

発作性夜間血色素尿症における血栓症発症の分子メカニズムの解明 —新規止血薬ターゲット分子の探索とその可能性—

1. 研究の目的

(1) 発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal haemoglobinuria : PNH) は、後天的な多能性造血幹細胞における phosphatidylinositol glycan class-A (PIG-A) 遺伝子の後天的点突然変異に起因し、glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型膜蛋白が生合成されない疾患で、血球の補体感受性が亢進することにより発作的・慢性的に血管内容血を起こす。しかし、補体による血小板活性化への影響、PNH 患者と健常人の間で血小板構造や機能に違いがあるのか、さらには他の溶血性貧血にはない PNH に特徴的な合併症である血栓症がどのようにして誘発されるのか、その分子メカニズムも未だ解明されていない。一方、我々は、安全かつ有効な止血方法の開発に着手し、重炭酸塩が血小板活性化を増強することや血小板製剤の長期保管により機能が減弱した血小板製剤機能を回復させること、保管血小板製剤中に phosphatidylserine (PS) 陽性 microparticle (MP) や血小板膜糖タンパク GPIb の断片である glycolalicin (GC) が増加し、その MP や GC は脱シアル化されていること、PNH 患者において脱シアル化血小板の割合が多いことも見出した。また、脱シアル化 MP の機能を明らかにするために血小板を neuraminidase で脱シアル化した後、血小板を刺激したところ、脱シアル化血小板で MP 産生が増加することを見出した。しかしながら、製剤上清中に増加する GC の産生メカニズムや脱シアル化血小板の機能については知られていない。そこで本研究では、血小板製剤上清中に増加する GC 産生メカニズムを明らかにするとともに、脱シアル化血小板の機能を検証することを目的とした。

2. 研究の計画

(1) GC 産生メカニズムの解析とその定量

①血小板からの GC の切断

本研究では、血小板膜糖タンパク GPIb を切断することが報告されている matrix metalloproteinase (MMP) に着目し、血小板より GC が産生されるメカニズムを MMP 阻害剤を中心に使用して検証した。また、MMP 阻害剤添加による GC 切断阻害を western blotting や flow cytometry を利用して検証した。

②GC の定量 (検体を ELISA により解析)

(2) 脱シアル化血小板機能解析

①血小板凝集能 (agonist: collagen, ADP)

②血小板活性化マーカー測定 (p-selectin, PS exposure を flow cytometry で測定)

3. 研究の成果

(1) GC 産生メカニズムの解析とその定量

①血小板からの GC の切断

健常者より採血して作成した保管血小板を22℃・振盪保管し、経時的に保管後血小板製剤の上清を回収後、ELISA にて測定したところ、保管するに従い GC 濃度は増加した。一方、血小板より GC が産生されるメカニズムを明らかにするために、CD42b を切断する可能性がある matrix metalloproteinase (MMP) に着目し、MMP 阻害剤、GM6001 を保管血小板に添加した結果、CD42b 切断が抑制された。

(2) 脱シアル化血小板機能解析

①血小板凝集能

健常人ボランティアより採血し、platelet rich plasma (PRP) を回収後、neuraminidase 処理により脱シアル化を誘導した。collagen, ADP, ristocetin 刺激による血小板凝集能は未処理血小板と比較し脱シアル化血小板で増強していた。また、neuraminidase 処理後 PRP を洗浄し、洗浄血小板を作製し、thrombin 刺激下で検証したところ、pPRP と同様に脱シアル化血小板で凝集能が増強していた。

②血小板活性化マーカー測定

Neuraminidase 処理により得られた脱シアル化血小板または未処理血小板を 抗 CD62P 抗

体または annexinV を用いて P-selectin 発現血小板や PS 露出血小板の割合を測定したが両者で差は認められなかった。次に、これら血小板を collagen 刺激後、P-selectin 発現血小板を測定した結果、脱シアル化血小板でその割合は増加していた。また、PS 露出血小板の割合も脱シアル化血小板で増加傾向が認められた。

4. 研究の反省・考察

(1) GC 産生メカニズムの解析とその定量

CD42b の発現は、血小板製剤の保管に従い低下する一方、製剤上清には CD42b の断片である GC が増加した。以前、Jansen らは matrix metalloproteinase (MMP) 阻害剤, GM6001 をマウス血小板に添加したところ、CD42b 発現低下を抑制することが可能であると報告していた (Jansen AJG, et al. Blood 119: 1263-1273, 2012.)。そこで、ヒト血小板においても GM6001 に同様の効果があるか検証したところ、CD42b の切断は抑制された。CD42b は、血小板が血管損傷部位に接着する際に重要な蛋白であることから、血小板製剤保管に伴い CD42b 発現を維持するために MMP 機能を阻害することは極めて重要であると考えられる。一方、GC は以前血小板の損傷マーカーとして測定されていたが、その機能は不明である。今後は血小板製剤の保管と共に増加する GC の機能を明らかにするとともに、我々生体内に GC がどのくらい存在するのか検証する予定である。

(2) 脱シアル化血小板機能解析

近年老化血小板として注目されている脱シアル化血小板の機能については全く報告がない。そこで、neuraminidase 処理により脱シアル化した血小板の凝集能や P-selectin 発現率、PS 露出血小板の割合を測定したところ、未処理血小板と比較していずれも増強していた。これまで我々は、PNH 患者において脱シアル化血小板の割合が多いことを見出している。一方、PNH における特徴的な合併症として血栓症が知られているがどのようにして誘発されるのかその分子メカニズムも未だ解明されていない。従って、PNH 患者における脱シアル化血小板の割合の増加が血栓症発症に関与する可能性もあり、今後はより詳細な血小板機能解析は勿論、凝固への関与についても検証するが必要と考える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①登尾一平, 田邊香野, 山本隆敏, 南部雅美, 檜原真二, 川口辰哉, 上妻行則, Bernard-Soulier 症候群様疑似検体を用いた血小板凝集能検査実習の試み、臨床検査学教育 14(1)、18-23頁、2022年3月

(2) 口頭発表

①登尾一平, 山本隆敏, 田邊香野, 南部雅美, 川口辰哉, 内場光浩, 上妻行則, Bernard-Soulier 症候群様疑似検体を用いた血小板凝集能検査実習の試み、第15回日本臨床検査学教育学会学術大会(Web 開催 (2021年8月18-26日 の期間オンデマンド配信))、2021年8月

②Noboru I, Nambu M, Kawaguchi T, Kozuma Y. Significance of measuring microparticles derived from stored platelets. The 6th Allied Health Sciences International Symposium 2021. 2021年12月

③Kano Tanabe, Yukinori Kozuma. Protein phosphatase is involved in the maintenance of homotypical aggregation by CD40 stimulation in Ramos cells. The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2021年12月

(3) 出版物

なし