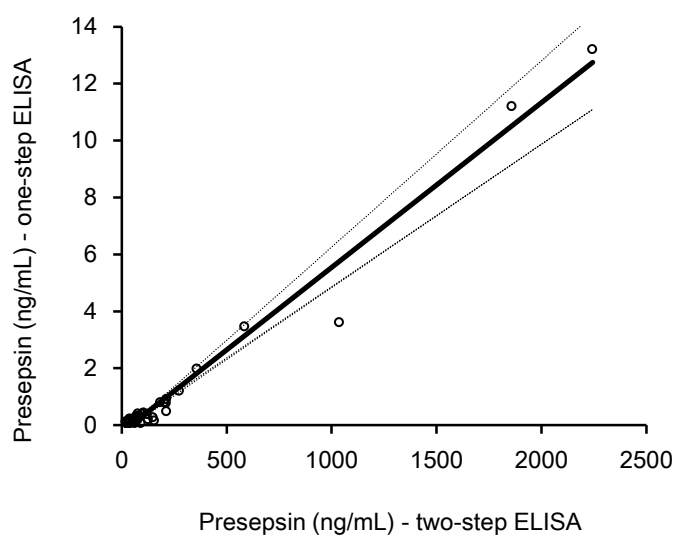
次に、本研究で構築した one-step ELISA の感度、精度、および特性を評価した (Table 3)。presepsin の測定レンジは 0.05-3.0 ng/mL (Recombinant presepsin) であり、さらに sCD14 に対する交差反応性は 0.001% 以下であった。日内誤差は 2 種のサンプル (Presepsin 濃度; 1.00, 1.66 ng/mL) を  $n=8$  で測定することで算出し、coefficient of variation (CV) はそれぞれ 4.2% と 4.4% であった。日間誤差は 2 種のサンプル (Presepsin 濃度; 0.90, 1.69 ng/mL) を 8 回測定することで算出し、CV はそれぞれ 4.1% と 3.5% であった。次に、血液成分がアッセイに与える影響を Interference Check-A Plus kit、Interference RF Plus kit、および Intralipid 20% を用いて検討した。その結果、抱合型ビリルビンは 200 mg/L、非抱合型ビリルビンは 208 mg/mL、ヘモグロビンは 4840 mg/L、リウマチ因子は 500 IU/mL、トリグリセリドは 2000 mg/dL まで添加してもアッセイに影響を及ぼさなかった。次に、アッセイの感度 (Limit of detection; LOD, Limit of quantification; LOQ) を検討した。LOD は、サンプル希釈液 (0 ng/mL) を  $n=10$  で測定した際の吸光度の平均値 (mean) と標準偏差 (Standard deviation; SD) を算出し、0 ng/mL の吸光度の mean + 3SD の値に対応する濃度とした。LOQ は日間誤差の CV が 20% 以下となる最小濃度で算出した。その結果、LOD および LOQ は、それぞれ 0.05 ng/mL と 0.12 ng/mL であった。次に、2 倍、4 倍、8 倍、および 16 倍で希釈した 2 種のサンプル (Presepsin 濃度; 0.73, 0.77 ng/mL) を測定し、直線性試験を実施した。各測定値をプロットして線形回帰分析を行った結果、 $R^2=0.996-1.000$  であった。添加回収率試験は recombinant presepsin をヒト血清に添加することで実施し、回収率は 87-94% を示した。さらに one-step ELISA に特有なフック効果 (サンプル濃度が濃すぎることで反応性が低下する現象) は 192 ng/mL まで認められなかった。これらの結果は、本研究で構築した presepsin の one-step ELISA が特異性、頑健性、再現性に優れたアッセイ系であることを示している。

### 1-3-2. 相関解析 (one-step ELISA vs. two-step ELISA)

構築した one-step ELISA と既存の two-step ELISA を用いて、敗血症患者および正常人血清中の presepsin 濃度を測定し、各アッセイにおける測定値の相関を検討した。その結果、両アッセイは  $R=0.988$  と非常に高い相関を示した (Figure 2)。

**Table 3** Performance characteristics of the one-step ELISA for presepsin measurement.

Parameters	Mode of assessment	Results
Dynamic range	Reactivity for presepsin	0.05-3.00 ng/mL
Cross-reactivity	Reactivity for sCD14	<0.001%
Imprecision		
Within-run	8 replicates of 2 samples in single assay	4.2-4.4%, CV
Between-run	2 samples in 8 consecutive assays	3.5-4.1%, CV
Interference	Conjugated bilirubin	200 mg/L
	Unconjugated bilirubin	208 mg/L
	Hemoglobin	4840 mg/L
	Rheumatoid factor (RF)	500 IU/mL
	Triglyceride	2000 mg/dL
Limit of detection	Mean of zero standard (n=10) + 3SD	0.05 ng/mL
Limit of quantification	Lowest concentration for 20% CV	0.12 ng/mL
Linearity	R <sup>2</sup> of two different serially diluted samples	0.996-1.000
Recovery	% Recovery of two different samples	87-94%
Hook effect	Highest concentration test	192 ng/mL



**Figure 2** Comparison of the one-step ELISA to the two-step ELISA for presepsin.

The presepsin concentrations in the 40 samples were determined by one-step ELISA and two-step ELISA. The method used to compare the two assays was evaluated using Deming regression analysis (Analyse-it). Solid line shows the results of the Deming regression analysis; dashed line, 95% confidence interval.



#### 第4節 考察

本研究では presepsin の one-step ELISA を検討し、アッセイ時間は4時間から1.5時間まで短縮することに成功した。また構築したアッセイは presepsin に対する特異性が高く、再現性および頑健性に優れ、既存のアッセイ (two-step ELISA) とも高い相関性を示した。

敗血症患者の血中 presepsin 濃度が約 1 ng/mL に対して、sCD14 は 10000 倍の約 10 µg/mL も存在する。そのため、presepsin の one-step ELISA を構成する抗 presepsin 抗体は sCD14 に交差反応を示さず、presepsin に対して極めて高い特異性を持つことが要求される。本研究で構築した one-step ELISA の sCD14 に対する交差反応性が 0.001%以下であったことから、測定系に使用した2つの抗 presepsin 抗体 (F1106-13-3 monoclonal antibody および S68 polyclonal antibody) は sCD14 に対して反応せず、presepsin に対して高い特異性を持つことが示唆された。序論にも述べたように、presepsin は CD14 の部分配列 (N 末端断片) である。そのため、本研究で検討した抗 presepsin 抗体は presepsin の特異的な立体構造を認識するか、または CD14 から presepsin に切断された際に出現するエピトープを認識する抗体であると考えられる。

本研究において構築した one-step ELISA は presepsin に対して高い特異性を持ち、さらに、two-step ELISA と比較してアッセイに要する時間を大幅に短縮することが出来た。しかし、2013年2月に発表された「Surviving Sepsis Campaign : International Guideline for Management of Severe Sepsis and Septic Shock : 2012」では、敗血症の治療では、救急外来では来院してから3時間以内、ICU であれば1時間以内に抗菌薬の投与を推奨している [27]。本検討でアッセイ時間は大幅に短縮できたものの、まだ臨床において実用的なレベルではない。しかしながら本研究で得られた基礎データおよび抗 presepsin 抗体の評価は、今後に予定している自動測定機 (臨床検査機器) の開発や、免疫クロマトを用いた POCT 等の開発にも繋がると考えられる。

## 第2章 Anti-GPVI antibody (抗 GPVI 抗体) の作製と抗原特異性の解析

### 第1節 序論

血小板の活性化や血小板機能を測定する方法は、これまでも多数報告されている。血小板膜表面上のマーカータを評価する flow cytometry 法は、血小板特異的な評価が可能であるが、高価な装置と新鮮なサンプルが必要といった欠点もある。血小板凝集能検査 (Platelet aggregation) は血小板の機能評価や抗血小板療法のモニタリングを行うには有用な方法であるが、煩雑な前処理が必要なため、人工的な血小板の活性化が懸念されている [17, 18]。また、血中の可溶性バイオマーカーによる血小板活性化の評価は、安価で簡便な方法である (Soluble P-selectin (sP-selectin)、 $\beta$ -thromboglobulin、platelet derived microparticle (PDMP) 等)。しかしながら、血小板特異性、感度、および採血の影響といった問題から、未だにゴールドスタンダードとなる血小板マーカーは存在しない [19]。そこで本研究では、血小板に特異的に発現する glycoprotein VI (GPVI) に着目し、可溶性 GPVI (Soluble GPVI ; sGPVI) の血小板マーカーとしての可能性を検討することとした。

GPVI は血小板膜上に特異的に発現するコラーゲン受容体である [29]。GPVI を介したシグナルの伝達は、GPVI の細胞内領域にある Src ファミリーキナーゼが、Fc receptor (FcR)  $\gamma$  鎖における immunoreceptor tyrosine-based activation motif のチロシン残基をリン酸化することにより開始される [30]。さらに、血小板が活性化されることにより血小板上の膜型 GPVI が切断され、血中に sGPVI が放出されることが報告されている [31-35]。血小板受容体が切断されることにより、過剰に活性化された血小板機能は抑制されるが、さらに切断された受容体断片はバイオマーカーとして利用できる可能性がある [34, 35]。そこで本研究では、sGPVI の測定系の開発を目指し、本章では抗 GPVI 抗体の作製を検討した [42]。

抗 GPVI 抗体の歴史は、コラーゲンによる血小板凝集能が特異的に欠損した患者の解析から始まった [36]。本患者には GPVI に対する自己抗体が存在し、抗体により後天的な GPVI の欠損が誘導されることが明らかとなった。また、本患者の血小板は ADP や von Willebrand factor (vWF) に対する凝集反応は正常であり、出血時間の著しい延長が認められないことが特徴として挙げられる [37]。さらに GPVI ノックアウト・マウス (KO マウス) や抗 GPVI 抗体による GPVI 欠損マウスにおいても、出血時間を延長することなく、血小板のコラーゲン凝集を抑制する結果が確認された [38, 39]。この様に GPVI は著しい出血時間の延長なしに抗血栓作用を示す魅力的な創薬ターゲットとして注目されており、現在では多数の抗 GPVI 抗体が報告されている。GPVI KO マウスより作製した抗 GPVI 抗体 (OM2) は、カニクイザルにおいて出血時間を延長させることなく抗血小板作用を示した [40]。Niewswandt らは、血小板を活性化させ、GPVI の Shedding を引き起こす抗 GPVI 抗体 (JAQ1) を報告した [41]。一方、Takayama らは血小板を活性化させずに、cAMP 依存的に GPVI をエンドサイトーシスさせる抗 GPVI 抗体 (F1232) を報告している [42]。Loyau らのグループは dimer 構造の GPVI のみを認識する抗体 (9E18) を作製し、血小板膜上の GPVI の活性化のモニタリング方法を報告した [43]。Jung らは GPVI のコンフォメーション変化を引き起こす抗体 (204-11) と、そのコンフォメーションを特異的に

認識する抗体 (m-Fab-F) を報告している [44]。この様に抗 GPVI 抗体には多様な作用を示す機能性抗体や、GPVI の多様な構造を特異的に認識する抗体が数多く報告されている。そこで本章では recombinant GPVI をマウスに免疫することで抗 GPVI 抗体を作製し、SPR や flow cytometer を用いて抗 GPVI 抗体の抗原特異性を解析した。

## 第2節 実験方法

本章で記載している全ての動物実験は、動物実験倫理委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 承認のもと実施した。また、ヒト血液を用いた実験は、ヒト組織・遺伝子利用研究倫理委員会の承認のもと実施した。

### 2-2-1. Materials

- ✓ FuGENE 6. Transfection Reagent ; (Roche, Cat. No. 11 814 443 001)
- ✓ pEF-Vector ; (prepared in our laboratory) [27]
- ✓ COS-1 cell ; (ATCC, Cat. No. CRL-1650)
- ✓ Hybridoma-SFM ; (Life Technologies, Cat. No. 12300-067)
- ✓ C96 Microwell Plate, Maxisorp ; (Thermo, Cat. No. 430341)
- ✓ Recombinant Human IgG1 Fc ; (R&D, Cat. No. 110-HG-100)
- ✓ Stabilguard ; (SurModics, Cat. No. SG01-1000)
- ✓ TMB One Component HRP Microwell Substrate ; (SurModics, Cat. No. TMBW-1000)
- ✓ Peroxidase-labeled rabbit anti-mouse Ig antibody ; (DAKO, Cat. No. P0260)
- ✓ FITC-labeled rabbit anti-mouse Ig antibody ; (DAKO, Cat. No. F0260)
- ✓ Purified anti-mouse Ig light chain  $\kappa$  antibody ; (BioLegend, Cat. No. 407202)
- ✓ Ni-Sepharose High Performance ; (GE Healthcare, Cat. No. 17-5268-02)
- ✓ Prosep-vA High Capacity ; (Millipore, Cat. No. 113115827)
- ✓ Amine Coupling Kit ; (GE Healthcare, Cat. No. BR-1000-50)
- ✓ CM5 biosensor chip ; (GE Healthcare, Cat. No. BR-1005-30)
- ✓ 10 $\times$  HBS-EP buffer ; (GE Healthcare, Cat. No. BR-1006-69)
- ✓ IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit ; (Roche, Cat. No. 11493027001)
- ✓ Biacore 3000 optical biosensor ; (GE Healthcare)
- ✓ Flow cytometer, Cytomics FC500 ; (Beckman Coulter)

## 2-2-2. Recombinant GPVI の作製

### 2-2-2-1. Human GPVI-human Fc (hGPVI-Fc) および Human GPVI-mouse Fc (hGPVI-mFc) の調製

ヒト GPVI の細胞外ドメイン(アミノ酸配列におけるシグナルペプチドを含む 1 番目のメチオニンから 269 番目のアスパラギン)、ヒト IgG1 の Fc ドメインおよびマウス IgG2a の Fc ドメインをコードする cDNA は、ゲノム DNA を鋳型とした polymerase chain reaction (PCR) 法 (genomic PCR 法) にてクローニングした。これら cDNA フラグメントを用いて hGPVI-Fc (ヒト GPVI の細胞外ドメインの C 末にヒト IgG1 の Fc 部位を融合させた組換えタンパク質)、および hGPVI-mFc (ヒト GPVI の細胞外ドメインの C 末にマウス IgG2a の Fc 部位を融合させた組換えタンパク質) を調製した。すなわち、pEF-Vector における human elongation promoter の下流にあるマルチクローニングサイトに、ヒト GPVI の cDNA とヒト IgG1 の Fc ドメインをコードする cDNA フラグメント、またはヒト GPVI の cDNA とマウス IgG2a の Fc ドメインをコードする cDNA フラグメントを連続して挿入した。これらプラスミドをトランスフェクション試薬 (FuGENE6) にて COS-1 細胞に遺伝子導入し、無血清培地 (Hybridoma SFM) にて数日間培養した (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)。培養上清中に発現した hGPVI-Fc および hGPVI-mFc は、Protein A column を用いた affinity chromatography に供することで精製した。

### 2-2-2-2. Human GPVI-His (hGPVI-His) の調製

hGPVI-His (ヒト GPVI の細胞外ドメインの C 末に Histidine-tag (His-tag) を融合させた組換えタンパク質) は以下の方法で作製した。pEF-vector のマルチクローニングサイトに、上記 2-2-2-1. でクローニングしたヒト GPVI の cDNA フラグメントと、His-tag をコードするフラグメントを連続して挿入した。得られたプラスミドを用いて、2-2-2-1. と同様な方法で COS-1 細胞に発現させた。培養上清中に発現した hGPVI-His は、Ni-カラムを用いた metal chelate affinity chromatography に供することで精製した。

### 2-2-2-3. Mouse GPVI-human Fc (mGPVI-Fc) の調製

マウスの GPVI の細胞外ドメインをコードする cDNA はマウスのゲノムを鋳型とした genomic PCR 法にてクローニングした。プライマーはマウスの cDNA 配列 (GeneBank accession No. NM\_001163014) を基に設計した。得られたマウス GPVI の細胞外ドメインをコードする cDNA と上記 2-2-2-1. でクローニングしたヒト IgG1 の Fc ドメインをコードする cDNA フラグメントを用いて mGPVI-Fc (マウス GPVI の細胞外ドメインの C 末にヒト IgG1 の Fc 部位を融合させた組換えタンパク質) を調製した。すなわち、pEF-Vector のマルチクローニングサイトにマウス GPVI およびヒト IgG1 Fc 部位をコードする cDNA フラグメントを連続して挿入した。得られたプラスミドを用いて、上記 2-2-2-1. と同様な方法で発現・精製を行うことで mGPVI-Fc を作製した。

#### 2-2-2-4. Human/Mouse chimera GPVI (mGPVI(hD1)-Fc, mGPVI(hD2)-Fc) の調製

Human/Mouse chimera GPVI (mGPVI(hD1)-Fc; マウス GPVI における domain I 部位をヒト GPVI の domain I に置換した組換えタンパク質、mGPVI(hD2)-Fc; マウス GPVI における domain II 部位をヒト GPVI の domain II に置換した組換えタンパク質) をコードする cDNA をマウス GPVI とヒト GPVI を鋳型とした overlap extension PCR 法 [45] にてクローニングした。これら Human/Mouse chimera GPVI とヒト IgG1 の Fc ドメインをコードする cDNA フラグメントを連続して pEF-vector のマルチクローニングサイトに挿入した。得られたプラスミドを用いて、上記 2-2-2-1. と同様な方法で発現・精製を行うことで mGPVI(hD1)-Fc および mGPVI(hD2)-Fc を作製した。

#### 2-2-3. 抗 GPVI 抗体 (7S1, 10S2, 19D1, および 21D1) の作製

上記 2-2-2-1. で作製した hGPVI-mFc をマウスに免疫することで抗 GPVI 抗体を作製した。まず、アジュバント共に 8 週齢の ddY マウス (Japan SLC, Inc) に 1 回目の投与を行い、さらに 11 日後に 2 回目の投与を行った [42]。2 回目の投与から 3 日後、剖検により単離したリンパ球とマウスミエローマ細胞 (P3U1) を polyethylene glycol 法にて細胞融合した。HAT 培地にてハイブリドーマをセレクションし、さらに、抗原結合アッセイで抗 GPVI 抗体を発現するハイブリドーマをスクリーニングした (2-2-4. 参照)。抗 GPVI 抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、Hybridoma-SFM 培地にて大量培養を行った。培養上清中に存在する抗 GPVI 抗体は、Protein A column を用いた affinity chromatography に供することで精製した。

#### 2-2-4. 抗 GPVI 抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング

2-2-2-1. で作製した hGPVI-Fc および Recombinant Human IgG1 Fc (R&D) を PBS で 2 µg/mL に調製し、アッセイプレート (C96 MicroWell Plate, Maxisorp) に固相化した後、ブロッキング溶液 (5% stabilguard / PBS) を用いてブロッキング処理を行った。本プレートにハイブリドーマの培養上清 (2-2-3. 参照) を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% tween 20 / saline) にてプレートを洗浄した。次いで、標識抗体希釈液 (4% rabbit serum, 0.05% tween 20 / PBS) で 1000 倍希釈した peroxidase-labeled rabbit anti-mouse Igs antibody を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液にて再度プレートを洗浄した。抗 GPVI 抗体の結合は、TMB を基質としたペルオキシダーゼ反応にて検出した。反応は酸を添加することで停止させ、450 nm の吸光度 (対照波長; 650 nm) を測定することで固相化抗原に結合した抗 GPVI 抗体を解析した。

#### 2-2-5. ヒト洗浄血小板の調製

インフォームドコンセントを取得したボランティアに対してクエン酸採血を行い、得られた全血を遠心操作（120 g × 15 minutes）に供することで platelet rich plasma (PRP) を分画した [42, 46]。得られた PRP を再度遠心操作（1200 g × 10 minutes）に供し、血小板を沈殿させた。上清を除去した後、血小板ペレットを 0.02% BSA, acid-citrate-dextrose / Tyrode-HEPES buffer, pH 6.4（137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 5.5 mM glucose）に懸濁した。洗浄目的の本操作は 2 回実施した。2 回目の洗浄操作終了後、血小板ペレットをアッセイバッファー（0.02% BSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> / Tyrode-HEPES buffer, pH 7.4）に懸濁し、洗浄血小板として各種実験で使用した。

#### 2-2-6. 認識ドメインの解析（エピトープ解析）

2-2-2-1. 2-2-2-3. および 2-2-2-4. で得られた hGPVI-Fc, mGPVI-Fc, mGPVI(hD1)-Fc および mGPVI(hD2)-Fc（各 2 μg/mL in PBS）をアッセイプレート（C96 MicroWell Plate, Maxisorp）に固相化した後、ブロッキング溶液（5% stabilguard / PBS）を用いてブロッキング処理を行った。本プレートに、サンプル希釈液（0.1 % BSA / PBS）で 30 ng/mL に希釈した抗 GPVI 抗体を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液（0.05% tween 20 / saline）にてプレートを洗浄した。次いで、標識抗体希釈液（4% rabbit serum, 0.05% tween 20 / PBS）で 1000 倍希釈した peroxidase-labeled rabbit anti-mouse Igs antibody を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液にて再度プレートを洗浄した。抗 GPVI 抗体の各種 recombinant GPVI への結合は、TMB を基質としたペルオキシダーゼ反応にて検出した。反応は酸を添加することで停止させ、450 nm の吸光度（対照波長；650 nm）を測定することにより、各種 recombinant GPVI に結合した抗体量を解析した。

#### 2-2-7. Flow cytometry による解析

2-2-5. で調製した洗浄血小板に終濃度 1% でパラフォルムアルデヒドを添加し、氷上で 1 時間反応させることで固定化処理を行った。固定化処理した血小板を遠心操作と FACS バッファー（1% 非動化 FBS, 2.5 mM EDTA / PBS）を用いて洗浄した後、抗 GPVI 抗体 (Final conc. 10 μg/mL) を氷上で 1 時間反応させた。反応終了後、遠心操作と FACS バッファーを用いて洗浄を行った。次いで、FACS バッファーで 20 倍希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled rabbit anti-mouse Igs antibody と血小板を混合し、氷上で 1 時間反応させた。反応終了後、遠心操作と FACS バッファーを用いて再度洗浄を行った。血小板に結合した抗体の蛍光強度は、CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter) で測定し、抗 GPVI 抗体の結合量は mean fluorescence intensity (MFI) で示した。また、isotype control 抗体 (Mouse IgG2a, κ 抗体、および Mouse IgG2b, κ 抗体) を添加したときの MFI をバックグラウンド値として処理した。

#### 2-2-8. Surface plasmon resonance (SPR) による解析

sGPVI に対する親和性の解析は Biacore 3000 を用いて実施した。rat anti-mouse immunoglobulin light chain  $\kappa$  抗体 (Capturing molecule) をアミンカップリングキットにより CM5 biosensor chip の表面上に固相化した。本センサーチップに ligand として抗 GPVI 抗体 (7S1, 10S2, 19D1, および 21D1) を結合させた。次いで、SPR バッファー (HBS-EP buffer) で希釈した hGPVI-His および hGPVI-Fc を analyte として 10  $\mu$ L/min, 2 minutes でインジェクションし、さらに SPR バッファーを 7 minutes 供した。センサーチップの再生は、10 mM glycine-HCl (pH 1.7) を用いて実施した。データの解析は、analyte を添加しない際のセンサーグラム (SPR バッファーのみを供した際のセンサーグラム) をバックグラウンドとして処理した。hGPVI-His に対する解離定数 ( $K_D$ ) は 1:1 の Langmuir モデルを用いて解析し、hGPVI-Fc に対しては Bivalent モデルを用いて解析した。

### 第3節 結果

#### 2-3-1. 抗 GPVI 抗体 (7S1, 10S2, 19D1, 21D1) の作製

GPVI 抗原 (hGPVI-mFc) を免疫したマウスよりリンパ球を採取し、ミエローマ細胞 (P3U1) と細胞融合を行った。細胞融合後、HAT 培地でハイブリドーマをセレクションし、さらに hGPVI-Fc に対する結合アッセイで抗 GPVI 抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。その結果、抗 GPVI 抗体を産生する 4 種類のハイブリドーマ、7S1、10S2、19D1、および 21D1 を得た (本ハイブリドーマが産生する抗体もそれぞれ 7S1、10S2、19D1、および 21D1 と示した)。これら抗体を Isotyping Kit を用いてサブタイプ解析した結果、10S2 は IgG2b,  $\kappa$  であり、7S1、19D1 および 21D1 は IgG2a,  $\kappa$  であった。

#### 2-3-2. 認識ドメインの解析 (エピトープ解析)

4 種類の recombinant GPVI (hGPVI-Fc、mGPVI-Fc、mGPVI(hD1)-Fc、および mGPVI(hD2)-Fc) を用いて各抗体のエピトープ解析を実施した (Figure 3)。全ての抗 GPVI 抗体はヒト GPVI (hGPVI-Fc) に対して結合したが、マウス GPVI (mGPVI-Fc) に対しては結合しなかった。さらに、10S1 および 21D1 はマウス GPVI の domain I をヒト GPVI の domain I に置換したキメラタンパク質 (mGPVI(hD1)-Fc) には結合したが、マウス GPVI の domain II をヒト GPVI の domain II に置換したキメラタンパク質 (mGPVI(hD2)-Fc) に対しては結合しなかった。一方、7S1 および

19D1 は mGPVI(hD1)-Fc に対して結合しないが、mGPVI(hD2)-Fc に対しては結合活性が認められた。これらの結果は、10S1 および 21D1 は GPVI の domain I を認識し、7S1 および 19D1 は domain II を認識する抗体であることを示している。

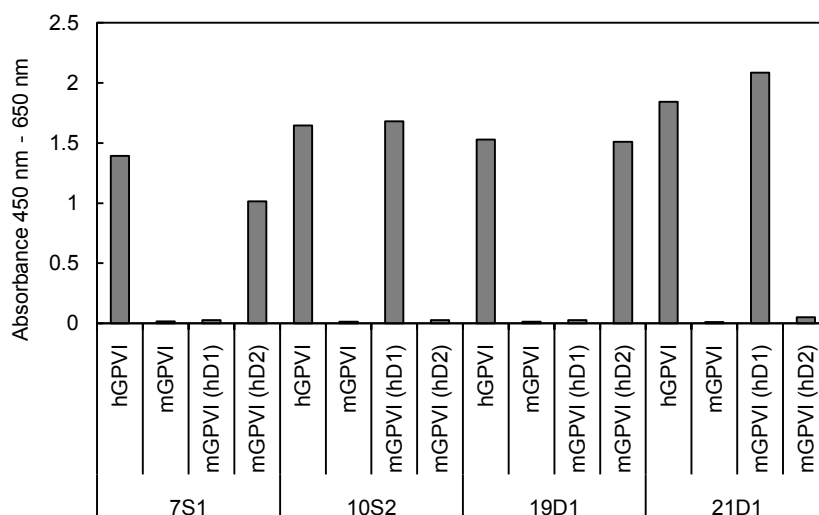


Figure 3 Epitope analyses of anti-GPVI antibodies using human/mouse chimeric GPVI.

Anti-GPVI antibodies, 7S1, 10S2, 19D1, and 21D1, were incubated with human GPVI (hGPVI), mouse GPVI (mGPVI), or human/mouse chimeric GPVI mutants which are expressed as (mGPVI (hD1)) and (mGPVI (hD2)) meaning that the amino acid sequence on mouse GPVI is swapped for the counter domain of human GPVI. The bound anti-GPVI antibodies were detected by peroxidase-labeled anti-mouse immunoglobulins. Data are expressed as mean of duplicate determinations.

### 2-3-3. 膜型 GPVI に対する結合解析

ヒト洗浄血小板を用いて膜型 GPVI に対する結合を評価した。その結果、全ての抗体は膜型 GPVI を認識した (Figure 4)。結合活性の強度 (MFI ± SD) は、7S1 ;  $6.87 \pm 1.01$ 、10S2 ;  $9.63 \pm 1.99$ 、19D1 ;  $7.05 \pm 1.34$ 、21D1 ;  $9.48 \pm 1.91$  であり、7S1 と 19D1 は、10S2 と 21D1 に比べて若干結合活性が低い結果を示した。

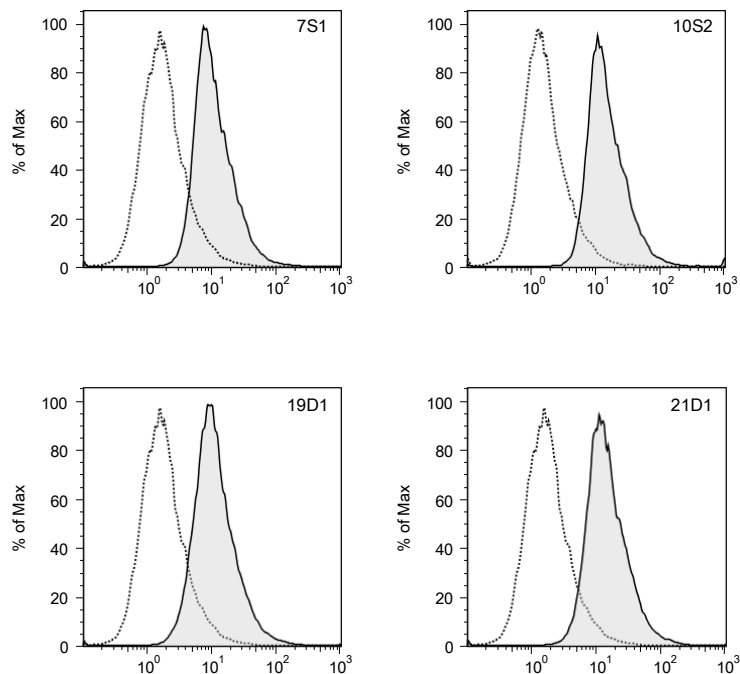
### 2-3-4. 可溶型 GPVI に対する結合解析

抗 GPVI 抗体 (7S1、10S2、19D1、および 21D1) の sGPVI に対する結合活性を SPR にて評価した。抗 GPVI 抗体を ligand とし、2 種類の recombinant sGPVI (monomeric sGPVI (hGPVI-His) および dimeric sGPVI (hGPVI-Fc)) を analyte として解析を実施した (Figure 5)。Table 4 に結合速度定数 ( $k_a$ )、解離速度定数 ( $k_d$ ) および解離定数 ( $K_D$ ) を示した。7S1 および 10S2 は、monomeric

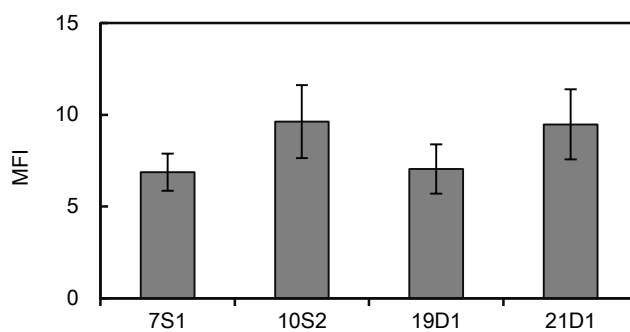


sGPVI および dimeric sGPVI に対して同等の親和性を示した。一方、19D1 および 21D1 は dimeric sGPVI に対してのみ強い結合活性を示し、monomeric sGPVI に対しては、100 倍ほど弱い結合活性を示した。

A

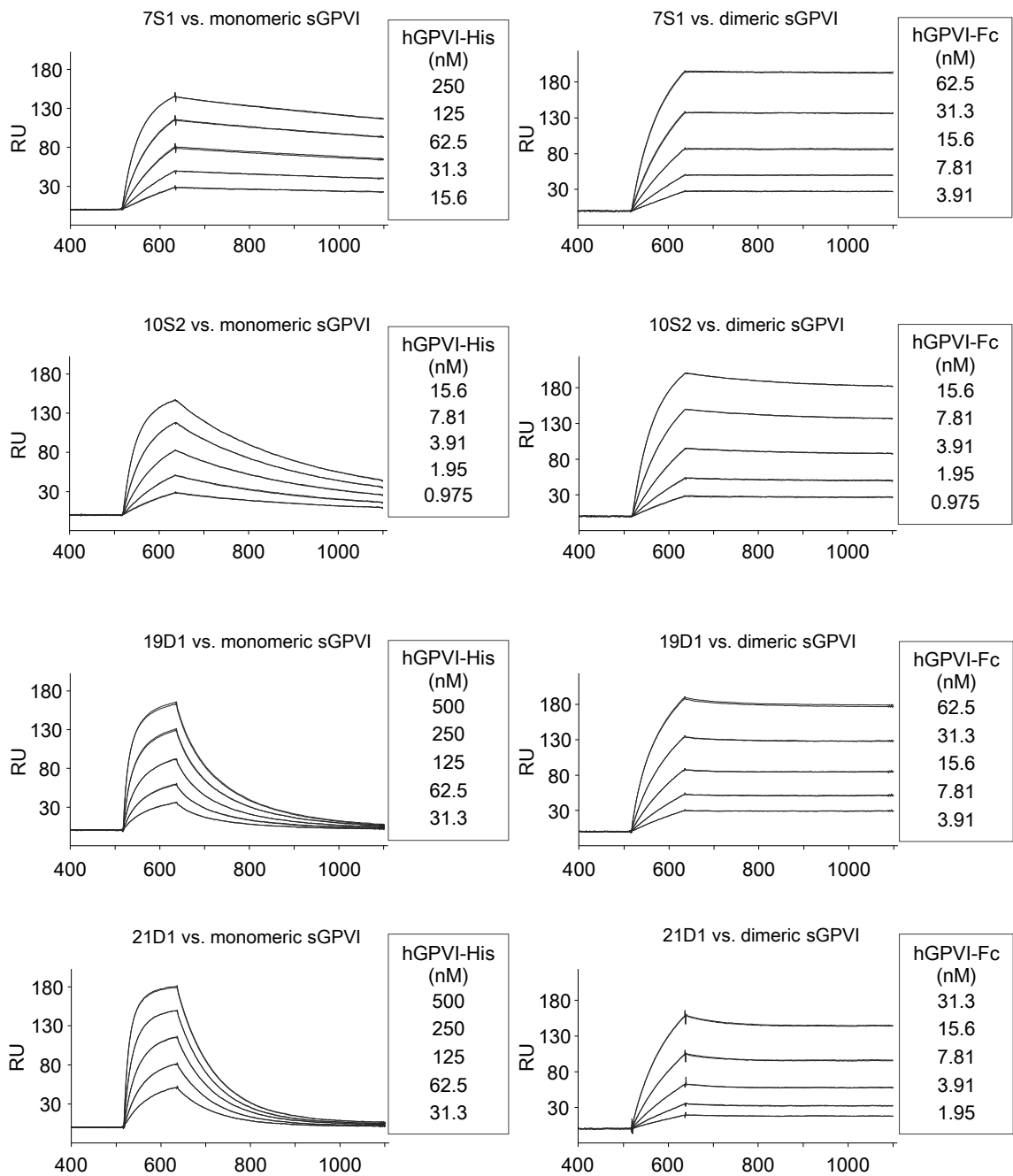


B



**Figure 4** Avidity of anti-GPVI antibody for membrane bound GPVI

Anti-GPVI antibodies, 7S1, 10S2, 19D1, and 21D1, were incubated separately with platelets. After incubation, the bound anti-GPVI antibodies were detected by FITC-labeled anti-mouse immunoglobulins. (A) A typical histogram for the binding of anti-GPVI antibody to platelets is shown. The shaded and open histograms indicate anti-GPVI antibody binding and isotype control binding, respectively. (B) The mean fluorescence intensity (MFI) of the isotype control was subtracted from the MFI of each anti-GPVI antibody. Data represent means  $\pm$  SD of 3 separate experiments, each using platelets from different donors.



**Figure 5** SPR sensorgrams for the interaction between anti-GPVI antibodies and monomeric sGPVI or dimeric sGPVI.

Anti-mouse immunoglobulin light chain antibody was immobilized on a CM5 sensor chip as a capturing molecule. Anti-GPVI antibodies were used as ligands, and monomeric sGPVI (hGPVI-His) or dimeric sGPVI (hGPVI-Fc) as analyte. The concentrations of analyte are indicated, based on experiments performed in duplicate.

**Table 4** Quantitative analysis of anti-GPVI antibodies and sGPVI interactions by SPR.

	monomeric sGPVI (hGPVI-His)			dimeric sGPVI (hGPVI-Fc)		
	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
7S1	$1.1 \times 10^5$	$4.5 \times 10^{-4}$	4.26 (0.43)	$9.9 \times 10^4$	$4.1 \times 10^{-5}$	0.437 (0.14)
10S2	$1.9 \times 10^6$	$2.8 \times 10^{-3}$	1.51 (0.19)	$4.6 \times 10^5$	$9.1 \times 10^{-4}$	2.08 (0.57)
19D1	$4.5 \times 10^4$	$8.4 \times 10^{-3}$	190 (15)	$1.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-4}$	1.07 (0.11)
21D1	$1.2 \times 10^5$	$9.4 \times 10^{-3}$	80.3 (10)	$1.5 \times 10^5$	$2.2 \times 10^{-4}$	1.49 (0.14)

$k_a$ : association rate constant;  $k_d$ : dissociation rate constant;  $K_D$ : dissociation constant.

The monomeric sGPVI binding profiles were fitted using the 1:1 Langmuir model, and the bivalent model was used for dimeric sGPVI.  $K_D$  value was presented as means (SD) of 3 separate experiments.

#### 第4節 考察

生体のタンパク質の多くは外的刺激を受けてダイナミックに構造変化を起こし、その構造変化によって特有の機能を発揮する。GPVIも同様に、血小板膜上において構造変化を起こすことで受容体としての機能を発揮すると考えられる。組換えタンパク質を用いた検討において、dimeric GPVI (hGPVI-Fc) はコラーゲンに対して高い親和性を有するが、monomeric GPVI (hGPVI-His) はコラーゲンには結合しない [47]。結晶構造解析においても、GPVIの dimer 構造にはコラーゲンとの結合サイトが存在することが示されている。これらの結果は、GPVIは定常状態では monomer 構造で存在するが、活性化により dimer 構造に変化することで、コラーゲン受容体としての機能を発揮することを示唆している。つまりは GPVI の dimer と monomer は、構造的に大きく異なることが予想される [48, 49]。

抗原の構造変化が多様であるように、抗体の機能や抗原認識特異性も多様である。抗原認識特異性には、一次構造を認識する抗体と、特定の立体構造を認識する抗体に大別される [50]。また、機能面においても作動性抗体（アゴニスト抗体）、抑制性抗体（アンタゴニスト抗体）、抗原を認識するだけの抗体（無作動性抗体）など様々である。抗体医薬や診断薬（イムノアッセイ法）の開発において、標的となる抗原の特徴だけでなく、抗体の抗原認識特異性、および抗体の機能を理解することは必要不可欠である。本研究において得られた4種の抗体の特性、および抗原特異性を Table 5 に示した。

**Table 5** Characteristic of anti-GPVI antibodies.

	Isotype	Epitope	Flow Cytometry	SPR for sGPVI	
			Platelet mGPVI (MFI)	monomeric $K_D$ (nM)	Dimeric $K_D$ (nM)
7S1	IgG2a, $\kappa$	Domain II	6.87	4.26	0.437
10S2	IgG2b, $\kappa$	Domain I	9.63	1.51	2.08
19D1	IgG2a, $\kappa$	Domain II	7.05	190	1.07
21D1	IgG2a, $\kappa$	Domain I	9.48	80.3	1.49

各抗体のエピトープ解析では 7S1 および 19D1 は GPVI の domain II を認識し、10S2、21D1 は domain I を認識した。GPVI の domain I はコラーゲンとの結合サイトであり、10S2 および 21D1 はコラーゲンと GPVI の結合を阻害する抗体であることが予想される。また、SPR による解析では、7S1 および 10S2 は monomeric sGPVI と dimeric sGPVI を認識し、一方、19D1 と 21D1 は dimeric sGPVI のみを認識した。GPVI は monomer と dimer では立体構造が大きく異なることから、19D1 および 21D1 は特異的な立体構を認識する抗体であることが示唆された。さらに、血小板上の膜型 GPVI に対する結合活性を flow cytometry を用いて検討した。血小板の定常状態において GPVI は monomer 構造をとるため、7S1 と 10S2 のみ結合する結果を予想していた [43]。しかし、予想に反して全ての抗体が膜型 GPVI を認識した。本結果に関して原因の究明は行っていないが、洗浄血小板を調製する際に血小板が活性化され、血小板膜上の GPVI が dimer 構造に変化している可能性も考えられた。

また本研究では、抗 GPVI 抗体の機能に関して検討を行っていない (Collagen binding 阻害抗体、エンドサイトーシス誘導抗体、アゴニスト抗体等)。しかしながら、本研究では複数のエピトープを認識する抗体と、抗原の多様な構造を認識する抗体が得られており、これらの抗体の機能を検討することは、新たな GPVI の機能解析に繋がると考えている。

### 第3章 Soluble GPVI (sGPVI) 測定系の樹立

#### 第1節 序論

血小板膜上には 626 種類の膜タンパク質が発現しており、血小板活性化に伴い、そのうち 69 種類は切断されて可溶性タンパク質となる [51]。この血小板受容体の切断は過剰に活性化された血小板機能を抑制するが、さらに切断された受容体はバイオマーカーとしての利用可能性を秘めている [34, 35]。血小板膜上に発現した GPVI も同様に、活性化によりマトリックスメタロプロテアーゼによって切断され、血中に可溶性の GPVI (sGPVI) が放出される。さらに sGPVI は以下の特徴から血小板活性化のバイオマーカーとして注目されており、既に複数のグループが測定系の樹立とバイオマーカーとしての評価を報告している [33, 52-60]。

- ✓ GPVI の発現が血小板に特異的である
- ✓ 血小板の活性化に伴い sGPVI が産生される
- ✓ sGPVI の血中濃度は採血の影響を受けにくい (PDMP 上に GPVI は存在しない)
- ✓ sGPVI の血中濃度は年齢、性別、喫煙の影響を受けない

しかしながら臨床検体 (血栓症患者の血漿) を用いた検討において、各グループの結果は全く異なっている [33, 59, 60]。Andrews らは血小板の活性化が予想される急性冠症候群において、血中の sGPVI 濃度は上昇すると報告したが、Gawaz らは同患者の血中において sGPVI 濃度が低下すると報告した。Gawaz らは、血小板の活性化により産生された sGPVI は血管内のプラークに結合し、その結果、血中の sGPVI 濃度が低下すると考察している。各グループ間での結果の相違に対して、その理由は明らかとなっていない。しかし、サンプル調製方法の違い (採血や血漿調製) の他に、測定系を構成する抗体の特性が原因として考えられる。そこで本章では、第2章で作製した4種類の抗 GPVI 抗体 (7S1、10S2、19D1、および 21D1) を用いて、2種類の sGPVI サンドイッチ ELISA (7S1/10S2-horseradish peroxidase (HRP) および 19D1/21D1-HRP) を構築し、sGPVI の反応性を比較した。

## 第2節 実験方法

本章で実施するヒト血液を用いた実験は、ヒト組織・遺伝子利用研究倫理委員会の承認のもと実施した。

### 3-2-1. Materials

- ✓ C96 MicroWell Plate, Maxisorp ; (Thermo, Cat. No. 430341)
- ✓ Stabilguard ; (SurModics, Cat. No. SG01-1000)
- ✓ TMB One Component HRP Microwell Substrate ; (SurModics, Cat. No. TMBW-1000)
- ✓ Lysylendopeptidase ; (Wako, Cat. No. 125-05061)
- ✓ N $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK) ; (SIAMA, Cat. No. T7254)
- ✓ Mono Q 5/50 GL ; (GE Healthcare, Cat. No. 17-5166-01)
- ✓ Superdex 200 10/300 GL ; (GE Healthcare, Cat. No. 17-5175-01)
- ✓ Peroxidase Labeling Kit-SH ; (DojinDo, Cat. No. LK09)
- ✓ Convulxin ; (Enzo Life Sciences, Cat. No. ALX-350-100-C050)
- ✓ Protease Inhibitor Cocktail ; (Roche, Cat. No. 04693116001)
- ✓ Rabbit anti-GPVI polyclonal antibody ; (prepared in our laboratory) [42]
- ✓ Peroxidase-labeled goat anti-rabbit Igs antibody ; (Dako, Cat. No. P0450)
- ✓ Block-Ace ; (Daini-hon Seiyaku, Cat. No. UK-B80)

### 3-2-2. Sandwich ELISA 組合せのスクリーニング

2-2-2-1. で作製した hGPVI-Fc (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS) をアッセイプレート (C96 MicroWell Plate, Maxisorp) に固相化した後、ブロッキング溶液 (5% stabilguard / PBS) を用いてブロッキング処理を行った。本プレートにサンプル希釈液 (0.1% BSA / PBS) で調製したビオチン標識-抗 GPVI 抗体 (Final conc. 30 ng/mL) と、非標識の抗 GPVI 抗体 (Final conc. 0.1, 1.0, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を同時に添加し、室温で1時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% tween 20 / Saline) でプレートを洗浄した。次いで、標識体希釈液 (0.1% BSA, 0.05% tween 20 / PBS) で調製した peroxidase-labeled neutravidin を添加し、室温で30分間反応させた。反応終了後、洗浄液にて再度プレートを洗浄した。固相化抗原に結合したビオチン標識-抗 GPVI 抗体の検出は、TMB を基質としたペルオキシダーゼ反応にて検出した。反応は酸を添加することで停止させ、450 nm の吸光度 (対照波長 ; 650 nm) を測定することにより、固相化抗原に結合した抗体量を解析した。

### 3-2-3. 標識抗体 (10S2-HRP, 21D1-HRP) の作製

10S2 および 21D1 の F(ab')<sub>2</sub> 抗体を作製した。すなわち両抗体を Tris-HCl buffer (pH8.5) にバッファー置換した後、lysylendopeptidase を添加し (抗体 : lysylendopeptidase = 100 : 1)、37°C で 3 時間反応させた。TLCK を終濃度 30 mM 添加することで反応を停止した。次いで、酵素処理した抗体を 4mM Tris-HCl (pH8.5) にバッファー置換し、Mono Q column (Buffer A\_5mM Tris-HCl (pH8.5), Buffer B\_0.25 M NaCl / 5mM Tris-HCl (pH8.5) : Elution\_linear-gradient : Volume\_50 column bed)、Superdex 200 column に供することで F(ab')<sub>2</sub> 画分を精製した。Peroxidase Labeling Kit SH (DojinDo) を用いて F(ab')<sub>2</sub> のシステイン残基に peroxidase を結合させた。作製した標識抗体は 10S2-HRP および 21D1-HRP とした。

### 3-2-4. sGPVI 測定系 (7S1/10S2-HRP)

Monomeric および dimeric sGPVI を認識する抗体 (7S1, 10S2) で測定系を構築した。7S1 (10 µg/mL in PBS) をアッセイプレート (C96 MicroWell Plate, Maxisorp) に固相化した後、ブロッキング溶液 (5% stabilguard, 3.2% sucrose / PBS) を用いてブロッキング処理を行った。本プレートにサンプル希釈液 (0.2% BSA, 0.05% tween 20, 300 mM NaCl / PBS) で適宜希釈した recombinant sGPVI または各種検体を供し、室温で 2 時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% tween 20 / Saline) でプレートを洗浄した。次いで、標識抗体希釈液 (6% rat serum, 1% mouse serum, 300 mM NaCl, 0.05% tween 20 / PBS) で希釈した 10S2-HRP を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液にて再度プレートを洗浄した。7S1 と 10S2 抗体でサンドイッチされた sGPVI の検出は、TMB を基質としたペルオキシダーゼ反応にて検出した。反応は酸を添加することで停止させ、450 nm の吸光度 (対照波長 ; 650 nm) を測定することにより sGPVI 濃度を定量した。

### 3-2-5. sGPVI 測定系 (19D1/21D1-HRP)

Dimeric sGPVI のみを強く認識する抗体 (19D1, 21D1) で測定系を構築した。19D1 (10 µg/mL in PBS) をアッセイプレート (C96 MicroWell Plate, Maxisorp) に固相化した後、ブロッキング溶液 (5% stabilguard, 3.2% sucrose / PBS) を用いてブロッキング処理を行った。本プレートにサンプル希釈液 (0.2% BSA, 0.05% tween 20, 300 mM NaCl / PBS) で適宜希釈した recombinant sGPVI または各種検体を供し、室温で 2 時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% tween 20 / saline) でプレートを洗浄した。次いで、標識抗体希釈液 (6% rat serum, 1% mouse serum, 300 mM NaCl, 0.05% tween 20 / PBS) で希釈した 21D1-HRP を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液にて再度プレートを洗浄した。19D1 と 21D1 抗体でサンドイッチされた sGPVI の検出は、TMB を基質としたペルオキシダーゼ反応にて検出した。反応は酸を添加することで停止させ、450 nm の吸光度 (対照波長 ; 650 nm) を測定することにより sGPVI 濃度を定量した。

### 3-2-6. 血小板由来 sGPVI の調製

洗浄血小板に convulxin (蛇毒 ; GPVI ligand) を作用させることで、血小板由来の sGPVI を調製した。すなわち、アッセイバッファー (0.02% BSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> / Tyrode-HEPES buffer, pH 7.4) で  $25 \times 10^4$  platelets/ $\mu$ L に調製した洗浄血小板 (2-2-5.参照) に、convulxin を終濃度 0, 10, 30, 100 ng/mL で添加し、37 °C で 1 時間反応させた。EDTA (Final conc. 5mM) と protease inhibitor cocktail を添加することで反応を停止させ、遠心操作 (18,000 g  $\times$  1 minute) により、血小板と sGPVI を含んだ上清画分を分離した。

### 3-2-7. Western blotting による sGPVI の検出

血小板由来の sGPVI を western blotting 法にて検出した。すなわち、3-2-6. で作製した上清画分を還元条件下で SDS-PAGE に供し、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキング溶液 (100% ブロックエース / PBS) で転写膜をブロッキング処理した後、抗体希釈液 (10% ブロックエース, 0.05% tween 20 / PBS) で 30  $\mu$ g/mL に調製した rabbit anti-GPVI polyclonal antibody を供し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05 % tween 20 / PBS) で転写膜を洗浄した。次いで、抗体希釈液で 1000 倍希釈した peroxidase-labeled goat anti-rabbit Igs antibody を供し、室温で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液で転写膜を再度洗浄した。抗体が結合した転写膜上の sGPVI は ECL-Prime (GE Healthcare) を基質とした化学発光法で検出した。



### 第3節 結果

#### 3-3-1. 競合反応による抗体の組合せの検討

抗 GPVI 抗体の競合アッセイにより、サンドイッチ ELISA に至適な組合せを検討した。hGPVI-Fc を固相化したプレートに、各種ビオチン標識した抗 GPVI 抗体と、非標識の抗 GPVI 抗体を同時に添加することで競合反応を確認した。その結果、同じドメインを認識する抗体は互いの結合を阻害し、異なるドメインを認識する抗体は競合反応を示さなかった (Figure 6)。domain I を認識する抗体と、domain II を認識する抗体を組み合わせることで、サンドイッチ ELISA を構築できることが示唆された。

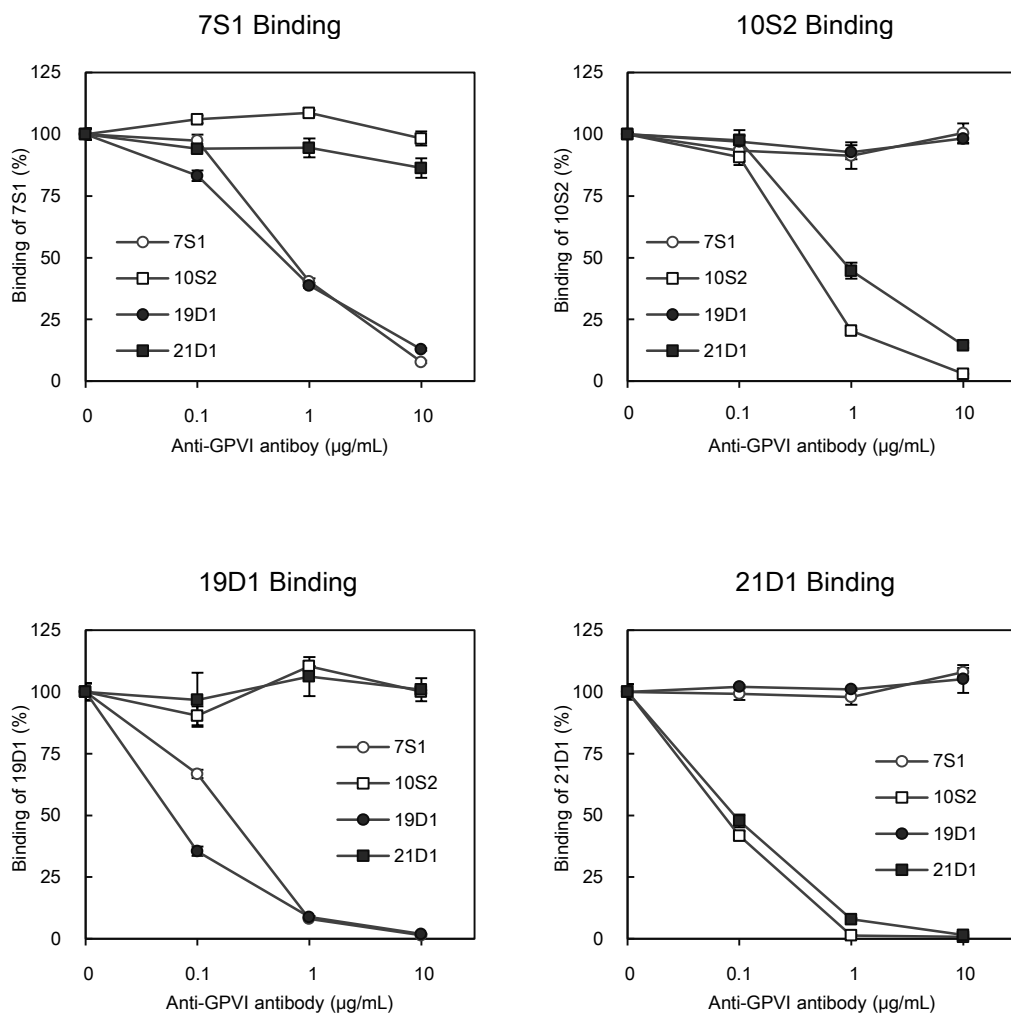


Figure 6 Analysis of antigenic domains by competition assays.

Competitive binding assays were performed with each anti-GPVI antibody in both biotin-labeled and non-labeled forms: 7S1 (open circles), 10S2 (open squares), 19D1 (closed circles), and 21D1 (closed squares). Data are expressed as the percentage of total binding of each biotin-labeled anti-GPVI antibody in the absence of a competitor and are the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations.

### 3-3-2. Recombinant sGPVI に対する反応性の比較

抗 GPVI 抗体の抗原特異性と各抗体の競合反応の結果を基に、2 種の sGPVI ELISA を構築した。一方は、monomeric sGPVI と dimeric sGPVI に対して親和性を持つ抗体で構築したアッセイであり (7S1/10S2-HRP)、もう一方は、dimeric sGPVI に対してのみ親和性を持つ抗体で構成されたアッセイである (19D1/21D1-HRP)。アッセイを構築する際には domain II 認識抗体を固相化抗体とし、domain I 認識抗体を検出抗体として用いた。また、標識抗体 (10S2, 21D1) には、それぞれの F(ab')<sub>2</sub> 抗体のシステイン残基にペルオキシダーゼを結合させたものを用いた (10S2-HRP および 21D1-HRP)。両アッセイにおける monomeric sGPVI および dimeric sGPVI に対する反応性を比較した結果、7S1/10S2-HRP は monomeric sGPVI および dimeric sGPVI を同等の感度で検出した (Detection range: 0.03-10 ng/mL)。一方、19D1/21D1-HRP は dimeric sGPVI を高感度で検出したが (Detection range: 0.03-10 ng/mL)、monomeric sGPVI に対しては 100 倍程度低い反応性を示した (Detection range: 10-1000 ng/mL) (Figure 7)。

### 3-3-3. 血小板由来 sGPVI に対する反応性の比較

次に、血小板由来 sGPVI に対する両アッセイの反応性を比較した。ヒト洗浄血小板に convulxin (蛇毒; GPVI ligand) を添加することで産生させた sGPVI を western blotting および ELISA にて検出した。Western blotting 解析では、convulxin 濃度依存的に sGPVI の産生が確認され、さらに Src ファミリーキナーゼの阻害剤である PP2 (GPVI を介した血小板活性化において、Syk のリン酸化を阻害することで血小板の活性化を阻害する化合物) を添加することで sGPVI の産生は抑制された (Figure 8A)。同サンプルを 2 種の sGPVI ELISA に供したところ、7S1/10S2-HRP は western blotting 解析と同様に convulxin 濃度依存的な sGPVI の産生を検出したが、19D1/21D1-HRP は全く sGPVI を検出しなかった (Figure 8B)。

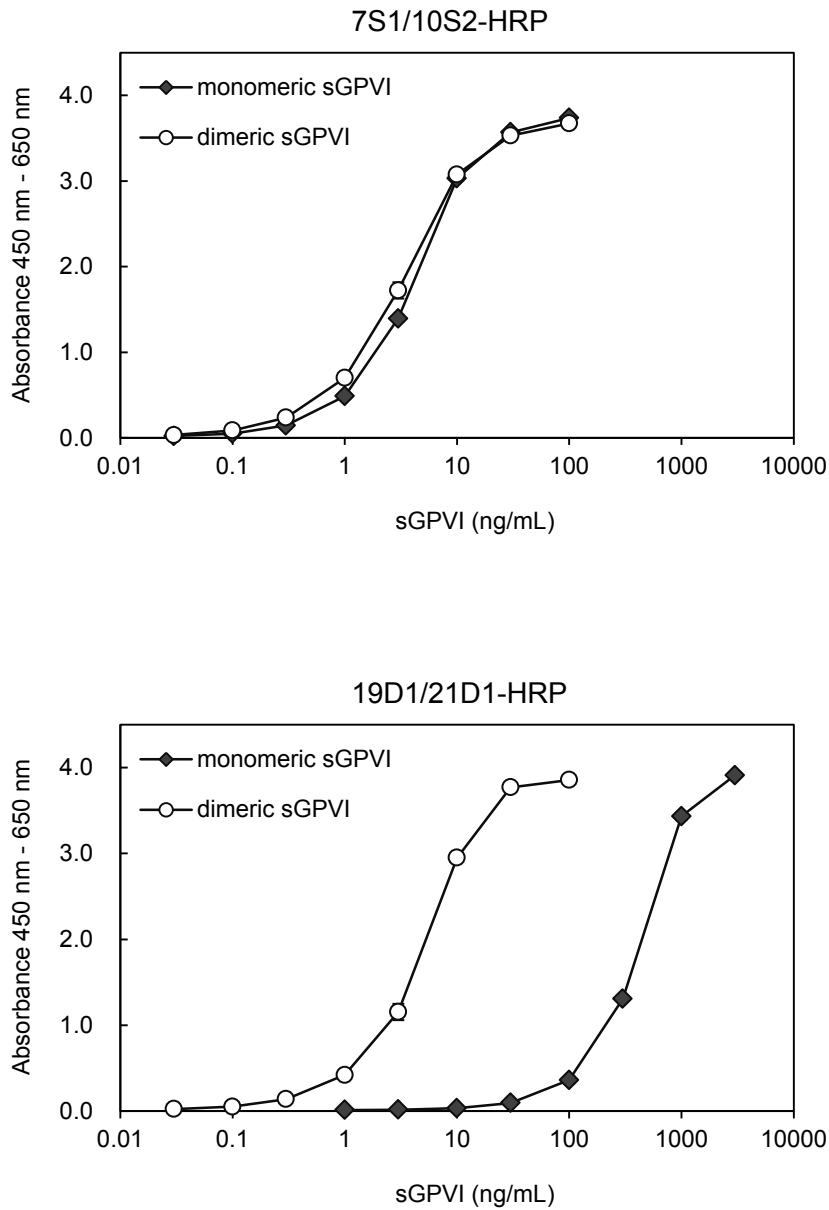
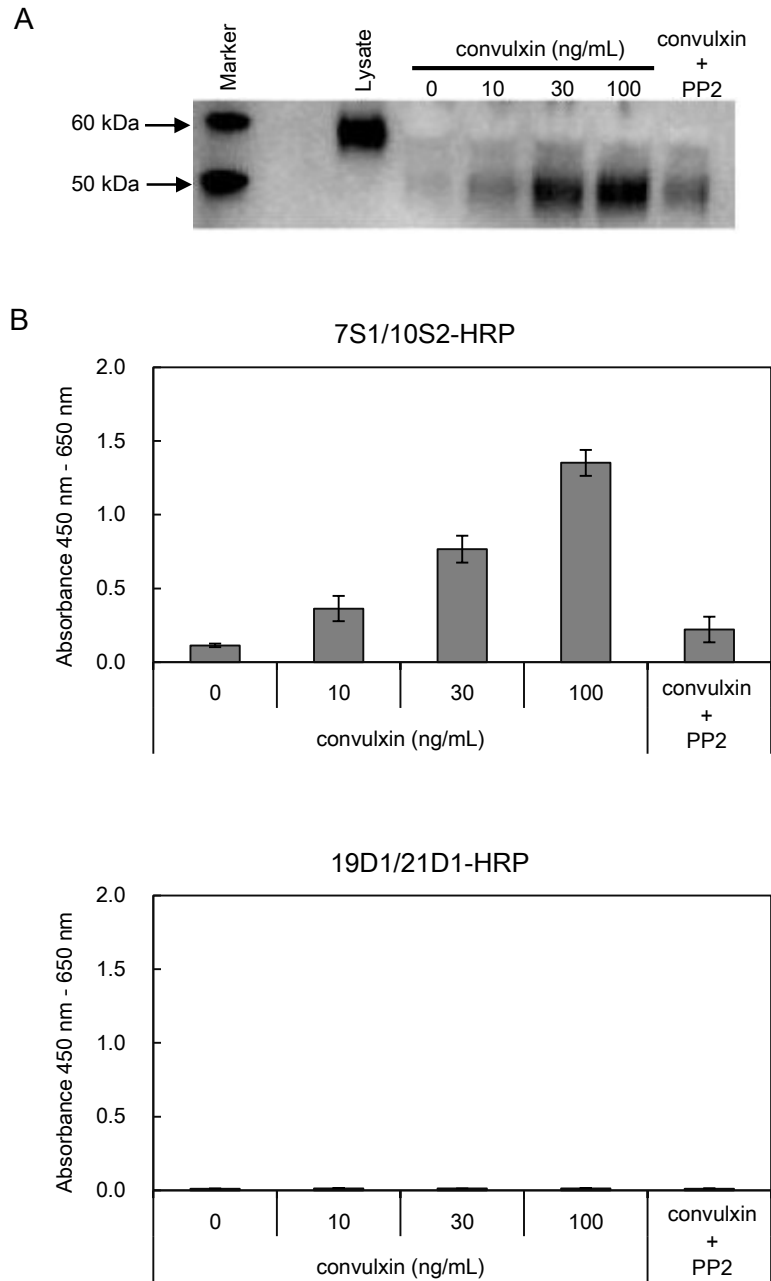


Figure 7 Dose response curves for monomeric sGPVI and dimeric sGPVI in each assay.

Various concentrations of recombinant human sGPVI were applied to each assay (7S1/10S2-HRP and 19D1/21D1-HRP). The closed diamond and the open circle represent monomeric sGPVI (hGPVI-His) and dimeric sGPVI (hGPVI-Fc), respectively. Each value is expressed as means  $\pm$  SD of quadruplicate determinations.



**Figure 8** Comparison of reactivity for sGPVI derived from platelet.

Washed human platelets were treated with convulxin in the presence or absence of PP2 (Src-family kinase inhibitor), and the platelet pellets were separated from the supernatants. (A) The levels of shed sGPVI in the supernatants were quantitated by western blotting using a rabbit anti-GPVI antibody. “Lysate” and “Marker” labels indicate the washed platelet lysate sample and the molecular weight marker (MagicMark XP, Invitrogen), respectively. “convulxin + PP2” show the treatment with 100 ng/mL convulxin in the presence of 10  $\mu$ M PP2. (B) sGPVI from platelets in the supernatants was measured by the 7S1/10S2-HRP and 19D1/21D1-HRP assays. Each bar represents means  $\pm$  SD of 3 separate experiments, each using platelets from different donors.

## 第4節 考察

最初に、サンドイッチ ELISA を樹立するためにペアとなる抗体のスクリーニングを行った。同じドメインを認識する抗体は互いの結合を阻害し、異なるドメインを認識する抗体は競合反応を示さなかった。結晶構造解析においても GPVI の domain I と domain II は構造的に十分に離れており、立体構造障害による競合反応は無いことが予想された [48]。

そこで、monomeric sGPVI と dimeric sGPVI の両方を認識する抗体で構成された測定系と (7S1/10S2-HRP)、dimeric sGPVI のみを強く認識する抗体で構成された測定系 (19D1/21D1-HRP) を作製した。互いの測定系は domain II 認識抗体を固相化抗体とし、domain I 認識抗体を標識抗体に用いており、抗体以外の条件 (サンプル希釈液、標識抗体希釈液、標識抗体の形状、洗浄方法、反応温度および反応時間) は全く同じとした。この 2 種類のアッセイを用いて、2 種の recombinant sGPVI (monomeric sGPVI (hGPVI-His) および dimeric sGPVI (hGPVI-Fc)) の反応性を確認した結果、7S1/10S2-HRP は monomeric sGPVI および dimeric sGPVI の両方を高感度に検出し、19D1/21D1-HRP は dimeric sGPVI のみ高感度に検出した。アッセイを構築している抗体のスペックをそのまま反映する結果であった。次に、血小板由来 sGPVI に対する反応性を比較したところ、7S1/10S2-HRP は血小板由来の sGPVI を鋭敏に検出したが、19D1/21D1-HRP は全く反応性を示さなかった。

GPVI は血小板表面上に特異的に発現する I 型膜タンパク質であり、2 つのイムノグロブリンドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインで構成される。GPVI の細胞外ドメイン同士の間相互作用は弱く、血小板膜上での GPVI の二量体は細胞内ドメインに位置する 338 番目のシステインによるジフルフィド結合により形成される [61]。つまり、血中の sGPVI のコンフォメーションは monomer 構造であると推測される。これらの結果から、sGPVI 測定系は monomer 構造の GPVI を認識する抗体で構成することが重要であり、7S1/10S2-HRP は sGPVI のバイオマーカーとしての機能を評価するうえで有用なアッセイ系であることが明らかとなった。

## 第4章 カニクイザルを用いた sGPVI の評価研究

### 第1節 序論

緒言にも記載した様に、バイオマーカーはその用途に応じて複数の種類が存在し、それぞれにおいて必要な条件も異なる [1-3]。診断マーカー (diagnostic marker) には病態の特異性および感度が要求され、モニタリングマーカー (monitoring marker) は治療効果を反映するためにも適度な半減期が求められる。これまでも sGPVI の評価が多数報告されている。しかし、その殆どが血栓症患者 (心筋梗塞や不安定狭心症等) と、正常人の血中 sGPVI 濃度を比較するような retrospective な研究だけである。prospective な study は精度の高い結果を得ることが出来るが、実際は大規模なコホートを長期間追跡する必要があるため現実的ではない。

そこで本章では、7S1/10S2-HRP アッセイで交差反応が期待できるカニクイザルを用いて、sGPVI のバイオマーカーとしての特性および有用性を評価した。LPS 惹起カニクイザル血小板減少モデルでは血小板活性化マーカーとしての感度を検討した。さらに、カニクイザルに recombinant sGPVI を投与することで pharmacokinetics 解析を実施し、sGPVI の血中安定性を検討した。

## 第2節 実験方法

本章で記載している全ての動物実験は、動物実験倫理委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 承認のもと実施した。

### 4-2-1. Materials

- ✓ Ni-Sepharose High Performance ; (GE Healthcare, Cat. No. 17-5268-02)
- ✓ Collagen related peptide ; (prepared in our laboratory) [42]
- ✓ Convulxin ; (Enzo Life Sciences, Cat. No. ALX-350-100-C050)
- ✓ Lipopolysaccharides (LPS) from *E. coli* 0111:B4 ; (SIGMA, Cat. No. L4391)
- ✓ Monkey sP-selectin Platinum ELISA ; (Affymetrix, Cat. No. BMS650/4)
- ✓ Hematology Analyzer F-820 ; (Sysmex)

### 4-2-2. Recombinant cynomolgus GPVI (cynomolgus GPVI-His) の調製

カニクイザル GPVI の細胞外ドメインをコードする cDNA を genomic PCR 法にてクローニングした。プライマーはヒト GPVI の cDNA 配列を基に設計した。得られたカニクイザル GPVI の細胞外ドメインをコードする cDNA と His-tag をコードする cDNA フラグメントを pEF-vector のマルチクローニングサイトに連続して挿入した。得られたプラスミドを用いて、2-2-2-1.と同様な方法で COS-1 細胞に発現させた。培養上清中に発現した cynomolgus GPVI-His は、Ni-カラムを用いた metal chelate affinity chromatography に供することで精製した。

### 4-2-3. カニクイザル洗浄血小板の調製

カニクイザルの下肢伏在静脈からクエン酸採血を行い、得られた全血を遠心操作 (120 g ×15 minutes) に供することで PRP 画分を調製した [42]。得られた PRP は 2-2-5.記載の方法で処理を行い、カニクイザル洗浄血小板を調製した。

### 4-2-4. カニクイザル血小板由来 sGPVI の調製

カニクイザル洗浄血小板に GPVI ligand (Convulxin および collagen related peptide (CRP)) を作用させることで、カニクイザル血小板由来の sGPVI を調製した [42]。すなわち、アッセイバッファー (0.02% BSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> / Tyrode-HEPES buffer, pH 7.4) で 30×10<sup>4</sup> platelets/μL に調製した洗浄血小板 (4-2-3.参照) に、convulxin を終濃度 50, 150 ng/mL、または

CRP を終濃度 5, 15  $\mu\text{g/mL}$  で添加し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。EDTA (Final conc. 5 mM) と protease inhibitor cocktail を添加することで反応を停止させ、遠心操作 (18,000  $\text{g} \times 1 \text{ minute}$ ) により、血小板と sGPVI を含んだ上清画分を分離した。

#### 4-2-5. LPS 誘発カニクイザル血小板減少モデル (DIC 様モデル)

カニクイザル (♂, 3.49–5.2 kg ; HMRI Co. Ltd.) に LPS (*E. coli* 0111:B4) を 10 mg/kg で静脈内投与することで、LPS 誘発カニクイザル血小板減少モデルを作製した [62]。LPS 投与前 (コントロール)、投与 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, および 24 時間後に下肢伏在静脈よりクエン酸採血を行った。採取した全血中の血小板数は Hematology Analyzer F-820 (Sysmex) にて測定した。また、血液を遠心操作 (2000  $\text{g} \times 10 \text{ minutes}$ ) に供することで血漿を調製した。得られた血漿中の sP-selectin 濃度を Monkey sP-selectin ELISA (Affymetrix) で測定し、sGPVI 濃度は 3-2-4.記載の方法にて測定した。

#### 4-2-6. カニクイザルを用いた sGPVI の pharmacokinetics 解析

2-2-2-2.で調製した hGPVI-His をカニクイザルに投与し、sGPVI の pharmacokinetics 解析を実施した。カニクイザル (♂, 4.25–6.05 kg ; HMRI Co. Ltd.) に hGPVI-His を 5, 10, 20  $\mu\text{g/kg}$  で静脈内に投与した。hGPVI-His の投与前、投与後、0.5, 1, 2, 4, 8, および 24 時間後に下肢伏在静脈よりクエン酸採血を行い、採取した血液を遠心操作 (2000  $\text{g} \times 10 \text{ minutes}$ ) に供することで血漿を調製した。血漿中の sGPVI 濃度は 3-2-4.記載の方法で測定した。また、各測定値から hGPVI-His を投与する前の sGPVI 濃度 (カニクイザルの血中 sGPVI 濃度) を差し引いた値を用いて解析を行った。pharmacokinetics パラメーター解析は 2-コンパートメントモデル (WinNonlin software, version 6.2) で実施した。



### 第3節 結果

#### 4-3-1. カニクイザル GPVI のクローニングとアミノ酸相同性解析

sGPVI のバイオマーカーとしての有用性を動物モデルにより検討した。ヒトと遺伝子のホモロジーが高く、7S1/10S2-HRP アッセイでの交差反応が期待できるカニクイザルをモデル動物として選定した。最初にヒト GPVI の cDNA 配列を基に設計したプライマーと、カニクイザルのゲノム DNA を鋳型に用いた genomic PCR 法にて、カニクイザル GPVI のクローニングを実施した (Figure 9)。その結果、カニクイザルの GPVI 配列は、ヒト GPVI のスプライシングバリエーション (Alternative spliced form) であるヒト GPVI-2 と同様に、exon5 の欠損体であることが明らかとなった [63]。また、その相同性は完全長のヒト GPVI に対してはアミノ酸ベースで 89%、ヒト GPVI-2 に対しては 96% と非常に高い相同性を示した。

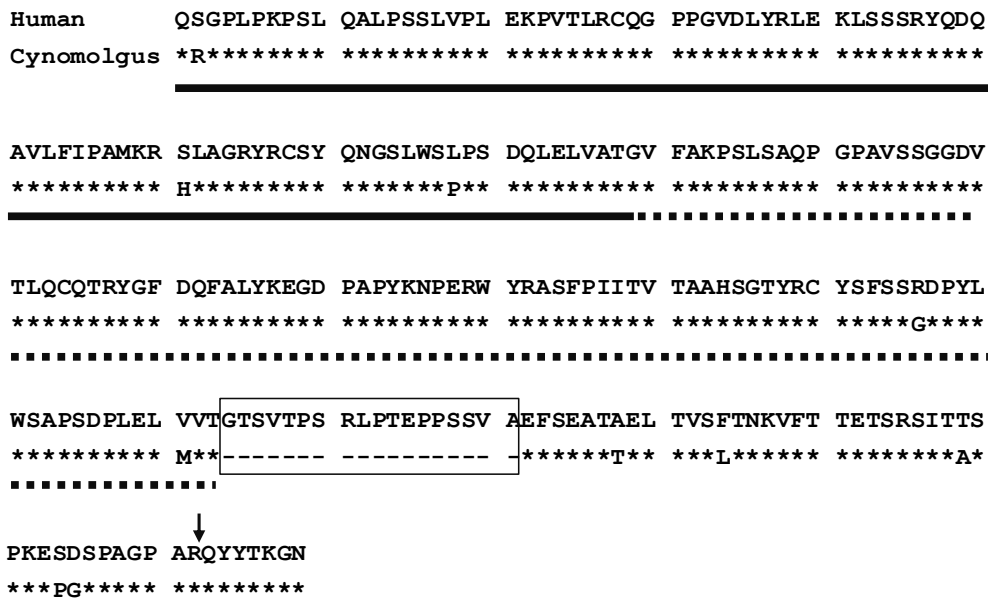


Figure 9 Amino acid alignments of extracellular domains of human GPVI and cynomolgus GPVI.

Amino acids identical to human GPVI are indicated by stars. The domain I and –domain II regions of GPVI are underlined with solid and dotted lines, respectively. The exon 5–encoded region is boxed in a solid line, while the putative cleavage site is indicated by the arrow.

#### 4-3-2. カニクイザル GPVI の交差反応性

次に、7S1/10S2-HRP アッセイのカニクイザル GPVI に対する交差反応性を確認した。カニクイザル sGPVI の cDNA 配列を基に組換えタンパク質 (cynomolgus GPVI-His) を調製し、

7S1/10S2-HRP で測定した。その結果、ヒト sGPVI と同等の反応性を示した (Figure 10A, 10B)。また、カニクイザル血小板由来の sGPVI に対する反応性を確認したところ、ヒト血小板での結果と同様に (3-3-3.参照)、GPVI ligand (Convulxin および CRP) 濃度依存的な sGPVI の産生を検出した (Figure 10C)。これらの結果は、カニクイザル sGPVI が 7S1/10S2-HRP に交差反応することを示している。

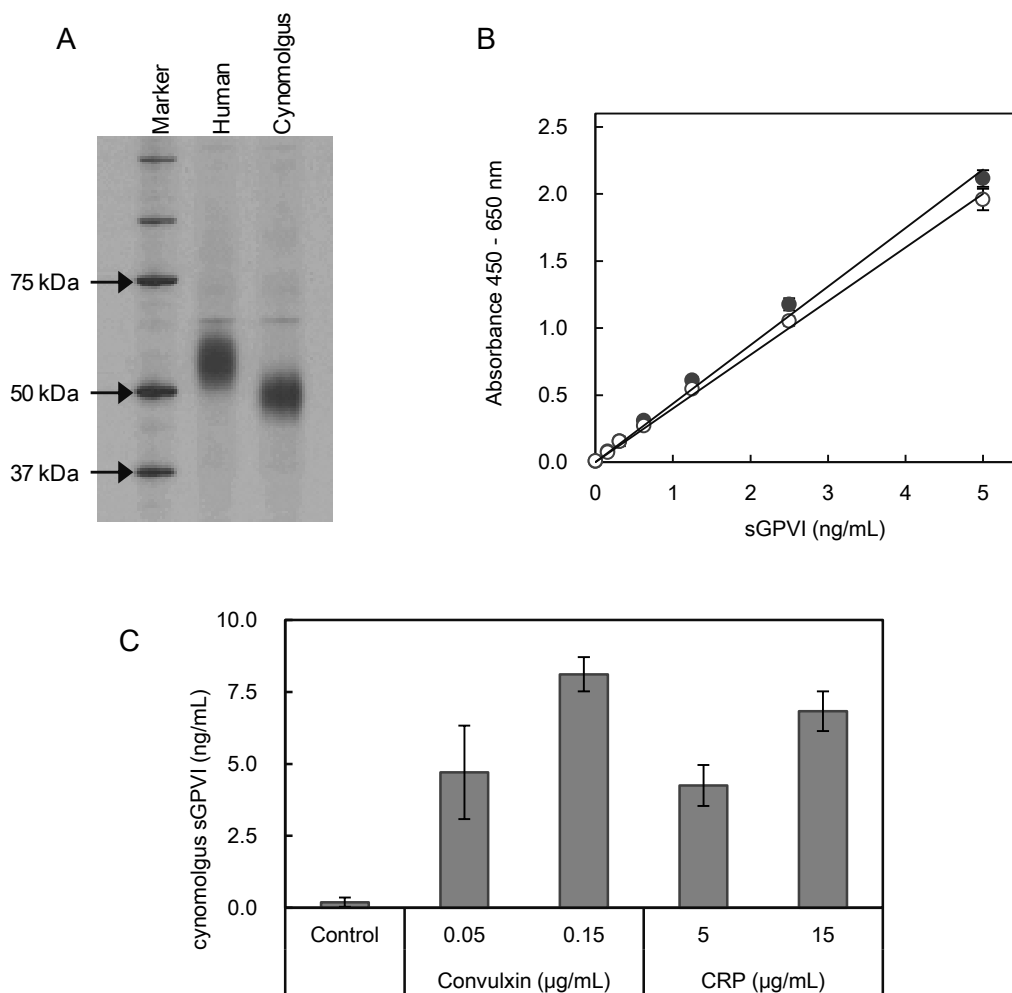


Figure 10 Cross-reactivity to cynomolgus monkey sGPVI.

SDS-PAGE was used to analyze recombinant human sGPVI (hGPVI-His) and cynomolgus sGPVI (cynomolgus GPVI-His) (A). The Marker was indicated molecular weight marker (Bio-Rad). Various concentrations of human sGPVI (closed circles) and cynomolgus monkey sGPVI (open circles) were applied to the immunoassay for human sGPVI (7S1/10S2-HRP) (B). Each symbol indicates mean  $\pm$  SD (n=4). Reactivity for sGPVI derived from cynomolgus monkey platelets (C). Washed platelets from cynomolgus monkeys were treated with or without (control) the GPVI ligands, convulxin and collagen-related peptide (CRP). Data are presented as mean  $\pm$  SD of three separate experiments from different cynomolgus monkeys.

#### 4-3-3. LPS 誘発カニクイザル血小板減少モデルにおける血小板マーカーの比較

LPS 誘発カニクイザル血小板減少モデルにより、sGPVI の血小板活性化マーカーとしての感度を検討した。カニクイザルに LPS (*E. coli* 0111:B4) を 10 mg/kg で静脈内投与し、投与 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, および 24 時間後の血中の血小板数、血小板活性化マーカー (sP-selectin および sGPVI) の濃度を測定した。その結果、LPS 投与直後から血小板数の低下 (Figure 11A)、凝固系マーカー (Thrombin-antithrombin complex ; TAT) の上昇が認められ (data not shown)、本モデルは DIC 様の症状を呈していると考えられた。また、本モデルにおける血漿中の sP-selectin 濃度と sGPVI 濃度を比較したところ、sP-selectin 濃度は LPS 投与後に緩やかに上昇し、投与 8 時間後にはコントロールと比較して 1.4 倍程度まで上昇した (Figure 11B)。一方、sGPVI 濃度は血小板活性化を鋭敏に反映し、投与 1 時間後には 2.5 倍、投与 8 時間後には 7.5 倍の上昇が認められた (Figure 11C)。また、LPS 投与 24 時間後の sGPVI 濃度は、LPS 投与前 (コントロール) と同等の濃度まで低下した。

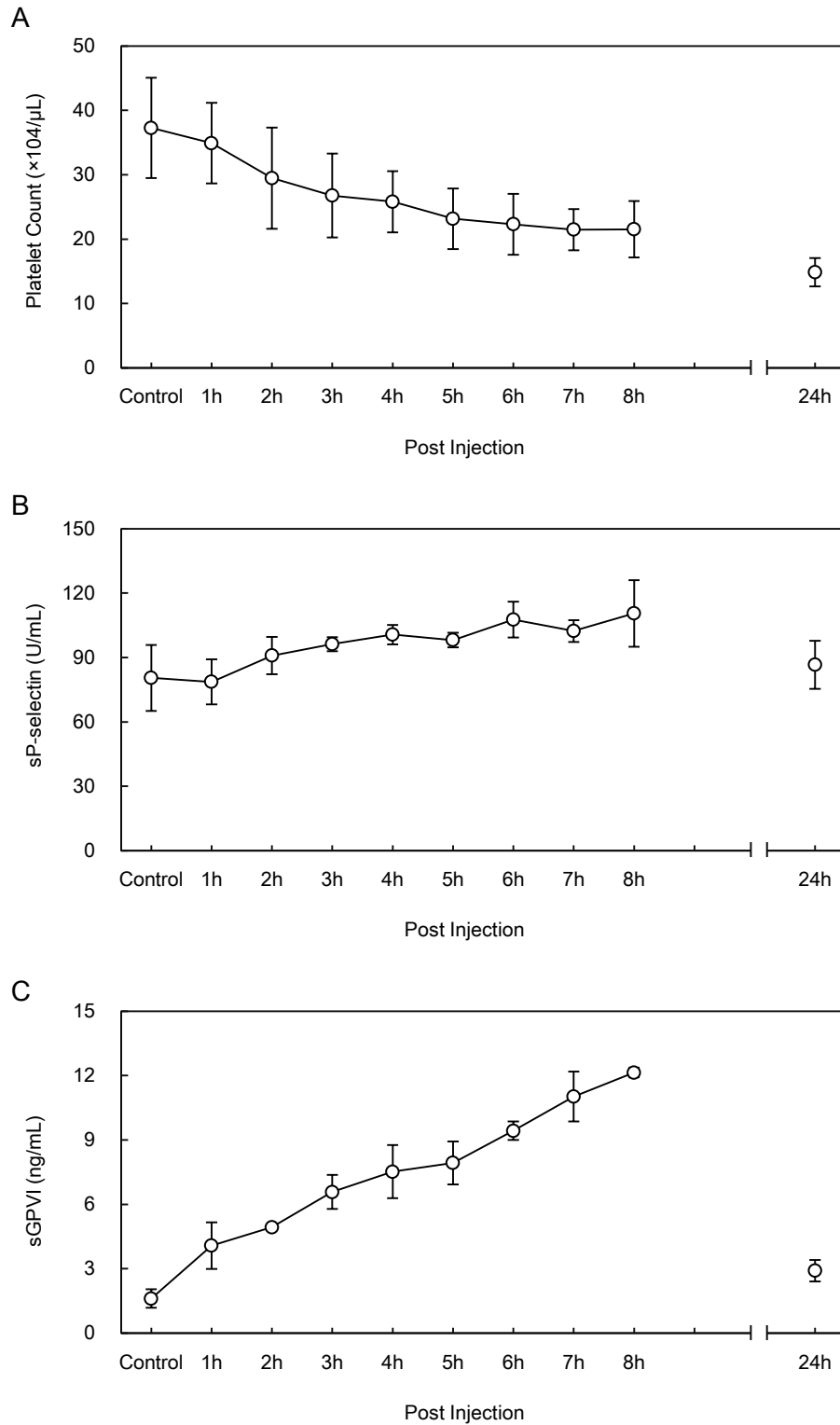


Figure 11 Time course of platelet count and levels of platelet markers in a thrombocytopenia model.

An LPS-induced thrombocytopenia model was prepared by intravenous administration of LPS (10 mg/kg) to male cynomolgus monkeys. Citrated blood samples were obtained at the indicated times after LPS injection; control signifies pre-injection. The platelet count and the levels of cynomolgus monkey sP-selectin and sGPVI in plasma are shown (A, B, and C). Each value represents means  $\pm$  SE (n=3).

#### 4-3-4. カニクイザルを用いた sGPVI の pharmacokinetics 解析

Recombinant human sGPVI (hGPVI-His) をカニクイザルに投与し (5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、血中の sGPVI 濃度の経時変化を 7S1/10S2-HRP アッセイで検出することで pharmacokinetics 解析を実施した (Figure 12)。また、カニクイザル由来の sGPVI 濃度 (投与前の sGPVI 濃度) をバックグラウンドとして処理した。2-コンパートメントモデルを用いて解析した結果、sGPVI の血中半減期は 1.8~3.1 時間 (平均 2.5 時間) であった (Table 6)。

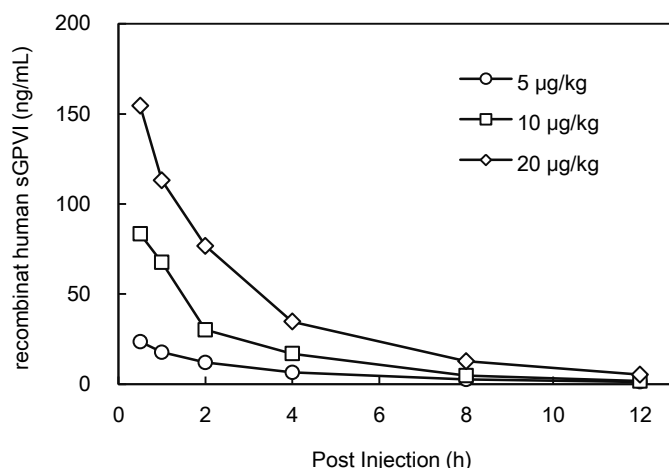


Figure 12 Pharmacokinetics study of sGPVI after single-dose intravenous administration in cynomolgus.

Recombinant human sGPVI (hGPVI-His) was intravenously administered to cynomolgus monkeys at the indicated doses. Citrated blood samples were obtained at 0.5, 1, 2, 4, 8 and 12 hours after recombinant human sGPVI injection, and the plasma levels of recombinant human sGPVI in cynomolgus monkeys were measured by sGPVI ELISA. Plasma sGPVI levels before administration were subtracted from the subsequently measured values. Data are expressed as mean value (n=2 per dose).

Table 6 Pharmacokinetics parameters of sGPVI in cynomolgus monkey.

Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$C_0$ (ng/ml)	$T_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/ml)	$CL_{tot}$ (ml/h/kg)
5	25.5	3.1	116	46.2
10	110	2.6	288	36.9
20	194	1.8	496	40.9

$C_0$ : initial plasma concentration extrapolated to time zero after intravenous administration,  $T_{1/2}$ : elimination half-life,  $AUC_{0-\infty}$ : area under the plasma concentration time curve from time 0 to infinity,  $CL_{tot}$ : total plasma clearance. Each value represents the means of 2 animals.

#### 第4節 考察

ヒトの GPVI はスプライシングバリエントにより、2 種類のアイソフォームが存在する。一方は完全長のヒト GPVI (GPVI-1) に対して、もう一方は exon 5 が欠損した GPVI-2 である [63]。GPVI-2 は GPVI-1 と同様に collagen に対して結合する能力を持ち、生理学的な存在意味は不明である。本研究において、カニクイザル GPVI はヒト GPVI-2 と同様に exon 5 欠損体であることが明らかとなった。血小板は血液凝固に対する凝集反応だけでなく、様々な機能が報告されているが、そのメカニズムは未解明の部分が多い。ヒト GPVI の exon 5 は進化の過程で獲得したアミノ酸配列で、コラーゲン受容体以外の機能に関与する可能性も否定できないが、本研究では exon5 の生理的な意義を解明するまでには至らなかった。今後の研究を期待したい。

DIC モデルは組織因子または LPS を投与することで凝固系を惹起させるが、投与する誘発物質により DIC の病像が異なる。本研究では敗血症 DIC におけるバイオマーカーの評価を目的としているため、LPS 誘発 DIC モデルを選定した。カニクイザルに LPS を 10 mg/kg で投与することで血小板数の減少と凝固系マーカーの上昇が確認され、本モデルは DIC 症状を引き起こしていると判断した。本モデルにおける血中の sP-selectin と sGPVI の濃度変化を比較した結果、sP-selectin 濃度は LPS 投与後に緩やかに上昇するのに対して、sGPVI 濃度は急激に上昇した。sGPVI は臨床研究で汎用されている sP-selectin よりも鋭敏に血小板の活性化を反映することが明らかとなった [64]。また、sGPVI が血小板に特異的に発現するのに対して、sP-selectin は血小板の他に血管内皮細胞にも発現が認められる。sGPVI は特異性の面でも sP-selectin より優れた血小板マーカーであると考えられる [65, 66]。

また、LPS 誘発カニクイザル血小板減少モデルにおいて、LPS 投与 24 時間後における sGPVI 濃度は、LPS 投与前の濃度まで低下した。GPVI の細胞外ドメインは immunoglobulin fold を形成する 2 つのドメイン (domain I および domain II) を持ち、VCAM-1 や ICAM-1 と同じくイムノグロブリン・スーパーファミリーに属していたため、sGPVI の血中安定性は高いと推測される [35, 67]。また、Revacept (Soluble GPVI-Fc Fusion: 障害を受けた血管内皮に結合し、血小板の凝集・血管の肥厚を阻害する組換えタンパク質。現在 phase II) の半減期は 100 時間以上であるが、これは Fc ドメインが付加されているため sGPVI の半減期を反映しているとは考えにくい [68, 69]。これまでにも sGPVI の半減期に関して議論されてきたが、実際に半減期を証明するような研究は行われていない。本研究では recombinant human sGPVI (hGPVI-His) をカニクイザルに投与することで pharmacokinetics 解析を実施し、その半減期は約 2.5 時間を示した。GPVI (Glycoprotein VI) は、その名の通り糖タンパク質である。組換え体技術で作製したタンパク質では、糖鎖構造を完全に再現することは難しい。しかしながら、① 血小板由来の sGPVI と recombinant human GPVI の分子量は共に 55kDa とほぼ同等であること、② 正常ヒト尿中に sGPVI は  $15 \pm 3.2$  ng/mL (mean $\pm$ SE; n=10) と血中と同等な濃度が存在することから (data not shown)、sGPVI の消失は腎クリアランスの影響を受けることが予想された。これらの結果を併せて考えても、本研究における半減期の値は暫定的な値ではあるが sGPVI の半減期はそれほど長くないことが予想された。

臨床では冠動脈疾患の一次予防として、また脳梗塞患者や心筋梗塞患者における二次予防として抗血小板薬（クロピドグレルおよびアスピリン）が処方される [70, 71]。しかし、これらの薬剤の効果には重大な個人差があることが多数の臨床研究から報告されている。クロピドグレルはプロドラッグであり、CYP の遺伝多型の患者には全く効力が認められない (Clopidogrel resistance)。一方で overdose により脳内出血の危険発生することも懸念されている。抗血小板薬の治療効果をモニターすることは臨床上大きな意義があるが、未だに血小板の機能や、活性化状態を診断することは困難である [72, 73]。本研究において sGPVI は鋭敏に血小板の活性化を反映し、さらには適当な半減期プロファイルを持つことが明らかとなった。つまり sGPVI は血小板活性化を判定する『診断マーカー』としてだけでなく、治療効果を判定する『モニタリングマーカー』としても利用できる可能性が示唆された。今後、患者検体を用いた sGPVI のさらなる臨床研究が期待される。

## 総括

本研究では『敗血症 DIC 疾患におけるバイオマーカー』をテーマに、敗血症における診断マーカー『Presepsin』と、敗血症から重症化 (DIC) する際のモニタリングマーカーとして『sGPVI』に着目し、測定系の開発およびバイオマーカーとしての有用性を評価した。

敗血症は病原体の全身感染によって引きこされた全身性炎症反応症候群 (SIRS) である。重症化後 (DIC、敗血症ショック) の死亡率は約 6 割と非常に予後が悪く、早期診断および早期治療介入が必須な疾患である。SIRS おいて感染・非感染を判定することは、その後の治療方針の決定に重要な役割を果たすが、現在の敗血症診断は医師による経験に基づくものが多く、客観的に感染の有無を判定するのは非常に困難である。そんな中で presepsin (CD14 の N 末断片) は診断の感度および特異性が高く、さらに血中濃度と重症度が相関することで注目されている。また、presepsin は白血球が細菌を貪食・消化する過程で産生されることが明らかとなっており、その産生メカニズムからも理想的な敗血症マーカーであると考えられている。しかし、初期に開発されたアッセイは two-step ELISA であるため、測定開始から結果が得られるまで 4 時間を要し、救急医療における利用価値は低い。そこで本研究では、臨床測定機器への応用性が高い one-step ELISA の検討を行った。その結果、改良したアッセイは再現性と頑健性に優れ、既存のアッセイとも高い相関性を示した。また、sCD14 に対する反応性が 0.001%以下であり、測定系を構成する anti-presepsin 抗体は sCD14 には反応せず、presepsin に対して高い特異性を持つことが明らかとなった。さらに、アッセイ時間は 1.5 時間と大幅に短縮され、本研究成果は自動臨床測定機器や POCT の開発に繋がると考えられる。実際に presepsin は 2014 年 1 月に保険収載され、現在はパフアースト (LSI メディエンス) を用いて 17 分で測定が可能となっている [28]。

感染 (敗血症) から重症化 (DIC) へ移行するメカニズムは、細菌由来の LPS がマクロファージや好中球を介して、または直接的に血管内皮細胞を活性化させることから開始される。活性化された血管内皮細胞から産生される組織因子や血小板活性化因子は、凝固系や血小板を活性化させ、血管内に過剰な血栓を形成することで DIC 症状を引き起こす。また、血小板は炎症に関与する受容体を多く発現し、炎症性のモジュレーターを産生する分子である。つまり、血小板は血栓形成における単なるレスポンドーではなく、炎症のメディエーターとして病態の進展に重要な役割を果たしている。そこで、血小板活性化を鋭敏にとらえるバイオマーカーは、初期の炎症反応や血栓形成傾向を捉える有用なバイオマーカーになる可能性があると考え、血小板特異的に発現する GPVI に着目し、測定系の開発およびバイオマーカーとしての有用性を評価した。

sGPVI は血小板特異性が高く、活性化に伴い産生されることから、新規の血小板マーカーとして注目されている。これまでも複数のグループが測定系を樹立し、臨床検体を用いた評価を行っているが、各グループの結果は全く異なっている。この結果の差異について原因は明らかとなっていないが、測定系を構成する抗体の特性が一つの要因として挙げられる。そこで、本研究では、最初に recombinant GPVI (hGPVI-mFc) をマウスに免疫することで、anti-GPVI モノクローナル抗体を 4 種類 (7S1, 10S2, 19D1, 21D1) 作製し、抗体の抗原特異性や抗原認識部位の解析を行った。ヒト GPVI とマウス GPVI のキメラタンパク質によるエピトープ解析を実施し



た結果、10S2 および 21D1 は GPVI の domain I を認識し、7D1 および 19D1 は domain II を認識した。血小板上に発現する膜型 GPVI に対する結合を flow cytometry にて確認したところ、全ての抗体に結合活性が認められた。SPR で sGPVI に対する親和性評価を評価した結果、7S1 および 10S2 は monomeric sGPVI と dimeric sGPVI に対して高い親和性を示したが、19D1 および 21D1 は dimeric sGPVI のみを強く認識した。得られた抗 GPVI 抗体は多様な GPVI の構造を認識し、さらには多様なエпитープを持つことが明らかとなった。

次に、得られた 4 種の抗体を用いて、2 種のサンドイッチ ELISA を作製した。monomeric sGPVI と dimeric sGPVI を認識する抗体で構成された測定系 (7S1/10S2-HRP) と、dimeric sGPVI のみを認識する抗体で構成された測定系 (19D1/21D1-HRP) である。両アッセイは dimeric sGPVI に対して同等の反応性を示したが、monomeric sGPVI に関しては約 100 倍の反応性の差が認められた。構成している抗体のスペックをそのまま反映した結果となった。次に、両アッセイにおける血小板由来 sGPVI の反応性を比較した。その結果、7S1/10S2-HRP は高感度に血小板由来の sGPVI を認識したが、19D1/21D1-HRP は全く反応性を示さなかった。さらに Wada らは 7S1/10S2-HRP を用いて、血栓性微小血管症 (TMA) や DIC 患者における sGPVI 濃度の上昇を報告している [58]。これらの結果は、sGPVI は血中において monomer 構造で存在することを強く示唆しており、また 7S1/10S2-HRP は有用なアッセイであることを示している。

最後に sGPVI のバイオマーカーとしての有用性を動物実験で評価した。7S1/10S2-HRP がカニクイザルの sGPVI に交差反応性を示したため、LPS 惹起カニクイザル血小板減少症モデル (DIC 様モデル) を用いてバイオマーカーとしての感度を検討した。その結果、sGPVI は sP-selectin よりも鋭敏に血小板の活性化を捉えることが明らかとなった。また、カニクイザルを用いて sGPVI の pharmacokinetics 解析を実施し、sGPVI の半減期が約 2.5 時間と比較的短時間であることが明らかとなった。これは sGPVI が治療効果のモニタリングマーカーとして利用可能であることを示唆している。

本研究では、敗血症のバイオマーカーである presepsin の測定系の改良と、敗血症から DIC へ重症化する際のモニタリングマーカーとして sGPVI に着目し、測定系の開発とバイオマーカーとしての有用性を評価した。敗血症 DIC は感染による炎症や血液の凝固・線溶反応が複雑に絡み合った病態である。患者の病態変化を早期にかつ適切に把握することで早期に適切な治療介入が可能となり、さらには患者の予後改善に繋がると考えられる。今後、多様な臨床検体を測定することで、presepsin および sGPVI のさらなる解析が期待される。

## 謝辞

終わりに臨み、本学位論文の主査を快く引き受けてくださり、格別なるご指導と御助言を賜りました静岡県立大学大学院 薬学研究院 生薬学教室教授 野口 博司 先生に厚く御礼申し上げます。また、副査を引き受けてくださり、終始御懇篤なるご指導と御鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院 薬学研究院 医薬生命化学教室教授 奥 直人 先生、免疫微生物学教室教授 今井 康之 先生、並びに臨床薬効解析学教室教授 伊藤 邦彦 先生に心より御礼申し上げます。

また、本学位論文の主論文『Presepsin (sCD14-ST): development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients.』、『Properties of soluble glycoprotein VI, a potential platelet activation biomarker.』、『Establishment of immunoassay for platelet-derived soluble glycoprotein VI, a novel platelet marker.』において、共著者であります白川 嘉門 様、広瀬 二郎 氏、保坂 義隆 様、川原 哲史 様、本田 元康 様、高橋 智裕 様、小川 久美子 様、古迫 正司 様に感謝いたします。

さらに本研究の遂行にあたり、ご協力を賜りました持田製薬株式会社 創薬研究所の皆様にも心より感謝いたします。

最後に、私の研究生生活を理解し、支えてくれた両親、家族に厚く感謝の意を表します。

内藤克紀

## 参考文献

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95.
2. La Thangue NB, Kerr DJ. Predictive biomarkers : a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:587-596.
3. 医薬産業政策研究所 リサーチペーパー・シリーズ 2013年3月 No.57.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-1655.
5. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:210-217.
6. Christ-Crain M1, Müller B. Procalcitonin in bacterial infections--hype, hope, more or less? *Swiss Med Wkly* 2005;135:451-460.
7. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 2010;14:R15.
8. Katsuki N, Kamon shirakawa et. Al. The new sepsis marker, sCD14-ST (PRESEPSIN), induction mechanism in the rabbit sepsis models. *SEPSIS* 2010 Poster:P-19.
9. Arai Y, Mizugishi K, Nonomura K, Naitoh K, Takaori-Kondo A, Yamashita K. Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin. *J Infect Chemother* 2015;21:564-569
10. 丸藤 哲, 救急領域における DIC の診断と治療. 血栓止血誌 2008;19:353-357.
11. 前川正 : DIC の診断基準について、厚生省特定疾患汎発性血管内血液凝固症調査研究班業績集報告 昭和 54 年度 ; 汎発性血管内凝固症 III. 厚生省特定疾患汎発性血管内血液凝固症調査研究班 1980, 5-12
12. Kobayashi N, Maekawa T, Takada M, Tanaka H, Gonmori H. Criteria for diagnosis of DIC based on the analysis of clinical and laboratory findings in 345 DIC patients collected by the Research Committee on DIC in Japan. *Bibl Haematol* 1983;49:265-75.
13. 青木延雄, 長谷川淳 : DIC 診断基準の「診断のための補助的検査成績、所見」の項の改訂について、厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班 昭和 62 年度研究報告書, 厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班
14. Taylor FB Jr1, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M; Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:1327-1330.

15. 丸藤 哲, 射場敏明, 江口 豊, 大友 康裕, 岡本 好司, 小関 一英, 真弓 俊彦, 村田厚夫, 池田 寿昭, 石倉 宏恭, 上山 昌史, 小倉 裕司, 久志本 成樹, 齋藤 大蔵, 遠藤 重厚, 島崎 修次. 急性期 DIC 診断基準 多施設共同前向き試験結果報告. *日本救急医学会雑誌* 2005;16:188-202.
16. 丸藤 哲, 池田 寿昭, 石倉 宏恭, 射場 敏明, 上山 昌史, 江口 豊, 大友 康裕, 岡本 好司, 小倉 裕司, 久志本 成樹, 小関 一英, 齋藤 大蔵, 真弓 俊彦, 遠藤 重厚, 島崎 修次. 急性期 DIC 診断基準—第二次多施設共同前向き試験結果報告. *日本救急医学会雑誌* 2007;18:237-272.
17. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol* 2009;103:20A-26A.
18. Burdess A, Michelsen AE, Brosstad F, Fox KA, Newby DE, Nimmo AF. Platelet activation in patients with peripheral vascular disease: reproducibility and comparability of platelet markers. *Thromb Res* 2012;129:50-55.
19. Gurney D, Lip GY, Blann AD. A reliable plasma marker of platelet activation: does it exist? *Am J Hematol* 2002;70:139-144.
20. Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, Suzuki Y, Kojika M, Imai S, Takahashi G, Miyata M, Furusako S, Endo S. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *J Infect Chemother* 2005;11:234-238.
21. Shirakawa K, Naitoh K, Hirose J, Takahashi T, Furusako S. Presepsin (sCD14-ST): development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:937-939.
22. Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, Kojika M, Okamura Y, Endo S. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Chemother* 2011;17:764-769.
23. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, Nishida T, Irie Y, Miura M, Iguchi H, Fukui Y, Tanaka K, Nojima T, Okamura Y. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2012;18:891-897.
24. Ulla M, Pizzolato E, Lucchiari M, Loiacono M, Soardo F, Forno D, Morello F, Lupia E, Moiraghi C, Mengozzi G, Battista S. Diagnostic and prognostic value of presepsin in the management of sepsis in the emergency department: a multicenter prospective study. *Crit Care* 2013;17:R168.
25. Cakır Madenci Ö, Yakupoğlu S, Benzonana N, Yücel N, Akbaba D, Orçun Kaptanağası A. Evaluation of soluble CD14 subtype (presepsin) in burn sepsis. *Burns* 2014;40:664-669.
26. Mizushima S, Nagata S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 1990;18:5322-5322.

27. R. P. Dellinger et. al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012. *Intensive Care Medicine* 2013;39:165-228.
28. Okamura Y, Yokoi H. Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (sCD14-ST). *Clin Chim Acta* 2011;412:2157-2161.
29. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem* 1997;272:23528-23531.
30. Leitinger B. Transmembrane collagen receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:265-290.
31. Gardiner EE, Arthur JF, Kahn ML, Berndt MC, Andrews RK. Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase. *Blood* 2004;104:3611-3617.
32. Gardiner EE, Karunakaran D, Shen Y, Arthur JF, Andrews RK, Berndt MC. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J Thromb Haemost* 2007;5:1530-1537.
33. Al-Tamimi M, Grigoriadis G, Tran H, Paul E, Servadei P, Berndt MC, Gardiner EE, Andrews RK. Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa. *Blood* 2011;117:3912-392
34. Andrews RK, Karunakaran D, Gardiner EE, Berndt MC. Platelet receptor proteolysis: a mechanism for downregulating platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1511-1520.
35. Gardiner EE, Al-Tamimi M, Andrews RK, Berndt MC. Platelet receptor shedding. *Methods Mol Biol* 2012;788:321-339.
36. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1987;69:1712-1720.
37. Moroi M1, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 1989;84:1440-1445.
38. Lockyer S, Okuyama K, Begum S, Le S, Sun B, Watanabe T, Matsumoto Y, Yoshitake M, Kambayashi J, Tandon NN. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb Res* 2006;118:371-380.
39. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C, Zirngibl H. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 2001;193:459-69.
40. Matsumoto Y, Takizawa H, Nakama K, Gong X, Yamada Y, Tandon NN, Kambayashi J.

- Ex vivo evaluation of anti-GPVI antibody in cynomolgus monkeys: dissociation between anti-platelet aggregatory effect and bleeding time. *Thromb Haemost* 2006;96:167-175.
41. Bender M, Hofmann S, Stegner D, Chalaris A, Bösl M, Braun A, Scheller J, Rose-John S, Nieswandt B. Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases. *Blood* 2010;116:3347-3355.
  42. Takayama H, Hosaka Y, Nakayama K, Shirakawa K, Naitoh K, Matsusue T, Shinozaki M, Honda M, Yatagai Y, Kawahara T, Hirose J, Yokoyama T, Kurihara M, Furusako S. A novel antiplatelet antibody therapy that induces cAMP-dependent endocytosis of the GPVI/Fc receptor gamma-chain complex. *J. Clin. Invest* 2008;118:1785-1795.
  43. Loyau S, Dumont B, Ollivier V, Boulaftali Y, Feldman L, Ajzenberg N, Jandrot-Perrus M. Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:778-785.
  44. Jung SM, Tsuji K, Moroi M. Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *J Thromb Haemost* 2009;7:1347-1355.
  45. Sambrook, J., and Russel, D.W.. Site-specific mutagenesis by overlap extension. In Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA* 13.36–13.39.
  46. Stephens G, Yan Y, Jandrot-Perrus M, Villeval JL, Clemetson KJ, Phillips DR. Platelet activation induces metalloproteinase-dependent GP VI cleavage to down-regulate platelet reactivity to collagen. *Blood* 2005;105:186-191.
  47. Miura Y, Takahashi T, Jung SM, Moroi M. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem* 2002;277:46197-46204.
  48. Horii K, Kahn ML, Herr AB. Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood* 2006;108:936-942.
  49. Herr AB. Direct evidence of a native GPVI dimer at the platelet surface. *J Thromb Haemost* 2009;7:1344-1346.
  50. Tomita M, Hirano M, Watanabe E et al. A new technology for intact antigen-based and receptor-mediated generation of novel monoclonal antibodies. *Hum. Antibodies* 2007;16:40–41.
  51. Fong KP, Barry C, Tran AN, Traxler EA, Wannemacher KM, Tang HY, Speicher KD, Blair IA, Speicher DW, Grosser T, Brass LF. Deciphering the human platelet sheddome. *Blood* 2011;117:e15-26.
  52. Al-Tamimi M, Arthur JF, Gardiner E, Andrews RK. Focusing on plasma glycoprotein VI. *Thromb. Haemost* 2012;107: 648-655
  53. Al-Tamimi M, Gardiner EE, Thom JY, Shen Y, Cooper MN, Hankey GJ, Berndt MC,

- Baker RI, Andrews RK. Soluble glycoprotein VI is raised in the plasma of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2011;42: 498-500.
54. Gardiner EE, Al-Tamimi M, Mu FT, Karunakaran D, Thom JY, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Baker RI. Compromised ITAM-based platelet receptor function in a patient with immune thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost* 2008;6:1175-1182.
  55. Nurden P, Tandon N, Takizawa H, Couzi L, Morel D, Fiore M, Pillois X, Loyau S, Jandrot-Perrus M, Nurden AT. An acquired inhibitor to the GPVI platelet collagen receptor in a patient with lupus nephritis. *J. Thromb. Haemost* 2009;7:1541-1549.
  56. Bigalke B, Stellos K, Weig HJ, Geisler T, Seizer P, Kremmer E, Pötz O, Joos T, May AE, Lindemann S, Gawaz M. Regulation of platelet glycoprotein VI (GPVI) surface expression and of soluble GPVI in patients with atrial fibrillation (AF) and acute coronary syndrome (ACS). *Basic Res. Cardiol* 2009;104:352-357.
  57. Al-Tamimi M, Mu FT, Moroi M, Gardiner EE, Berndt MC, Andrews RK. Measuring soluble platelet glycoprotein VI in human plasma by ELISA. *Platelets* 2009;20:143-149.
  58. Yamashita Y, Naitoh K, Wada H, Ikejiri M, Mastumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N. Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic microangiopathy. *Thromb Res* 2014;133:440-444.
  59. Bigalke B, Pötz O, Kremmer E, Geisler T, Seizer P, Puntmann VO, Phinikaridou A, Chiribiri A, Nagel E, Botnar RM, Joos T, Gawaz M. Sandwich immunoassay for soluble glycoprotein VI in patients with symptomatic coronary artery disease. *Clin Chem* 2011;57:898-904.
  60. Al-Tamimi M, Mu FT, Moroi M, Gardiner EE, Berndt MC, Andrews RK. Measuring soluble platelet glycoprotein VI in human plasma by ELISA. *Platelets* 2009;20:143-149.
  61. Arthur JF, Shen Y, Kahn ML, Berndt MC, Andrews RK, Gardiner EE. Ligand binding rapidly induces disulfide-dependent dimerization of glycoprotein VI on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem* 2007;282:30434-30441.
  62. Okada H, Imai M, Ono F, Okada A, Tada T, Mizue Y, Terao K, Okada N. Novel complementary peptides to target molecules. *Anticancer Res* 2011;31:2511-2516.
  63. Ezumi Y, Uchiyama T, Takayama H. Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localization, and alternative splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:27-36.
  64. Katayama M, Handa M, Araki Y, Ambo H, Kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y. Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *Br J Haematol* 1993;84:702-710.
  65. Wagner DD. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost* 1993;70:105-110.
  66. Gurbel PA, Kereiakes DJ, Serebruany VL. Soluble P-selectin is not a surrogate marker

- for platelet P-selectin: evidence from a multicenter chest pain study group. *J Thromb Thrombolysis* 2000;10:15-22.
67. Gardiner EE, Thom JY, Al-Tamimi M, Hughes A, Berndt MC, Andrews RK, Baker RI. Restored platelet function after romiplostim treatment in a patient with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2010;149:625-628.
  68. Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, Piechatzek R, Uhland K, Schlieper P, Gawaz M, Münch G. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation* 2011;123: 1891-1899.
  69. Wu B, Sun YN. Pharmacokinetics of Peptide-Fc fusion proteins. *J Pharm Sci* 2014; 103:53-64.
  70. T Medical Research Council's General Practice Research Framework. Thrombosis prevention trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. *Lancet* 1998;351:233-241.
  71. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Flather MD, Haffner SM, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak KH, Mas JL, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Brennan DM, Fabry-Ribaudo L, Booth J, Topol EJ. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006;354:1706-1717.
  72. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: Molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:230-237.
  73. Oqueli E, Hiscock M, Dick R. Clopidogrel resistance. *Heart Lung Circ* 2007;16 Suppl 3:S17-S28.
  74. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 2005;106:2417-2423.
  75. Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KW, Nestel FP, Ni H, Lazarus AH, Freedman J, Semple JW. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood* 2006;107:637-641.
  76. Herter JM, Rossaint J, Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J Thromb Haemost* 2014;12:1764-1775.