

論文の内容の要旨

論文題目 全血における血小板マイクロパーティクルの産生機構

指導教官 平井 久丸

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月 入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 高野 勝弘

【序文】血小板が刺激をうけて活性化されると、細胞膜の一部が遊離し微小な膜小胞体が生成される。これは血小板マイクロパーティクル (platelet microparticle, PMP) と呼ばれ、procoagulant 活性を有し凝固カスケードに関与し、血栓形成、特に動脈血栓に関与すると考えられている。実際、PMP は臨床検体における検討でも、心筋梗塞、脳梗塞、糖尿病、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)、閉塞性動脈硬化症 (ASO)、artery bypass surgery、血液透析、病的流産、等の血栓が関係すると思われる疾患において著明に産生されているとされている。PMP はまた、白血球、内皮細胞との接着分子を発現しており、炎症、動脈硬化に関与していると考えられている。

in vitro では血小板浮遊液やチトラート採血の platelet-rich plasma (PRP) を用いた報告が多くなされているが、臨床検体における報告と矛盾することに、PMP 産生のためには高濃度の thrombin + collagen や calcium ionophore など、非常に強力な刺激あるいは非生理的な刺激が必要とされている。Thrombin 単

独では中等量の PMP 産生をひきおこすが, collagen は単独ではあまり PMP を産生させず, thrombin とともに用いることで thrombin 惹起 PMP 産生を増強させるとする報告が多い. 一方, ADP やエピネフリン等, 血小板の weak agonist(s) での PMP 産生の報告は非常に少ない. 近年, 2 種類の ADP 受容体 P2Y₁ 及び P2Y₁₂ がクローニングされ, それぞれの機能が解析されてきているが, これら受容体と PMP 産生との関係を研究した報告はほとんどない.

PMP 産生と血小板 procoagulant 活性は非常に密接に関連している. 血小板 procoagulant 活性とは, 血小板の活性化にともない細胞膜の内膜に局在している陰性荷電のリン脂質 (phosphatidylserine (PS) , phosphatidylethanolamine (PE) 等) が外膜に移動し, プロトロンビナーゼ複合体を結合させ凝固カスケード進展の場を提供するという現象であるが, この PS, PE の細胞膜外側への移動はアポトーシスのさい一般細胞においても見られる. caspase, calpain はアポトーシスに関与する重要な Ca 依存性細胞内プロテアーゼであるが, これらプロテアーゼ, 特に calpain の活性化が PMP 産生と密接に関連するという報告があり, PMP 産生の主要なメカニズムのひとつとして注目される. *in vivo* での PMP 産生の実際の機序や, どの受容体への刺激が関与しているかを明らかにすることは, 動脈血栓, 動脈硬化症に関わる疾患の予防/治療を考えるうえで大きな意義を持つと思われる.

【方法】フローサイトメーターによる全血, PRP からの血小板および PMP を定量する測定系を確立した. より *in vivo* での条件に近づけるため, サンプル血液にチトラートではなく, 抗 thrombin 剤であるアルガトロバン (0.2 mg/ml) 採血のものを使い, 生理的細胞外カルシウム濃度を保つようにした. 血小板/PMP のマーカーとして FITC 標識抗 CD41 抗体 (annexinV の実験の時は PerCP 標識抗 CD61 抗体) を使用, procoagulant 活性は FITC 標識 annexinV の結合率を測定することで評価した. 血小板刺激は, 過度の凝集を避けるため静的な系で行った. Calpain の活性はウエスタンブロッティング法で評価した.

【結果/考察】検討したアゴニストでは, collagen 刺激において最も著明な PMP 産生が見られており, collagen 受容体の細胞内シグナルが PMP 産生に大きな意味を持つことが示唆される. PMP は convulxin で collagen と同様に著明に産生され, rhodocytin でほとんど産生されないこと, また collagen による PMP 産生は PP1 によってほぼ完全に抑制されることから, 特に GP VI を介するシグナルが重要と思われる. この顕著な PMP 産生には, 生理的濃度の細胞外カルシウムの存在が重要であり, 抗凝固剤として EGTA, チトラートを用いると PMP 産生は著明に減少した. 一方, PAR1 への SFLI による刺激では, PMP 産生は

非常に弱いものであった。Dörmann らの報告でも SFLL 刺激では血小板 procoagulant 活性は非常に弱く、thrombin による procoagulant 活性の強い増加には GP Ib からのシグナルも同時におこることが重要であるとしており (Blood96,2469-2478,2000), PMP 産生に関してもこういった thrombin と SFLL の違いを考える必要があると思われる。Dörmann らは、thrombin による procoagulant 活性には GP Ib の thrombin 結合領域が関与し vWF 結合領域は関与していないと報告しているが、今回の実験では TM60, GUR20-5 の方が AjvW2 よりもより顕著ではあったが、ともに抑制効果は有為であり、collagen による PMP 産生には thrombin 結合領域, vWF 結合領域ともに関与していると考えられた。

また、20 μ g/ml collagen と 100 μ M SFLL では血小板凝集は同程度であり、PMP 産生と血小板凝集が必ずしも相関しないことが示唆された。血小板凝集は GP IIb/IIIa の活性化に伴う立体構造の変化により起こるが、GP IIb/IIIa をブロックすると PMP 産生が著明に抑制されるという報告は多く、今回の実験でも RGDS により PMP 産生は著明に減少している。RGDS により血小板凝集も大きく減少しているが、血小板凝集と PMP 産生が必ずしも相関しないことを考慮すると、この PMP 産生抑制は血小板凝集が減少した結果ではなく、GP IIb/IIIa の outside-in シグナルをブロックしたためにおこっていると考えられる。

collagen 刺激による PMP 産生は、全血と PRP とで大きな差がみられた。PRP に赤血球を加えると濃度依存性に PMP 産生増加がみられ、全血での顕著な PMP 産生には赤血球の存在が重要であると考えられた。PRP を少量の ADP と collagen で刺激すると collagen 単独刺激に比べ PMP 産生は著しく増加し、全血に ADP スカベンジャーを加えると PMP 産生は抑制され、赤血球は ADP の供給源として作用し、PMP 産生増加をおこしていることが示唆された。ADP 単独でもある程度の PMP 産生が認められるが、上記の結果からは、ADP は *in vivo* では (赤血球から供給される) 少量が collagen 作用増強に働いていることが示唆される。この ADP 作用における P2Y₁, P2Y₁₂ の関与につき、それぞれの特異的阻害剤 A3P5P 及び AR-C69931 を用いて検討したところ、ともに collagen による PMP 産生を著明に抑制し、両方を用いると抑制効果はさらに強まったことから、collagen 作用の増強に関しては両受容体は相乗的に働いていると考えられた。

今回の実験では、calpain の活性化は PMP 産生が顕著である PRP での ADP+collagen では見られなかった。calpain の特異的インヒビターである calpeptin を用いても PMP 産生の抑制はみられず、calpain は、この系ではあまり重要で

なく、*in vivo* での PMP 産生のメカニズムを考えた場合、他の因子を考える必要があると思われる。PMP 産生は procoagulant 活性と一致して見られており、PS/ PE の細胞膜内側での維持、あるいは細胞膜表面への露出に関与すると考えられている物質、例えば aminophospholipid translocase (flipase), scramblase などが PMP を産生させるメカニズムとして働いている可能性がある。今回、他の protease として caspase についても検討したが、2 種の inhibitor はいずれも collagen による PMP 産生を抑制せず、caspase は PMP 産生の主要な因子ではないと考えられた。また A23187 あるいは thrombin + collagen では calpain は活性化されており、従来報告と一致するものであったが、これらは非生理的な血小板刺激あるいは強すぎる刺激であり、*in vivo* での PMP 産生を再現しているかどうかは疑問である。ただしこの結果からは、PMP が刺激により異なった機序で産生されている可能性があることが示唆された。

【総括】

- (1) 全血で生理的濃度の細胞外カルシウムが存在する条件での PMP 測定系を確立した。この系は *in vivo* での PMP 産生をより正確に反映していると考えられ、この条件下では collagen により顕著な PMP の産生が見られた。
- (2) GP VI を介する細胞内シグナルは、GP Ib, GP IIb/ IIIa outside-in シグナルとともに、PMP 産生にとって重要である。GP Ia/ IIa, PAR1 の刺激は、PMP 産生に大きく関与しないと考えられる。
- (3) 赤血球は、ADP 供給源として、全血での collagen による PMP 産生を強めるように作用する。P2Y₁, P2Y₁₂ 両受容体はともにこの増強作用に関与していると考えられる。
- (4) 血小板 procoagulant 活性は PMP 産生と強く相関する。一方、calpain の活性化は、全血での collagen による PMP 産生に大きく関与しないと考えられる。