

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590911

研究課題名（和文）心筋梗塞の発症にかかわる血小板活性化におけるミトコンドリアの役割の研究

研究課題名（英文）Role of Mitochondria on Platelet Activation Contributing to the Onset of Acute Myocardial Infarction

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（和文）：

心筋梗塞の発症には血小板が重要な役割を演じる。血小板細胞は複数のミトコンドリアを有し代謝活性が高い。心筋梗塞の発症における血小板の役割と、血小板細胞内のミトコンドリアの役割を明らかにすることを目的に本研究を計画した。

ミトコンドリアの機能発現には酸素が必要である。酸素濃度の高い動脈血中の血小板は単位時間内の血栓産生能力が高かった。血小板細胞が活性化しても、細胞内のミトコンドリアの数、分布は影響を受けなかった。ミトコンドリア機能を阻害すると細胞内カルシウムイオン濃度の増加は阻害されることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Platelets play crucial role in the onset of acute myocardial infarction. Platelets are active cells in view of energetic metabolism with several mitochondria. This study attempts to clarify the role of mitochondria in platelet cells for the onset of acute myocardial infarction.

Mitochondria need oxygen to express their physiological function. Platelets in arterial blood containing high oxygen concentration have higher thrombogenicity than those in venous blood. The number and localization of mitochondria was not influenced by platelet activation. Cyclic increase in intracellular concentration of calcium ion induced by platelet activation was inhibited when the function of mitochondria was blocked.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血小板、ミトコンドリア、血栓、アテローム血栓、心筋梗塞、電子伝達系、動脈血栓

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞、脳梗塞などの疾患による死亡率

は世界の全死亡の約3割を占めると報告されている (*World Health Report: WHO*)。本邦では、死因の第一位が悪性腫瘍であるとはいつても、生活スタイルの欧米化とともにこれらの疾患の有病率の増加が懸念される現状にある。実際、冠動脈、脳血管、末梢血管に動脈硬化性病変を認める症例に限局すれば、わが国に症例の心筋梗塞/脳卒中/心筋梗塞発症リスクは欧米諸国の70-80%に達している (*Goto S, et al. Heart Asia, 2011*)。これらの動脈硬化を基盤とする血栓性疾患の発症の初期段階には血小板細胞が重要な役割を演じる。心筋梗塞、脳梗塞の発症を制御するためには血小板細胞の制御が必須である。

心筋梗塞、脳梗塞の発症病態を考えると、これらの疾患は、心臓、脳などの重要臓器を灌流する冠動脈、脳血管内の動脈硬化巣の破綻を契機とする。抗血栓性の強い血管内皮細胞に被覆された血管には血小板細胞は接着しないが、動脈硬化巣が破綻して血管内皮細胞による被覆の損なわれた部位には即座に血小板細胞が集積する。たとえば、冠動脈内の動脈硬化巣破綻部位局所に集積した血小板は、細胞表面の活性化受容体刺激を経て活性化する。活性化した血小板細胞は、ADP、セロトニン、トロンボキサンA₂、CD40 ligand、細胞膜の一部であるmicroparticleなど多くの物質を局所放出する。これらの物質は血管収縮、炎症調節、凝固系活性化に寄与し、血管内局所の血栓性を著しく増加させる。血小板細胞が心筋梗塞の発症に重要な役割を演じていることは、アスピリン、クロピドグレルなど血小板の活性化シグナルの一部を阻害する抗血小板薬の服用により心筋梗塞の発症を予防できるとの臨床エビデンスからも確認されている。

血小板内には数個のミトコンドリアが存在する。血小板細胞は代謝活力の高い細胞である。活性化シグナルの多くがATP消費と伴うシグナル蛋白リン酸化反応であることを考えると、血小板のミトコンドリア機能制御による血小板活性化制御は現実性がある。しかし、本研究開始の時点において血小板活性化、血栓形成におけるミトコンドリアの役割、酸素の意義については十分に検討されていない。

2. 研究の目的

動脈血の酸素濃度の条件では、血小板の中心に存在するミトコンドリアが過剰なATPを産生し、細胞膜近傍により多く存在するシグナル蛋白、膜蛋白の活性化構造維持の過程で消費される。しかし、ミトコンドリアは血小板細胞中心に位置するため、1) ATPの産生がミトコンドリアの局在する細胞中心で起こり、2) ATPの消費が細胞膜近傍に存在する活性化受容体から細胞内に向けてATP消費

と共にシグナル蛋白リン酸化反応により担われると仮定すると、血小板細胞が刺激を受けた直後には、血小板細胞中心部ではATP過剰、膜近傍ではATP欠乏状態に平衡が崩れ、その後一定時間をかけて平衡が再度成立すると想定される。そこでミトコンドリアの血小板細胞中心部の局在を考慮した血小板細胞内のエネルギー供給モデルを考案した。従来、抗血小板薬の薬効はミトコンドリアの機能しない静脈血を用いて行われていた。ミトコンドリアが機能する「動脈血の酸素濃度」における血小板活性化、血栓形成のメカニズムとミトコンドリアが十分に機能しない静脈血における血小板活性化、血栓形成のメカニズムの差異を実証的、理論的に明らかにし、心筋梗塞発症における血小板細胞活性化のプロセスにおけるミトコンドリアの役割を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラットを対象として、酸素濃度が高くミトコンドリアが有効に機能する動脈血内の血小板と、酸素濃度が低くミトコンドリアの機能が不十分な静脈血内の血小板の止血機能の差異を明らかにするための実験を行なった。

① 同一条件により飼育した同一週齢のラット20匹より、動脈血液、静脈血液を各々採取し選択的トロンビン阻害薬により抗凝固処理を行う。採取した血液を、コラーゲンを固相化したガラス板上に灌流し、コラーゲン繊維上に形成される血小板血栓を定量する。

② 事前に書面による同意を取得した胸痛症候群の症例より、心臓カテーテル検査中に動脈および静脈より同時に10 mlの血液を採取して同様の抗凝固処理を行う。採取した血液中の血小板をメパクリンにて蛍光標識し、コラーゲンを固相化したガラス面上に灌流して血小板の接着、血栓形成を定量評価する。なお、本研究はヒト検体を用いた臨床研究の範疇に入るため、本研究プロトコルは東海大学臨床研究審査委員会による審議を受け、研究の実施に関する許可を取得している (臨審伊委第08R-022号)。コラーゲン上の血小板血栓の成長過程を蛍光顕微鏡、および以前の科学研究費補助金により開発して高速3次元イメージング法によりリアルタイムイメージングする。

③ ローダミン123により血小板のミトコンドリアの活性化電位変化をリアルタイムにて検出できる。本法を用いてラット血液において、動脈血と静脈血のミトコンドリアの差異を検討する。

④ 血栓形成におけるミトコンドリアのエネルギー産生の役割を検討するために、電子伝達系の阻害物質 FCCP の効果を検討した。

(2) 血小板の接着、血栓形成におけるミトコンドリアのATP産生能力の役割を、各種電子伝達系阻害物質を用いて薬理的に検討した。具体的には、臨床研究審査委員会にて承認を受けた手順により、健常人のボランティアより血液を採取して抗凝固処理した。血小板内にカルシウム感受性色素Fluo-3を負荷した。血小板細胞を洗浄して、余分のFluo-3を取り除いたのちに、洗浄した赤血球、血小板を含む再構成血液を作成した。血管壁損傷部位にて血小板を停止させるvon Willebrand因子 (VWF) を固相化したガラス板上に再構成血液を灌流した。既に確立した方法を用いて血栓を形成する血小板細胞中のカルシウム濃度を既報にしたがって計測した (Goto S, et al. *J Am Coll Cardiol*, 2004)。また、コラーゲン上の血小板血栓を定量評価した。ミトコンドリアの電子伝達系の阻害物質として、作用機序の異なるカルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP)、oligomycin, antimycinを用いた。細胞内へのカルシウム流入を阻害する非特異的カルシウムチャンネル阻害薬ランタン、カルシウムイオン流入阻害効果を有することを以前に報告しているP2Y₁₂ ADP受容体阻害薬の効果と比較検討した。

(3) 血小板細胞内のミトコンドリアの局在同定と細胞内活性化シグナルイメージング
ミトコンドリアの主要機能はATP産生である。血小板活性化受容体は細胞膜上に存在し、活性化シグナルの多くはATP消費と共役したシグナル蛋白リン酸化反応であるため、細胞内のミトコンドリアの局在は活性化シグナルの伝播の理解に必須である。そこで、ミトコンドリアに集積する蛍光色素ミトトラッカーを用いて、血小板細胞内のミトコンドリアの局在同定を行なった。トロンビン、ADPなどの刺激後のミトコンドリアの数と細胞内局在の変化の有無も検証した。

血小板細胞の活性化反応はシグナル蛋白リン酸化反応により担われる。リン酸化シグナル蛋白は、膜糖蛋白 GPIIb/IIIa の細胞内ドメインに結合して同蛋白の細胞外ドメインの高次構造変化を惹起する。活性化刺激後のリン酸化刺激の局在変化を明らかにするために、リン酸化 vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) に対する特異抗体を細胞内に導入し、その局在変化をイメージングによる半定量する技術を確立した。VASP のリン酸化はATPの分解と共役する反応であるが、採取した直後の血液から分離した血小板を使用する限りにおいては、ミトコンドリア機能阻害時に VASP リン酸化阻害効果を確認することはできなかった。細胞表面の受容体刺激開始後数分以内に完了する血小板活性

化反応を担うに十分量のATPの細胞内蓄積を示唆した。

4. 研究成果

(1) ラット動脈および静脈血を採取してコ

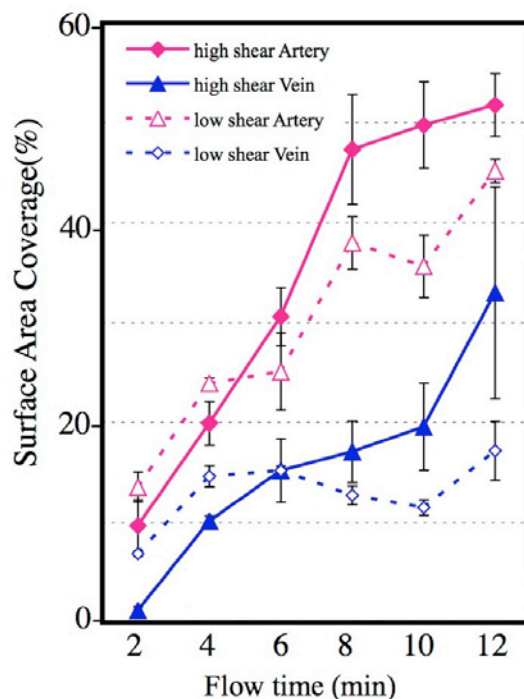


図1: 動脈血と静脈血の差異

ラーゲン上に灌流したところ、6分間の灌流時間内により血小板により被覆された部分の面積は、動脈血灌流時において静脈血灌流時よりも 2.5 ± 0.7 倍広がった (図1)。ヒト血液を用いた実験結果もラットと同様であった。FCCPを用いて電子伝達系を阻害しても、血小板による被覆率は影響を受けなかった。

ローダミン 123 を用いて、血小板細胞内のミトコンドリアのイメージングは可能であった。また、ビデオレートにて蛍光強度の変化の検出も可能であったが、ミトコンドリアのサイズが小さいため定量評価は困難であった。

(2) ミトコンドリアのATP産生阻害効果を有するFCCP, oligomycin, antimycinはいずれも、VWFとの結合後の血小板細胞内へのカルシウムの流入を阻害した。血小板とVWFの接着から細胞内カルシウムイオン濃度上昇に至る時間はFCCPでは影響を受けず、oligomycin, antimycinの存在下では延長した。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇抑制により示された血小板活性化阻害効果は、VWF上への血小板の接着阻害効果には直結しなかった。

(3) 健常成人の静脈から採取した血小板細胞内のミトコンドリアの局在同定を行なっ

た。図2最上段に、血小板細胞を上から観察した時の、2段目に血小板細胞を側方から観察した時のミトコンドリアの局在を示す。その局在に関する定量情報を図の下の表として示した。非活性化血小板には 3.7 ± 1.9 個のミトコンドリアが存在した (計測血小板数: $n=20$)。トロンビン受容体、ADP受容体刺激により血小板細胞を活性化しても、ミトコ

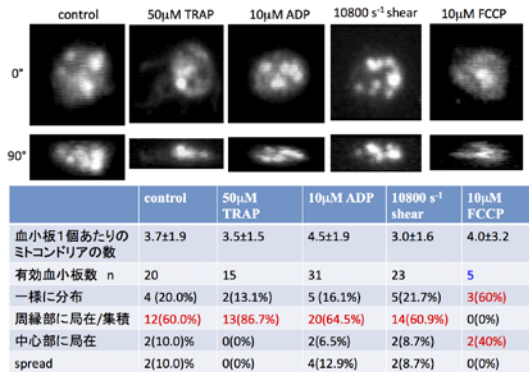


図2. 血小板細胞内のミトコンドリアの局在と各種刺激時の局在変化
ンドリアの個数、局在は変化しなかった。電子伝達系阻害薬である FCCP 投与時にはミトコンドリアは細胞中心部に集積する蛍光を認めた。

血小板細胞活性化時には、血小板細胞内にてリン酸化刺激が活性化する結果、シグナル蛋白が増加した。典型的なリン酸化シグナル蛋白である VASP もリン酸化し、VASP-P が増加した。

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 14 件)

- Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, Burton P, Cohen M, Cook-Brunns N, Fox KA, Goto S, Murphy SA, Plotnikov AN, Schneider D, Sun X, Verheugt FW, Gibson CM; the ATLAS ACS 2-TIMI 51 Investigators. Rivaroxaban in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2011 Nov 13. *N Engl J Med*. 366 (1): 9-19 査読有
- Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, Al-Khalidi HR, Ansell J, Atar D, Avezum A, Bahit MC, Diaz R, Easton JD, Ezekowitz JA, Flaker G, Garcia D, Geraldes M, Gersh BJ, Golitsyn S, Goto S, Hermosillo AG, Hohnloser SH, Horowitz J, Mohan P, Jansky P, Lewis BS, Lopez-Sendon JL, Pais P, Parkhomenko A, Verheugt FW, Zhu J, Wallentin L; the ARISTOTLE Committees and Investigators.

- Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 365: 981-992, 2011 査読有
- Goto S, Ikeda Y, Shimada K, Uchiyama S, Origasa H, Kobayashi H; The J-TRACE Investigators. One-Year Cardiovascular Event Rates in Japanese Outpatients With Myocardial Infarction, Stroke, and Atrial Fibrillation. *Circ J*. 2011 Aug 20. 75(11):2598-2604. 査読有
 - O' Donoghue ML, Bhatt DL, Wiviott SD, Goodman SD, Fitzgerald DJ, Angiolillo DJ, Goto S, Montalescot G, Zeymer U, Aylward PE, Guetta V, Dudek D, Ziecina R, Contant CF, Flather MD, on behalf of the LANCELOT-ACS Investigators. Safety and Tolerability of Atopaxar in the Treatment of Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation*, 123: 1843-53, 2011 査読有
 - Goto S, Ikeda Y, Chan JCN, Wilson PWF, Yeo TC, Liau CS, Abola MT, Salette G, Steg PG, Bhatt DL on behalf of the REACH Registry Investigators*. Risk-factor profile, drug usage and cardiovascular events within a year in patients with and at high risk of atherothrombosis recruited from Asia as compared with those recruited from non-Asian regions: a substudy of the REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) registry. *Heart Asia* 3: 92-98, 2011 査読有
 - Wiviott SD, Flather MD, O' Donoghue ML, Goto S, Fitzgerald DJ, Cura F, Aylward P, Guetta V, Dudek D, Contant CF, Angiolillo DJ, Bhatt DL, on behalf of the LANCELOT-CAD Investigators. Randomized Trial of Atopaxar in the Treatment of Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 123: 1854-63, 2011 査読有
 - Goto S, Ogawa H, Takeuchi M, Flather M, Bhatt DL, on behalf of the J-LANCELOT Investigators. Double-blind, placebo-controlled Phase II studies of the PAR-1 antagonist E5555 in Japanese patients with acute coronary syndrome (ACS) or high-risk coronary artery disease (CAD). *Eur Heart J*, 31(21) : 2601-2613, 2010 査読有
 - Sumi, T, Yamashita, A, Matsuda, S, Goto S, Nishihira, K, Furukoji, E, Sugimura, H, Kawahara, H, Imamura, T, Kitamura, K, Tamura, S, Asada, Y. Disturbed blood flow induces erosive injury to smooth

- muscle cell-rich neointima and promotes thrombus formation in rabbit femoral artery, **J Thromb Haemost**, 8: 1394-402, 2010 査読有
9. Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, and Eto K: Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo. **J Clin Invest**, 120: 179-90, 2010 査読有
 10. Angiolillo DJ, Ueno M, and Goto S. Basic Principles of Platelet Biology and Clinical Implications. **Circ J**; 74: 597 -607, 2010 査読有
 11. Angiolillo DJ, Capodanno D, and Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. **Eur Heart J**, 31(1):17-28 2010 査読有
 12. Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H and Goto S. Imaging of Structural Changes in Endothelial Cells and Thrombus Formation at the Site of FeCl3-Induced Injuries in Mice Cremasteric Arteries. **J Atheroscler Thromb** 16(6):807-814, 2009 査読有
 13. 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 arteiral blood flow conditions, **Circ J** 73:540-548, 2009 査読有
 14. 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 査読有

[学会発表] (計 5件)

1. 後藤信哉. 教育講演：ステント後の抗血栓療法. 第 59 回日本心臓病学会学術集会.2011 年 9 月 23 日, 神戸国際会議場(神戸市)
2. Goto S. Lower Risk of Coronary Events in Japanese Outpatients with Ischemic Stroke-Results from the Effective Vascular Event Reduction after Stroke Registry. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation

- Society. 2011 年 8 月 3 日, パシフィコ横浜 (横浜市)
3. Goto S. Risk and benefit of anti-thrombotic therapy: Still ignore the bleeding risk? ISTH 2011, 2011 年 7 月 25 日, ICC京都 (京都市)
 4. Tamura N, and Goto S. ROLE OF MITOCHONDRIA IN THE PROCESS OF PLATELET ACTIVATION AND THROMBUS FORMATION UNDER BLOOD FLOW CONDITIONS. ISTH 2011, 2011 年 7 月 28 日, ICC京都 (京都市)
 5. 後藤信哉. 血管内治療における抗血小板薬の役割. 第 10 回日本頸部脳血管治療学会 2011 年 6 月 11 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪市)

[図書] (計 3 件)

1. Goto S, et al. How can we avoid stroke crisis in the Asia-Pacific region? Pp 1-81, Chameleon Communications International, London, UK, 2011
2. 後藤信哉. 抗血栓療法ハンドブック, pp 1-107, 中外医学社、東京、2011
3. 後藤信哉. そこが知りたい抗血栓療法. 1-255, Medical View, 東京、2011

○取得状況 (計 1 件)

名称：特許
 発明者：広渡祐史、岡本奈美、後藤信哉
 権利者：東ソー株式会社／学校法人東海大学
 種類：特許取得
 番号：特許第 4693563 (P4693563)
 取得年月日：平成 23 年 3 月 4 日
 国内外の別：国内

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