

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659290

研究課題名(和文)新規抗 GPIb 抗体 (HU-12) の活性化血小板マーカーとしての有用性に関する研究

研究課題名(英文)Anti-platelet GPIb monoclonal antibody (HU-12) and activated platelets

研究代表者

高見 秀樹 (TAKAMI, HIDEKI)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10226920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト血小板膜糖蛋白Ib(GPIb)に対する新規マウスモノクローナル抗体であるHU-12の活性化血小板マーカーとしての有用性を検討した。本抗体は各種血小板刺激剤や高ずり応力刺激後の血小板に高い結合を認めた。また、脳梗塞および心筋梗塞発症直後の患者血小板に有意な結合増加を認めたことから活性化血小板検出の有用なマーカーであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Clinical usefulness of new monoclonal antibody against human platelet membrane glycoprotein Ib to detect activated platelets was studied. HU-12 was suggested to be a new marker of activated platelets.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：活性化血小板

1. 研究開始当初の背景

現在、動脈血栓症の増加に伴い抗血栓療法が予防・治療の目的で広く行われている。ワーファリン治療時におけるプロトンピン時間の薬効モニタリングの有用性が認められている一方、アスピリンをはじめとする抗血小板療法における有用なモニタリング方法はないのが現状である。そのなかで活性化血小板を的確に検出することが可能であれば血栓症の診断、予防あるいは抗血小板療法の効果判定として極めて意義のあることである。活性化血小板検出のマーカーとして現在、CD62P、CD63 や PAC-1 が用いられているが、いずれも感度および特異度に問題があり、新たなマーカーの開発が望まれている。我々の作製した新規抗 GPIb 抗体である HU-12 は高ずり応力刺激血小板に強い結合能を示す極めてユニークな抗体であることに着目し、この抗体を用いた新たな臨床的有用性のある活性化血小板検出法を着想するに至った。

2. 研究の目的

アテローム性動脈硬化症を基盤とした動脈血栓症に対する抗血小板療法の有効性は広く認められているが、その薬効をモニタリングする臨床的に有用な方法はないのが現状である。我々は多くの血小板膜に対するモノクローナル抗体を作成してきたが、そのなかで HU-12 が極めて特異的な特徴を有することを見出した、すなわち HU-12 は GPIb に対する抗体であるが、不活性化血小板への結合は弱いものの、高ずり応力刺激血小板に対しては強い結合能を示した。このことから HU-12 が活性化血小板検出の有用なマーカーとして期待される。本研究ではこのユニークな抗体の活性化血小板マーカーとしての臨床的有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗体の精製は HU-12 産生 hybridoma cell をマウス腹腔内で増殖させ、腹水から affinity column を用いて精製した。

(2) 高ずり応力刺激血小板への結合能を検討した。洗浄血小板を回転血液粘度計で高ずり応力 (0 ~ 200 dyne/cm²) を加えホルマリン固定後、フローサイトメトリーにて HU-12 の血小板結合を検討した。

(3) 高ずり応力以外の血小板刺激物質による活性化血小板への結合を ADP、コラーゲン、リズトセチンを刺激物質として同様に検討した。

(4) 他の血小板活性化マーカーとの比較検討では、PAC-1、CD62P、CD63 との結合能との差を検討した。

(5) 動脈硬化性血栓症の代表的疾患である心筋梗塞と脳梗塞症例を対象に発症直後から経時的に採血し、フローサイトメトリー法により HU-12 の血小板への結合を検討した。同時に既存の活性化マーカーである PAC-1、CD62P、CD63 を用いて同様の測定を行い、これらの血栓症における活性化血小板マーカーとしての HU-12 結合血小板測定の臨床的意義と優位性を比較検討した。

(6) 抗血小板薬療法時における活性化血小板マーカーとしての HU-12 の有用性を検討した。動脈硬化性血管障害例 (心筋梗塞、狭心症、脳梗塞既往症例) および糖尿病性血管障害症例を対象に抗血小板療法開始前および開始後の HU-12 を用いた活性化血小板の測定をフローサイトメトリー法により行った。また他の活性化マーカーとの比較を行った。

(7) 血小板由来マイクロパーティクルへの HU-12 の結合能を検討した。高ずり応力刺激により血小板から産生されるマイクロパーティクルをターゲットにしてフローサイトメトリー法で HU-12 の結合を測定し、他の血小板活性化マーカーとの比較を行った。高ずり応力 (108 dyne/cm²) 刺激後の血小板浮遊液をホルマリン固定後、フローサイトメトリーにてマイクロパーティクル部分の HU-12 の結合を測定した。同様の測定を PAC-1、CD62P を抗体として用い、結合能を比較検討した。

(8) HU-12 を用いた ELISA 法による活性化血小板検出法の開発を試みた。高ずり応力刺激血小板に強い結合能を有する HU-12 と高ずり応力で産生される血小板由来マイクロパーティクルを組み合わせることにより、さらに感度および特異度の高い血小板活性化の測定が可能と考えるため、sandwich 法による血小板由来マイクロパーティクル測定法の開発を行った。一次抗体として抗 CD42 モノクローナル抗体を固相化し、二次抗体として標識 HU-12 を用いたマイクロパーティクル測定法の開発のために、測定時の至適条件 (一次抗体・二次抗体の至適濃度設定、抗体の反応時間、検体として全血での測定の可能性、血漿を検体とする場合の血漿検体作成の至適条件) を検討した。

4. 研究成果

(1) 本研究の遂行に必要な HU-12 モノクローナル抗体を 4850mg 精製した。精製した抗体は乾燥凍結保存した。本抗体のサブクラスは IgG1 であった。

(2) 健常人静脈血より洗浄血小板を作成し、cone-plate 型回転血液粘度計を用いて高ずり応力 (0 ~ 200 dyne/cm²) を加えホルマリン固定後の血小板への HU-12 は刺激前血小板に比し明らかに結合の増加を認め、この結合増加はとくに高ずり応力刺激後で顕著であった。

活性化血小板の代表的マーカーである PAC-1 もずり応力刺激後の血小板への結合の増加を認めたが、その結合は HU-12 がより強かった。また他の活性化血小板マーカーである CD62P、CD63 との比較でも HU-12 の有意な結合が認められた (図 1)。

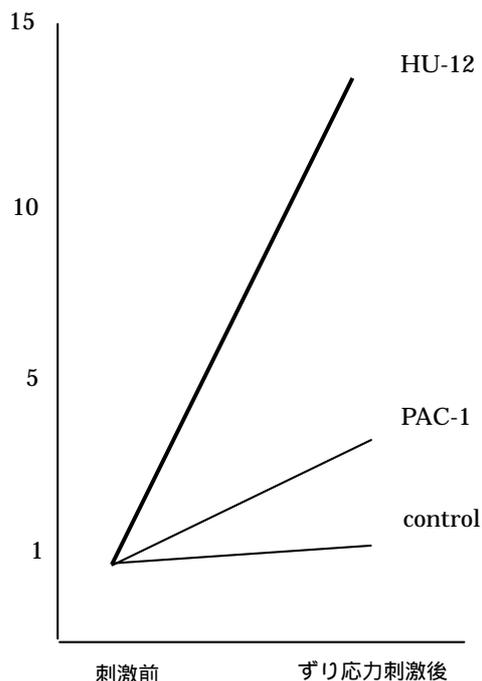


図 1.高ずり応力(108 dyne/cm²)刺激による血小板結合能の変化

(血小板 1 個当たりの平均蛍光強度を刺激前 1.0 として指標化)

(3)ずり応力以外の各種血小板刺激物質での検討では、ADP およびコラーゲン刺激血小板で刺激後に HU-12 の結合増加を認めたが、高ずり応力刺激血小板に対する結合と比較するとその結合増加は軽度であった。

(4)ADP 刺激血小板への HU-12 の結合は PAC-1 および CD62P の結合と比較すると弱かった。リストセチン刺激血小板への結合も同様であった。このことから、HU-12 はずり応力刺激血小板に対するより特異的マーカーであると考えられた。

(5)動脈硬化性血栓症の代表的疾患として心筋梗塞 8 例、脳梗塞 12 例を対象として発症直後 (発症 0.5 ~ 2.0 時間) から経時的に採血し HU-12 結合血小板をフローサイトメトリー法で測定した結果、心筋梗塞 5 例 (62.5%)、脳梗塞 3 例 (25%) で HU-12 結合血小板の有意な増加がみられた。経時的な検討では、心筋

梗塞症例では発症直後より結合血小板は経時的に低下したが発症 7 日でも健常対象に比し有意な増加がみられた。一方、脳梗塞症例では発症直後に HU-12 結合血小板の有意な増加を認めた症例でも発症 7 日後には対象と差がない程度の減少がみられた。両疾患での違いは疾患発症のメカニズムの差か、あるいはカテーテル治療を含む治療の違いによるのか今後の検討が必要であると考えられた。CD62P との比較では心筋梗塞 6 例 (75%)、脳梗塞 5 例 (41.7%) で発症直後に CD62P 結合血小板の有意な増加がみられた。このことから HU-12 が既存のマーカーに比べて活性化血小板検出の優位性を示すことはできなかった。しかし、HU-12 結合血小板増加の見られた症例のなかで心筋梗塞 (3 例) では CD62-P に比し HU-12 の結合が優位に強いことから今後さらに検討する必要があると考えられた。

(6)高ずり応力刺激により産生される血小板以来マイクロパーティクルへの HU-12 の結合をフローサイトメトリー法で測定した結果、高ずり応力刺激血小板と同様に強い結合がみられた。この結合は CD62P および CD63 の結合に比し有意に強いことを認めた。

(7)HU-12 を用い ELISA 法による活性化血小板検出法の開発では、測定時の至適条件 (一次抗体・二次抗体の至適濃度設定、抗体の反応時間) にまだ問題が残されており、さらなる検討が必要である。

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 2 件)

Junya Sato, Ippei Takahashi, Takashi Umeda, Masashi Matsunaga, Ryosuke Tsuya, Kazuyuki Kida, Hideki Takami, Sigeyuki Nakaji : Effect of alcoholic drinking and cigarette smoking on neutrophil functions in adults, Luminescence, 査読有、26 巻、2011、557 - 564

高見 秀樹、玉井 佳子、出血時間 測定意義と臨床検査としての問題点、臨床検査学教育、査読有、3 巻、2011、71 - 73

[学会発表] (計 1 件)

太田 健、山形 和文、玉井 佳子、高見 秀樹、上腸管膜動脈血栓症による急性腹症にて発覚した先天性アンチトロンビン欠乏症の 1 例、第 35 回日本血栓止血学会学術総会、2013 年 5 月 30 日、山形県山形市

[図書] (計 1 件)

玉井 佳子、高見 秀樹、メジカルビュー社、心房細動マネージメント、2012、183 -

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見 秀樹 (TAKAMI, Hideki)
弘前大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：10226920

(2) 研究分担者

玉井 佳子 (TAMAI, Yoshiko)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10322934

(3) 連携研究者

()

研究者番号：