

博士（保健科学） 長澤 あゆみ

学位論文題名

循環血液中における白血球－血小板凝集塊形成の意義

学位論文内容の要旨

[要 旨]

【目的】循環血液中における血小板の活性化は血管内皮損傷時の血栓形成に重要であり、また近年では炎症反応との関連についても多数の報告がある。このため、血小板の活性化を捉える高感度かつ簡便なマーカーが必要とされている。本検討において著者は、汎白血球マーカーCD45染色を応用した全血フローサイトメトリーのプロトコルを作成し、同一検体における白血球－血小板凝集塊形成および血小板CD62P発現の測定を行った。循環血液中における血小板の活性化を捉えるマーカーとしての白血球－血小板凝集塊測定の有用性を検討した。さらに全血検体および分離した細胞を用いて白血球－血小板凝集塊の形成機序および炎症性の病態に伴う白血球－血小板凝集塊形成について検討し、生体内における白血球－血小板凝集塊形成の仕組みを明らかにすることを試みた。

【方法】CD45ゲーティングを用いた全血フローサイトメトリーは、3.2%クエン酸ナトリウム加全血を汎白血球マーカーCD45染色し、CD45発現強度の差により単球、好中球、リンパ球にゲートをかけ、各細胞集団における血小板特異抗原CD41発現率（%）を白血球－血小板凝集塊として測定した。血小板アゴニストとして既知濃度TRAPまたはcollagenを用い、Ca²⁺キレートにはEGTA溶液を用いた。モノクローナル抗体（mAb）添加実験は、既知濃度の非標識mAbを添加後、血小板を活性化し凝集塊を測定した。

好中球はMagnetic cell sorting（MACS）により分離し、LPSまたはfMLPで活性化し、細胞透過処理はIntraPrep kitにより行った。

【結果】健常人18名における単球－血小板凝集塊、好中球－血小板凝集塊、リンパ球－血小板凝集塊は循環血液中でそれぞれ約5%の形成がみられた。血小板アゴニストによる活性化時には、単球－血小板凝集塊、好中球－血小板凝集塊で増加がみられ、前者で特に顕著であ

った。リンパ球ー血小板凝集塊では血小板活性化時の増加はみられなかつたが、サブセット別の解析では NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞で凝集塊形成の増加傾向がみられた。血小板 CD62P 発現は、血小板活性化時にも大きな変化はみられなかつた。健常群 18 名と糖尿病群 15 名の凝集塊形成および血小板 CD62P 発現を比較すると、循環血液中での単球ー血小板凝集塊は患者群で有意に高く、好中球ー血小板凝集塊でも高い傾向があつた。

単球ー血小板凝集塊および好中球ー血小板凝集塊は、抗 CD162 モノクローナル抗体、KPL-1 添加により有意に抑制された。さらに同抗体で白血球細胞表面 CD162 発現を定量したところ、単球は他の細胞と比較し有意に発現量が高く、好中球は T 細胞および B 細胞と比較し有意に高かつた。また NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞は CD4 陽性 T 細胞、B 細胞より発現量が有意に高かつた。凝集塊形成前後の EGTA による Ca^{2+} キレートおよび Ca^{2+} 再添加により単球ー血小板凝集塊および好中球ー血小板凝集塊の形成には Ca^{2+} の存在が必須であることが示された。さらに血漿分画の添加による凝集塊形成の検討の結果、 Ca^{2+} が単独で凝集塊形成に関与していることが明らかとなつた。

好中球を炎症性アゴニスト LPS、fMLP 刺激により活性化し、好中球ー血小板凝集塊形成への影響を検討した。10 μM fMLP 刺激時、凝集塊は有意に増加し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 刺激時でも増加傾向がみられた。しかし好中球活性化により発現が増加した CD11b、CD63 の凝集塊形成への影響はみとめられなかつた。好中球ー血小板凝集塊形成後の血小板の動態について検討するため、細胞透過処理による好中球細胞内血小板の検出を試みた。血小板の活性化により、好中球の細胞内に血小板が増加することがわかつた。さらに取り込まれた血小板の経時的な減少がみられた。

【考察】白血球ー血小板凝集塊、特に単球ー血小板凝集塊は、循環血液中における血小板の活性化を鋭敏に捉えることが可能であると考えられた。糖尿病患者群の循環血液中における単球ー血小板凝集塊の増加は、血小板の緩やかな活性化を捉えていると考えられた。また白血球 CD162 発現量は血小板活性化時の凝集塊形成の増加の程度とほぼ一致しており、CD162 発現量が高い単球が高確率に血小板と結合することが考えられる。白血球ー血小板凝集塊の形成に必要な血漿成分は Ca^{2+} であり、単独で形成に関与していると考えられる。LPS、fMLP 刺激時の好中球ー血小板凝集塊の増加は生体内における炎症反応時の病態を反映していると考えられるが、今回検討した活性化抗原発現の関与は認められず、凝集塊形成機序についてはさらなる検討が必要である。好中球に活性化血小板が結合すると細胞内に取り込まれ、さらに処理される可能性が示された。好中球ー血小板凝集塊の形成、さらに好中球による血小板の内在化と処理といった機序が考えられた。

【結論】白血球ー血小板凝集塊は循環血液中における血小板の活性化を捉える鋭敏なマーカーであり、全血フローサイトメトリーにより簡便な測定が可能である。血小板活性化時の凝集塊形成は、血小板 CD62P と白血球 CD162 の Ca^{2+} 存在下での結合が主要である。白血球ー血小板凝集塊の形成は、血栓傾向のみならず炎症反応時など、生体内における血小板の働きを理解するうえで重要な現象であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　小　林　清　一
副　查　教　授　千　葉　仁　志
副　查　教　授　森　山　隆　則

学　位　論　文　題　名

循環血液中における白血球－血小板凝集塊形成の意義

循環血液中における血小板の活性化は血管内皮損傷時の血栓形成に重要であり、また動脈硬化症などの血栓性疾患の発症に関与していることが報告されている。このため、血小板の活性化を捉える高感度かつ簡便なマーカーが必要となっている。そのため本研究では、汎白血球マーカーである CD45 ゲーティング用いた全血フローサイトメトリーの新しいプロトコールを作成し、同一検体における白血球－血小板凝集塊形成および血小板 CD62P 発現の測定を行ったものである。この方法により、循環血液中における血小板の活性化を捉えるマーカーとしての白血球－血小板凝集塊測定の有用性を検討し、さらに全血検体および分離した細胞を用いて白血球－血小板凝集塊の形成機序の検討も行った。また、近年では生体内の炎症反応と血小板の関連について多くの報告があることから、炎症反応に伴う白血球－血小板凝集塊形成について検討し、生体内における白血球－血小板凝集塊形成の臨床的意義を明らかにしようとしたものである。

CD45 ゲーティングを用いた全血フローサイトメトリーは、3.2%クエン酸ナトリウム加全血を汎白血球マーカー CD45 に対するモノクローナル抗体 (mAb) で染色し、CD45 発現強度の差と側方散乱 (SCC) により単球、好中球、リンパ球を区別してゲートをかけ、一回の測定で各白血球細胞集団における血小板特異抗原 CD41 陽性率 (%) を白血球－血小板凝集塊として測定した点に工夫が認められる。凝集塊形成機序の検討では、Magnetic cell sorting により分離した好中球浮遊液に同一被験者の血小板浮遊液を添加するという基礎的な再構築実験も行っている。

健常人 18 名における単球－血小板凝集塊、好中球－血小板凝集塊、リンパ球－血小板凝集塊の検討では、循環血液中でそれぞれ約 5% の形成がみられている。血小板アゴニストによる活性化時には、単球－血小板凝集塊、好中球－血小板凝集塊で増加がみられ、前者で特に顕著であったという。リンパ球－血小板凝集塊では血小板活性化時の増加はみられなかったが、サブセット別の解析では NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞で凝集塊形成の増加傾向がみられている。次に、健常群 18 名と糖尿病群 15 名の凝集塊形成および血小板 CD62P 発現を比較すると、循環血液中の単球－血小板凝集塊は患者群で有意に高く、好中球－血小板凝集塊でも高い傾向がみられたが、血小板 CD62P 発現で両群に差はみられていない。

単球－血小板凝集塊および好中球－血小板凝集塊は、抗 CD162 mAb である KPL-1 添加により有意に抑制されたことから、これらの白血球－血小板凝集塊の形成には CD162 と CD62P によるレセプター・リガンド系が関与することを証明した。さらに同抗体で白血球細胞表面 CD162 発現量を定量したところ、単球は他の細胞と比較し有意に発現量が高く、好中球は T 細胞および B 細胞と比較し有意に高かった。また NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞は CD4 陽性 T 細胞、B 細胞より発現量が有意に高かったことから、凝集塊レベルは血小板活性化抗原 CD62P の発現量よりも、

白血球側の CD62P リガンド、すなわち CD162 の発現量に依存することを明らかにしている。

凝集塊形成に関する因子を追究するために再構築実験を行っているが、分画した血漿成分に凝集塊形成への影響はなく、 Ca^{2+} キレート剤および Ca^{2+} 再添加実験から、 Ca^{2+} が単独で凝集塊形成に関与していることを証明している。さらに、生体内の炎症反応による好中球活性化が好中球一血小板凝集塊形成に影響するかどうか再構築実験にて検討した結果、 $10\mu\text{M}$ fMLP の刺激により凝集塊は有意に増加し、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 刺激時でも増加傾向がみられた。しかし、mAb 添加実験から、好中球活性化により発現が増加した CD11b、CD63 の凝集塊形成への関与はないと推察している。また、好中球一血小板凝集塊形成後の血小板の動態についても検討しているが、血小板の活性化によって好中球細胞内に血小板特異抗原 CD41 が増加し、その後経時に減少したという。

以上の研究結果から、白血球一血小板凝集塊、とりわけ单球一血小板凝集塊は、糖尿病患者群などの循環血液中における血小板の活性化を鋭敏に反映する検査マーカーとして利用可能であると考察している。また、白血球と血小板活性化時の凝集塊形成には白血球側の CD162 と活性化血小板の CD62P との結合が関与していること、その凝集塊レベルはリガンド発現量に依存し、しかも、血漿成分中の Ca^{2+} 依存性であることを初めて明らかにした。さらに、好中球との凝集塊形成には CD11b や CD63 などの好中球活性化抗原の関与は認められることや、凝集塊形成後に好中球による血小板の内在化と活性化血小板の処理という新たな生体防御機構の存在の可能性も指摘した。

本論文は、循環血液中における血小板の活性化を捉える鋭敏なマーカーとして白血球一血小板凝集塊を、全血フローサイトメトリーを利用して簡便に測定が可能であることを指摘し、白血球一血小板凝集塊の形成機序とその臨床的意義および生体防御機構としての新知見を得たものであり、血小板動態の研究に大きく貢献するものと考えられる。よって著者は、北海道大学博士（保健科学）の学位を授与される資格あるものと認める。