

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860718

研究課題名(和文) 新たな血栓症の予防・治療法確立を目指した巨核球造血・血小板機能における系統的解析

研究課題名(英文) Systematic analysis of megakaryopoiesis and platelet function

研究代表者

上妻 行則 (Kozuma, Yukinori)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90550145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：巨核球は、造血幹細胞から巨核球系特異的サイトカイン、トロンボポエチン(TPO)の作用を受け分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成するが、そのメカニズムや血小板活性化制御機構については以前不明な点が多い。本研究では、巨核球胞体突起形成、血小板凝集能などについて野生型巨核球及び血小板と dnam-1 ノックアウト(KO)、calpastatin KO で差が認められた。以上の結果から、DNAM-1, calpain-calpastatin 系が巨核球造血、血小板機能に重要であることが示唆された。また、人工髄液に含まれる重炭酸塩が血小板機能を増強することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Megakaryocytes (MKs) differentiate from hematopoietic stem cells under the control of MK-specific cytokine, thrombopoietin (TPO). Subsequent maturation of MKs is morphologically characterized by polyploidization and expansion of the cytoplasmic body. Final stage of differentiation is characterized by platelet release from the ends of long thin cytoplasmic processes called proplatelet. However, the mechanism of proplatelet formation and platelet function have not been completely understood. In this study, proplatelet formation, MK ploidy and platelet activation including platelet aggregation of dnam-1, calpastatin KO platelets were changed comparing with those of wild-type. These results suggest that DNAM-1, calpain-calpastatin are involved in megakaryopoiesis and platelet function. Furthermore, we demonstrated that sodium bicarbonate facilitates hemostasis.

研究分野：血栓・止血学

キーワード：巨核球 血小板

1. 研究開始当初の背景

血小板の母細胞である巨核球は、造血幹細胞から核の多倍化と胞体の成熟を伴いながら分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成する。この胞体の先端が断裂し、血小板が産生される。巨核球造血研究は、骨髄内巨核球の絶対数が少ないこと、他血球と比較して脆弱であることなどから研究材料として扱いにくく、巨核球内情報伝達系を系統的に解析するための実験系の確立が遅れていた。しかし、1994年トロンボポエチン (TPO) の発見以降、巨核球研究は飛躍的に進歩し、TPOにより惹起される情報伝達系は詳細に検討されてきたが、巨核球造血、特に血小板産生にどのような細胞内情報伝達物質が関与しているか、十分には解明されていない (総説: 小島ら, 日本血栓止血学会誌 2006;17: 261-271)。

一方、血小板は血球のなかで最小の細胞であるが、巨核球より細胞数が多く研究対象として扱いやすいため、血小板活性化メカニズムは詳細に検討されているものの、血小板活性化を抑制する分子は prostaglandin I₂ (PGI₂) など少数しか発見されていないため、血栓症における有効な予防法は十分に確立されていない。

申請者は、巨核球・血小板と骨髄間質細胞・血管内皮細胞との接着に関与する分子及びそれにより作動する細胞内情報伝達系が巨核球造血・血小板機能を制御するのではないかと仮説を立て、平成20年度日本学術振興会特別研究員 特別研究員奨励費、平成21・22年度 科研費 (若手研究 (スタートアップ))、平成23-25年度 科研費 (若手研究 (B)) の支給のもと研究を行い、少ない細胞数で巨核球動態、血小板活性化を正確に測定する実験系も構築し、以下の知見を得た。

- 1) caspase 活性化は造血幹細胞から巨核球への commitment に重要であるが、血小板産生には 関与しない。
- 2) pro-apoptotic protein, Bim は造血幹細胞の細胞周期や巨核球の apoptosis を制御する。
- 3) Immunoglobulin super family に属する DNAM-1 が巨核球造血・血小板機能を制御する可能性を見出した (第23回国際血栓止血学会 (2011年) Young Investigator Awards 受賞)。
- 4) caspase 活性化は血小板活性化に関与せず、血小板寿命のみ制御する可能性を見出した。
- 5) calpain-calpastatin 系により造血幹細胞から巨核球への分化・成熟が負に制御されている可能性、calpastatin による calpain の抑制が血小板の顆粒分泌を制御する可能性を見出した。
- 6) p38 MAPK が血小板産生、胞体突起形成に重要な役割を担う可能性が示唆された。

2. 研究の目的

巨核球は、核の多倍化と胞体の成熟を伴いながら分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成し血小板を産生するが、どのような細胞内情報伝達物質が巨核球造血を制御し、さらには骨髄内巨核球と他の細胞との相互作用が巨核球造血にどのような影響を及ぼすのかについては未だ不明な点が多い。申請者はこれまでに、DNAM-1, calpain-calpastatin 系, caspase など様々な分子が巨核球造血及び血小板機能において重要な役割を担う可能性を見出した。本研究では、そのなかでも DNAM-1, calpain-calpastatin 系を中心に巨核球造血・血小板機能を検証することにより、新たな血栓症の予防・治療法の確立を目指して研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

本研究では、*dnam-1* knockout (KO) マウス、*calpastatin* KO マウス、*vav-bcl-2* transgenic (Tg) マウスを用いた。野生型 (WT) マウス (C57BL/6J, Balb-c) は日本チャールス・リバー社より購入した。

(2) 血小板採取

本研究で用いた血小板は上記(1) マウスに記載した遺伝子組換えマウスより採血した血液または健康人ボランティアより採血した血液を遠心分離 (1,000 rpm, 10分) した後、得られた platelet rich plasma (PRP) または洗浄血小板を使用した。なお本研究においてヒト血液を用いる研究に関しては、筑波大学医学医療系 医の倫理委員会に申請し、承認されている (承認番号:795)。

(3) 血小板機能解析

in vitro でのマウス血小板機能解析

血小板凝集能 (血小板惹起物質: thrombin, ADP, collagen, convulxin など)

血小板粘着能 (collagen, fibrinogen などへの血小板接着数及び形態変化を蛍光顕微鏡で観察)

血小板内における細胞内情報伝達系の解析 (免疫沈降法及び western blotting)

血小板活性化マーカーの測定 (active glycoprotein (GP)IIb/IIIa, CD62P, phosphatidylserine (PS) exposureなどを flow cytometry で測定)

血餅収縮能 (thrombin 添加による血餅形成を測定)

in vivo でのマウス血小板機能解析

血栓形成能解析 (マウス腸間膜微小血管を塩化鉄にて障害させ、生じる血栓を生体蛍光顕微鏡下で観察し、閉塞までの時間を計測)

出血時間測定 (tail bleeding time)

血小板寿命測定 (biotin 静脈内投与後経時的に flow cytometry で測定)

(4) 巨核球造血解析

in vitro 培養系による解析

成熟巨核球の胞体突起形成能 (immunocytochemistry 後に蛍光顕微鏡で観察)

造血幹細胞から TPO で誘導した巨核球の分化能 (核 ploidy を flow cytometry で観察)

造血前駆細胞からの巨核球への分化能 (巨核球コロニー形成能: CFU-MK)

造血幹細胞、巨核球・赤血球前駆細胞 frequency (CD34-/c-kit+/Sca-1+/Lin-、CD34-/c-kit+/Sca-1-/IL7R-/FcγR low/Lin- を flow cytometry で測定)

巨核球の超微形態観察 (電子顕微鏡)

巨核球における細胞内情報伝達系の解析 (免疫沈降法及び western blotting)

in vivo による解析

定常状態における血小板数

マウスに抗血小板抗体、5-FU などの抗がん剤投与により血小板数を減少させた後の血小板回復能 (血小板数を経時的に観察)、骨髓中巨核球サイズ、核 ploidy (flow cytometry で観察)

血小板回復期の巨核球の形態学的観察

4. 研究成果

(1) 血小板機能における calpain-calpastatin 系の役割

何らかの原因により血管内皮細胞が障害されると、露出した collagen への血小板の接着や ADP などの放出、GPIIb/IIIa の活性化、microparticle (MP) の放出など一連の血小板活性化反応が惹起される。さらに PS が細胞膜表面に曝露 (PS exposure) される。一方で、apoptosis を起こした細胞において、apoptosis に伴う apoptosis 小体という MP に類似した膜小体が放出され、さらにはその表面に PS が曝露されていることも知られており、血小板活性化、特に PS exposure や MP 放出のメカニズムに apoptosis が関与すると考えられてきた。近年 PS exposure の責任分子として transmembrane protein 16F (TMEM16F) が同定され、PS 曝露のメカニズムは解明されつつあるが、MP 放出のメカニズムは以前不明である。そこで、MP 放出への apoptosis の関与、特に caspase 活性化の関与を考え、精製血小板に apoptosis 阻害剤、z-VAD-fmk を添加し、PS exposure 及び MP 放出を測定したが、コントロール群と差はみられなかった。そこで apoptosis に強い抵抗性を示す *vav-bcl-2* Tg マウスより血小板を採取し、測定したが、PS exposure 及び MP 放出ともに WT と差はなかった。一方、血小板寿命を flow cytometry で測定した結果、Tg で有意に延長していた。しかし、Tg マウスでは脾腫がみられたため、脾摘を行ったところ、血小板寿命は WT と差がなくなった。次に血小板活性化に caspase-3 活性化が関与するか否かを western blotting で検討した。血小板を A23187 で刺激したが、活性化 caspase-3 (17kDa) は認められなかったが、約

29kDa の caspase-3 のバンドが検出された。このバンドは、calpain 阻害剤、calpeptin 添加により抑制された。また calpeptin 添加は MP 放出も抑制した。これらの結果から、MP 放出に calpain 活性化が関与する可能性が示唆されたため、最後に、calpain の内在性阻害剤である *calpastatin* KO マウスより血小板を採取し、MP を測定したところ、KO 血小板で有意に MP 放出が増加していた。以上の結果から、血小板からの MP 放出に calpain-calpastatin 系が重要な役割を担う可能性が示唆された。本研究成果は、現在論文投稿準備中である。

(2) 巨核球造血における calpain-calpastatin 系の関与の検討

WT マウスより巨核球を精製し、calpain 阻害剤、ALLN を添加し培養したところ、ALLN 濃度依存性に巨核球胞体突起形成 (proplatelet formation: PPF) を抑制した。この傾向は、他の calpain 阻害剤、EST でも同様であった。そこで、*calpastatin* KO マウスを用いて、巨核球からの血小板産生への calpain-calpastatin 系の関与を検討したところ、WT と KO 巨核球で PPF に差はみられなかった。次に、5-FU を投与して生体内での造血幹細胞から巨核球への分化能、血小板産生能を評価した。5-FU 投与後の血小板回復期の巨核球 ploidy は WT と比較して KO で未熟巨核球の割合が増加していた。さらに骨髓薄切標本を作製し、免疫染色をした後、骨髓内巨核球数の測定や flow cytometry による測定の結果、KO マウスで巨核球数が増加していた。以上の結果から、*calpastatin* は、巨核球造血の初期、造血幹細胞から巨核球へ commit する際に重要な役割を担う可能性が示唆され、現在も研究を継続中である。

(3) 抗血小板抗体による巨核球造血への影響の検討

上記 (2) 巨核球造血における calpain-calpastatin 系の関与の検討に際して、生体内における巨核球からの血小板産生能を評価するための予備検討として、WT マウスに抗血小板抗体を投与した後、巨核球を採取し培養したところ、PPF が抑制され、胞体突起形成巨核球において platelet bud サイズの増大が確認された。さらに抗血小板抗体投与マウス末梢血中に大型血小板が認められた。一方、免疫性血小板減少症 (ITP) は産生された抗血小板自己抗体が血小板に結合し、脾臓などにおいて破壊されることにより血小板減少をきたす疾患であるが、抗血小板抗体による巨核球造血への影響は十分には解明されていない。そこで本研究では、抗血小板抗体投与モデルマウスを用いて巨核球造血への影響を検討した。精製巨核球に抗血小板抗体を添加し、培養したところ、濃度依存性に PPF が抑制された。また、抗血小板抗体存在下で胞体突起を形成した巨核球では、platelet bud サイズは大型化し、その数は有意に低下していた。一方、巨核球 ploidy

や CFU-MK 数に差はみられなかった。次に、抗血小板抗体を連続投与した ITP モデルマウスを作製し、血小板減少期の巨核球を精製し、培養した結果、未処置マウスと比較して PPF が有意に抑制された。また ITP における巨核球からの血小板産生、特に PPF に apoptosis が関与するために血小板数が減少するという報告がある。そこで、ITP モデルマウスを用いて PPF の低下が巨核球の apoptosis に原因があるか否かを検討したが、caspase-3 活性化はみられなかった。以上の結果から、抗血小板抗体は巨核球分化・成熟には影響を与えないが、PPF を阻害したことから、ITP では巨核球への抗血小板抗体の結合による PPF の低下が血小板減少の原因となる可能性が示唆された。本研究成果は、現在論文投稿準備中である。

(4) 血小板機能における DNAM-1 の役割の検討

これまでの研究から、血小板に発現する DNAM-1 は血小板活性化を負に制御する可能性を見出してきた。そこで、血小板活性化における DNAM-1 の役割をより詳細に検討するために *dnam-1* KO マウスより血小板を採取し、検討を行った。血小板を A23187 で刺激した後、flow cytometry で MP 放出能を測定したところ、KO 血小板で増加していた。また、collagen, thrombin など血小板を刺激し、血小板凝集能を測定したところ、WT と比較して KO で血小板凝集が増強していた。しかしながら、CD62P の発現は WT と差がみられなかった。以上の結果から、DNAM-1 は血小板機能を負に制御する可能性が示唆されたが、CD62P の発現が低下した原因が明らかでない。そこで、現在も研究を継続し、その原因の解明及び他の血小板活性化マーカーについて検討中である。

(5) 人工髄液による血小板活性化増強効果

本研究の最終的な目標は、血栓症の新たな予防及び治療法の確立を目指すことにあった。そこで、血小板機能を制御する可能性のある分子の探索を行ったところ、近年脳外科手術において洗浄液として用いられる人工髄液を使用する際、生理食塩水を使用した際と比較して止血が速やかに行われることが報告されている。そこで、人工髄液または生理食塩水存在下で collagen, ADP, thrombin など血小板を刺激し、凝集能を測定した結果、人工髄液の添加により血小板凝集能が増強された。また、flow cytometry にて活性化 GPIIb/IIIa, CD62P, PS exposure を測定したところ、いずれにおいても人工髄液添加で増強した。しかしながら、人工髄液は PT や APTT など凝固能には影響を与えなかった。次に、血小板機能を制御する分子、特に血小板活性化を増強する分子が人工髄液中に存在する可能性が考えられたので、人工髄液を構成する各成分除去した溶液を調整し検討した結果、sodium bicarbonate 除去の場合のみ血小板凝集の増強が認められず、また

HCO₃/Cl⁻ exchanger 阻害剤、DIDS 添加により増強した血小板凝集が抑制された。そこで、この活性化の増強のメカニズムを明らかにするために western blotting を行ったところ、Src-PLCgII 活性化が関与することが明らかとなった。またマウスによる出血時間は人工髄液群で有意な短縮を認めた。以上のことから、人工髄液、特に sodium bicarbonate は凝固に影響することなしに血小板の Src 活性化を増強させることにより血小板活性化を促進させることが明らかとなった。このことは人工髄液灌流法での止血効果のメカニズムを明らかにしたのみならず、頭蓋内手術全般での出血コントロールに sodium bicarbonate が重要であることを示唆する所見である。

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)

上妻 行則, 血小板寿命とクリアランス、血液フロンティア、27 巻、71-77 頁、2017 年、査読無

Yukinori Kozuma, Tetsuya Yamamoto, Eiichi Ishikawa, Fumiyo Yoshida, Hiroyoshi Akutsu, Masahide Matsuda, Kei Nakai, Wataro Tsuruta, Shingo Takano, Akira Matsumura, Haruhiko Ninomiya. Sodium bicarbonate facilitates hemostasis in the presence of cerebrospinal fluid through amplification of platelet aggregation. Neurosurgery、78 巻、274-284 頁、2016 年、査読有、DOI: 10.1227/NEU.0000000000001058

[学会発表](計 5 件)

上妻 行則、山本 哲哉、阿久津 博義、石川 栄一、松田 真秀、吉田 文代、高野 晋吾、松村 明、二宮 治彦。神経内視鏡手術で用いられる人工髄液による止血メカニズム-Sodium bicarbonate の有用性を探る-、第 38 回日本血栓止血学会学術集会、2016 年 6 月 17 日、奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)

上妻 行則、山本 哲哉、阿久津 博義、石川 栄一、松田 真秀、吉田 文代、高野 晋吾、松村 明、二宮 治彦。シンポジウム 7 「脳室内腫瘍」人工髄液灌流による止血メカニズム-Sodium bicarbonate による血小板凝集の増強-、第 22 回日本神経内視鏡学会、2015 年 11 月 6 日、ホテル松島大観荘(宮城県・宮城郡)

Yukinori Kozuma, Hiroshi Kojima, Haruhiko Ninomiya. Anti-GPIIb antibody inhibits platelet production from megakaryocytes, but not megakaryocyte maturation, analyzed in a murine model of immune thrombocytopenia. XXXV Congress

of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2015年6月20日～2015年6月25日、Toronto (Canada)

上妻 行則、山本 哲哉、石川 栄一、吉田 文代、阿久津 博義、松田 真秀、中井 啓、鶴田 和太郎、高野 晋吾、松村 明、二宮 治彦。顕微鏡下脳神経外科手術で用いられる人工髄液は血小板活性化を増幅させ、止血促進に寄与する。第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月23日、甲府市総合市民会館（山梨県・甲府市）
生田 理紗、上妻 行則、田代 ゆう子、高野 二郎、西道 隆臣、小島 寛、二宮 治彦。血小板活性化制御におけるcalpastatin の役割、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月31日、大阪国際交流センター（大阪府・大阪市）

()
研究者番号：
(3)連携研究者 ()
研究者番号：
(4)研究協力者 ()

〔図書〕(計 1 件)

編著：一瀬 白帝、丸山 征郎、内山 真一郎、分担：上妻 行則、小島 寛、株式会社金芳堂、新・血栓止血血管学 血管と血小板、Scramblase と Scott 症候群、2015年、180-186頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：重炭酸イオンまたは重炭酸塩を含有する血小板機能の維持及び/又は増強剤
発明者：上妻 行則、山本 哲哉
権利者：株式会社大塚製薬工場、国立大学法人筑波大学
種類：特許
番号：特願 2016-78983
出願年月日：2016年3月10日
国内外の別：国内

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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

上妻 行則 (Kozuma Yukinori)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：90550145

(2)研究分担者