

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 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592021

研究課題名（和文）人工心肺手術周術期の可逆的血小板機能低下と細胞死に及ぼす細胞内シグナリングの解明

研究課題名（英文）Elucidation of intracellular signaling on cell death and reversible perioperative platelet dysfunction in cardiopulmonary bypass surgery.

研究代表者

影山 京子（KAGEYAMA KYOKO）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80347468

研究成果の概要（和文）：人工心肺使用下の開心術の周術期では、血小板機能低下が原因で止血に難じる事がある。本研究は血小板細胞内 p38MAPK 経路を中心とした細胞内情報伝達系の経時的変化とその役割について研究を行った。結果、人工心肺離脱後から GPIb や PAR-1 など、トロンビン受容体の発現低下を認めた。また、細胞死シグナルである血小板内 Bax の上昇とミトコンドリア内シトクロム C の低下を認め、Bax のミトコンドリアへの移行が関連していることが示唆された。血小板の機能維持のためには、血小板内の Bax の制御が重要であると考えた。

研究成果の概要（英文）：In the perioperative period of open-heart surgery under cardiopulmonary bypass, hemostasis may be difficult due to decreased platelet function. This study was conducted to study changes over time of intracellular signal transduction system and its role with a focus on p38MAPK pathway in platelet cells. As a result, we observed decreased expression of thrombin receptor, such as GPIb and PAR-1 after withdrawal from cardiopulmonary bypass. Also, we observed elevated levels of Bax in the platelet and the decreased levels of cytochrome C in mitochondria, the migration of Bax to mitochondria has been associated with decreased platelet function has been suggested. We thought to maintain the function of platelets, it is important to control of Bax signaling in the platelet.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：麻酔学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：遺伝子治療，人工心肺，周術期

1. 研究開始当初の背景

人工心肺下手術の周術期において、希釈性凝固因子の低下の他に、血小板機能低下が原因で止血に難じる事が広く知られている。従来の研究報告では、周術期の血小板凝集能低下の原因として、血小板膜表面抗原発現の低下(Glycoprotein Ib)の報告があるが、血小板細胞内情報伝達系との関連についての研究は少ないため、研究を行った。

2. 研究の目的

人工心肺下手術における周術期の血小板凝集能の変化、アポトーシス(細胞死)シグナル上流の血小板内キナーゼリン酸化(主に p38MAPK 経路)の変化と血小板アポトーシスとの関係を解明した。

3. 研究の方法

人工心肺を使用する On-pump CABG 患者の血小板と、人工心肺を使用しない Off-pump CABG 患者の血小板と比較することで、人工心肺下手術の周術期の血小板機能低下と、血小板細胞内の情報伝達系の経時的な変化を観察した。On-pump 群では、手術直前、人工心肺開始 1 時間後、離脱プロタミン投与後、離脱 6 時間後、手術開始 24 時間後の 5 ポイント、Off-pump では、それに対応するポイントを中心に、ヒト血小板において以下の項目を全血を用いて測定し、血小板凝集能との相関関係を考察した。さらに健康成人から血液を採取し、全血または洗浄血小板溶液を用いて、人工心肺負荷模擬実験、すなわち全血にコーンプレート型粘度計(CAP2000, Brookfield 社, 現有設備)を用いて Shear Stress 負荷(0, 50, 100, 200,

400dynes/cm²)を与えるずり応力負荷試験、およびトロンビン負荷試験を行い、以下の項目を測定した。

(1) 血小板凝集反応 : Whole Blood

Aggregometry (現有設備)にて、全血の凝集反応および血小板 Ca 放出反応(Fluoro-3, フローサイト法)を観察。

(2) 血小板膜表面抗原(PAC-1, P-selectin)および血小板 GPIb, PAR-1 受容体発現の周術期変化 (フローサイト法)

(3)血小板内キナーゼリン酸化解析 : ERK, AKT, p38, JNK のリン酸化 / Total (比)変化の定量 (フローサイト法)。

(4)血小板ミトコンドリア内 Cytochrome C, TNF α converting enzyme (TACE)の周術期変化

(5)血小板内 Bcl-2 ファミリータンパク質の発現の変化:全血を用いた Bcl-xl, Bcl-2, Bax, Bak 発現の変化 (フローサイト法)

(6)血小板内カスパーゼ発現の変化 : Caspase 3, 9 (フローサイト法)

4. 研究成果

トロンビン刺激による血小板細胞表面抗原 PAC-1, P-selectin の変化をそれぞれ観察したところ、Off-pump 群ではともに発現の上昇傾向を認めたが、On-pump 群では有意に値が低く、人工心肺後にトロンビンに対する血小板の反応が抑制されていることがわかった。

血小板膜表面の GPIb と PAR-1 受容体の発現では、On-pump 群では、人工心肺中から発現の低下を認め、人工心肺離脱後から有意差をみとめた。以上から血小板のトロンビン反

応性低下の原因として、トロンビン受容体である GPIb 及び PAR-1 の発現低下が示唆された。次に細胞内情報伝達系において、細胞死シグナルである Active-Bax と生存シグナルである Bcl-xl の血小板内の周術期変化を比較したところ、Bcl-xl 発現では有意差を認めなかったが、On-pump においては、人工心肺離脱後に Active Bax の有意な上昇を認めた。血小板ミトコンドリア内の Cytochrome C の周術期変化を比較すると、On-pump 群でミトコンドリア内 Cytochrome C の有意な低下を認め、Cytochrome C が血小板細胞質内に遊離し、ミトコンドリア依存性の細胞死の過程が起きていると考えた。また On-pump 群において、TACE (TNF- α converting enzyme) の上昇を認めた。

トロンビン負荷実験とずり応力負荷実験では、GPIb と血小板ミトコンドリア内の Cytochrome C の有意な低下を認める一方で、p38MAPK, Active Bax, Bax, Bak, TACE は control 群 と比べて有意な上昇を認めた。Akt, Bcl-xl の値は有意な差を認めなかった。

人工心肺手術に伴う血小板機能の低下は、血中トロンビン濃度の上昇と、GPIb の発現低下が主に関与していることが示唆された。

また、血小板細胞内情報伝達系では Bax の上昇と、Bax のミトコンドリアへの移行が関連していることが示唆された。

以上から、血小板の機能維持のためには、血小板内の Bax の制御が重要であると考えた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Beppu S, Nakajima Y, Kageyama K et al. Phosphodiesterase 3 inhibition

reduces platelet activation and monocyte tissue factor expression in knee arthroplasty patients.

Anesthesiology 査読有, 2009, 111巻 1227-37

[学会発表] (計 3 件)

① 稲見直子, 中嶋康文, 影山京子 他
血小板細胞内情報伝達に対するヒドロキシエチルスターチの影響

日本麻酔科学会学術集会 2009.8.16. 神戸

② Murase M, Nakajima Y, Kageyama K et al. Time-dependent changes in intraplatelet signaling pathways relevant to platelet function defect with cardiopulmonary bypass surgery.

Euroanaesthesia 2010.6.12. Helsinki

③ 村瀬百子, 中嶋康文, 影山京子, 溝部俊樹, 他
人工心肺周術期の血小板機能低下に関する細胞内情報伝達系の経時的変化 日本心臓血管麻酔学会 2011.10.8. 旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 京子 (KAGEYAMA KYOKO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80347468

(2) 研究分担者

中嶋 康文 (NAKAJIMA YASUFUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：70326239

溝部 俊樹 (MIZOBE TOSHIKI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：50239266

(3) 連携研究者

()

研究者番号：