

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500530

研究課題名(和文)カルシウムイオンナノレベルイメージングによる血小板内活性化機能に関する研究

研究課題名(英文)Local distribution of cytosolic calcium ions in activated platelets both on collagen fibrils and on Von Willebrand factor under controlled blood flow conditions.

研究代表者

田村 典子(TAMURA, Noriko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：90439703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：血小板は止血時に血管壁損傷部位のコラーゲンおよび、フォンビルブランド因子(VWF)に接着する。血流条件下共焦点レーザー顕微鏡による、マトリクス接着時の血小板内カルシウムイオン(Ca^{2+})をリアルタイムイメージングした。血小板の連続イメージを16分割し各分画の細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)を経時的に定量することで、細胞内 Ca^{2+} の局在を明らかにする方法を確立した。コラーゲン、VWF接着直後の血小板 $[Ca^{2+}]_i$ は細胞の中心分画で一過性に高い $[Ca^{2+}]_i$ を示した。活性化した血小板では局所的な Ca^{2+} 上昇は認められず、血小板の活性化動態と Ca^{2+} の局在について特異性を認めた。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the initial activation of human platelet in forming thrombi on collagen fibrils or VWF, localizations of intra-cytosolic calcium ion in an individual platelet were imaged in real time using an ultrafast confocal laser microscope. Images of a single platelet were divided into 16 segments (4x4) the intra-cytosolic calcium ion concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) in each segment were measured with software Image J. The $[Ca^{2+}]_i$ of individual platelets transiently increased after they first bound to the VWF or the collagen fibrils. The increase in $[Ca^{2+}]_i$ started at the center division of each individual platelet under blood flow conditions, although there were no significant difference in $[Ca^{2+}]_i$ division in activated platelets. In this study we established the methods of platelet Ca^{2+} localization under various activated states when platelets bound with VWF or collagen under blood flow conditions.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：カルシウムイオン 血流

1. 研究開始当初の背景

血小板のカルシウムイオン (Ca^{2+}) の研究では、止血時の血小板血栓形成による凝固活性に Ca^{2+} が必須であること、また血栓形成にともなう血小板凝集には血小板細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が上昇することが広く知られている。血小板の $[Ca^{2+}]_i$ は、カルシウム貯蔵庫である小胞体からの細胞内による放出、および細胞外からのカルシウムイオンの流入により調節されているが、血小板活性化開始時には、小胞体からの一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き金になっている。本研究室ではこれまでに血流条件下でコラーゲン上に形成された血小板血栓形成にはアデノシン二リン酸 Adenosine diphosphate (ADP) 受容体 $P2Y_{12}$ が関与しており、 $P2Y_{12}$ 阻害時には $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が抑えられることを報告している (*J Am Coll Cardiol.* 2006 3;47(1):155-62)。また、コラーゲン上に形成される血小板血栓の成長が血中トロンビン濃度により影響を受けることも報告している (*Circ J.* 2009 74(3):540-8)。昨今 2~4 μm の血小板内部のイメージング方法として、電子顕微鏡だけではなく、蛍光顕微鏡を用いて生きた細胞の変化を経時的に追うことも可能になり、total $[Ca^{2+}]_i$ として、血小板の Ca^{2+} の検出も可能になっている。しかし血小板内局所の Ca^{2+} の変化について詳細なイメージング、解析はなされていない。

2. 研究の目的

(1) 生体内環境により近い血流条件下で、血管壁損傷部位に存在するマトリクスとしてコラーゲンおよび von Willebrand Factor (VWF) への血小板接着に起因する血小板初期活性化反応について、細胞内局所の $[Ca^{2+}]_i$ をイメージングにより経時的に解析評価する方法を確立する。

(2) VWF 惹起血小板活性化にともなう $[Ca^{2+}]_i$ 上昇にかかわる因子として、血小板の活性化物質 ADP の受容体 $P2Y_{12}$ 、およびトロンビン受容体 PAR-1 の影響をそれぞれ特異的阻害薬を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントをとった健康成人より採血し、抗トロンビン薬アルガトロバン (終濃度 100 μM) にて抗凝固処理した血液を用いた。血小板内にカルシウムイオン感受性蛍光色素 Fluo3-AM (終濃度 5 μM) を取り込ませた再構築血液を調製した。

(2) ADP の受容体 $P2Y_{12}$ 阻害薬 AR-C69931MX (終濃度 100nM)、およびトロンビン受容体 PAR-1 阻害薬 E5555 (終濃度 10 μM) は、それぞれ再構築血液調製後に室温にて反応させた。

(3) 血小板のイメージングは既に確立した方法フローチャンバーシステムを用いて行った (*J Am Coll Cardiol.* 2006 3;47(1):155-62)。ウサギのアキレス腱由来 1 型コラーゲンまたはヒト血清より精製した VWF を固

相化したガラスプレート上にヒト動脈血流速に相当する 1500 s^{-1} の流速で血液を灌流した。高速共焦点レーザー顕微鏡 (Axiovert200 ZEISS, CSU10 YOKOGAW, EM-CCD Camera ImagEM Hamamatsu Photonics) にてコラーゲン、および VWF に接着する血小板のリアルタイムイメージングを 60 フレーム/秒にて経時的に記録した。(Fig 1)

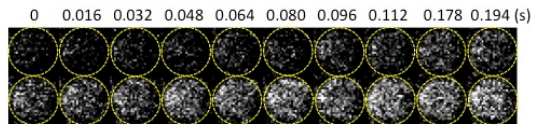


Fig1. VWF上に接着した単一血小板の $[Ca^{2+}]_i$ イメージ

(4) VWF およびコラーゲン刺激に特異的な血小板の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇について明らかにするため、解析サンプルとして記録した血小板イメージングより以下の条件を満たす血小板イメージを選択した。a) 単一血小板であること b) マトリクスに接着した瞬間を確認できること、すなわち記録開始時にあらかじめマトリクスに接着していないこと c) 血小板がマトリクスに接着してから最初の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇までに 1 秒以上の接着反応時間を確認できること d) 活性化による形態変化が起こっていないこと。単一血小板の total $[Ca^{2+}]_i$ について、VWF 接着からの最初の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇最大濃度までの時間、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加量、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇開始から最大濃度までの時間を定量した (Fig 2)。

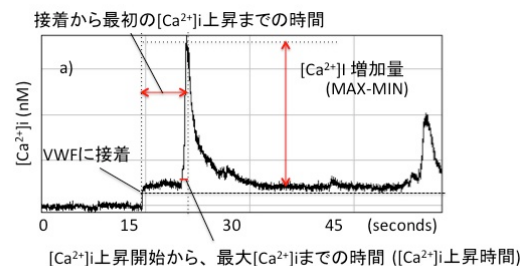


Fig2. 血流条件下VWFに接着した単一血小板total $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変化

(5) 画像解析ソフト ImageJ にて単一血小板のイメージング像を血流と平行方向に縦横 4x4 分割 16 分割し (但し 4 隅の分画については、血小板被覆面積が不十分なため加えず) 実質 12 分画をそれぞれの血小板内の $[Ca^{2+}]_i$ を定量することにより、

$[Ca^{2+}]_i$ の経時的な局在の変化を示した。各分画の $[Ca^{2+}]_i$ はそれぞれの分画の被覆面積を算出し、単位面積当たりの $[Ca^{2+}]_i$ として解析を行った。それぞれの単一血小板の中でその最も $[Ca^{2+}]_i$ の低い分画とそれ以外の各分画の $[Ca^{2+}]_i$ の比較を行った。

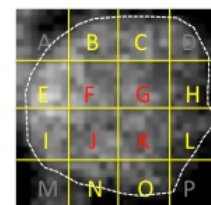


Fig3. 単一血小板内の分割(4x4)

4. 研究成果

(1) VWF 接着時の血小板活性化動態による細胞内 Ca^{2+} の局在解析方法の確立

血流条件下、VWF 接着により惹起される血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇時、血小板活性化前、および VWF 惹起 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇から 1 分以上経過している活性化後の活性化動態を比較することにより、血小板の VWF 接着に起因する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇時の特異的な Ca^{2+} の局在について解析方法を確立した。(具体的な解析方法については方法を参照。) 研究開始当初、ナノレベルのイメージングとして、1 ピクセル 70nm による縦横 30x30 分画の詳細な解析を試みたが、いずれの血小板にも共通する特異性として、細胞の内部と細胞の周縁部の 2 つに大きく分類することとした。

Fig4 に total $[Ca^{2+}]_i$ の定量した結果を示し

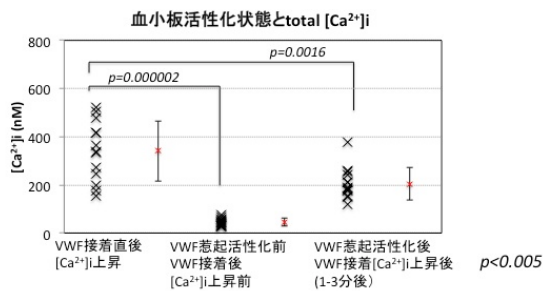


Fig4. VWF上に接着した単一血小板の活性化状態とtotal $[Ca^{2+}]_i$ の比較した。VWF に接着した血小板は、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められ、初期の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇時の増加量は 340.4 ± 124.5 (nM)、上昇前の rest 状態では 44.9 ± 15.6 、活性化状態の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇では 204.6 ± 67.3 (nM) と VWF 接着直後の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が最も高値を示した。Fig. 5 に血小板内各分画の初期 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇最大値までの $[Ca^{2+}]_i$ 増加量を示した。VWF 接着直後の血小板初期活性化では細胞中心部に位置する分画を含む F, J, K で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が顕著に認められ $\{393.7 \pm 153.3, 410.7 \pm 140.6, 400.6 \pm 126.3$ (nM)} 細胞内部から細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が生じていることが示唆された。一方、既に活性化後時間の経過している状態では、分割内に有意に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をしている分画は認められなかった。活性化直前の安定した状態では有意差を認めたものの、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加量が極めて低いため特異性を示すものではなかった。以上により、VWF 接着に起因する血小板初期活性化時の $[Ca^{2+}]_i$ は細胞内の局所的な Ca^{2+} の上昇により特異的に起こることが明らかになった。

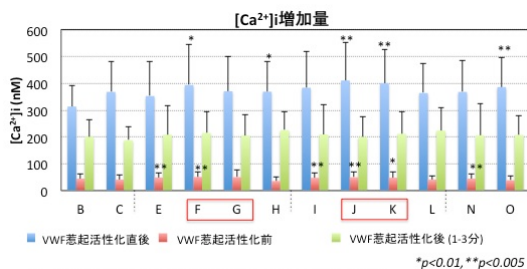


Fig5. VWF接着血小板活性化過程と Ca^{2+} の局在

(2) VWF およびコラーゲンのマトリクスの違いによる血小板の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇におよぼす影響

Fig. 6 にコラーゲン接着直後の血小板 total $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変動を示した。VWF と

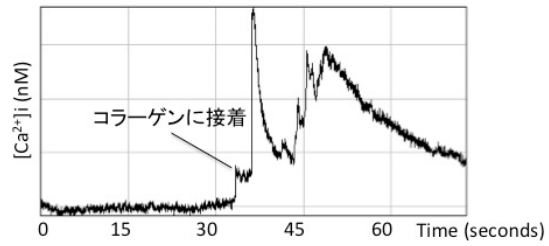


Fig6. 血流条件下コラーゲン接着血小板のtotal $[Ca^{2+}]_i$

同様、接着直後に一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められるが、特徴としてその後 $[Ca^{2+}]_i$ が細胞内に蓄積される期間が存在した。血小板のマトリクス接着直後の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の細胞あたりの総増加量はコラーゲンでは 333.6 ± 94.7 (nM) であったが、VWF では 395.5 ± 121.3 (nM) と顕著な差は認められなかった (Fig. 7)。 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇開始から最大値までの時間についても、それぞれ 0.64 ± 0.14 秒、 0.56 ± 0.12 秒と顕著な差は認められなかったが、マトリクス接着直後から最初の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇時の最大値までの時間は 5.2 ± 1.6 秒、 9.6 ± 3.5 秒と顕著な差を認めた ($p < 0.0001$) (Fig. 7)。VWF 接着直後の血小板では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇時の Ca^{2+} の局在は、細胞中心部

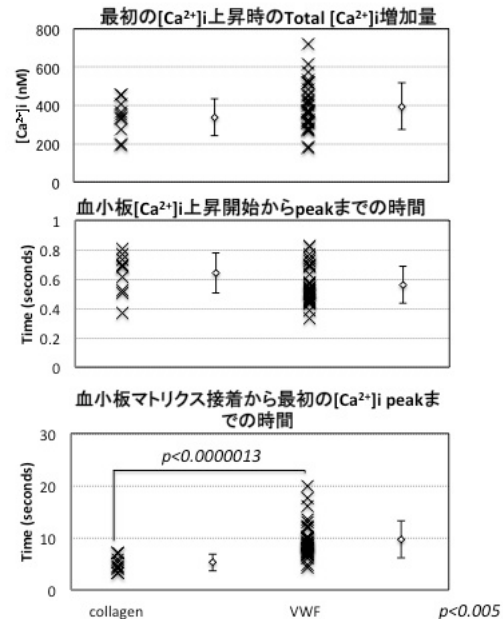


Fig7. コラーゲンおよびVWFに接着した血小板最初の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇時のtotal $[Ca^{2+}]_i$

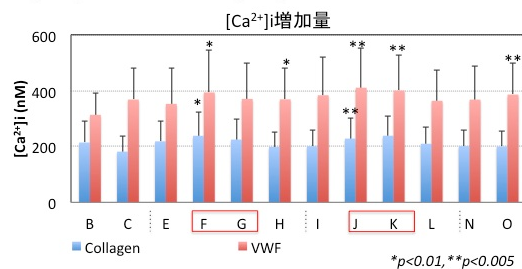


Fig8. コラーゲンまたはVWFに接着直後の血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇時の Ca^{2+} の局在

の分画を含む F, J, K, O であったのに対し (Fig5と同様)、コラーゲンもまた細胞中心部の分画 F, J に Ca^{2+} の局在が認められた $\{238.4 \pm 86.5, 228.4 \pm 72.3 \text{ (nM)}\}$ 。コラーゲンと VWF による接着直後の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇について Ca^{2+} 局在による顕著な差異は認められなかったが、total $[Ca^{2+}]_i$ 上昇最大値までの時間に数秒の単位の差があることから、血小板の活性化がコラーゲン上に接着した血中 VWF に反応したのではなく、コラーゲンに特異的な反応であることが示された。

(3) VWF 惹起による血小板活性化 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に関与する因子

血流条件下、VWF により惹起される血小板活性化初期の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇について、 $P2Y_{12}$ 阻害薬 (AR-C69931MX), PAR-1 阻害薬 (E5555), による影響を検討した。VWF 接着に起因する血小板の単位時間あたりの total $[Ca^{2+}]_i$ の増加量は Control では $376.7 \pm 98.6 \text{ (nM)}$ であったが、AR-C69931MX ($211.1 \pm 102.1 \text{ (nM)}$, $p=0.002$), と顕著に抑制された (Fig. 9)。一方 E5555 で

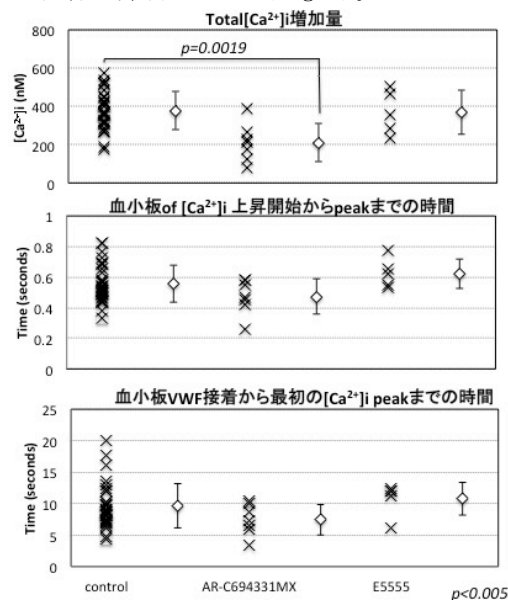


Fig9. 受容体阻害条件下、VWF 惹起血小板の total $[Ca^{2+}]_i$

は $368.5 \pm 113.8 \text{ (nM)}$ と total $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に影響は認められなかった。血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇開始から最大 $[Ca^{2+}]_i$ までの到達時間については、いずれの阻害条件でも顕著な差は認められなかった。また VWF 接着から最初の最大 $[Ca^{2+}]_i$ までの到達時間では、Control が 9.6 ± 3.5 秒であるのに対し、AR-C69931MX では 7.5 ± 2.5 秒とわずかに到達時間の短縮が認められた ($p=0.03$)。一方 E5555 では 10.7 ± 2.6 秒と影響は認められなかった。血小板内 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇時の Ca^{2+} の局在について Fig10 に示す。Control では Fig5 同様血小板の中心に位置する分画を含む F, J, K, O で顕著な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められたが、E5555 でも同様に分画 F, J で顕著な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められた $\{(336.7 \pm 170.0, 322.5 \pm 120.9 \text{ (nM)})\}$ 。一方 AR-C69931MX では顕著な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇分画は認められなかった。以上の結果より、 $P2Y_{12}$ は血小板 VWF 接着時の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の局

所的な Ca^{2+} の上昇を抑制することから、血小板の初期活性化に関与する一方、PAR-1 受容体は影響およぼさないことが明らかになった。

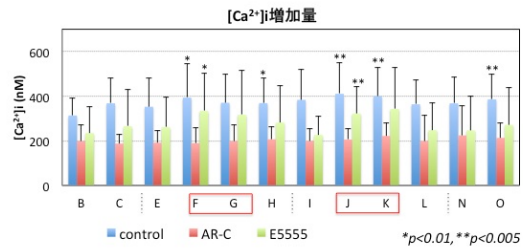


Fig10. 阻害存在下 VWF 惹起血小板の Ca^{2+} の局在

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 田村典子 他, Contributing factors influencing the time from platelets adhesion on von Willebrand factor to start activation detected by increasing intra-platelet calcium ion. 第 24 回国際血栓止血学会 2013 年 6 月 30 日 アムステルダム
- 2) 田村典子 他, 血流条件下 VWF 刺激による初期の血小板カルシウムイオン濃度 第 33 回日本血栓止血学会 2013 年 5 月 30 日 山形
- 3) 田村典子 他, 血小板初期活性化と血小板細胞内 ATP. 第 32 回日本血栓止血学会 2012 年 6 月 9 日 東京
- 4) 田村典子 他, Role of Mitochondria in the Process of Platelet Activity and Thrombosis Formation under Blood Flow Conditions. 第 23 回国際血栓止血学会 2011 年 7 月 28 日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者 田村 典子

(TAMURA Noriko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：90439703