

# 論文要旨

## Enhanced platelet responsiveness due to chilling and its relation to CD40 ligand level and platelet-leukocyte aggregate formation

冷所保存による血小板の応答性亢進と CD40 リガンドレベル  
及び血小板・白血球複合体形成との関連性

鮎川 修

### 【序論および目的】

血液を低温に保存した場合、血小板は活性化し、形態の変化に伴い、 $\alpha$ -顆粒内容物の放出が起こることから、採取後の血液中の血小板の機能及び生存能は、その保存温度によって変化すると考えられているが、このような保存温度による血小板の応答性の変化に関する機序については、明確にされていない。Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily に属する膜糖蛋白 CD40 のリガンドである CD40L は、活性化血小板の膜表面に存在すること、膜結合型のみならず可溶性の CD40L (sCD40L) も存在することが知られている。これら CD40L と CD40 との結合は、種々の炎症反応の一因となることが指摘されている。

多血小板血漿 (PRP) を用いた *in vitro* の実験において、アゴニスト刺激により血小板から接着分子 P-セレクチンの可溶性 (sP-セレクチン) が放出されることを我々は報告している。また、sP-セレクチンの全身循環レベルの上昇は、血管内皮細胞、血小板および白血球の活性化を反映し、心血管系の疾患においてその高値が、また、安定狭心症や動脈硬化症患者の血中で血小板と白血球の複合体の形成が観察されている。sP-セレクチンの全身循環レベルの上昇および血小板と白血球の複合体の形成は、sCD40L レベルの上昇と相俟って血栓性イベント発症を誘導する要因となる可能性が高いと推測されている。

本研究では、健康人から得た血液を冷所保存したときの血小板の活性化を PRP 凝集能、血小板内容物の放出反応、全血凝集能およびフローサイトメトリーにより評価し、血小板の活性化と CD40L の関与をウエスタンブロッティング、フローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡により検討した。さらに、得られた成績を心血管系疾患患者の成績と比較することにより、血小板と白血球の複合体形成と病態との関連性についても考察した。

### 【材料および方法】

対象は健康人 5 名、心臓弁膜症患者 6 名および胸部大動脈瘤患者 4 名とした。健康人から採血した血液の一部を直ちに遠心分離して得た PRP をコントロールとし、残りの血液を 4°C および 25°C で 6 時間保存した。抗凝固剤には 3.8% クエン酸ナトリウムを用いた。

PRP 凝集は、アゴニストに ADP 1 $\mu$ M を用い、比濁法で測定し、最大凝集率 (MA) で評価した。全血凝集は、ADP (1, 2, 4, 8 $\mu$ M) で刺激したときの反応を screen filtration pressure method を用いた WB アナライザーで測定し、platelet aggregatory threshold index (PATI) で評価した。sP-セレクチン、トロンボキサン B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) および sCD40L の各濃度は ELISA 法で測定した。活性化血小板は、P-セレクチンおよび PAC-1 の血小板膜上の共発現を指標に、蛍光標識した CD62P 抗体および PAC-1 抗体を用い、フローサイトメトリーで評価した。CD40L の血小板膜上の発現は、蛍光標識した CD42b 抗体および CD40L 抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。血小板中の CD40L は、ウエスタンブロッティングで検出した。血小板と白血球の複合体は、蛍光標識した CD42b 抗体と CD45 抗体を用い、フローサイトメトリーで測定することにより、評価した。

### 【結果】

1) 健康人の血液を 4°C で 6 時間保存後に得た PRP を ADP 1 $\mu$ M で刺激したとき、MA はコントロールに比して有意に高かった。一方、25°C で 6 時間保存したときの MA は、コントロールに比して有意に低かった。患者 PRP を ADP 1 $\mu$ M で刺激したときの MA は、健康人コントロールに比して有意に高かった。

- 2) 全血凝集の PATI 値は、4°Cで6時間保存がコントロールに比して有意に低かった。患者の PATI 値は、健常人コントロールに比して有意に低かった。
- 3) 健常人の血液を4°Cで6時間保存後に得た PRP を ADP 1 $\mu$ M で刺激したとき、放出された sP-セレクチンおよび TXB<sub>2</sub> のレベルは、コントロールに比して有意に高かった。一方、25°Cで6時間保存したときの sP-セレクチンおよび TXB<sub>2</sub> のレベルは、コントロールに比して有意に低かった。患者 PRP を ADP 1 $\mu$ M で刺激したときの sP-セレクチンおよび TXB<sub>2</sub> のレベルは、健常人コントロールに比して有意に高かった。
- 4) P-セレクチンおよび PAC-1 の血小板膜上の共発現は、4°C、6時間保存がコントロールに比して有意に高かった。患者の血小板膜上の P-セレクチンおよび PAC-1 の共発現は、健常人コントロールに比して有意に高かった。
- 5) 4°C、6時間保存した全血の血小板は、アゴニストの刺激なしで、CD42b 抗体と CD40L 抗体の両抗体により染色され、コントロールの血小板を ADP 1 $\mu$ M で刺激したときに匹敵した。
- 6) 保存温度、アゴニストによる刺激の有無に関係なく、用いた血小板のすべてに2種類の CD40L のアイソフォームが検出された。
- 7) 4°C、6時間保存した全血の sCD40L 濃度は、コントロールに比して有意に高かった。患者の血漿中の sCD40L 濃度も健常人コントロールに比して有意に高かった。
- 8) 4°C、6時間保存したとき、CD45 と CD42b の共発現はコントロールに比して有意に高かった。患者の CD45 と CD42b の共発現も健常人コントロールに比して有意に高かった。

### 【結論及び考察】

健常人の血液の冷所保存すなわち4°C、6時間の保存では、PRP凝集の亢進および血小板からのsP-セレクチンおよびTXB<sub>2</sub>の放出増加が認められたことから、血小板の活性化が起こっていると判断された。また、フローサイトメトリーで検討したP-セレクチンおよびPAC-1の血小板膜上の共発現も4°Cで6時間の保存で増加し、血小板の活性化を裏づける成績が得られた。さらに、4°Cで6時間の保存により、PATI値が低下し、全血凝集能が亢進した。我々は以前、全血凝集能は血小板同士の凝集のみでなく、血小板と白血球の相互作用も反映することを報告している。従って、今回の4°Cで6時間の保存における全血凝集能の成績は、血小板と白血球の複合体形成の亢進を示唆しているものと考えられた。そこで、この仮説を確認するために、4°Cで6時間保存したときの血小板と白血球の複合体形成について蛍光標識した抗体を用いてフローサイトメトリーを行った結果、CD45とCD42bの共発現が増加したことから、血小板と白血球の複合体形成の亢進が裏づけられた。次に、血小板膜上へのCD40Lの発現を蛍光標識したCD42b抗体およびCD40L抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、ADP 1 $\mu$ Mで刺激したときCD42b抗体とCD40L抗体の両抗体により健常人の血小板が染色された成績と同じく、4°Cで6時間保存した血小板においても、アゴニストによる刺激を要さず、両抗体により染色された成績を得た。すなわち、4°C、6時間保存は血小板の活性化を誘導し、細胞膜上へのCD40L発現とこのCD40Lを介した白血球との複合体形成を進行させることが考えられた。

心血管系疾患患者では、PRP凝集は亢進していること、血小板からのsP-セレクチンおよびTXB<sub>2</sub>の放出が増加していること、P-セレクチンおよびPAC-1の血小板膜上の共発現が増大していることなどから、血小板の活性化を強く示唆する成績が得られた。さらに、患者の全血凝集能が亢進していることから、血小板と白血球の複合体形成が亢進状態にあるものと考えられた。また、患者の血漿中のsCD40Lも高濃度であったこと、CD45とCD42bの共発現が増大していたことから、心血管系疾患患者ではCD40Lを介した複合体形成が進行している可能性が高いと考えられる。

本研究において、血液を4°Cで6時間保存すると血小板が活性化すること、血小板の活性化は血小板と白血球の複合体形成促進に関与していることを明確にするとともに、心血管系疾患患者では血小板の活性化に伴う血小板と白血球の複合体形成のリスクが存在することを指摘することができた。

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 676 号	氏名	鮎川 修
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	有馬 直道	宮田 篤郎

## Enhanced platelet responsiveness due to chilling and its relation to CD40 ligand level and platelet-leukocyte aggregate formation

(冷所保存による血小板の応答性亢進と CD40 リガンドレベル及び血小板・白血球複合体形成との関連性)

血液の低温保存は、血小板の活性化と形態の変化を引き起すが、その詳細な機序に関しては明確にされていない。

一方、血管内皮細胞、血小板および白血球の活性化を反映する接着分子は心血管系の疾患において高値を示し、また、安定狭心症や動脈硬化症患者の血中において血小板と白血球の複合体の形成が観察されている。さらに、膜糖蛋白の CD40 とそのリガンドである CD40 ligand (CD40L) との結合は、種々の炎症反応の一因となることが指摘されている。

本研究の目的は、健常人の採血血液の冷所保存における血小板活性化と、CD40L 及び血小板・白血球複合体との関連を検討することである。また、可溶性である soluble CD40L (sCD40L) と血小板・白血球複合体形成との関連性について検討することである。更に、心血管系疾患患者における血小板・白血球複合体の重要性を考察するために、健常人から得た結果と心血管系疾患患者の結果を比較し検討することである。

本研究で得られた新知見は、以下の 2 点である。

- ①採血血液を 4℃、6 時間保存した場合、血小板の活性化により、血小板の CD40L は膜上に表出し、血漿中の sCD40L レベルの上昇もみられた。更に、血小板・白血球複合体形成が亢進した。
- ②心血管系疾患患者では、血小板の活性化が亢進していた。また、血漿中 sCD40L レベルの上昇もみられた。更に、血小板・白血球複合体形成も亢進していた。

以上により、本研究は、血液を 4℃で 6 時間保存した場合、血小板の活性化により血小板膜上へ発現した CD40L 及び、血漿中へ放出された sCD40L を介して血小板・白血球複合体形成が亢進していることを明確にした。

また、心血管系疾患患者では血小板が活性化され、それに伴う CD40L の膜上への発現の亢進及び、CD40L を介した血小板・白血球複合体形成の亢進が示唆された。即ち、心血管系疾患患者においては、血小板活性化が亢進しており、血小板・白血球複合体の形成が促進されることから、血栓形成イベントの危険性が增大することを考慮するべきであると指摘した。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 <b>676</b> 号	氏名	鮎川 修
審査委員	主 査	丸山 征郎	
	副 査	有馬 直道	宮田 篤郎
<p>主査および副査の3名は、平成21年2月18日、学位請求者 鮎川修 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) コントロール群とは、どのようなサンプルか。また、4℃保存までの保管はどのような条件下だったのか？  (回答) 健常人の採血直後の全血及び多血小板血漿をコントロールとした。採血後、実験室までは室温で運搬し、4℃は冷蔵庫で、25℃はその温度設定した場所で保存した。</p> <p>質問2) 4℃保存する際に、急激に冷却するのではなく、徐々に4℃にした場合に血小板の反応性に差異はあるのか？  (回答) 今回は、採血後、4℃に設定されている場所に検体を保存しており、段階的に温度を低下させる方式を用いて血小板の機能を検討していない。今後検討したい。</p> <p>質問3) 4℃、25℃以外の温度では研究していないのか？  (回答) 今回は、4℃と25℃の保存のみで研究を行ったため分からないが、37℃で保存した場合、ADPに対する全血凝集能は2時間までは殆ど変化が認められなかったという Ruomei らの報告がある。  他温度での保存に関しては、今後検討したい。</p> <p>質問4) 患者サンプルは、手術のどれくらい前に採血したものか？  (回答) 手術の前日に採血したサンプルである。</p> <p>質問5) 大動脈瘤や弁膜症の患者は、血小板機能に影響を与える薬物の服用はなかったか？  (回答) 採血時にアスピリン等の血小板凝集能に影響を与える薬物の使用はなかった。</p> <p>質問6) 4℃、6時間で実験しているが、時間の経過を調べたデータがあるか？また、4℃での活性化は、どのくらいの時間で起こり、6時間では、反応がプラトーに達していると考えてよいのか？  (回答) 予備実験として、4℃における3, 6, 24時間保存した血液からの血小板を用いて、ADPによる刺激実験を行い、thromboxane B<sub>2</sub>の血漿中濃度を測定したが、3から6時間保存においては顕著な差が認められなかった。しかし、24時間後では低値であった。従って、少なくとも3時間以内には活性化が生じるが、その血小板機能は少なくとも6時間までは持続するが、24時間後までには減衰するものと考えられる。</p> <p>質問7) 血小板と白血球の結合実験で、白血球と血小板はクラスターを形成しているのか？  (回答) 本研究では、顕微鏡等で複合体そのものを観察していないが、1つの白血球に数</p>			

個の血小板が結合しており、クラスターを形成していることを示唆する Tibbles らの報告がある。

質問 8) ウェスタンブロッティングによる CD40L の検出は、膜画分で行ったものか？

(回答) 今回は、トータルライゼートを用いており、分画では行っていない。

質問 9) アラキドン酸経路の活性化により、thromboxane A<sub>2</sub> が放出されることで、凝集は起こるのか？

(回答) 活性化血小板より放出された thromboxane A<sub>2</sub> は、オートクラインもしくはパラクラインに血小板に作用し、トロンボキサンレセプターを介して顆粒放出などの反応を起こし、血小板凝集を惹起・進行させる。

質問 10) 白血球と血小板の相互作用の後に、どのような現象が生じるのか？

(回答) 血小板と白血球の相互作用は、P-selectin-PSGL-1(P-selectin glycoprotein ligand-1) を介してなされ、PAF(platelet activating factor)やβ-TG(β-thromboglobulin)などのメディエーターを介して白血球上の接着分子 (Mac-1 等) が活性化を起こす。その後血小板と白血球は複合体を形成する。

炎症への関与として、複合体形成により血小板から PDGF(Platelet-Derived Growth Factor)等の種々のケモカインが放出され、補体系の活性化がある。CD40L-CD40 の相互作用により炎症性 interleukin、MCP-1(monocyte chemotactic protein-1)等の種々のサイトカインを放出することが知られている。

血栓への関与として、白血球は血管損傷部の血小板血栓と結合し、血栓内に浸潤していく。特に単球は tissue factor を発現し、止血や血栓形成に重要な役割を果たす。

血小板・好中球複合体形成の結果、NETs(neutrophil extracellular traps)という核内物質より構成される放出物により細菌の捕獲及び殺菌作用を示すことが示唆する Brinkmann らの報告がある。

また、血小板・単球複合体形成の結果、単球の cyclooxygenase-2 等の発現を誘導することを示唆する Eligini らの報告がある。

質問 11) 血小板が 4 °C、6 時間で活性化するメカニズムは何か？

(回答) 冷却による血小板の活性化は、細胞膜リン脂質のゲル化、微小管の崩壊、血小板内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇、アクチンの重合が起こること等により、その結果血小板が円盤状から球状、偽足の伸張などの形態変化、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇や顆粒分泌などが起こると考えられている。

質問 12) 血小板が、4 °Cで活性化するということは、生理的あるいは病的にどのような意義があるのか？ 脳卒中が寒い時期に起こるのは、血小板の活性化と関与があるのか？

(回答) 4 °Cではないが、寒冷環境下では、交感神経の興奮に伴うエピネフリンの分泌による血小板の活性化や血管収縮が生じる事が知られている。その結果、凍傷や脳卒中等の危険性が高くなることが考えられる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。