1. 血管系疾患における血小板由来マイクロパーティクル Platelet-derived microparticles in vascular disease

Director, Center for Platelet Function Studies
Professor of Pediatrics, Medicine, and Pathology, University of Massachusetts Medical School
Alan D. Michelson

監修 慶應義塾大学医学部 内科学 教授 池田 康夫

Key words: 血小板, 血小板由来マイクロパーティクル (platelet-derived microparticles; PMP), 凝固促進性, 血栓形成性疾患

はじめに

ヒトの血漿中には、血小板、白血球（単球、顆粒球、T細胞）、赤血球、および血管内皮細胞などに由来する多様な微粒子成分（マイクロパーティクル）が存在する。これらの中で血小板由来マイクロパーティクル（platelet-derived microparticles; PMP）は、近年、血栓形成を増幅する凝固促進物質として注目され、種々の血栓性疾患との関連性が示唆されている。そこで PMP の特徴や機能、検出法、および疾患との関連に関する現在までの知見を概説する。

PMP の放出機序と特徴

1967 年、Wolf は、血漿や血清の高速遠心分離を行うと凝固促進活性を示す血小板由来成分が得られることを見出し、“platelet dust” と命名した (*Br J Haematol* 13: 269-288, 1967)。これが PMP に関する最初の報告である。その後、多数の研究が行われ、PMP は活性化した血小板から放出される膜小胞体の一種であることが明らかにされている。

表 1 血小板活性化で放出される 2 つのタイプの膜小胞体 (*in vitro*)

- ・ マイクロパーティクル
 - 細胞膜から分離する
 - 直径 100 nm ~ 1.0 μ m
- ・ Exosome
 - 細胞内 multivesicular body (α 顆粒形成の中間段階) および α 顆粒に含まれる
 - 直径 40 ~ 100 nm

Heijnen HFG, et al. *Blood* 94: 3791-3799, 1999

また、1999年にHeijnenらが報告したように、実際に *in vitro* で血小板を活性化すると、2つのタイプの小胞体が放出されることが確認されている (*Blood* 94: 3791-3799, 1999) (表 1)。このうち直径 100 nm ~ 1.0 μ m のマイクロパーティクルが PMP であり、より小さな 40 ~ 100nm の粒子を Heijnen らは *exosome* と称している。

活性化血小板からの PMP の放出は、血小板細胞膜の一部が分離してちぎれ落ちる、いわゆる “surface shedding” という現象である (図 1)。これに対し、*exosome* は非刺激血小板でも α 顆粒内に含まれており、それらが血小板活性化後の脱顆粒の過程で放出される。

表面マーカーの特徴や機能をみると、PMP と *exosome* にはさらに違いがある。PMP の膜上には血小板と同様に、糖蛋白 (glycoprotein; GP) Ib, GPIIb/IIIa, α 顆粒の膜成分 P セレクチン, P セレクチンリガンド-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1; PSGL-1), 血小板内皮細胞接着分子-1 (platelet and endothelial cell adhesion molecule-1; PECAM-1), および CD40 リガンドなどが発現しており、 α 顆粒由来の第 V 因子も豊富に含有する。血小板の活性化が起こると、通常は膜内面に存在しており凝固反応に関与するホスファチジルセリンが膜の反転現象によって外表面上に露出し、プロトロンビナーゼ複合体, tenase 複合体, プロテイン C/プロテイン S 系などが反応する触媒表面として機能する。これらの特徴からわかるように、PMP は著明な凝固促進活性を示し、プロコアグulant 活性に関与する。対照的に *exosome* はライソゾーム顆粒の膜成分 CD63 を豊富に発現しているが、凝固関連因子の結合親和性はきわめて低い。このため *exosome* に凝固促進活性はなく、炎症などへの関与が示唆されている。

血小板における PMP の形成

PMP はトロンビン、コラーゲンなどの典型的な血小板アゴニストによる刺激だけでなく、補体成分、可溶性 P セレクチン、可溶性 CD40 リガンドなどの他、動脈血流において高ずり応力がかかることによって血小板から放出される (表 2)。またこれらの刺激がなくても、保存血液中では血小板からの PMP 放出が起こる。

PMP 放出時にみられる重要な特徴として、上述のような“surface shedding”の現象はよく知られているが、その他の PMP 形成過程は十分には解明されていない。しかしながら、細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) の増加や細胞骨格蛋白の分解は明らかに PMP の形成を促進させる。また血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa や GPVI、あるいはカスパーゼ 3 などが PMP の形成過程で何らかの重要な役割を担う可能性が示唆されており、PMP の形成と放出は多くの面でアポトーシス様現象に類似することも報告されている。

PMP の機能

PMP は *in vitro* で膜表面上に第 Va 因子や第 VIII 因子などを結合させ、膜上での凝固反応の促進に寄与することがわかっている。さらに、PMP にはリン脂質の他、組織因子も発現しており、組織因子依存性フィブリン形成において重要な役割を担っている。PMP は高ずり応力下の血流において内皮細胞基質に接着し、膜成分 P セレクチンと白血球表面の PSGL-1 を介する血小板と白血球との接着を促進させることが報告されている。このような細胞間接着能も PMP の重要な機能の一つであると考えられる。

—昨年、オランダの Biro らは、血中マ

表 2 PMP を放出させる刺激

- ・アゴニスト (例: トロンビン/コラーゲン, A23187 [Ca^{2+} イオノフォア])
- ・補体 (C5b-9)
- ・可溶性 P セレクチン
- ・可溶性 CD40 リガンド
- ・高ずり応力
- ・血小板保存

マイクロパーティクルの組織因子依存性の血栓形成能について報告している (*J Thromb Haemost* 1: 2561-2568, 2003). これはヒト血液から分離したマイクロパーティクル (PMP 以外も含まれる) を静脈血栓モデルラットに注入した実験である (図 2). 健康ドナーの静脈血 (○) または心臓手術時の心外膜血液 (●) から同数のマイクロパーティクルを分離したところ, 前者に比較して後者では組織因子抗原量が多く, 血栓形成量も有意に高かった (ラット, *in vivo*). これはヒトの血中マイクロパーティクルが *in vivo* で組織因子依存性の血栓形成促進活性を有し, 血小板のプロコアグulant 活性に関与することを示した良い根拠である.

一方, 興味深いことに, PMP に抗凝固作用がある可能性も報告されている. Tansらの報告では, 一部のタイプの PMP がプロテイン C の活性化を介して第 Va 因子を不活性化することが明らかにされている (*Blood* 77: 2641-2648, 1991).

PMP の検出

PMP の検出には, 主に電子顕微鏡, フローサイトメトリー, または ELISA 法による 3 通りの方法が用いられている. われわれの研究室では, フローサイトメトリーによる全血試料中の PMP 検出を検討してきた.

その方法の概要を表 3 に示す (*Thromb Haemost* 84: 492-498, 2000). 操作 2) で添加する Gly-Pro-Arg-Pro とは, フィブリンノゲン α 鎖やフィブリンモノマーのアミノ末端配列のアナログである. この物質は試料中でのフィブリン重合や血小板凝集を阻害する一方, 血小板からの PMP 形成は阻害しないという特長を有している. 操作 4) で緩衝液を添加すれば *in vivo* ですでに形成されている PMP を, 血小板アゴニス

図 2 ヒト血中マイクロパーティクルによる組織因子依存性血栓形成の促進 (ラット, *in vivo*)

表 3 全血フローサイトメトリーによる凝固促進性 PMP の検出 (*in vitro*)

方法

- 1) クエン酸ナトリウム添加
- 2) Gly-Pro-Arg-Pro 添加によりフィブリン塊形成阻害
- 3) 希釈後, 抗体結合の促進のために自己血漿または精製凝固因子を添加
- 4) 緩衝液またはアゴニスト + Ca^{2+} 添加
- 5) FITC 結合第 V 因子およびフィコエリトリン結合 CD42a に対する特異的モノクローナル抗体添加
- 6) 固定
- 7) 2 色全血フローサイトメトリー

Furman MI, et al. *Thromb Haemost* 84: 492-498, 2000

ト + Ca^{2+} を添加すれば *ex vivo* での血小板刺激による PMP 形成をみることができる。操作 5) では血小板特異的な表面マーカーのモノクローナル抗体を適宜 2 種類結合させ、最後に 2 色フローサイトメトリーで測定する (図 3)。

この方法の利点として、1) 生理的条件に近い全血試料で PMP を分析できる、2) 検体への操作が少ないためアーチファクトが少ない、3) 表面マーカー (組織因子、第 Va 因子、第 Xa 因子、アネキシン V など) のモノクローナル抗体を適宜選択することで PMP のプロコアグラント活性関連因子を個別に検出できる、4) *in vivo* での PMP 発現だけでなく、*ex vivo* での刺激に対する血小板の反応性をみることができる、5) 検体量が微量でよい ($5 \mu\text{L}$)、6) 著明な血小板減少症患者の血液でも分析可能、などが挙げられる。一方、現時点では *exosome* やごく小さな PMP は検出限界未満になること、散乱光の検出は細胞サイズ以外の要因にも影響される可能性があることなどが問題点として残されている。

われわれはテナガザルを用い、血小板の *in vivo* 動態をフローサイトメトリーで追跡する研究を行っている。図 4 に示す実験では、PKH2 で蛍光標識した自己血小板 (非刺激または活性化後) を静注し、24 時間後に再度採血して、標識血小板の濃度やアゴニスト刺激に対する反応性を測定した (*Proc Natl Acad Sci* 93: 11877-11882, 1996)。この実験からは、活性化血小板 (上段) が静注 24 時間後にも依然として血中を循環しており、アゴニスト刺激に対する PMP 放出能も非刺激血小板 (下段) と同様であることが判明し、きわめて興味深い。

PMP と疾患との関連性

近年では、急性冠症候群などの心血管系

疾患、播種性血管内凝固症候群をはじめとする血液疾患、およびその他の多数の領域において、血中 PMP と疾患との関連性が報告されている(表 4)。例えば、特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura; ITP) における出血傾向と PMP の関連性を評価した Jy らは、出血傾向のない患者では出血傾向のある患者に比較して血中 PMP 濃度が有意に高いことを報告した (*J Lab Clin Med* 119: 334-345, 1992)。また、日本の Ando らの報告によると、血栓性イベントの発現した腎不全患者ではイベントのない患者に比較して血中 PMP 濃度が有意に高かった (*Kidney Int* 62: 1757-1763, 2002)。

これらの研究の多くはサンプルサイズが比較的小さく、臨床的転帰と PMP との明確な関連性は明らかにされていない。しかしながら現在までの知見を総合すると、血中 PMP は *in vivo* での血小板活性化のマーカーの一つであり、active な血液凝固の存在を示唆する指標といえる。PMP は臨床的にも血栓形成に直接的に関与することが示唆される。

まとめ

PMP の特徴や機能の解明は、将来的に血栓症の病態把握、治療への応用にもつながる可能性がある。例えば、血液製剤や血小板製剤には豊富な PMP が含有されることが明らかにされており、これらの製剤の臨床的有効性の少なくとも一部には PMP が関与する可能性がある。保存血小板から PMP を単離し、血小板輸血の代替として使用することも実際に検討されている。

逆に、血中 PMP をターゲットとする抗 PMP 療法の可能性も浮上する。GPIIb/IIIa 拮抗薬 (国内未承認) や Ca 拮抗薬などは血小板からの PMP 放出を抑制する可能性

表 4 血中 PMP の増加を伴う疾患

心血管系疾患

- ・急性冠症候群
- ・心肺バイパス術
- ・経皮的冠インターベンション
- ・人工心臓弁置換術
- ・一過性脳虚血発作および脳卒中
- ・肺塞栓症
- ・末梢動脈疾患
- ・糖尿病
- ・高血圧症
- ・赤血球増加症を伴うチアノーゼ型先天性心疾患

血液疾患

- ・播種性血管内凝固症候群
- ・免疫性血小板減少性紫斑病
- ・ヘパリン起因性血小板減少症
- ・抗リン脂質抗体症候群
- ・血栓性血小板減少性紫斑病 / 溶血性尿毒症症候群
- ・発作性夜間血色素尿症
- ・骨髓増殖性疾患
- ・鎌状赤血球症
- ・Wiskott-Aldrich 症候群

その他

- ・尿毒症
- ・外科手術後
- ・胃癌
- ・レジオネラ肺炎

が期待できるであろう。また PMP によるプロコアグulant 活性の多くは P セレクチンや PSGL-1 に媒介されることから、これらを阻害する薬剤も有望である。研究段階ではあるが、そのような薬剤はすでに合成されていることから、今後の研究がきわめて注目される。

Q & A

野村 (関西医科大学内科学) 冠インターベンション施行時のマイクロパーティクル放出のリスクについては、どのようにお考えでしょうか。例えば血管内にステントを挿入するような場合、ステントがアテロームプラークを傷つけ、そこから組織因子に富むマイクロパーティクルが放出される可能性があると思います。もしこうしたマイクロパーティクルが新たな血栓やインターベンション後の再狭窄の原因になるのであれば、何らかの対策を講じる必要があるのではないかと考えています。

Michelson おっしゃる通り、ステント術などの場合には、PMP や他の細胞からプロコアグulant 活性のあるマイクロパーティクルが放出される可能性があると思います。

鈴木 (司会：三重大医学部分子病態学) 血漿中には血小板だけでなく、赤血球や内皮細胞、その他の細胞に由来する多様なマイクロパーティクルが存在するわけですが、それらをどのようにして鑑別するのでしょうか。

Michelson 基本的には PMP の検出法と同様です。PMP であれば血小板特異的マーカーのモノクローナル抗体を用いるところで、個々

の細胞のマーカーを使用すればよいのです。この方法では同一の全血検体から異なる細胞起源のマイクロパーティクルを同時に検出することも可能です。

Wagner (CBR Institute for Biomedical Research, Harvard Medical School) PMP の形成に GPIIb/IIIa が関与するという点が興味深いと思いました。どのようなエビデンスがあるのでしょうか。

Michelson トロント大学の Yeo のグループの論文です (*J Biol Chem* 268: 14586-14589, 1993)。Glanzman 血小板無力症患者の血液などを用いた多様な実験を行い、PMP の形成において GPIIb/IIIa が重要な役割を担うことを示した優れた論文です。

松本 (広島大学大学院医歯学総合研究科脳神経内科学) PMP は最終的にどのような転帰をたどるのでしょうか。動脈血と静脈血で PMP 濃度に違いはありますか。

Michelson 生体内での PMP の転帰についてはほとんど解明されていません。われわれもその点に関心があるのですが、まだ未検討です。しかし、動脈血と静脈血の PMP 濃度に差はないと思います。

松本 微小循環系で PMP が消費されることはないということでしょうか。

Michelson 正確なところは解明されていませんが、疾患がない場合には血中の血小板は消費されませんので、PMP でも同様だと思います。