

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590871
 研究課題名（和文）局所血管機能の調節における血小板由来マイクロパーティクルの役割の検討
 研究課題名（英文）Role of platelet derived microparticle in the local regulation of vessel function.
 研究代表者
 後藤 信哉（GOTO SHINYA）
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号：50225653

研究成果の概要：動脈硬化巣周囲の血栓形成にて血小板は必須の役割を演じる。血管内皮細胞機能障害部位に集積した血小板は活性化し microparticle を放出する。これは血管内皮、炎症性細胞機能調節、凝固系活性化にも寄与する。産生されたトロンビンは、トロンビン受容体刺激を介してさらに血小板の活性化を促進させることを示した。また、血栓形成に関与する各種細胞機能が、活性化血小板から産生された microparticle により調節されるメカニズムを示した。また、細胞内小器官であるミトコンドリアの関与を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科学・循環器内科学（血管：

キーワード：(1) 血小板 (2) microparticle (3) 炎症性細胞
 (4) 血栓 (5) 凝固系 (6) 心筋梗塞
 (7) 脳梗塞 (8) 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢人口の増加とともに、動脈硬化を基盤とする血栓性疾患である心筋梗塞、脳梗塞の有病率が増加している。血管壁の慢性炎症性疾患であるとされる動脈硬化巣の形成には単球系を中心とする炎症性細胞が必須の役割を演じる。白血球系細胞ほどには注目されていないが、細胞内にセロトニン、CD40 ligand (CD40L)、P-selectin など多くの生理活性物質を含有し、刺激に応じてこれらの物

質を局所放出する血小板もまた血管壁の炎症反応の調節、動脈硬化巣の形成において必須の役割を演じている。われわれは、動脈血流条件下における血小板の活性化機構に着目し、国内外の多くの研究機関との比較においてもユニークな視点から血栓形成、炎症調節など局所の血管機能調節におよぼす血小板の役割を検討して来た。すなわち、動脈血流に相当する高いずれ応力の条件下では、ADP、トロンビンなどの活性化物質が存在し

なくとも von Willebrand 因子との相互作用により血小板が活性化されること (Goto S, et al. *J Biol Chem*, 1995, Goto S, et al. *J Clin Invest*, 1998)、活性化された血小板は P-Selectin, CD40L などの炎症調節蛋白の表面への発現を介して、また多くの可溶性生理活性物質の局所放出を介して、炎症にかかわる白血球、血管内皮細胞の機能調節にかかわること (Hagihara M, et al. *J Immunol*, 2004, 後藤信哉他特願 2005-270387)、膜蛋白の脂質構成も変化して凝固亢進作用を有するリン脂質が表面に発現すること (Goto S, et al. *JTH*, 2003)、脂質成分、膜蛋白を含む血小板膜の一部を microparticle として局所放出すること (Goto S, et al. *JTH*, 2003, Goto S, et al. *Circulation*, 2002)、などの研究成果を発表してきた。血液学者を中心とした従来の血小板研究では、血小板同士の結合 (血小板凝集)、コラーゲンなどの異物への血小板の接着 (血小板粘着) など、血小板自体による血栓形成の重要性が強調されてきた。従来のコンセプトに対してわれわれは、血小板の主要な役割は膜成分の変化、股蛋白の構造変化と生理活性物質の局所放出による凝固系、炎症などにおよぼす局所調節であると主張している (Goto S. *Current Vasc Pharmacol*, 2004)。実際人体に心筋梗塞を惹起した冠動脈の血栓を採取して組織学的に検討すると血小板とフィブリン、炎症性細胞の局在の一致が認められ、これらの細胞間の緊密な連携が示唆される (Hoshiba H, et al. *JTH*, 2006)。血小板による局所細胞機能の調節を考える上で、血小板膜の一部が膜蛋白、脂質成分、CD40L に代表されるサイトカインなどの生理活性物質と一緒に放出される microparticle の役割は重要と想定される。特に Thromboxane A₂ に代表される脂質性のメディエーターは水に溶解しないため直接液相に放出されて機能するとは考え難く、膜の脂質成分に結合された形態により放出される可能性が高い。脂質、蛋白を共有する microparticle の生体調節における役割は大きいと想定されるもののその生理学的、病態生理学意義については十分に検討されていない。

Microparticle の表面には Annexin V が結合する陰性荷電したリン脂質が発現している (Goto S, et al. *JTH*, 2003)。この性質により凝固系を効率的に活性化させることができる。また白血球系細胞、貪食細胞にも認識されやすいため白血球系細胞の機能の修飾にも一定の役割を演じていると想定される。P-selectin などの接着蛋白の発現を介して白血球系細胞に容易に結合すると想定されるが、血小板由来 microparticle と白血球系細胞の相互作用のメカニズムにも未知の部分が多い。複数の機能蛋白を含む塊として

作用する microparticle は、サイトカインなどの液性因子よりも複雑な細胞機能調節作用を有していると想定される。

2. 研究の目的

本研究では血小板由来 microparticle の産生メカニズムを解明するとともに、microparticle と一括している血小板膜由来の小粒子を機能的に細分し、各々粒子の白血球系細胞、血管内皮細胞などの細胞に対する調節メカニズムの詳細を明らかにしたい。膜の一部を切り出して、他の細胞による認識を受けやすい小粒子を産生するという血小板の特性から、局所血管機能調節の新たなメカニズムを明らかにしたい。さらには、止血には直結しない microparticle の放出抑制を製薬の標的とすることにより、出血性合併症を惹起しない新たな抗血小板薬、抗動脈硬化薬の開発につなげたい。

3. 研究の方法

動脈血流条件下における血小板からの microparticle の産生の基本的メカニズムと、産生放出された microparticle による白血球系細胞機能の調節機構の概略の確認

1) 生理的、病態生理学的条件における血小板からの microparticle 産生メカニズムの解明

2) 血小板由来 microparticle による白血球系細胞機能調節メカニズムの検討

4. 研究成果

糖尿病などのリスク因子により血管内皮細胞が機能的に障害された部位に血小板が集積する。集積された血小板は活性化され microparticle を放出し、放出された microparticle が血管内皮細胞機能をさらに修飾することにより血栓の形成速度に影響されることを示した。Microparticle は血管内皮細胞、炎症性細胞の機能に影響を与えるのみならず血小板血栓周囲における凝固系の活性化をも促進する。血小板表面膜上の凝固系活性化の結果産生されたトロンピンは、トロンピン受容体刺激を介してさらに血小板の活性化を促進させる効果を有することを示した。血管内皮細胞、炎症性細胞、血小板、凝固系は各々別個に作用するのみならず相互に緊密に作用することにより心筋梗塞、脳梗塞などの動脈血栓性疾患の発症に影響を与えていることを示した。動脈血流の条件下にて活性化された血小板からの Microparticle 産生メカニズムについて、細胞内小器官であるミトコンドリア、好気性代謝が一定の役割を演じていることを示唆する実験結果を得た。Microparticle による各種細胞機能の調節機構については、多くの研究成果をあげたが、血小板以外の他細胞にも

共通すると想定される microparticle 産生、放出のメカニズムについてはさらなる研究が必要である。

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 7 件)

1. Tamura N, Kitajima I, Kawamura Y, Toda E, Eguchi Y, Ishida H, Goto S: Important regulatory role of activated platelet-derived procoagulant activity in the propagation of thrombi formed under arterial blood flow conditions, *Circulation Journal* 73:540-548 (査読あり)
2. Moriguchi-Goto S, Yamashita A, Tamura N, Soejima K, Takahashi M, Nakagaki T, Goto S, Asada Y. ADAMTS-13 attenuates thrombus formation on type I collagen surface and disrupted plaques under flow conditions. *Atherosclerosis* 203:409-16, 2009 (査読あり)
3. Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, and Nakauchi H. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *Journal of Experimental Medicine*, 205: 1917-27, 2008 (査読あり)
4. Angiolillo DJ, Capranzano P, Goto S, Aslam M, Desai B, Charlton RK, Suzuki Y, Box LC, Shoemaker SB, Zenni MM, Guzman LA, Bass TA. A randomized study assessing the impact of cilostazol on platelet function profiles in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: results of the OPTIMUS-2 study. *European Heart Journal*. 2008, 29: 2202-11, 2008 (査読あり)
5. Serebruany VL and Goto S: The challenge of monitoring platelet response after clopidogrel, *European Heart Journal*. 100:1093-1094, 2008 (査読あり)
6. Goto S. Cardiovascular risk factors in patients at high risk of atherothrombosis. What we learned from Registries? *Thrombosis and Haemostasis*, 100:611-3, 2008 (査読あり)
7. Goto S. Blood constitution: platelet aggregation, bleeding, and involvement of leukocytes. *Virchow's triad 2008 in Caplan LR eds. Reviews in Neurological*

Diseases (Vol 5) 2008 S22-S27. MedReviews (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

1. Goto S. Atheroclerosis and use of anti-platelet agent in Asia. 6th Congress of the Asian Pacific Society of Vascular Disease (APSAVD) Symposium 9: Cardiometabolic Risks and Atherothrombosis. 28 Sep, 2008 (HongKong)
2. Goto S. Phase II trial the novel antiplatelet agents, SCH530348, in Japanese patients with non-ST segment elevation acute coronary syndromes (NSTE ACS) (poster), European Society of Cardiology Congress 2008, Sep, 2 2008. Munich 1.
3. 後藤信哉: mini debate 1: 血小板機能のモニターリングは患者予後を改善する? -機能評価を実地臨床に持ち込むのは早計である。第 8 回日本心血管カテーテル治療学会 シンポジウム 5 PCI と抗血小板療法、2008 年 11 月 24 日 京都
4. 後藤信哉: 抗血栓療法: 日本と海外とのギャップは埋めるべきか? 第 8 回日本心血管カテーテル治療学会 シンポジウム 3 急性冠症候群の包括的管理、2008 年 11 月 24 日 京都
5. 後藤信哉: 静脈血栓予防介入のメリットとデメリット -各種抗凝固薬の差異- 第 31 回日本血栓止血学会学術集會会長要望シンポジウム 2: 日本の周術期静脈血栓塞栓症予防の行方を考える 2008 年 11 月 22 日 大阪
6. 後藤信哉: Very late stent thrombosis の発症機序と対策-血小板の立場から 日本心血管インターベンション学会シンポジウム JSIC & JACC 共同企画: Very late stent thrombosis の発症機序と対策 2008 年 7 月 3 日 名古屋
7. 後藤信哉: 血管内皮傷害と血小板活性化 第 17 回日本脳ドック学会総会シンポジウム 2 「脳ドックは医療資源の有効活用に寄与しているか?」2008 年 6 月 29 日 郡山 (福島)

[図書] (計 5 件)

1. Goto S. Platelet procoagulant activity appeared by exposure of platelets to blood flow conditions. In Tanaka K and Davie EW (eds) *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008 (Springer): 290-297, 2008.*
2. 後藤信哉: chapter 4 抗血小板薬 1. アスピリン pp371-377, 2. チクロピジン、クロピトグレル、プラスグレル pp378-384, in 抗凝固薬の適正な使い方 第 2 版 櫻川信男、上塚芳郎、和田英夫編集。医歯薬出版

(株) 2008 年

3. 戸田恵理、後藤信哉 : pp240-245 抗血小板薬 In 心血管病薬物治療マニュアル 監修 山口徹 eds. 荻尾七臣、筒井裕之 2008 年, 中山書店
4. 半田俊之介、田邊晃久、伊荏裕二、後藤信哉 監修 循環器内科ゴールデンブック (改訂第 2 版)、南江堂 2008 年 4 月 15 日
5. 後藤信哉: 血栓・塞栓症 In 病気と薬 パーフェクトBOOK 池田宇一、大越教夫、横田千津子 eds. 山田勝士、櫛田賢次、大井一弥、丸山徹、高村徳人、伊藤由紀 pp57-58 2008 年 南江堂

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特許申請: 後藤信哉/末松誠 東海大学/慶應義塾大学 特願 2008-059457 : ステント形状最適化シミュレーター 2008 年 3 月 10 日出願 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 信哉 (GOTO SHINYA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号 : 50225653

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし