

Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo

著者	林 忠毅
発行年	2008-03-17
URL	http://hdl.handle.net/10271/89

doi: 10.1007/s00424-008-0466-9

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 515号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏名	林 忠 毅		
論文題目	Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo (生体内での血栓形成過程における血小板凝集と血栓原性発現のリアルタイム解析)		

博士(医学) 林 忠 毅

論文題目

Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo
(生体内での血栓形成過程における血小板凝集と血栓原性発現のリアルタイム解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血小板凝集ならびに血栓形成の個々の過程は、*in vitro*の系で詳細に検討されている。しかし実際の血栓形成においては、血流や正常血管内皮細胞を含む様々な生理的因子により個々の過程が影響される事実が明らかになっている。本研究では生きた動物個体の血管を傷害し、その傷害血管内皮上での血小板血栓ならびにフィブリン血栓形成過程を解析することを試みた。その際、標識操作等に伴う血小板の傷害を避け生理的な条件下での血栓形成機構の詳細を知るため、緑色蛍光色素蛋白(GFP)発現マウスを用い、傷害部位へのGFP発現血小板の粘着・凝集反応、血小板細胞外膜へのphosphatidylserine (PS)の露出、ならびにフィブリン形成について共焦点レーザー顕微鏡を用いてリアルタイムに観察し解析した。

[材料ならびに方法]

1. *in vitro*の検討

(1)野生型マウス、GFP発現マウスの洗浄血小板にカルシウム感受性色素であるFluo-4を導入後、フィブリノーゲン被覆したガラス底皿へ粘着させ各種アゴニスト刺激時の細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)変化を測定した。同時にPS発現を蛍光標識Annexin A5(標識ANX)の特異結合により測定した。

2. *in vivo*の検討

(1)GFPマウス腸間膜静脈内皮にレーザーを照射し血管内皮細胞を限局性に傷害した後、同部へのGFP血小板の粘着および凝集をニポウ式共焦点レーザー顕微鏡で観察した。PSは標識ANX、フィブリンは蛍光標識特異抗体を経静脈投与して同定した。

(2)生体内での抗血栓剤の効果を評価するためにGFPマウスにアスピリン、血小板の非特異的チロシンキナーゼ阻害剤であるU73343を経静脈投与し同様の実験を行った。

[結果]

1. *in vitro*の検討

(1)血小板 $[Ca^{2+}]_i$ は粘着後短い周期でカルシウムオシレーションを繰り返した。薬理的に $[Ca^{2+}]_i$ を上げるカルシウムイオノファーによる刺激後、血小板 $[Ca^{2+}]_i$ は持続的に上昇し、その後血小板膜ではPSの発現を示す標識ANXの集積がみられた。その際血小板内のGFP蛍光強度は減弱し、膜透過性の亢進が示唆された。PSは早期に血小板 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる刺激を加えた時により多く、より短い潜時で発現した。PSを発現した血小板は膨化し球形になっていた。

2. *in vivo*の検討

(1)生体内での血栓形成過程における個々の血小板の粘着、凝集、PSの発現を蛍光強度の変化として観察できた。凝集塊の増大に伴いGFPの蛍光強度は一時増大したが凝集塊中央部ではその後著しく減弱した。標識ANXは凝集塊の周辺及び表層の血小板には結合せず中央部の血小板にのみ集積しその蛍光強度

は増大した。標識抗フィブリン抗体も凝集塊中央部に集積した。血栓の中央付近に存在するPSを発現した血小板は膨化し球形を呈していたが、PSを発現しない血栓辺縁の血小板は、GFPの蛍光を保ち円盤状を呈していた。

(2)生体内での血栓形成過程において、アスピリン前投与群ではコントロール群と比較して凝集塊の増大傾向は認めず、PSの発現もコントロール群の約40%に抑制されていた。U73343前投与群ではアスピリン前投与群とは異なり凝集塊はコントロール群と同様に一時増大したもののその後急激に縮小し、PSの発現は約25%に抑制されていた。

[考察]

GFPマウスの使用により生体内で正常血小板の粘着、凝集反応を時空間的に解析できた。*in vitro*、*in vivo*の系で同様な形態学的変化が観察され、*in vitro*の系で示された血小板 $[Ca^{2+}]_i$ の変化に依存した血小板の活性化とPS発現が生体内での血栓形成過程でも起きていることが推測された。血小板膜表面へのPS発現に凝集塊中で局在が認められフィブリンの局在と一致したことから凝固機転におけるPSの重要性が確認できた。また血小板活性化ならびに血栓原性(procoagulant activity)の発現は、凝集塊中の部位により異なる機構で制御されている事が示唆された。異なる抗血栓剤の前投与で血小板凝集およびPSの発現に異なるパターンが観察された。

[結論]

血流存在下の血栓形成過程における血小板の活性化は*in vitro*の系と同様に血小板 $[Ca^{2+}]_i$ の変化によってコントロールされており、凝集塊中の部位により異なる機構で制御されていることが明らかになった。GFPマウスと標識ANXを用いた本実験系は血栓形成過程における血小板凝集、血栓原性の発現、さらに血小板内外のカルシウムシグナルの同時評価を可能とし、各過程における薬剤の効果や病態生理学的反応を観察する手法の一つになり得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

*in vitro*における血栓形成においては、血流や血管内皮細胞を含む様々な生理的因子が複雑に関与しているが、それぞれの因子の役割を時間的、空間的に観察することは難しい。そこで、申請者は共焦点レーザー顕微鏡を用いて、血栓形成の過程をリアルタイムに観察できるシステムを立ち上げ、それを用いてそれぞれの因子の係わりを解析した。

以下に方法を示す。

1. *in vitro*の検討

1) 野生型マウス、緑色蛍光色素蛋白(GFP)発現マウスの洗浄血小板にカルシウム感受性色素であるFluo-4を導入後、フィブリノーゲン被覆したガラス底皿へ粘着させ、各種アゴニスト刺激時の細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)変化を測定した。同時にphosphatidylserine(PS)発現を蛍光標識Annexin A5(標識ANX)の特異結合により測定した。

2. *in vivo*の検討

1) GFPマウス腸間膜静脈にレーザーを照射し血管内皮細胞を限局性に傷害した後、同部へのGFP血小板の粘着および凝集をニポウ式共焦点レーザー顕微鏡で観察した。PSは標識ANX、フィブリンは蛍光標識

特異抗体を経静脈投与して同定した。

2) 生体内での抗血栓薬の効果を評価するためにGFPマウスにアスピリン、血小板の非特異的チロシンキナーゼ阻害剤であるU73343を経静脈投与し同様の実験を行った。

得られた結果を以下に示す。

1. *in vitro*の検討

血小板 $[Ca^{2+}]_i$ は粘着後短い周期でカルシウムオシレーションを繰り返した。カルシウムイオノファーにより血小板 $[Ca^{2+}]_i$ を持続的に上昇させると血小板膜ではPSの発現を示す標識ANXの集積がみられた。

2. *in vivo*の検討

1) 血栓形成過程における血小板の粘着、凝集、PSの発現を蛍光強度の変化として観察できた。凝集塊の増大に伴いGFPの蛍光強度は一時増大したが凝集塊中央部ではその後著しく減弱した。標識ANXは凝集塊の周辺及び表層の血小板には結合せず中央部の血小板にのみ集積した。標識抗フィブリン抗体も凝集塊中央部に集積した。

2) アスピリン前投与群ではコントロール群と比較して凝集塊の増大傾向は認められず、PSの発現もコントロール群の約40%に抑制されていた。U73343前投与群ではアスピリン前投与群とは異なり凝集塊はコントロール群と同様に一時増大したもののその後急激に縮小し、PSの発現は約25%に抑制された。

以上の結果から、申請者は*in vivo*血栓形成過程における血小板の活性化は血小板 $[Ca^{2+}]_i$ の変化によってコントロールされており、また凝集塊の部位により異なる機構で制御されていることを明らかにした。

審査委員会は、*in vivo*における血栓形成過程を空間的、時間的に解析できる実験系を確立したこととそれを用いて血栓形成の過程を詳細に検討したことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 血小板のカルシウムオシレーションはどのような状態を示すか
- 2) 細胞外カルシウム濃度とPSの発現について
- 3) 血小板の静止状態について
- 4) カルシウムイオノファー刺激に対するPS発現について
- 5) Prothrombinase活性の評価について
- 6) PSの発現に血小板 $[Ca^{2+}]_i$ のピークあるいは持続時間どちらがより重要か
- 7) PSが血栓内部に向かって広がる病態生理学的な意味について
- 8) PSはprocoagulant factorと考えられるか
- 9) PS発現とフィブリン凝集との関連について
- 10) ANXの凝固系への影響について
- 11) アスピリンはU73343よりPS発現を抑えていない理由について
- 12) アスピリンおよびU73343の血小板 $[Ca^{2+}]_i$ への影響について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梅村和夫
副査 渡邊裕司 副査 杉村基