

総説

血小板に魅せられて

岡野こずえ

山口大学大学院医学系研究科病態検査学分野(病態検査学) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 活性化血小板, 凝固止血機構, マイクロパーティクル, 測定法の開発, 血栓性疾患

抄録

血小板は直径2~4 μm の円盤状で、無核の微小細胞である。しかし、その内部の α 顆粒には血小板由来増殖因子、 β -トロンボグロブリン、von Willbrand (vWF) 因子、濃染顆粒にはADP、ATP、セロトニンなど様々な物質を含んでいる。また血小板膜表面にはvWFの受容体の膜糖蛋白 (GP) Ib/IX/V複合体やコラーゲンの受容体であるGPIIなど特有の機能的GPが存在し、生体の止血機構に重要な役目を果たしている。一方、血小板は活性化し易く形態の変形や粘着・凝集を起こし、崩壊後に微細粒子 (MP) 化することから、臨床検査法の対象としては取り扱いの難しい細胞でもある。その血小板に関して、測定方法に始まり巨核芽球性白血病の診断方法、血小板機能評価方法と血栓止血機構との関連性をテーマに研究を進めてきている。

活性化血小板由来マイクロパーティクル (aPLT-MP) は、強力な凝固活性促進や炎症促進作用を持ち、止血作用だけでなく脳梗塞や心筋梗塞の病因となる動脈硬化病変の形成にも強く関連している。しかし、MPは血小板の他に単球や血管内皮細胞など様々な細胞から産生され、細胞によってその動脈硬化病変の形成作用が異なると考えられているが、それらを鑑別測定できる検査法は確立されていない。現在、我々は血液中の多様なMPの中でもaPLT-MPを特異的に定量出来る高感度ELISAを開発し、種々の血栓症患者を対象に臨床的有用性の検討に取

り組んでいる。さらに、aPLT-MP以外のMP検出法を開発し、各細胞由来MPが血栓形成作用や炎症促進作用にどのように関与しているかをaPLT-MPとの比較で明らかにする研究を行っている。今回はその研究経過について報告する。

はじめに

血小板は直径2~4 μm の円盤状で、無核の微小細胞である。しかし、その内部の α 顆粒には血小板由来増殖因子、 β -トロンボグロブリン、von Willbrand Factor (vWF)、濃染顆粒にはADP、ATP、セロトニンなど様々な物質を含んでいる。また血小板膜表面にはvWF受容体の膜糖蛋白 (GP) Ib/IX/V複合体やフィブリノゲンと結合するGPIIb/IIIa複合体など特有の機能的GPが存在している。生体侵襲により血管壁が損傷すると血小板は、血管内皮細胞下組織のコラーゲンなどの外部刺激に対して極めて迅速・鋭敏に反応し、そのシグナル伝達機構により爆発的に情報を増幅させ、種々の生理的な反応をきたす。これを血小板の活性化といい、活性化した血小板は、変形や粘着・凝集を起こして崩壊し、微細粒子 (MP) 化する。更にこのMPに凝固系が作用して生理的な止血血栓あるいは病的な血栓形成がおこる (図1)。MPは、ほとんど全ての細胞で活性化あるいはアポトーシスを生じた細胞の膜の一部がちぎれて遊離する直径0.02~0.5 μm の微小な膜小胞体であると考えられている。血液中のMPでは、血小板由来MP、単球由来MP、血管内皮細胞由来MPなどが注目されている¹⁻³⁾。

aPLT-MPは、強力な凝固活性促進と炎症促進作用を持ち、脳梗塞や心筋梗塞の病因となる動脈硬化病変の形成に強く関連している。しかし、MPは血小板の他に単球や血管内皮細胞など様々な細胞から産生され、その由来細胞によって動脈硬化病変形成への関わりが異なると考えられているが、それらを鑑別測定できる検査法は確立されていない。そこで我々は、血液中の多様なMPの中でも活性化血小板由来マイクロパーティクル (aPLT-MP) を特異的に定量出来る高感度ELISAの開発と、種々の血栓症患者を対象にした臨床的有用性の検討を試みている。今回はその研究経過について報告する。

生体内におけるMPの発生機序および役割

MPの発生メカニズムは、細胞の活性化や傷害、アポトーシスに伴って幅広い細胞種で生じる現象であり、細胞内Caイオン濃度の上昇による一連の pathwayの活性化に始まる。その過程で細胞膜のリン脂質の非対称性が崩壊し、正常な細胞では脂質二重層の細胞膜側に存在するホスファチジルセリンが脂質二重層の細胞膜外側にも移動し分布するようになる (flip-flop現象)。次に細胞骨格タンパクの崩壊が生じ、細胞の収縮が起こりその結果膜の断片化 (blebbing) が生じMPが発生する。これらの変化はほぼ全ての細胞で同様のメカニズムとして発生することが知られている。またMPは生成の過程で、細胞膜に存在する膜タンパク質や脂質、さらには細胞質タンパクやmRNAまでも細胞から供給されている。結果的にMPは表面また内部に種々の物質を含有しながら、それをターゲットにした別々の機構が働くことも解明されてきている。

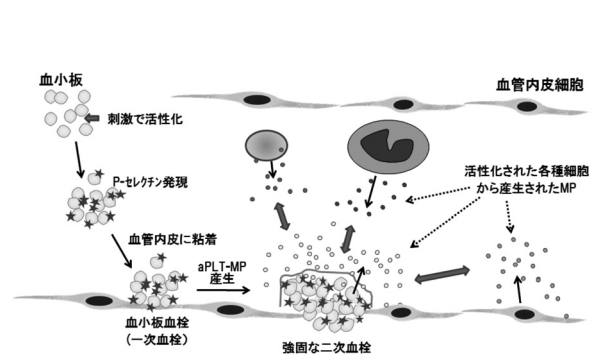


図1 活性化血小板マイクロパーティクル (aPLT-MP) と各種細胞由来MPの相互作用

MPの研究は、血管内に発生する病変の解析や血管内の恒常性維持のメカニズムを解明する上においても、極めて重要なテーマである。MPは血小板以外に様々な血球あるいは細胞から生成されることが判明しているが、どのMPもプロコアグulant活性をもつという点では共通している。しかし、それ以外の機能に関しては、MPの起源となった細胞の種類によって細胞膜に存在する膜蛋白質や脂質が少しずつ異なるために個々のMPの機能も異なると考えられている。このように、血液中MPは起源が多彩であるにもかかわらず、全てのMPに共通の因子、すなわち細胞膜リン脂質の非対称性の崩壊で出現するホスファチジルセリンを対象に研究されているのが一般的である。

実際に、動脈硬化病変では白血球や内皮細胞の接着分子の発現増加が見られるが、血小板由来MPはサイトカインやケモカインを介してこれらの反応を促進する方向に働いている。また、血小板由来MPが生じると、血小板内顆粒に含有されている種々の生物学的活性物質が放出されているなどアテローム性動脈硬化の進展や血栓形成に寄与することが示唆されているが、詳細なメカニズムは解明されていない¹⁻³⁾ (図1)。

凝固のメカニズム

生理的止血機構において、血小板が血管損傷部位の内皮下組織に集積し、活性化を経て形態変化、顆粒内容放出、血小板粘着に伴い血小板同士が凝集し血小板血栓が形成される (一次血栓)。活性化した血小板表面には陰性荷電を有するホスファチジルセ

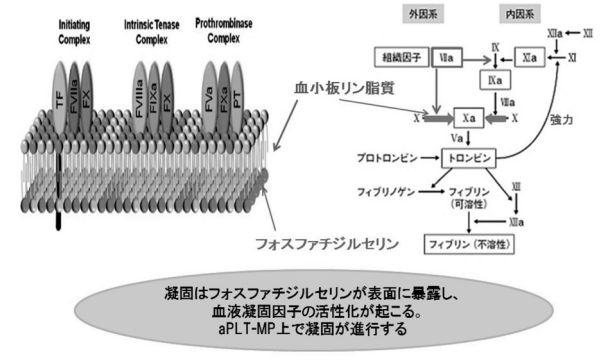


図2 凝固のメカニズムとaPLT-MPとの関連性
3) Owens A. P. III より改変

リン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトールなどのリン脂質が表出し、あるいは表面より陰性荷電に富んだ膜小胞 (microvesicle) を放出し、活性化凝固第V, X因子の結合部位を提供することで、凝固カスケードが作動する。そしてトロンビン生成に引きつづき、フィブリンが血小板血栓の血小板膜上に形成され、強固なフィブリン血栓 (二次血栓) が形成され止血機構が完了する (図2)³⁾。近年、凝固反応の考え方は細胞基盤凝固モデルに基づいてTissue Factor (TF) トリガーの凝固開始システムが重要視されており、従来の内因系と外因系に分かれて進行する古典的概念から細胞基盤凝固メカニズム⁴⁾に変わった。細胞基盤凝固メカニズムにおける止血は、血管が損傷されて出血が起こるとTFが血流に露出し、これに活性型第VII因子が結合 (FVIIa-TF) して第X因子を活性化し、プロトロンビンから微量のトロンビンが産生される。この段階でのトロンビン産生量ではフィブリンを形成するのに不十分であるが、血小板を活性化させ、さらに第VIII因子活性化反応が増幅される。その結果、活性化血小板上で安定したフィブリンを形成するのに十分なトロンビンが爆発的に産生されることになる。

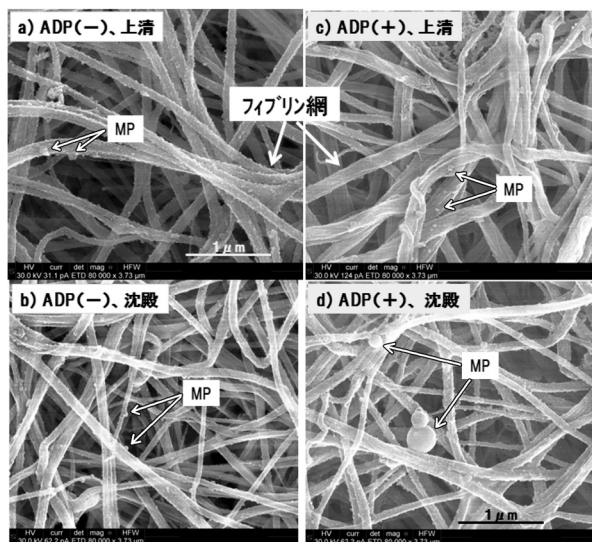


図3 フィブリン網の走査電子顕微鏡像
正常血小板富血漿にADPを添加して血小板を活性化した。その後1,200g, 10分遠心して上清と沈殿分画に分離した。更にその上清を20,000g, 10分遠心して上清と沈殿分画を得た。各血漿検体に塩化カルシウムを添加して凝固させ、産生したフィブリン網を走査電子顕微鏡で観察した。検体a) ADP刺激無しの上清, b) ADP刺激無しの上清, c) ADP刺激有りの上清, d) ADP刺激有りの沈殿

PLT-MPと凝固メカニズムとの関連性

我々は、血小板の機能検査法について研究する過程で、血小板が刺激を受けて活性化した際に血小板α顆粒中のP-セレクトインがその膜表面に高密度に発現する現象を見出し、それを高感度に検出する測定法を開発し、「血小板活性化能の測定方法および抗血小板薬の評価方法」として報告した^{5, 6)}。さらに、クエン酸Na抗凝固剤を添加して採取した血小板が、コラーゲンやadenosine diphosphate (ADP)などの活性化物質で凝集塊を作製しその後に凝集塊からMPが生じることを光学顕微鏡と走査電子顕微鏡で確認した (図3)。このMPは、一般的に検査室で用いられている1,200g, 10分の遠心では全く分離されず、20,000g, 10分の高速遠心の上清中にも径が0.1 μm以下の血小板由来MPが多数存在した。しかも血小板MP数は刺激の有無による有意差が無かつ

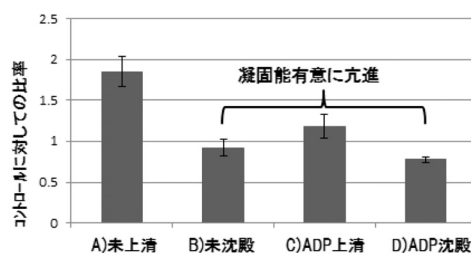


図4 血小板活性化の有無と遠心後の上清・沈殿中MPの凝固時間の比較 (n=4)

図3と同じ操作で作成した検体を用いて凝固時間を測定した。未刺激の正常血漿の凝固時間を1として比率で表した。

検体A) 未上清: ADP刺激無しの上清, B) 未沈殿: ADP刺激無しの上清, C) ADP上清: ADP刺激有りの上清, D) ADP沈殿: ADP刺激有りの沈殿

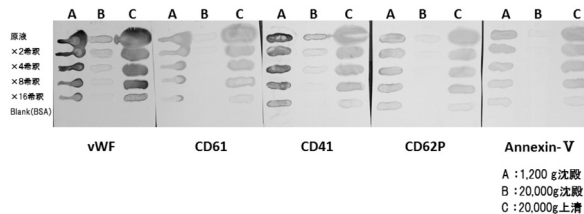


図5 活性化血小板 (aPLT)-MPの免疫染色

図3と同じ操作で作成した検体を用いて免疫染色を行った。

検体A) ADP刺激有りの1,200g遠心後の沈殿, B) ADP刺激有りの20,000g遠心後の沈殿, C) ADP刺激有りの20,000g遠心後の上清。

抗体は、vWF: 抗von Willbrand Factor抗体, CD61: 抗CD61抗体, CD41: 抗CD41抗体, CD62P: 抗CD62P抗体, Annexin-V: 抗Annexin-V抗体を使用してABC法で染色を行った。

た。しかし、図4に示したように刺激を受けた血小板MPは未刺激のMPより有意に凝固活性促進能が亢進していた。結果は示していないが、この凝固活性促進能は、抗CD62P (P-セレクチン) 抗体や抗アネキシンV抗体によって促進能が抑制された。更に、遠心力の差で分離したaPLT-MPの各分画は、vWF, CD61 (GP III a), CD41 (GP II b), CD62P, ホスファチジルセリンなどの組成量が有意に異なっていた (図5)。これらの結果からもわかるようにaPLT-MPと凝固反応との関連性は、まだまだ未解明な領域である。

臨床検査法の開発と臨床診断への応用

MP分析技術としては、ELISA法およびフローサイトメトリー法があるが、近年、フローサイトメトリー法による標準化の方向性が提唱された⁷⁾。しかし、フローサイトメトリー法は、測定値が相対値 (%) であり、絶対値を求める事が困難である。また、フローサイトメトリー法の感度から検出できる粒子径の下限は0.5 μ m程度であり、我々が明らかにした血小板の活性化・凝集後に生じた強力な凝固促進能を持つ0.1 μ m径以下の微粒子のaPLT-MPは測定不可能である。

一方、ELISAによる血小板由来MP測定法は、超微細な粒子も測定でき定量化も可能であるが、現在、市販されている血小板由来MP測定用キットは一般的な血小板特異的モノクローナル抗体 (抗CD42b抗体と抗CD42a抗体) を用いたELISAであり⁸⁾、強力な凝固促進能を持つaPLT-MPが捉えきれないと考えられる。更に、単球由来・血管内皮細胞由来のMPを鑑別測定できる検査法も確立されていない⁹⁻¹¹⁾。

我々は現在、血液中の多様なMPの中でも血栓形成に最も重要と考えられるaPLT-MPに着目している。その検出方法として凝固の引き金の役目をするホスファチジルセリンに対する抗アネキシンV抗体や活性化血小板マーカーのP-セレクチン (CD62P) に対する抗CD62P抗体を使用して、aPLT-MPを特異的かつ高感度に定量化するELISA法の開発に取り組んでいる。さらに、血栓形成や炎症作用に影響を及ぼすと考えられる単球や血管内皮由来MPに特異的な抗体を用いた定量化を試行中である。最終的

な目標は、種々の血栓性疾患患者検体でaPLT-MPや各種MPを測定し、血栓形成や炎症促進作用との関連性を検索することにある。

血栓塞栓症の発症過程におけるaPLT-MPや各種MPの役割とその相互関係を解明することは、炎症反応や血栓性疾患、動脈硬化発症など各種疾患の的確な診断及び予後予測に貢献すると期待される。

文 献

- 1) Rautou PE, Vion AC, Amabile N, et al. Microparticles, Vascular Function, and Atherothrombosis. *Circ Res.* 2011 ; 109 : 593-606.
- 2) van der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol Rev* 2012 ; 64 : 676-705.
- 3) Owens A. P. III and Mackman N. Microparticle in Hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 2011 ; 108 : 1284-1297.
- 4) Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cells to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996 ; 7 : 459-464.
- 5) Okano K, Naitou A, Yamamoto M, et al. Development of an improved assay system for activated platelet counts and evaluation by aspirin monitoring. *Translational Research* 2010 ; 155 : 89-96.
- 6) Okano K, Araki M, Mimura Y, et al. Simultaneous assay of activated platelet count and platelet-activating capacity by P-selectin detection using K2-EDTA treated whole blood for antiplatelet agents. *Int J Lab Hem* 2012 ; 34 : 621-629.
- 7) 野村昌作. フローサイトメトリーによるマイクロパーティクル計測の標準化に関する検討. *Cytometry Research* 2011 ; 21 : 78-84.
- 8) 小宮山豊. 血小板MP. *生物試料分析* 2007 ; 30 : 195-202.
- 9) 宮田敏行. DICと外因系凝固反応, MP. *医学のあゆみ* 2011 ; 238 : 5-9.

- 10) 浅田祐士郎. 生体内における血液凝固メカニズムと動脈血栓形成への関与. *医学のあゆみ* 2009 ; 228 : 1062-1066.
- 11) 藤田真也. 細胞由来MPの最前線. *Angiology Frontier* 2011 ; 10 : 1052-1055.

Fascinated by Platelets

Kozue OKANO

Department of Clinical Laboratory Sciences,
Faculty of Health Sciences, Yamaguchi
University Graduate School of Medicine, 1-1-1
Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

A platelet is a discoid and anucleate microcytic cell of diameter 2-4 μ m. It contains various substances such as platelet-derived growth factor, β -thromboglobulin, and von Willbrand factor (vWF) in its α -granule, as well as ADP, ATP, and serotonin in its dense granule. Platelet

membrane has some unique glycoprotein (GP) such as GP Ib/IX/V complex : the receptor for vWF, and GPVI : the receptor for collagen. These play an important role in body's hemostatic mechanism. However, platelet is difficult to operate as an object of a clinical investigation, because it is easily-activated, makes form change, adheres, clumps, and eventually, it becomes micro particles (MP) after activations.

Activated-platelet-derived MP has been produced from activated-platelet, which has strong procoagulant actions and important roles for a formation of thrombus after bleeding. On the other hand, MPs can also be produced by various cells such as monocytes, vascular endothelial cells, and cancers et al., and methods to identify sources of their MPs are not developed yet. We focus on developing highly-sensitive ELISA which enables to specifically measure aPLT-MP and engage in improving its diagnosis and prediction to patients with thrombosis. The progress of our research for various roles of platelets is reported here.