

総説 抗血栓薬の現状と新薬開発

血小板凝集とレムナント様リポタンパク

梅村 和夫¹⁾, Abby R. Saniabadi²⁾

要約：高脂血症は虚血性冠動脈疾患の危険因子である。近年、脂質成分中のレムナントリポタンパクの重要性がわれている。そこで今回はレムナント様リポタンパクが血小板凝集にどのような影響を与えるか検討した。レムナント様リポタンパクは血小板豊富な血漿中では血小板を凝集させなかったが、他の血球成分が含まれる全血中では凝集させた。走査型電子顕微鏡で、赤血球膜上で血小板の凝集がみられ、血小板・赤血球の相互関与の重要性が確認された。また、この凝集にはADPが関与していた。レムナント様リポタンパクによる血小板凝集の機構は直接血小板を刺激しておこなうのではなく、血小板と赤血球との相互関与を介することが予測され、新しい凝集経路を見出したことは興味深い。さらに、レムナント様リポタンパクの表面にはapoEがあり、レムナント様リポタンパクの細胞内取り込みのリガンドとしての役割を持っている。apoEにはE2, E3, E4の3つのアイソザイムがある。その中でapoE4は動脈硬化やアルツハイマー病に関与しているという報告がある。健常者はapoE3が多く含まれている。我々は、apoE4/3が豊富なレムナント様リポタンパクの血中濃度の高い患者から血液を採取し、apoE4/3が豊富なレムナント様リポタンパクの血小板凝集における影響を検討した。apoE4/3が豊富なレムナント様リポタンパクはapoE3/3が豊富なものより血小板を強く凝集させた。apoE3/3が豊富なレムナント様リポタンパクによる血小板凝集はベルシェイプで用量を高くすると凝集が弱くなってしまうが、apoE4/3が豊富なものでは用量に依存して凝集が強くな

り、さらに凝集の程度も強い。このことからapoEのアイソザイムの違いはレムナント様リポタンパクによる血小板凝集に大きく影響していることが示唆された。

1. はじめに

虚血性心疾患に代表される粥状動脈硬化疾患の基礎病態は血管壁に存在するプラークである。このプラークが破裂や亀裂を生じることで血栓が形成され、急性冠動脈疾患を引き起こす。最終的には血栓形成が重要なイベントとなる。この血栓が引き起こされる機構としてプラークの破綻や亀裂が重要であるが、血管内皮機能障害、血小板の活性化、凝固系の亢進が大きく関与している。血清脂質と血栓形成の関係については多くの研究が報告されている。家族性高コレステロール血症患者において血小板機能の亢進が認められたり(1,2)、無症候性的高脂血症患者では血小板のターンオーバーが短くなっているという報告がある(3)。さらに、レムナント様リポタンパクがコラーゲンやADPによって惹起された血小板凝集を増強するといった報告がある(4)。近年、レムナント様リポタンパクは冠動脈疾患の危険因子として注目されている(5~7)。そこで我々はレムナント様リポタンパクの血小板凝集における影響を検討した(8,9)。

さらに、apoEタンパクはレムナント様リポタンパクの表面に存在し、レムナント様リポタンパクの細胞内への取り込みに関与している。apoEはE2, E3, E4の3つのアイソザイムを持っており、健常者の多くはapoE3/3である。apoE4は動脈硬化やアルツハイマー病に関与しているといわれている(10)。そこでapoE4/3が豊富なレムナント様リポタンパクの血小板凝集における影響をapoE3/3と比べて検討した(11)。

2. 実験方法

(1) レムナント様リポタンパクの生成法

男性健常被験者にいつもより多量の朝食を食べてもらい、5時間後にヘパリン加シリンジにて採血した。採血後速や

キーワード：レムナント様リポタンパク、血小板凝集、赤血球と血小板の相互関与、ADP、apoE アイソザイム

¹⁾ 浜松医科大学薬理学教室
(〒431-3192 浜松市半田町 3600)

²⁾ 日本抗体研究所
(〒370-0021 高崎市西横手町 351-1)

e-mail: umemura@hama-med.ac.jp

原稿受領日：2000年7月10日、編集委員会依頼総説

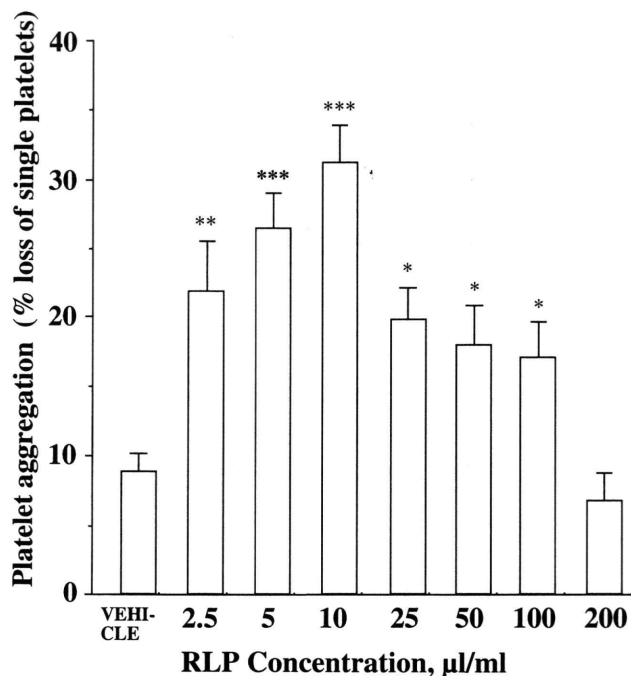


Fig. 1 A concentration response relationship for remnant-like lipoprotein particles (RLP) of CM/VLDL induced platelet aggregation in human whole blood measured as the fall in single platelet count. A 10 µl RLP preparation contained 7.2 ± 1.2 µg protein (mainly apoprotein), 3.2 ± 0.8 µg total cholesterol and 123.5 ± 62 µg total triglycerides. As shown, platelet aggregation in response to the RLP concentration increased from 2.5 µl up to 10 µl/ml blood and then decreased with increasing the concentration of RLP; at 200 µl/ml, the fall in single platelet count was less than the level of spontaneous platelet aggregation observed in aliquots treated with the vehicle. Data represent the mean \pm S.D., derived from 22 observations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; versus vehicle.

かに 3000 回転 4℃ で 30 分遠心し血漿を採取した。レムナント様リポタンパクの精製は、既に報告されている方法に従って行った(12~14)。簡単に述べると、2 種類のモノクローナル抗体 (抗アポ B-100 (JI-H) 抗体および抗アポ A-I (H-12) 抗体) をそれぞれ固定化したセファロース 4B 混合ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーで行った。このカラムに結合しない分画がレムナント様リポタンパクである。この分画はアポ B-48, およびアポ B-100 を含んでいるが、アポ B-48 を含むカイロミクロンレムナントはアポ A-I を欠く為、アポ B-100 を含む VLDL (超低比重リポタンパク) レムナントは JI-H 抗体の抗原認識

部位がアポ E により阻害される為にカラムに結合せず、レムナント様リポタンパクとして分離される。主にカイロミクロンレムナントと VLDL レムナントの混合物を総じて、レムナント様リポタンパクと呼ぶ。

ApoE4/3 が豊富なレムナント様リポタンパクの生成は以下の患者から採取した。47 歳男性、心疾患やその他の基礎疾患の既往はなかった。突然の死亡により法医学的な検死が行われた。死因は心筋梗塞と断定された。親族の同意のもと、この患者の心臓から血液を採取し、レムナント様リポタンパクを上記の方法で生成した。

(2) 全血における血小板凝集能測定

健常被験者から採血した。被験者は以下の項目を満たしている者に参加してもらった。アスピリンや他の血小板機能に影響を与える薬剤を 14 日以内に服用していない。アルコールを 48 時間以内に飲んでいない。前日の夕食を軽く、採血の当日の朝食は取らない。

採血に用いたシリンジは 3.2% クエン酸 (最終濃度 10 mM) を含み、採血後速やかにシリンジ内を優しく攪拌し、37℃ の保温器に入れた。

血小板凝集能を検討するために、1 ml の血液をプラスチックチューブへ移し、レムナント様リポタンパクを添加し優しく攪拌し 40 秒後に 1% ホルマリンと 0.1% グルタルアルデヒドを含んだ溶液を添加し、凝集反応を停止させた。レムナント様リポタンパクを添加することによって血小板が凝集塊を形成するが、そのために血小板が塊を形成せず 1 つずつの状態で存在する数が減少する。そこでこの 1 つずつの血小板の数を測定することで凝集能を検討した。何も添加しないものを対照群とした。

レムナント様リポタンパクの血小板凝集作用の機序を検討するためにシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるアスピリン、ホスホジエステラーゼ III 阻害薬であるシロスタゾール、ADP スカベンジャーであるアピラーゼ、ADP 拮抗薬である 2-クロロアデノシンを添加して凝集能に与える影響について検討した。

(3) 走査電子顕微鏡による検討

凝集反応後に血球成分を 50 ml の 2% グルタルアルデヒド (氷冷) へ入れよく攪拌し 1 時間放置し、その後リン酸バッファーで 10 倍に希釈した。その後、遠心しアルデヒドを取り除き、血球成分を 1% オスミウムに入れた。その後、血球成分を脱水、凍結乾燥して走査型電子顕微鏡で観察した。

3. 結果

(1) レムナントリポタンパクの成分

健常者のレムナント様リポタンパクの成分は総中性脂肪が 12.35 ± 6.2 mg/ml、総コレステロールが 0.32 ± 0.08 mg

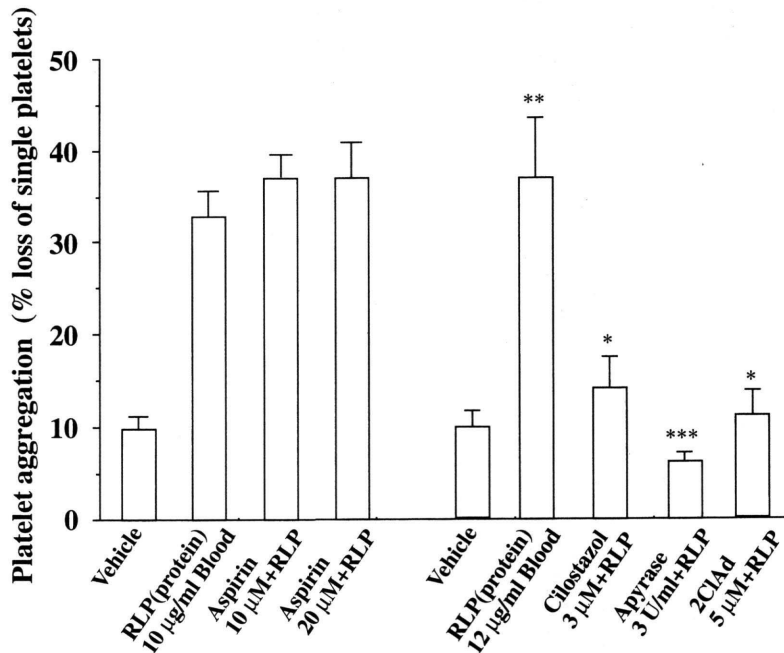


Fig. 2 Effects of aspirin, cilostazol (a phosphodiesterase type III inhibitor), apyrase (a ADP scavenger) and 2-chloroadenosine (2ClAd, a platelet ADP-receptor antagonist) on RLP induced platelet aggregation in human whole blood measured as the fall in single platelet count. As shown, aspirin was completely ineffective against the RLP-induced platelet aggregation. In contrast, cilostazol, apyrase and 2ClAd inhibited the aggregation. Data represent the mean \pm S.D. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 versus RLP alone.

/ml, タンパク (主にアポタンパク) が 0.72 ± 0.12 mg/ml であった。カイロミクロンは 4.2 ± 0.6 mg/ml, VLDL は 0.8 ± 0.2 mg/ml, レムナント様リボタンパクは 1.6 ± 0.2 mg/ml であった。

一方, apoE4/3 が豊富なレムナント様リボタンパクの成分は, アポタンパクが 13.9 mg/dl であった。296 µg protein のものではコレステロールは 308 µg で中性脂肪は 548 µg であった。

(2) 血小板凝集能測定

今回使用した血小板凝集能測定法が妥当かを検討するために, ADP を添加して凝集能を測定した。凝集は ADP の濃度に依存して惹起された。0.48 µM という少量でほぼ 100% の凝集が惹起され, かつ凝集のばらつきが少ないことから感度が高く再現性のよい方法と思われる。

(3) レムナント様リボタンパクによる血小板凝集

LDL, カイロミクロン, VLDL は凝集にはあまり影響を与えなかった。レムナント様リボタンパクは血小板の凝集を惹起させた (図 1)。レムナント様リボタンパクを 1 ml の全血へ 2.5~10 µl を添加したときは凝集を用量依存的に亢進させた。しかし, 10~100 µl を添加したときは

凝集は惹起させたものの 10 µl 添加時と比べ凝集は弱かった。200 µl 添加では凝集は惹起させなかった。レムナント様リボタンパク 10 µl に含まれるタンパク (主にリボタンパク) が 7.2 ± 1.2 mg/ml, 総中性脂肪が 123.5 ± 62.2 mg/ml, 総コレステロールが 3.2 ± 0.8 mg/ml であった。

(4) レムナント様リボタンパクによる血小板凝集に対するアスピリン, シロスタゾール, アピラーゼ, 2-クロロアデノシンの影響

結果を図 2 に示す。アスピリンを 10 µg/ml および 20 µg/ml (111 µM) 添加してもレムナント様リボタンパクによる血小板凝集において影響を与えなかった。シロスタゾール (0.4, 0.8, 1.6 µg/ml) を添加すると用量依存的にレムナント様リボタンパクによる凝集を抑制した。さらに, アピラーゼ (3U/ml) および 2-クロロアデノシン (5 µM) の添加でもレムナント様リボタンパクによる凝集を抑制した。

(5) 血小板凝集に対する赤血球の関与

—走査型電子顕微鏡による検討—

我々はレムナント様リボタンパクは血小板豊富な血漿においては血小板を凝集させないことを見出しており, 今回

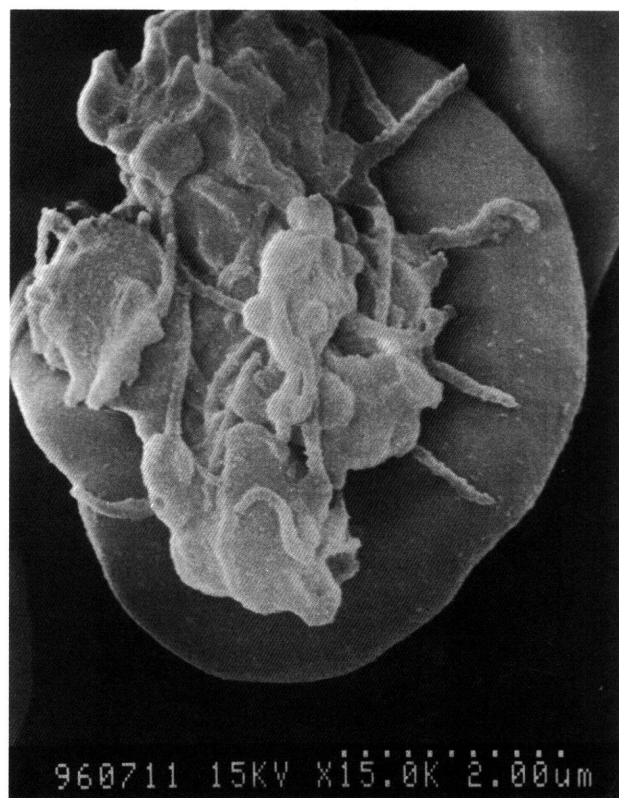


Fig. 3 Scanning electron micrographs showing typical examples of platelet adhesion to the red blood cell and aggregation formation on the red blood cell membrane treated with RLP.

の結果と併せて考えるとレムナント様リポタンパクによる血小板凝集は白血球あるいは赤血球が関与している可能性がある。そこで、血小板凝集の状態を走査型電子顕微鏡で観察した。驚くことに、赤血球膜上で血小板が凝集している像が多くみられた (図3)。また、ADP添加によって血小板凝集を惹起したときにはこのような赤血球と血小板との関係はみられなかった。

(6) ApoE4/3 が豊富なレムナント様リポタンパクによる血小板凝集における影響

レムナント様リポタンパクの濃度を上げていくと血小板凝集は用量依存的に強くなった (図4)。図1に示した 50 μ l/ml は図4の 74 g とほぼ同程度の濃度と思われるので、2つの図を見ても明らかな様に凝集反応のパターンが異なる。健常者のレムナント様リポタンパクによる血小板凝集と異なり apoE4/3 が豊富なものでは高濃度においても凝集は強く惹起された。この凝集反応はアスピリンでは抑制できず、ADP による凝集抑制剤や ADP スカベンジャーによ

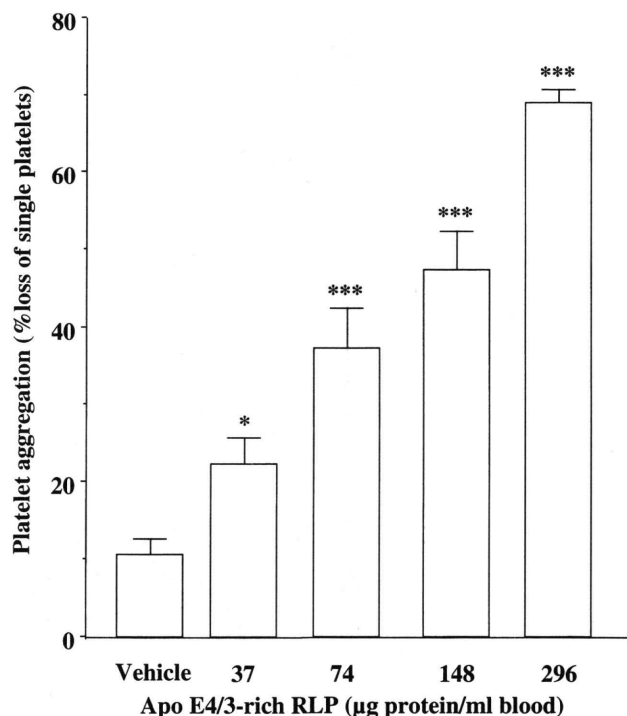


Fig. 4 Platelet aggregation induced by apo E4/3-rich RLP prepared from plasma of a sudden death case. * $P=0.002$, *** $P<0.0001$ versus vehicle.

り強力に抑制された。

4. 考察

今回の研究でレムナント様リポタンパクは血小板凝集を惹起させた。これは血小板豊富な血漿ではみられなく、他の血球成分を含んだ全血においてのみ観察された。また、走査型電子顕微鏡による観察から血小板は赤血球膜上で凝集をしている像がみられ、今回のレムナント様リポタンパクによる血小板凝集作用は血小板と赤血球の相互作用の関与が考えられた。その機構として以下のことが考えられる。まず、レムナント様リポタンパクが赤血球膜上に結合しそれを足がかりとして血小板がそこに接着し、それを核としてさらに血小板が凝集をおこす。次に、レムナント様リポタンパクが血小板と結合し血小板を活性化し赤血球との接着を促す。そしてさらなる凝集が起こる。しかし、今回の研究ではこの機構に関しては解明できなかった。それには、放射ラベルされたレムナント様リポタンパクを用いどちらに結合するか確認する必要がある。

また、赤血球膜上には細胞内から血小板を凝集させうる ADP が存在することが報告されている (15)。今回の研究

では、ADP スカベンジャーであるアピラーゼや ADP 拮抗薬である 2-クロロアデノシンを添加することによりレムナント様リポタンパクによる血小板凝集を抑制できた。このことより、レムナント様リポタンパクによる血小板凝集に ADP が関与していることが考えられ、そのソースとして血小板・赤血球の相互関与を考えると赤血球膜上にある ADP が最も疑われる。

このレムナント様リポタンパクによる血小板凝集は臨床における動脈硬化性疾患で重要な役割をしていることが考えられる。例えば、冠動脈疾患でプラークが破裂したときそこに血栓が形成され急性心筋梗塞を引き起こす。この血栓形成に、血清中のあるいはプラーク中のレムナントリポタンパクが血栓形成を助長することが多いと考えられる。

この場合に薬物治療薬として今回の研究ではレムナント様リポタンパクによる血小板凝集はシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるアスピリンでは抑制できず、ホスホジエステラーゼ III 阻害薬であるシロスタゾールは抑制した。レムナント様リポタンパクによる血小板凝集の機構が現在のところ明確でないので薬物の抑制効果の作用点を考察することは難しいが、ADP の関与が強く疑われることもありシクロオキシゲナーゼ抑制よりも ADP 凝集を抑制するようなチクロピジンや cAMP を増加させるプロスタグランジン類やホスホジエステラーゼ阻害薬が有効であることが予測される。今後の検討が待たれる。

今回、apoE の変異系である apoE4/3 を豊富にもったレムナント様リポタンパクの血小板凝集への影響を観察してみると apoE3/3 のものと比べ凝集を強く惹起するだけでなく用量を上げていくと凝集がさらに強くなっていく。ApoE はレムナント様リポタンパクの表面に存在し細胞膜上の受容体と結合し細胞内への脂質の輸送に大きく関与している。また、変異の割合は apoE3/3 を持ったヒトは約 60% で apoE4/3 は約 20% である。ApoE4/3 は受容体への結合は apoE3/3 と同程度であるが血清コレステロールは高値である。この変異がどうして血小板凝集へ反応が異なったかは分からないが、アルツハイマー病の発症や動脈硬化の促進と関与していることから血小板にも何らかの異なった刺激を与えていることが考えられる。また、頻度も 20% と多く高レムナント血漿だけでなく apoE の発現形の違いも十分視野に入れた検討が重要となってくる。

5. 最後に

レムナント様リポタンパクが患者で測定可能になり病態での意義が解明されてこよう。今回の研究で興味深いことはレムナント様リポタンパクによる血小板凝集は直接血小板に働きかけ凝集させるのと異なり、血小板と赤血球との相互関与が重要な役割をしていることである。さらに、表

面にある apoE の変異によって血小板凝集に対する反応が異なることは病態の遺伝的な背景の重要性を示すものである。今後この凝集の機構が解明されていくことにより新しい病態の解析や治療薬開発に結びつくことを期待する。

文 献

- 1) Carvalho AC, Colman RW and Lees RS: Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med* **290**, 434-438 (1974)
- 2) Editorial: Lipids, platelets and atherosclerosis. *Lancet* **1**, 464-465 (1980)
- 3) Corash L, Schaefer E, Poindexter E and Anderson J: Platelet function and survival in familial hypercholesterolaemia. *Circulation* **54**, II-117 (1976)
- 4) Knofler R, Nakano T, Nakajima K, Takada Y and Takada A: Remnant like lipoproteins stimulate whole blood platelet aggregation in vitro. *Thromb Res* **78**, 161-171 (1995)
- 5) Weintraub MS, Eisenberg S and Breslow JL: Different patterns of postprandial lipoprotein metabolism in normal, type IIa, type III, and type IV hyperlipoproteinemic individuals. Effects of treatment with cholestyramine and gemfibrozil. *J Clin Invest* **79**, 1110-1119 (1987)
- 6) Simons LA, Dwyer T, Simons J, Bernstein L, Mock P, Poonia NS, Balasubramaniam S, Baron D, Branson J, Morgan J, et al: Chylomicrons and chylomicron remnants in coronary artery disease: a case-control study. *Atherosclerosis* **65**, 181-189 (1987)
- 7) Groot PH, van Stiphout WA, Krauss XH, Jansen H, van Tol A, van Ramshorst E, Chin-On S, Hofman A, Cresswell SR and Havekes L: Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **11**, 653-662 (1991)
- 8) Saniabadi AR, Umemura K, Shimoyama M, Adachi M, Nakano M and Nakashima M: Aggregation of human blood platelets by remnant lipoprotein particles of plasma chylomicrons and very low density lipoprotein. *Thromb Haemost* **77**, 996-1001 (1997)
- 9) Saniabadi AR, Umemura K, Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, Adachi M and Nakashima M: Adenosine 5'-diphosphate as a factor in platelet aggregation induced by human plasma remnant lipoproteins. *Life Sci* **63**, 1065-1074 (1998)
- 10) Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C and Grobbee DE: Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* **349**, 151-154 (1997)
- 11) Saniabadi AR, Takeichi S, Yukawa N, Nakajima Y, Umemura K and Nakashima M: ApoE4/3-rich remnant lipoproteins and platelet aggregation. *Thromb Haemost* **79**, 878-879 (1998)
- 12) Campos E, Nakajima K, Tanaka A and Havel RJ: Properties of an apolipoprotein E-enriched fraction of triglyceride-rich lipoproteins isolated from human blood plasma with a monoclonal antibody to

- apolipoprotein B-100. *J Lipid Res* **33**, 369-380 (1992)
- 13) Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, Tanaka A, Tada N, Nakamura H, Campos E, et al: Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta* **223**, 53-71 (1993)
- 14) Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, Tanaka A, Tada N, Nakamura H and Murase T: A new approach for the detection of type III hyperlipoproteinemia by RLP-cholesterol assay. *J Atheroscler Thromb Vasc Biol* **1**, 30-36 (1994)
- 15) Saniabadi AR, Lowe GD, Barbenel JC and Forbes CD: A comparison of spontaneous platelet aggregation in whole blood with platelet rich plasma: additional evidence for the role of ADP. *Thromb Haemost* **51**, 115-118 (1984)

Abstract - Aggregation of human blood platelets by remnant-like lipoprotein particles. Kazuo UMEMURA¹⁾ and Abby R. SANIABADI²⁾ (¹⁾Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan, and ²⁾Japan Immunoresearch Laboratories, Takasaki 370-0021, Japan). *Folia Pharmacol. Jpn.* (Nippon Yakurigaku Zasshi) **116**, 269~274 (2000)

The action of lipoprotein lipase on chylomicrons (CM) and very low density lipoproteins (VLDL) produces remnant lipoproteins (RLP) that are rich in triglycerides, cholesterol and apolipoprotein E (apo E). Apo E serves as a ligand for the LDL receptor and mediates uptake of RLP by macrophages, vascular wall and other cells that express the LDL receptor. Uptake of RLP can profoundly alter the physiology of cells and promote atherosclerosis and thrombosis. Like RLP, blood platelets also have roles in atherosclerosis and thrombosis; hence it is likely that RLP can influence platelet activity as well. Platelet aggregation was assessed by measuring the loss of single platelets. Apo E3/3-rich RLP derived from normal human plasma VLDL and CM were prepared by an immunoseparation method. At 2.5 to 10 μ l, RLP induced platelet aggregation that increased with the dose of RLP, but decreased it at 25 to 200 μ l. Unlike apo E3/3-rich RLP, apo E4/3 (heterozygous phenotype) rich RLP caused platelet aggregation in a dose-dependent manner, without producing a bell-shape dose-response relationship. Scanning electron microscopy revealed that activated platelets had adhered to and formed aggregates on the red cell membrane. The platelet response was unaffected by aspirin, but was inhibited by apyrase (an ADP scavenger), 2-chloroadenosine (a platelet ADP-receptor antagonist) and cilostazol, a phosphodiesterase type III inhibitor. It is thought that RLP cause leakage of ADP from red cells, which then mediates platelet aggregation.

Keywords: remnant like lipoprotein particle; platelet aggregation; relationship between blood red cells and platelets; ADP; apoE isoform

著者プロフィール

梅村 和夫 (うめむら かずお)

浜松医科大学薬理学教室, 教授.

本誌 109 巻 4 号 185 頁 (1997) をご参照下さい.

Abby R. Saniabadi

(国籍) 英国, (所属) 日本抗体研究所, (職名) Vice President with Board Member Status, (学位) 博士 (Biomaterials Engineering).

◇1982-'85 University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, UK. Graduated with a PhD degree in Biomaterials Engineering with outstanding achievement in Thrombosis and Haemostasis Research.

◇研究テーマ: Vascular Biology, Atherosclerosis and Thrombosis, Inflammation, Free radical.

◇趣味: healthy food, red wine, fruits, mountain climbing, silent films and documentaries.

