

表 題 種々の血小板アゴニストによる細胞内カルシウム動員を簡便に
評価しうる巨核球系細胞株の樹立

論文の区分 博士課程

著 者 名 齊藤洋

担当指導教員氏名 生化学講座病態生化学部門 教授 大森司

指導協力教員氏名 生化学講座病態生化学部門 講師 早川盛禎
生化学講座病態生化学部門 講師 鴨下信彦

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 人間生物学系
専攻分野 生体分子医学
専攻科 細胞生化学

2020年1月10日申請の学位論文

目次

1. 緒言	p.3
2. 方法	
2. 1 Materials	p.11
2. 2 細胞培養	p.11
2. 3 ヒト血小板の作製	p.12
2. 4 ウェスタンブロッティング	p.12
2. 5 細胞内カルシウム濃度測定	p.13
2. 6 細胞株の樹立	p.14
2. 7 GCaMP6s 蛍光の検出	p.14
2. 8 フローサイトメトリー	p.15
2. 9 統計学的分析	p.15
3. 結果	
3. 1 血小板活性化の細胞内シグナル伝達	p.15
3. 2 血球細胞膜表面上の糖タンパクの発現	p.18
3. 3 巨核球系細胞株における細胞内シグナル伝達の比較	p.20
3. 4 GCaMP6s 発現プラスミドの構築と HEK293 細胞における細胞内カルシウム動員の検討	p.24
3. 5 GCaMP6s 発現 CMK 細胞、MEG-01 細胞における細胞内カルシウム動員	p.26
3. 6 GCaMP6s 発現 CMK 細胞株における特異的アンタゴニストによる細胞内カルシウム動員の抑制	p.29
4. 考察	p.32
5. 謝辞	p.39
6. 参考文献	p.40

略語一覽

ADP : adenosine diphosphate
ANOVA : analysis of variance
APC : allophycocyanin
APS : antiphospholipid syndrome
ATP : adenosine triphosphate
b2GPI : beta2-glycoprotein I
cAMP : cyclic adenosine monophosphate
BSA : bovine serum albumin
CMV : cytomegalovirus
COX1 : cyclooxygenase1
CRP : collagen-related peptide
CFP : cyan fluorecent protein
CYP : cytochrome P450
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid
EGFP : enhanced green fluorescent protein
EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid
EF1 α : elongation factor 1alpha
ELISA : enzyme-linked immuno sorbent assay
FITC : fluorescein isothiocyanate
GTPase : guanosine triphosphatase
Flamindo : fluorescent cyclic adenosine monophosphate indicator
Fura 2-AM : fura 2-acetoxymethyl ester
GPIb/IX/V : glycoprotein Ib/IX/V
GPIIb/IIIa : glycoprotein IIb/IIIa
GPVI : glycoprotein VI
HIT : heparin-induced thrombocytopenia
IgG : immunoglobulin G
IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iPS : induced pluripotent stem
IP₃ : inositol trisphosphate
LAT : linker for activation of T cell

mAb : monoclonal antibody
PAGE : poly acrylamide gel electrophoresis
PE : R-phycoerythrin
PF4 : platelet factor 4
PI : phosphatidylinositol
PIP₂ : phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PKC : protein kinase C
PLC : phospholipase C
PVDF : polyvinylidene fluoride
Raichu : Ras and interacting protein chimeric unit
RBD : Ras binding domain
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SDS : sodium dodecyl sulfate
SEM : standard error of the mean
SNP : single nucleotide polymorphism
TBS : Tris-buffered saline
TP : thromboxane receptor
TPO : thrombopoietin
VWF : von Willebrand factor
YFP : yellow fluorescent protein

1. 緒言

血小板は止血反応に関与する無核の血球細胞である。血管損傷が起こると、血小板は損傷部位に粘着し、活性化され、最終的に凝集反応により一次止血栓を形成する。血小板血栓の形成は、1) 粘着反応、2) 活性化・放出反応、3) 凝集、の3段階に分けられる。粘着反応は、フォンウィルブランド因子 (VWF) が内皮細胞下のコラーゲンに接着し、伸長したところに血小板が膜糖蛋白 (GP) Ib/IX/V 複合体を介して接着する。この粘着反応は血小板を損傷局所に留める意味合いがある。その後、損傷局所のコラーゲン、トロンビン等の血小板活性化物質が、血小板膜上の特異的受容体に結合し、血小板活性化を引き起こす細胞内シグナルが伝達される。血小板活性化シグナルとしては、チロシンリン酸化反応を介したホスホリパーゼ C γ の活性化、または7回膜貫通型受容体の活性化によるホスホリパーゼ C β の活性化が中心である。その後、イノシトール 3リン酸 (IP $_3$) の産生による細胞内カルシウム動員、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化、等を介して最終的に GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) が活性化され高親和性受容体となり、リガンドであるフィブリノゲンを介して、血小板どうしが凝集する (図1)。

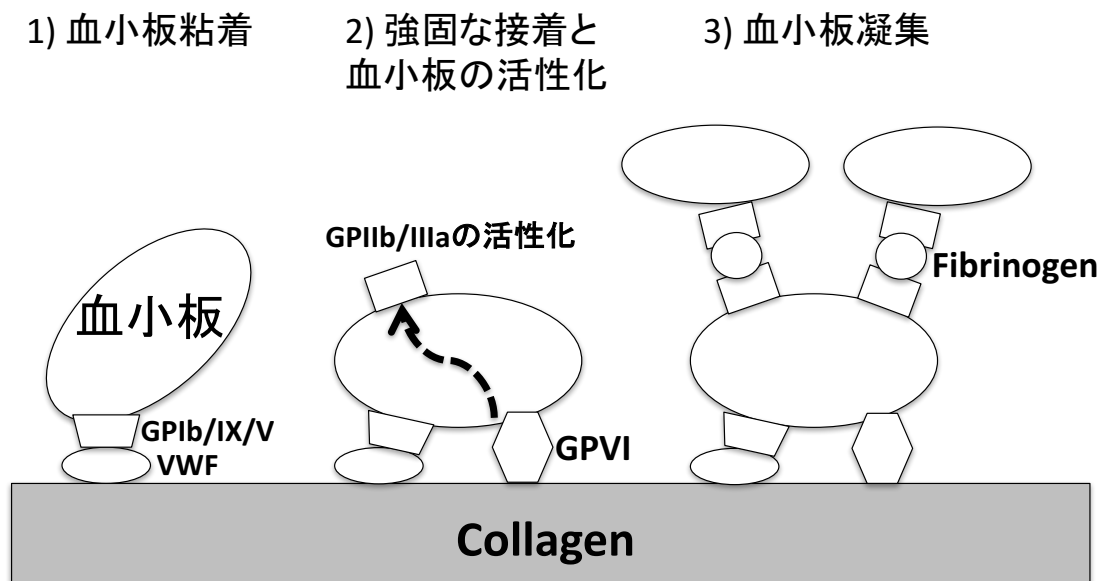


図1 ヒト血小板の活性化機構

1) 内皮細胞下のコラーゲンに結合したフォンヴィルブランド因子 (VWF) がずり応力で進展し、ここに血小板が GPIb/IX/V 複合体を介して粘着する。2) 粘着した血小板はコラーゲン受容体である GPVI とコラーゲンとの会合で、細胞内に活性化シグナルが伝達され、放出反応や GPIIb/IIIa の形態変化を引き起こす。3) 形態変化を起こした GPIIb/IIIa はフィブリノゲンと高親和性となり、血小板どうしが凝集する。

血小板活性化シグナルは、同時に血小板顆粒内容物 (α 顆粒、濃染顆粒) を細胞外に放出し、濃染顆粒に含まれるアデノシン二リン酸 (ADP) やセロトニンなどの血小板活性化物質がオートクライン、パラクライン的に周囲や自身の血小板活性化を増幅する。このような血小板活性化反応が低下すると出血性疾患に結びつく。脳梗塞や心筋梗塞などの血栓性疾患の予防・治療には血小板活性化を抑制する抗血小板薬が使用される。

血小板の活性化は血栓性疾患の発症において重要であるため、生体内の血小板活性化を臨床検査で評価し、血栓性疾患の診断や抗血小板薬の治療効果判定への応用が期待されている。現在、主に行われる血小板機能検査法には *ex vivo* で採血後に分離した血小板の活性化を評価する検査法と、*in vivo* で血小板活性化によって生じる血中の物質を直接測定する方法がある。前者には最も広く用いられる凝集能測定である透過光法 (light transmission assay) の他、血小板停滞率、セロトニンを測定する血小板放出能、全血をもちいた凝集能であるインピーダンス法などがある。

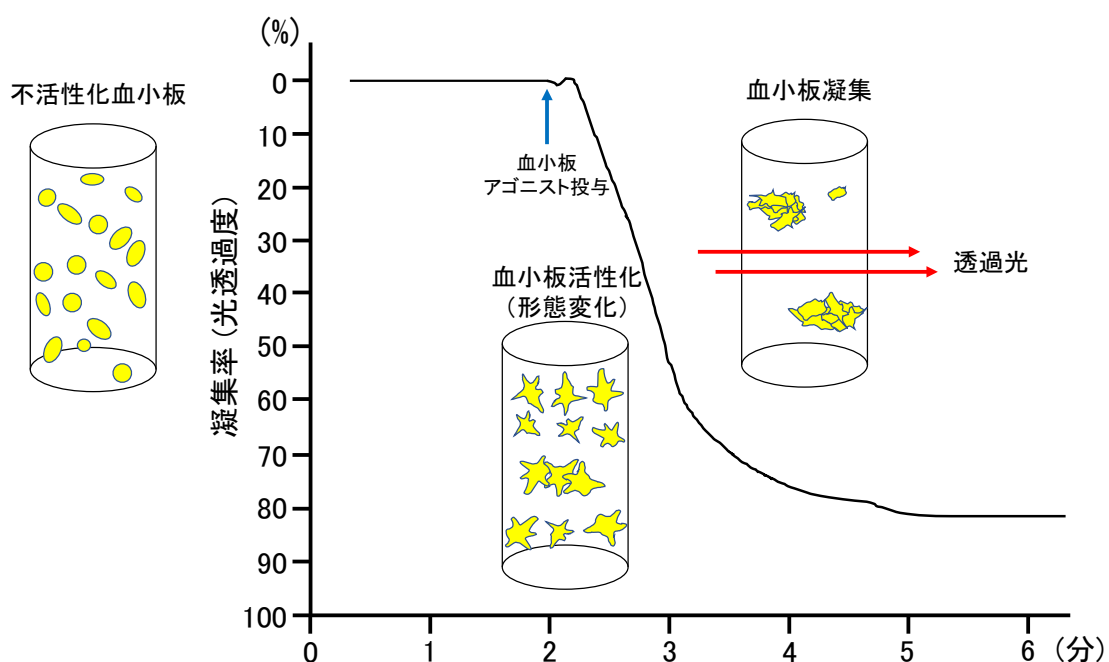


図2 透過度法による血小板凝集能測定

全血から遠心分離にて血小板多血漿を得る。血小板多血漿は血小板が存在するため光を透過しない。血小板多血漿に血小板を活性化させるアゴニストである、コラーゲン、ADPなどを添加すると血小板どうしが凝集し、最終的に血小板多血漿が透明化する。この光の透過性の変化により血小板凝集を評価する。

透過光法は血小板凝集に伴う血小板多血漿の透過性上昇を観察する方法である(Carr 1997) (図 2)。血小板停滞率はコラーゲン塗布ガラスビーズへの粘着率を、通過前後の血小板数から算出する検査法である(Kaneko et al. 2005)。これらの検査はリガンドから受容体のシグナルを介した、GPIIb/IIIa による凝集反応を評価することができる。血小板放出能は血小板活性化時に血小板の濃染顆粒から放出される ATP をルシフェリン・ルシフェラーゼの発光を用いて検出する方法である(Holmsen, Holmsen, and Bernhardsen 1966; Podda, Femia, and Cattaneo 2016)。インピーダンス法では、検体中の 2 本の電極に対する血小板凝集塊付着を電極間の抵抗変化として検出する(Mackie, Jones, and Machin 1984; Kruger et al. 2014)。また、血小板やマイクロパーティクル表面の抗原に対するモノクローナル抗体を用いて血小板活性化を評価する方法も用いられる(Lee et al. 1996)。in vivo で血小板活性化によって生じる物質を直接測定する方法では、血小板第 4 因子 (PF4) やセロトニンなどの血小板活性化物質の血中での存在を検出する(Dovlatova 2015; Ge et al. 2011)。一方、これらの血小板機能検査法は日常診療に浸透しているとはいえない。その理由として、1) 血小板寿命が短いため、採血から測定までの時間が限られること、2) その都度ドナーの採血を要することが挙げられる。さらに、健常ドナーにより血小板反応性が異なることから、検査結果の解釈を標準化できないことも問題となる。加えて、現状の血小板検査法は専用機器や検査者の熟練を要するため、限られた施設でしか施行できないという点も問題である。

血小板機能が障害される、血小板無力症、フォンヴィルブランド病、Bernard-Soulier 症候群などの出血性疾患の診断に血小板機能検査が極めて重

要である。逆に、血栓性疾患の診療に対して、血小板機能検査がもつポテンシャルとしては、1) 血中の血小板活性化物質の証明、2) 抗血小板薬の効果判定、の 2 つが挙げられる。生体内での広範な血小板活性化が病態の本態である疾患として、ヘパリン起因性血小板減少症 (HIT) や抗リン脂質抗体症候群 (APS) がある。HIT は外因性ヘパリンと内因性血小板第 4 因子 (PF4) の複合体に対し産生される抗体が CD32 のクロスリンクを介して、血小板を過剰に刺激することで生じる重篤な血栓症である (Arepally 2017)。血小板活性化により動静脈血栓症と消費性の血小板低下を引き起こす病態である (Gupta et al. 2015)。CD32 を介した血小板活性化シグナルを図 3 に示す。

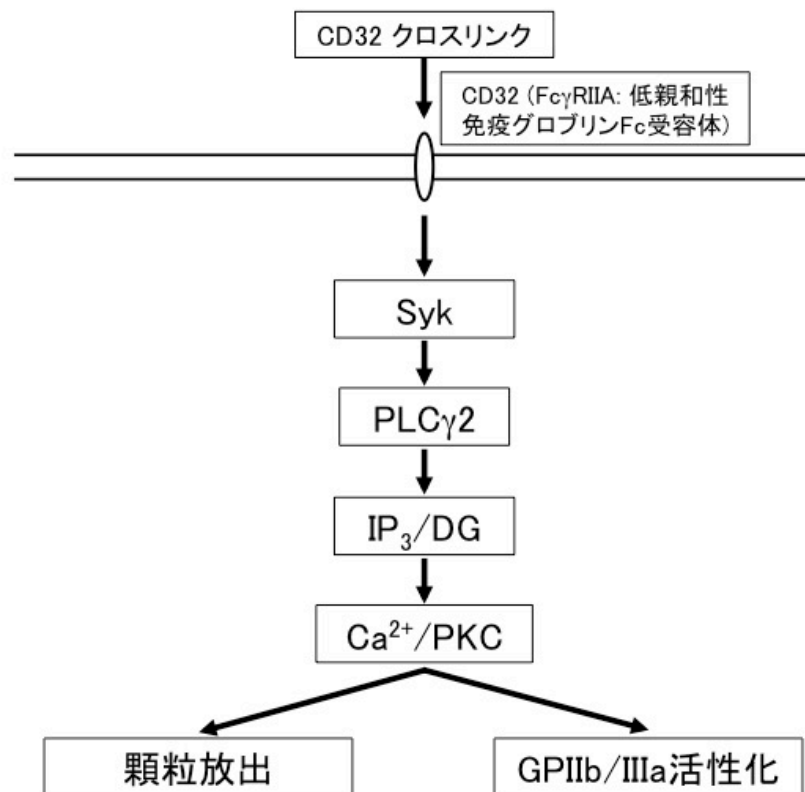


図3 血小板の CD32 クロスリンクを介する受容体シグナル

Syk チロシンキナーゼのリン酸化、PLC γ 2 の活性化を伴い、小胞体からの細胞内カルシウム動員、プロテインキナーゼ C の活性化を経て、血小板顆粒の放出、GPIIb/IIIa 受容体の活性化をもたらす。

現状では、HIT の診断には、血中に存在する HIT 抗体を ELISA 法で検出する検査が一般的である。しかし、HIT の病態をきたすのは IgG 抗体のみであり、IgG 以外の抗体による偽陽性の問題がある (Amiral et al. 1996)。つまり感度は高いが特異度が低い。確定診断には、血小板機能検査法として健常ドナー血小板と患者血清を用いた機能的アッセイが行われ、これはヘパリンと患者血清による血小板活性化を、健常人から得た血小板で凝集反応やセロトニン放出を検出する方法である (Favaloro, McCaughan, and Pasalic 2017)。本検査は、特異度は高いが感度が極めて低い (Warkentin et al. 2015)。特異度、感度共に優れた方法として、フローサイトメトリーをもちいたマイクロパーティクルを検出する手法も報告されているが (Hughes et al. 2000)、ドナー間の反応性の問題や特殊な機器が必要な点が問題である。他に血中の血小板活性化物質が発症に関わる疾患として、APS が挙げられる。APS は抗リン脂質抗体を介し、直接的に、あるいは補体活性化を介して血小板が活性化され、動静脈血栓症や習慣性流産をきたす疾患である。抗リン脂質抗体が、血小板や内皮細胞を活性化させることで血栓症を発症させるが、その本態となる受容体やシグナル伝達は明らかとなっていない (Santos et al. 2017)。また、APS の診断には Sapporo クライテリアが用いられている。これは臨床症状 (血栓症、または習慣性流産) に検査値 (抗カルジオリピン抗体、ループスアンチコアグラント、抗 β 2GPI 抗体のいずれか) 陽性により判断する (Chaturvedi and McCrae 2017)。既存の臨床検査が陽性でも、HIT と同様に、必ずしも APS の発症を意味するものではなく、特異度が低いことが問題である (Sammaritano 2019)。HIT や APS の診断のための機能的アッセイでは、血小板を得るために、その都度健常ドナーから採血

を行う必要があり、個人間の血小板の反応性の差異から検査の標準化が難しいといった問題点がある。特に HIT では迅速な治療が必要であり、一方で誤診に伴う過剰な抗血栓療法も問題となる(Cuker and Cines 2012; Marler et al. 2015)。以上より、血小板活性化を伴う HIT や APS のような血栓性疾患の診断の一助として、さらには抗血小板薬の効果判定スクリーニングの手段として、簡便で標準化された血小板機能検査法が求められている。今回、我々は血小板に代わって血小板前駆細胞である巨核芽球系細胞株を用いることで、簡便に血小板機能を評価することが可能かを検討した。

2. 方法

2.1 Materials

コラーゲン関連ペプチド (CRP) は既報の通り合成した(Inoue et al. 2009)。後述の試薬は記載の会社から購入した。Fura 2-acetoxymethyl ester (fura 2-AM)、イオノマイシンは Enzo Life Sciences (NY, USA)。Adenosine diphosphate (ADP) はサカエ (滋賀)。トロンビンと MRS2179 は Sigma-Aldrich (MO, USA)。U46619 と SQ29548 は Cayman Chemical (MI, USA)。CD32 monoclonal antibody (mAb) (clone IV.3) は GenTex (CA, USA)。Affinity purified antibody to mouse IgG(H+L)F(ab')₂ と Goat anti-mouse IgG secondary antibody は Seracare Life Sciences (MA, USA)。Anti-phosphotyrosine antibody (clone 4G10) は Millipore (MA, USA)。APC-conjugated anti-CD62P mAb、FITC-conjugated anti-CD41/61 mAb、APC-conjugated anti-CD32 mAb、PE-conjugated anti-CD42 mAb 及び PE-conjugated anti-CD42 mAb は BioLegend (CA, USA)。

2.2 細胞培養

CMK-11-5 細胞 (CMK 細胞) (JCRB 細胞バンク (大阪)) から購入した(Nagano et al. 1992)。ヒト巨核球系細胞株である CMK、MEG-01、ヒト急性 T 細胞性白血病細胞株 Jurkat 及びヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 はそれぞれ、10% 加熱不活化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) とペニシリン・ストレプトマイシン (Sigma Aldrich, MO, USA) を加えた Roswell Park Memorial

Institute (RPMI) 1640 培地で培養した。ヒト巨核球系細胞株である UT-7/TPO 細胞は、10% FBS とのペニシリン・ストレプトマイシンを加えた Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地で培養した(Komatsu et al. 1996)。HEK293 細胞は 10% FBS と 2 mM の L-グルタミン酸、ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で培養した。それぞれの細胞は、37°C、5%CO₂ の条件下で培養し、3-7 日間ごとに継代を行った。

2.3 ヒト洗浄血小板の作製

10%クエン酸ナトリウム入りのシリンジを用いて健常ドナーから血液を行い、220 g で 12 分間遠心分離し、血小板多血漿を得た。その後、15%クエン酸デキストロース含有 HEPES-Tyrode buffer [138 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 3.3 mM NaH₂PO₄, 1 mg/ml of glucose, 10 mM HEPES (pH 7.4)] で洗浄し、洗浄血小板を得た。健常人からの採血はヘルシンキ宣言に基づき、同意を得た提供者から行った。

2.4 ウェスタンブロッティング

血小板、CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat 及び K562 細胞に対し IV.3 mAb (3 µg/ml) を 5 分間インキュベートした。その後、IgG F(ab')₂ fragment (30 µg/ml) により CD32 をクロスリンクし、細胞刺激を行なった。一定時間経過後に細胞を同用量の 2× lysis buffer [2% TritonX-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl (pH7.4), 300 mM NaCl, 2 mM sodium orthovanadate and

cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)] を用いて溶解した。15,000 g で 10 分間遠心し、上清を SDS sample buffer と混合、98°C で 2 分間加熱した。タンパク質を 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分離し、Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写、1% BSA 含有 Tris-buffered saline (TBS) で 4°C、オーバーナイトでブロッキングを行なった。タンパク質を転写した PDVF 膜を TBS で洗浄後、Anti-phosphotyrosine mAb (clone 4G10) (1 µg/ml) でインキュベートした。1 次抗体の結合を horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody で検出し、ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Roche, Basel, Switzerland) で反応後、ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare, Amersham Place, UK) を用いて可視化した。

2.5 細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウム濃度はカルシウム依存性蛍光色素である fura 2-AM を用いて行なった(Poenie and Tsien 1986)。血小板、CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat 及び K562 細胞を Fura 2-AM (3 µM) で 37°C で 45 分間インキュベートした。Hepes-Tyrode buffer [138 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 3.3 mM NaH₂PO₄, 1 mg/ml of glucose, 10 mM Hepes (pH 7.4)] で洗浄後、細胞を 1.5 mM CaCl₂ 含有 Hepes-Tyrode buffer にサスペンドした。それぞれの細胞を、イオノマイシン (1 µM)、CD32 クロスリンク刺激、U46619 (1 µM)、ADP (20 µM)、または CRP (1 µg/ml) で刺激した。CD32 のクロスリンクは、IV.3 mAb (3 µg/ml) を 5 分間インキュベートした後、IgG F(ab')₂ fragment (30 µg/ml) を添

加した。細胞内カルシウム濃度は 340 nm における excitation と 380 nm における excitation の比の、増加分として測定した。測定には Spark 10M 蛍光プレートリーダー (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland) を用いた。細胞内カルシウム動員は、各アゴニストを添加した際の Fura2 比のピーク値と、同時に測定した非刺激検体の値との差で評価した。

2.6 細胞株の樹立

GCaMP6s 発現プラスミド (pGP-CMV-GCaMP6s) を Addgene (MA, USA) から購入した(Chen et al. 2013)。CMV プロモーターを pBApo-EF1 Neo プラスミド (タカラバイオ、滋賀) 由来の human elongation factor-1 α (EF1 α) に置換し、pGP-EF1 α -GCaMP6s プラスミドを作成した。pGP-CMV-GCaMP6s または pGP-EF1 α -GCaMP6s プラスミドを線状化した後、HEK293 細胞には Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて、CMK 細胞と MEG-01 細胞には SG Cell Line 4D-Nucleofector™ X Kit L (Lonza, Basel, Switzerland) を用いて、それぞれトランスフェクションした。トランスフェクション後、300 μ g/ml の G418 を培地に添加し、GCaMP6s を恒常的に発現する細胞株を樹立した。

2.7 GCaMP6s 蛍光の検出

GCaMP6s の蛍光は EGFP に由来する蛍光を、Spark 10M 蛍光プレートリーダー、または蛍光顕微鏡で観察した。蛍光顕微鏡をもちいた観察には BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE、大阪) を用いた。GCaMP6s の蛍光は励起波長 485 nm、

蛍光波長 510 nm で検出した(Chen et al. 2013)。各アゴニストを添加した際の GCaMP6s 蛍光のピーク値と、同時に測定した非刺激検体の値との差を細胞内カルシウム動員として評価した。

2.8 フローサイトメトリー

血小板、CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat 及び K562 細胞を APC-conjugated anti-CD62P mAb、FITC-conjugated anti-CD41/61 mAb、APC-conjugated anti-CD32 mAb、PE-conjugated anti-CD42 mAb または PE-conjugated anti-CD42 mAb で 30 分間インキュベートし、洗浄後に抗体の結合をフローサイトメトリー法で測定した (BD LSRFortessa (BD Biosciences, NJ, USA))。測定結果は FlowJow (BD Biosciences) を用いて解析した。

2.9 統計学的分析

実験結果は Graphpad Prism version 7 (Graphpad Software, CA, USA) を用いて解析した。有意差検定には One way ANOVA と Tukey's multiple comparisons test を用いた。全データは平均 \pm 標準誤差 (SEM) で表示した。

3. 結果

3.1 血小板活性化の細胞内シグナル伝達

まず、血小板活性化に伴う細胞のシグナル伝達を検証した。血小板膜上には血小板特異的抗原である膜糖タンパク質 GPIIb/IIIa (CD41/61)、GPIb (CD42) の発現を認めた (図 4A)。また、低親和性免疫グロブリン受容体である CD32 (Fc γ RIIA) の発現も認めた (図 4A)。血小板膜上の CD32 をクロスリンクすると、チロシンリン酸化反応を認めた。Syk、PLC γ 、CD32 に相当すると思われる、それぞれ 72 kDa、140 kDa、40 kDa のチロシンリン酸化を認めた (図 4B)。次に、アゴニスト刺激による細胞内カルシウム動員を検証した。CD32 クロスリンク刺激だけでなく、GPVI アゴニストである CRP、トロンボキサン A₂ アナログである U46619 でも細胞内カルシウム動員を認めた (図 4C)。ADP によるカルシウム動員はわずかであった (図 4C)。CD32 クロスリンクによって、放出反応を意味する CD62P (P-セレクチン) の発現を認めた (図 4D)。さらに、CD32 クロスリンクにより、GPIIb/IIIa 活性化にともなう血小板凝集を認めた (図 4E)。

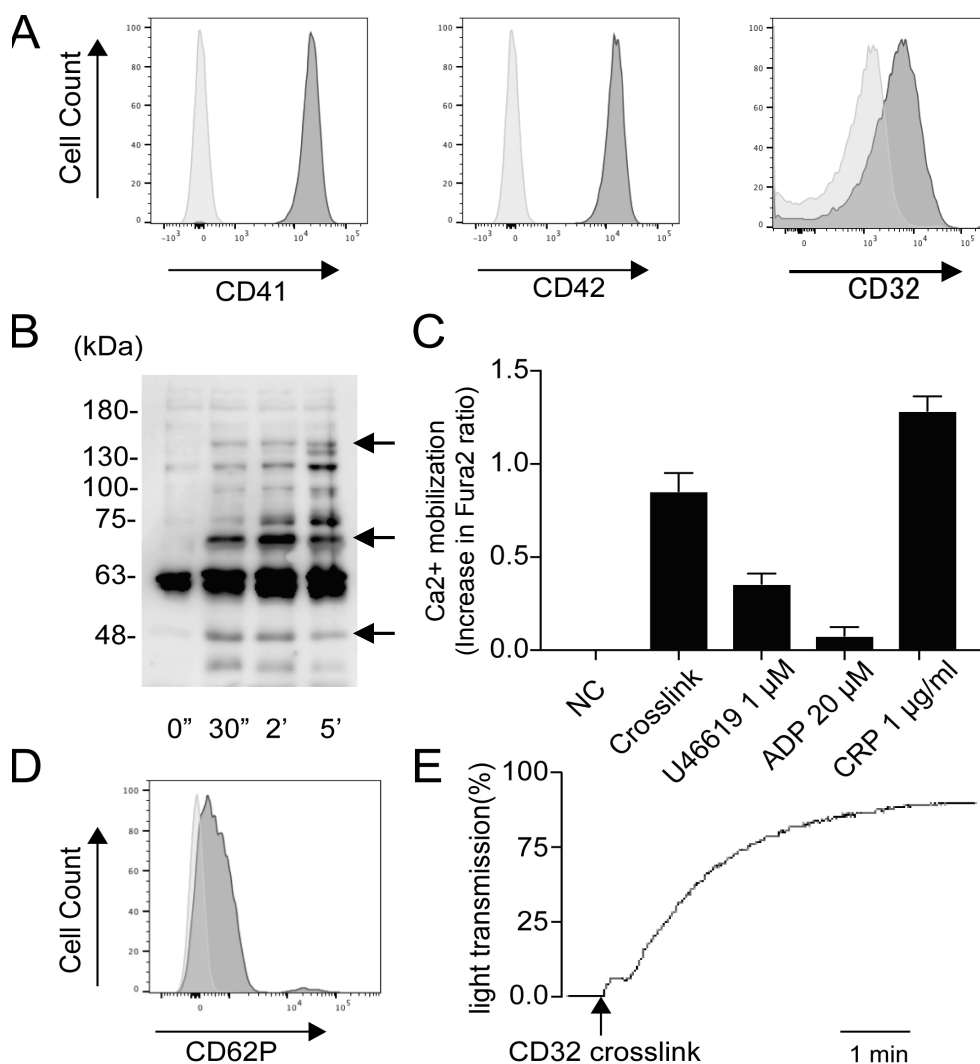


図4 血小板膜タンパク質と活性化反応

(A) 血小板上の CD41、CD42、CD32 の発現をフローサイトメトリーで検出した。薄灰、コントロール；濃灰、特異抗体。(B) 血小板に抗 CD32 抗体である IV.3 mAb (3 μg/ml) を添加後、5 分後に IgG F(ab')₂ fragment (30 μg/ml) を添加し、CD32 をクロスリンクした。タンパク質を SDS-PAGE で展開後、抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットした。結果は最低 3 実験の代表例。矢印は上から順に 140、72、40 kDa を示す。(C) CD32 クロスリンク、U46619、ADP、CRP 刺激後の細胞内カルシウム動員を Fura 2 の蛍光変化で検出した (n = 3, 平均 ± 標準誤差)。(D) CD32 クロスリンク刺激後の血小板上の、P-セレクチン発現。薄灰、未刺激；濃灰、CD32 クロスリンク。(E) CD32 クロスリンクによる血小板凝集能を透過度法により評価した。GPIIb/IIIa 活性化をフローサイトメトリーで検証した。

3.2 血球細胞膜表面上の糖タンパクの発現

次に、各種血球細胞株（CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat、K562 細胞）上の CD32、血小板特異抗原（CD41、CD42）の発現をフローサイトメトリーで検証した。CMK、MEG-01、UT-7/TPO 及び K562 細胞に細胞表面 CD32 発現を認めた（図 5A）。Jurkat 細胞には CD32 の発現は認めなかった（図 5A）。巨核球系細胞株である CMK、MEG-01、UT-7/TPO 細胞には GPIIb (CD41) の発現を認めるものの、その程度は血小板よりも低かった（図 5B、図 4A）。CD41 の発現は、Jurkat、K562 細胞には認めなかった。GPIb (CD42) の発現は CMK と UT-7/TPO に認めるが、CD41 と同様に、その発現は血小板よりも低かった（図 5C、図 4A）。

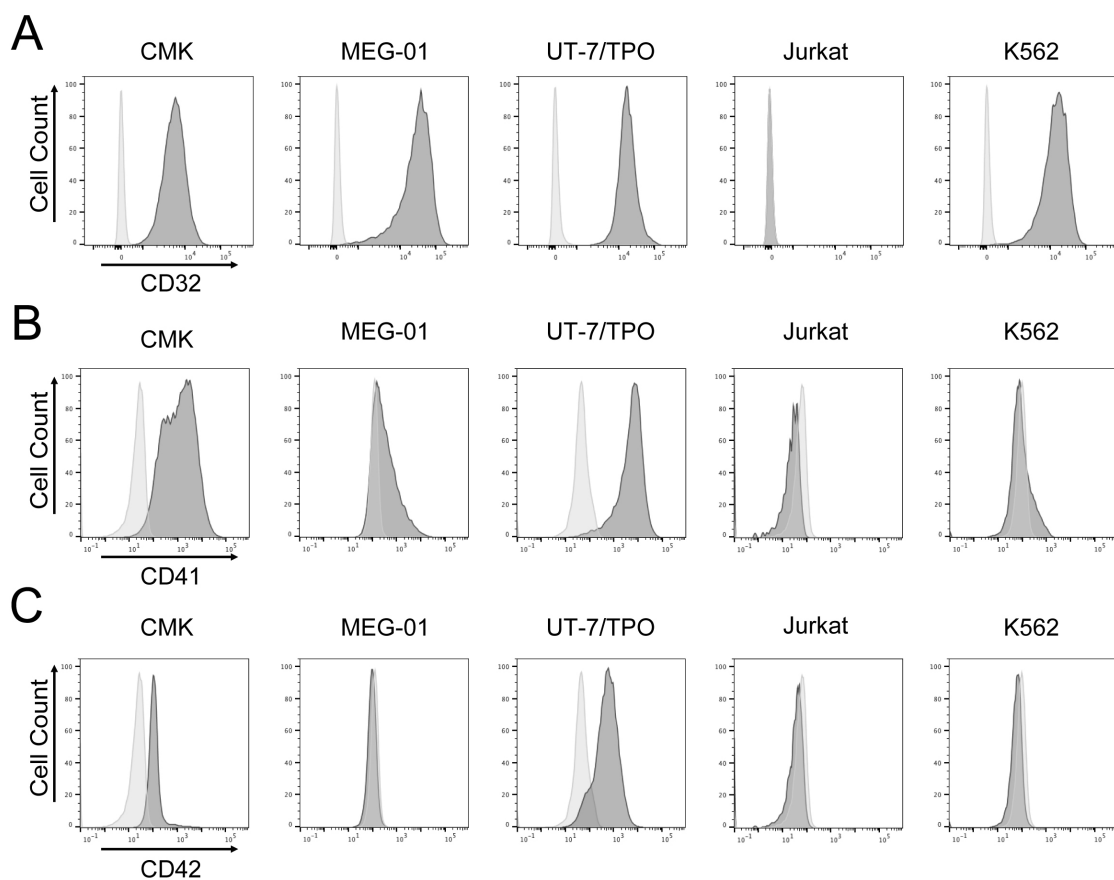


図5 血球細胞表面上の糖タンパク質の発現

CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat 及び K562 の各種細胞の細胞表面上の CD32 (A)、CD41 (B)、CD42 (C)の発現をフローサイトメトリーで解析した。代表的なフローサイトメトリーのヒストグラム。淡灰、コントロール抗体；濃灰、特異抗体。結果は3実験の代表例。

3.3 巨核球系細胞株における細胞内シグナル伝達の比較

種々の血球細胞株における CD32 クロスリンク刺激に対する反応性を評価した。CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat 及び K562 細胞に対して CD32 のクロスリンク刺激を行なった。CD32 を発現している巨核球系細胞株である CMK、MEG-01、UT-7/TPO 細胞では、ヒト血小板と類似したチロシンリン酸化反応を認めた (図 6A)。PLC γ 、Syk のチロシンリン酸化に相当する約 140、72 kDa にチロシンリン酸化を認めた (図 6A)。同様のチロシンリン酸化反応は CD32 を発現しない Jurkat 細胞では認めず、K562 細胞株では刺激前からの変化が乏しかった (図 6A)。

次に、ホスホイノシチド (PI) ターンオーバーの下流の細胞内カルシウム動員について検討した。カルシウム感受性蛍光試薬 fura 2-AM 添加後に、fura-2 の細胞内蛍光の強度比を用いて細胞内カルシウム濃度を測定した。CD32 クロスリンク刺激により CMK、MEG-01、UT-7/TPO 細胞において、ヒト血小板と同様の細胞内カルシウム動員を認めた (図 6B)。すべての細胞においてトロンボキサン A₂ アナログである U46619 によるカルシウム動員を認めた。一方で、血小板特異的受容体 GPVI に対するアゴニストである CRP によるカルシウム動員は認めなかった (データ未提示)。

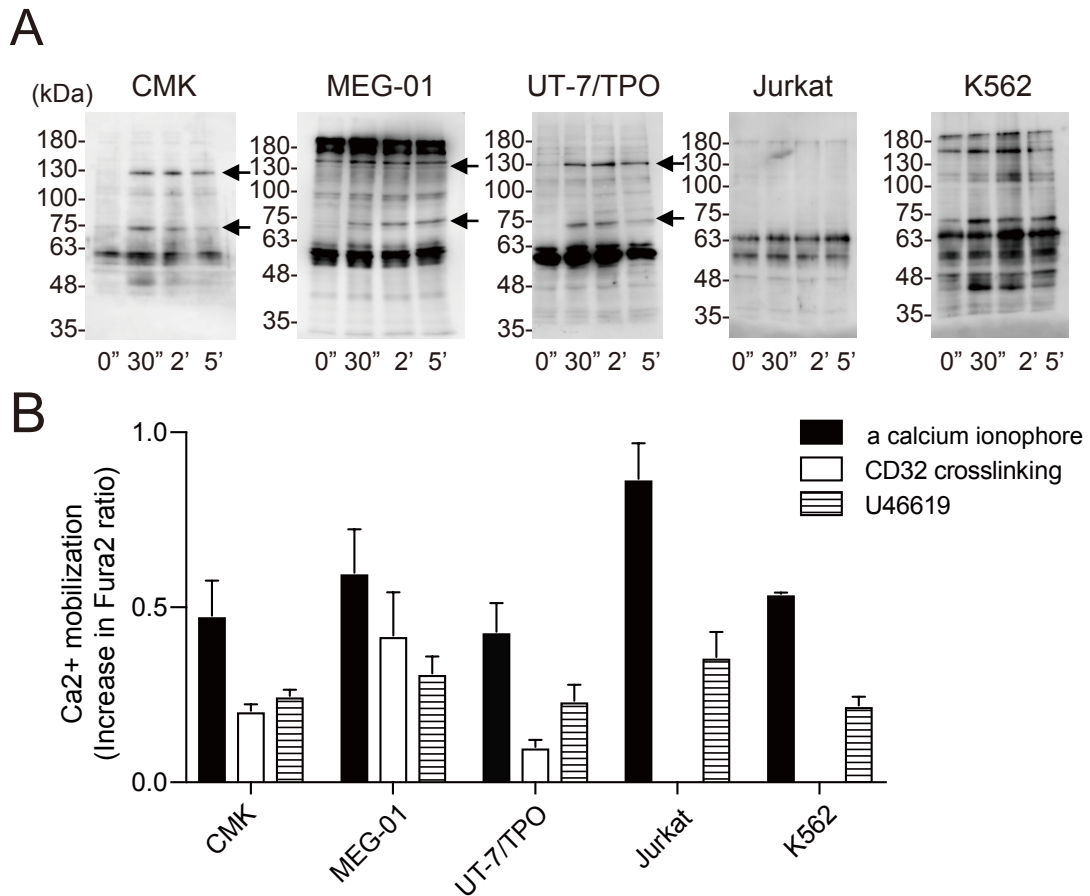


図 6 血球細胞株におけるチロシンリン酸化反応とカルシウム動員

(A) CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat、K562 細胞の各種細胞に対し IV.3 mAb (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 5 分間インキュベートした。その後、IgG F(ab')₂ fragment (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) により CD32 クロスリンク刺激を行なった。記載の時間経過後、タンパク質を SDS-PAGE で展開後、抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットした。結果は最低 3 実験の代表例。矢印は上から順に 140、72 kDa を示す。(B) CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat 及び K562 の各種細胞に対して、3 μM の fura 2-AM を 37°C で 30 分間前処置した。細胞を洗浄後、イオノマイシン (1 μM)、CD32 クロスリンク、U46619 (1 μM) を用いて刺激した。CD32 クロスリンクは、IV.3 mAb (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加後、5 分後に IgG F(ab')₂ fragment (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた。刺激後の fura 2-AM 蛍光変化を蛍光プレートリーダーにて測定した (n = 3, 平均 \pm 標準誤差)。

血小板はセカンドメッセンジャーである細胞内カルシウム動員や PKC の活性化に伴い、細胞内顆粒 (α 顆粒、濃染顆粒、リソゾーム) を細胞外に放出する。放出反応の際に顆粒膜が細胞膜と融合し、細胞内顆粒に存在する CD62P (P-セレクチン) が細胞表面に表出する。この顆粒放出にともなう CD62P (P-セレクチン) の発現を検討した。CMK、MEG-01 及び UT-7/TPO 細胞において、CD32 クロスリンク刺激後に P-セレクチンの発現を認めた (図 7A)。この反応は U46619 刺激または ADP 刺激後には起こらなかった (データ未提示)。

血小板は活性化に伴い、最終的に凝集を引き起こし、一次止血栓を形成する。この血小板凝集反応は GPIIb/IIIa (CD41/61、integrin α IIb β 3) とそのリガンドであるフィブリノゲンとの会合により引き起こされる。通常は GPIIb/IIIa はフィブリノゲンと結合しないが、血小板活性化によって形態が変化して高親和性受容体となる。CD41 が発現している巨核球系培養細胞において、GPIIb/IIIa の活性化を評価した。活性型 GPIIb/IIIa (CD41/61、integrin α IIb β 3) を特異的に検出する特異抗体 PAC-1 を用いたフローサイトメトリーを行った (Shattil et al. 1985)。図 7B に示すように、いずれの細胞においても、CD32 クロスリンク刺激による GPIIb/IIIa の活性化を認めなかった (図 7B)。

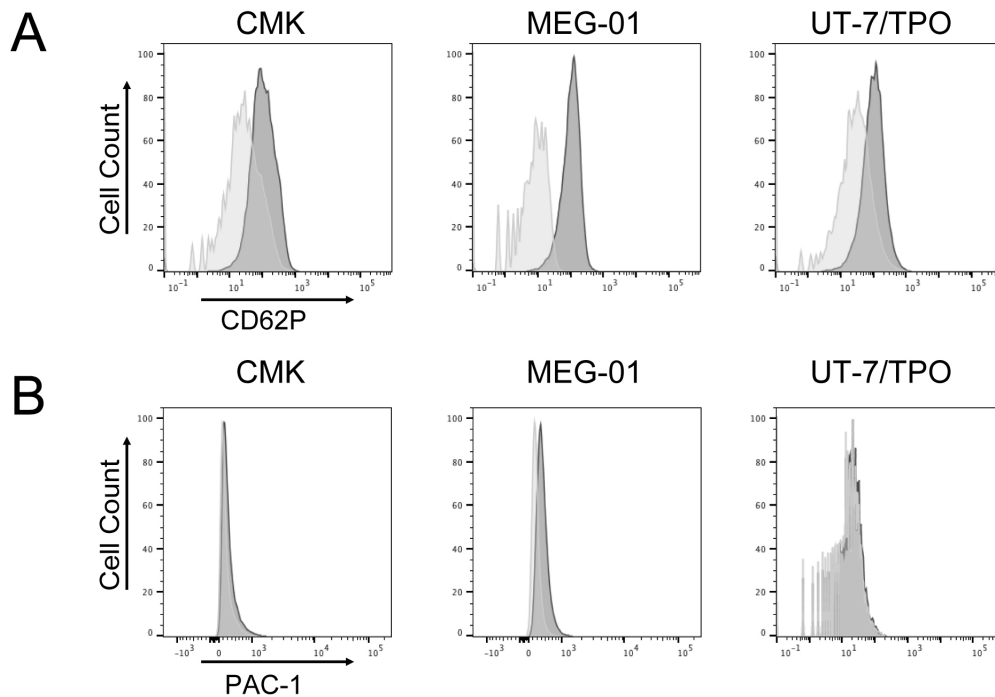


図7 巨核球系培養細胞の細胞表面 CD62P 発現と GPIIb/IIIa 活性化

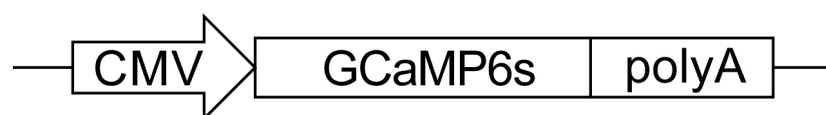
CMK、MEG-01、UT-7/TPO 細胞を CD32 クロスリンク刺激 (IV.3 mAb (3 μ g/ml) + IgG F(ab')₂ fragment (30 μ g/ml) 後に、CD62P の発現、GPIIb/IIIa の活性化をフローサートメトリー法で評価した。(A) CD62P 発現。薄灰、未刺激；濃灰、CD32 クロスリンク。図は 3 回の実験の代表例。(B) GPIIb/IIIa 活性化 (PAC1 結合)。薄灰、未刺激；濃灰、CD32 クロスリンク。図は 3 回の実験の代表例。

3. 4 GCaMP6s 発現プラスミドの構築と HEK293 細胞における細胞内カルシウム

動員の検討

以上の検討から、細胞内カルシウム動員を検出すれば、血小板アゴニストによる細胞活性化が効果的に検出できると考えられた。そこで、Fura 2-AM の前処置なしにカルシウム動員を測定するために、高感度カルシウムプローブである GCaMP6s に着目した。GCaMP6s はカルシウムと結合すると EGFP の蛍光 (励起波長/蛍光波長 485/510 nm) を発生することで細胞内カルシウムの変動を評価可能である(Akerboom et al. 2009)。CMV プロモーターまたは EF1 α プロモーターの下流に GCaMP6s を発現するプラスミドを作製し (pGP-CMV-GCaMP6s、pGP-EF1 α -GCaMP6s)、HEK293 細胞へ遺伝子導入した (図 8)。

pGP-CMV-GCaMP6s



pGP-EF1 α -GCaMP6s

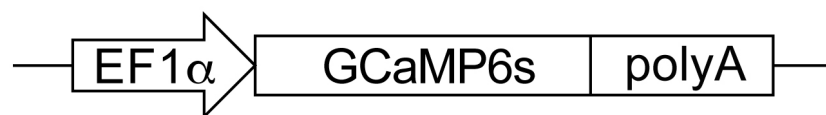


図 8 GCaMP6s 発現プラスミドの構築 細胞内カルシウム依存性蛍光タンパクである GCaMP6s を CMV または EF1 α プロモーターの下流に搭載したプラスミドを作製した。

遺伝子導入後、G418 存在化で遺伝子導入細胞の選択をおこなった。安定して遺伝子発現しているそれぞれの細胞を蛍光顕微鏡観察下でイオノマイシンにより

刺激した。CMV プロモーターの下流で GCaMP6 を発現させると、刺激前から GCaMP6s の蛍光をみとめ、イオノマイシンによる変化は認めなかった (図 9)。一方、EF1 α プロモーターで GCaMP6 を発現させた場合は、イオノマイシン刺激後にのみ GCaMP6s の蛍光を認めた (図 9)。

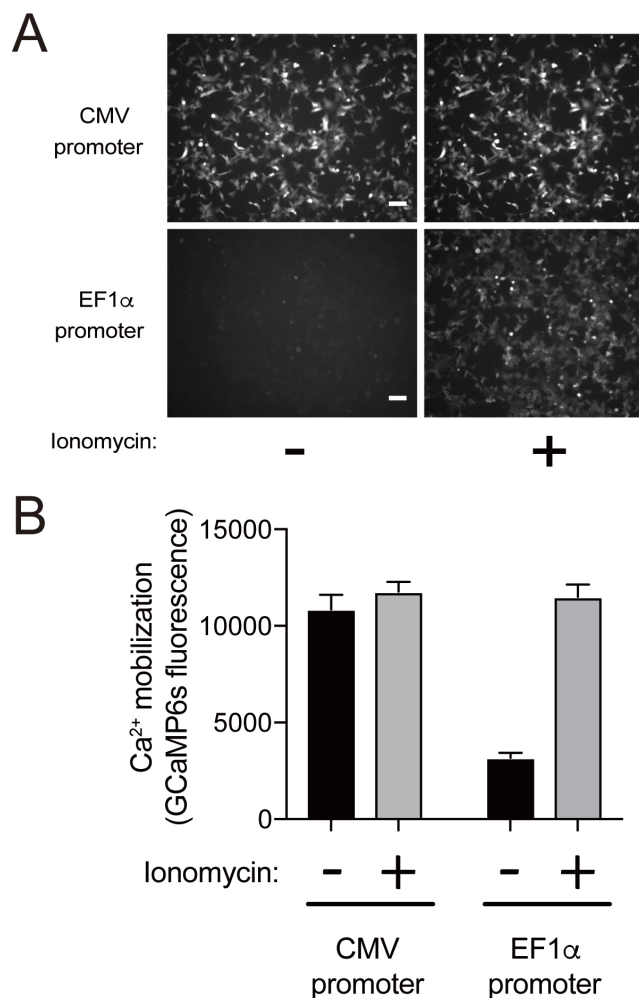


図 9 GCaMP6s 発現による HEK293 細胞のカルシウム動員

GCaMP6s を CMV、または EF1 α プロモーターの下流に搭載したプラスミドをトランスフェクションし、G418 で遺伝子導入細胞を選択した。(A) イオノマイシン (1 μ M) で刺激前後の蛍光顕微鏡像。スケールバーは 50 μ m。(B) GCaMP6s 発現 CMK、MEG-01 細胞のイオノマイシン (1 μ M) で刺激前後の GCaMP6s 蛍光変化をプレートリーダーで定量した (n = 3, 平均 \pm 標準誤差)。

3. 5 GCaMP6s 発現 CMK 細胞、MEG-01 細胞における細胞内カルシウム動員

次に、CMK、MEG-01 細胞にも同様に CMV プロモーター、EF1 α プロモーターで GCaMP6 を発現するプラスミドの遺伝子導入をおこない、G418 で遺伝子導入細胞のセレクションを行った。GCaMP6s 発現 CMK、MEG-01 細胞では、HEK293 細胞とは異なり、CMV プロモーターでは刺激前、刺激後、ともに GCaMP6s の蛍光を認めなかった (図 10、図 11)。一方、EF1 α プロモーターを用いた場合には、イオノマイシン刺激によるカルシウム動員に伴い GCaMP6s の蛍光増強を認めた (図 10、図 11)。次に、pGP-EF1 α -GCaMP6s を発現した CMK、MEG-01 細胞を種々のアゴニストで刺激を行い、GCaMP6s の蛍光変化を評価した。CMK 細胞では、CD32 クロスリンク、U46619、ADP 刺激後に GCaMP6s の蛍光変化を認めた (図 10C)。GPVI アゴニストである CRP 刺激では GCaMP6s 蛍光は変化しなかった。MEG-01 細胞では、CD32 クロスリンク刺激後に GCaMP6s の蛍光変化を認めたが、ADP、U46619 の反応は乏しかった (図 11C)。以上より、ADP、U46619、CD32 クロスリンク刺激に反応し、細胞内カルシウム動員が簡便に観察できる細胞株として、EF1 α プロモーターの下流で GCaMP6s を発現する CMK 細胞が評価に適していると考えた。

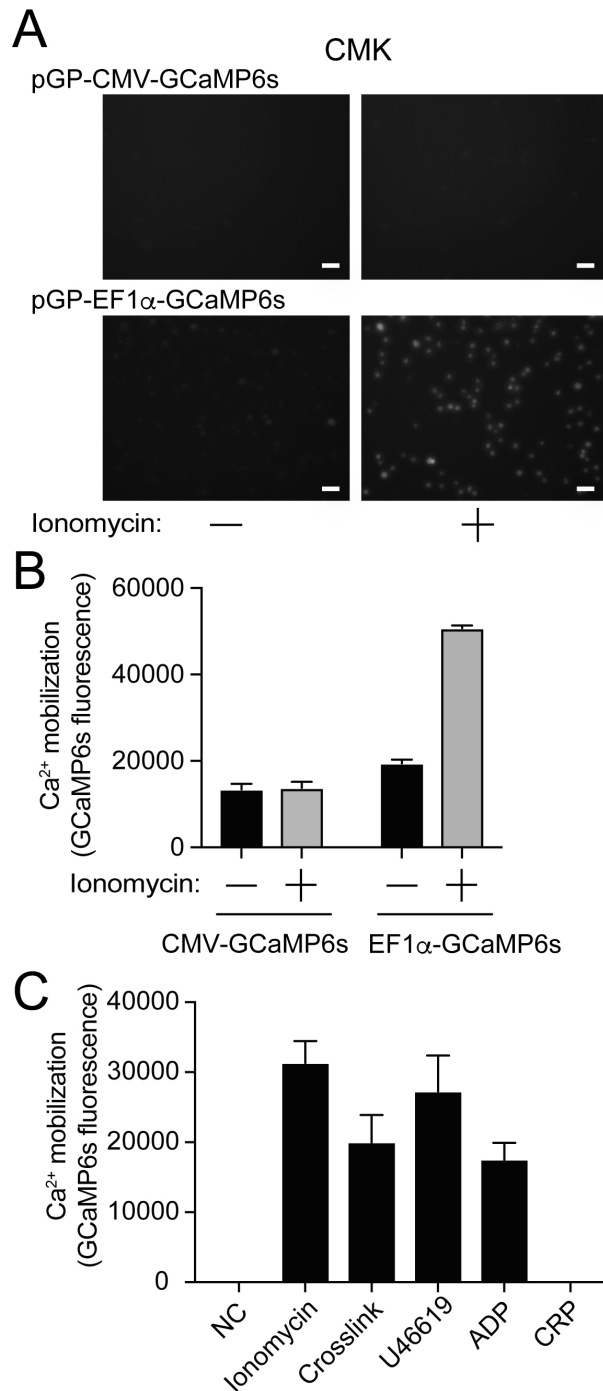


図 10 GCaMP6s 発現 CMK 細胞における細胞内カルシウム動員

(A) イオノマイシン (1 μ M) 刺激前後の GCaMP6s 蛍光変化を蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは 50 μ m。 (B) イオノマイシン (1 μ M) 刺激前後の GCaMP6s 蛍光変化を蛍光プレートリーダーで定量した (n = 3, 平均 \pm 標準誤差)。 (C) 未刺激、イオノマイシン (1 μ M)、CD32 クロスリンク、U46619 (1 μ M)、ADP (20 μ M)、CRP (1 μ g/ml) 刺激後の GCaMP6s 蛍光変化を蛍光プレートリーダーで定量した (n = 3, 平均 \pm 標準誤差)。

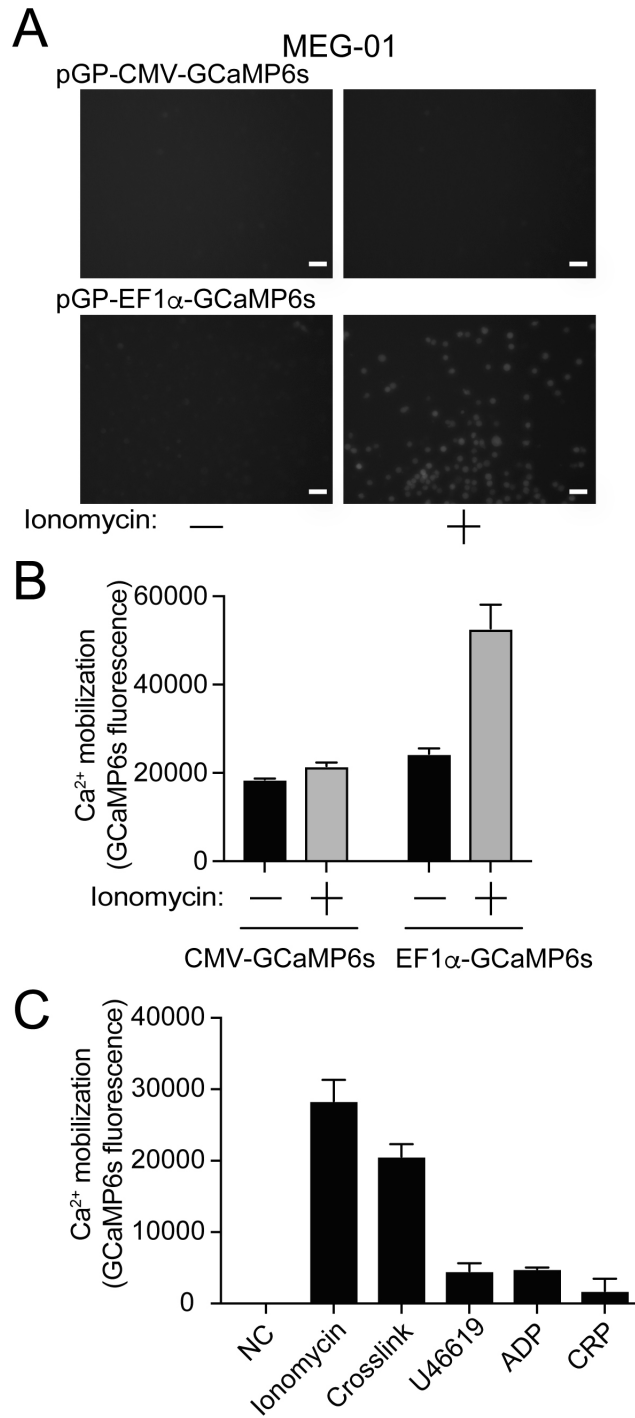


図 11 GCaMP6s 発現 MEG-01 細胞における細胞内カルシウム動員

(A) イオノマイシン (1 μ M) 刺激前後の GCaMP6s 蛍光変化を蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは 50 μ m。 (B) イオノマイシン (1 μ M) 刺激前後の GCaMP6s 蛍光変化を蛍光プレートリーダーで定量した (n = 3, 平均 \pm 標準誤差)。 (C) 未刺激、イオノマイシン (1 μ M)、CD32 クロスリンク、U46619 (1 μ M)、ADP (20 μ M)、CRP (1 μ g/ml) 刺激後の GCaMP6s 蛍光変化を蛍光プレートリーダーで定量した (n = 3, 平均 \pm 標準誤差)。

3. 6 GCaMP6s 発現 CMK 細胞株における特異的アンタゴニストによる細胞内カルシウム動員の抑制

最後に、EF1 α の下流で GCaMP6s を安定的に発現する CMK 細胞を用いて、ADP 受容体、トロンボキサン受容体特異的アンタゴニストによる細胞内カルシウム動員の抑制を検討した。ADP 受容体の一つである P2Y₁ 受容体の特異的アンタゴニストである MRS2179 は、ADP (2 μ M、20 μ M) による GCaMP6s の蛍光強度の増強を濃度依存性に抑制した (図 12)。トロンボキサン受容体の特異的アンタゴニストである SQ29548 は、U46619 刺激 (1 μ M、10 μ M) による GCaMP6s の蛍光強度の増強を濃度依存性に抑制した (図 13)。

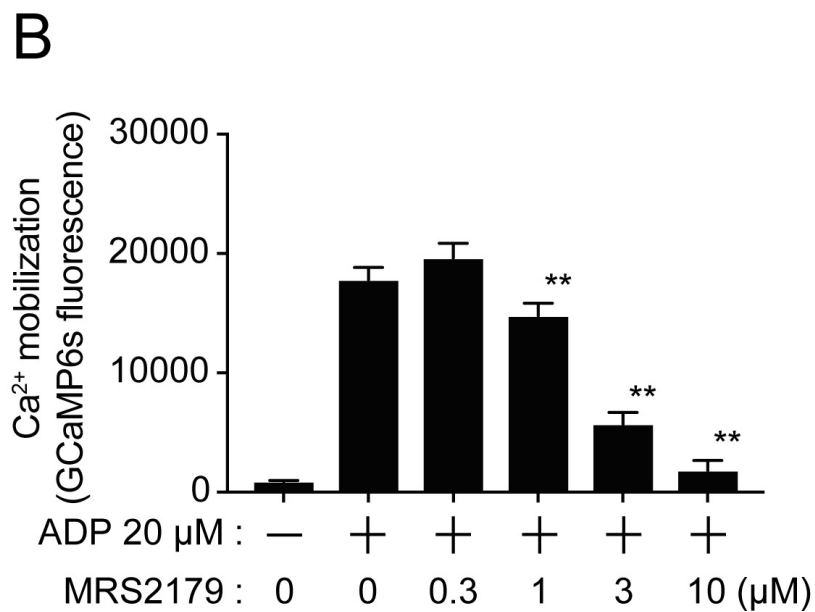
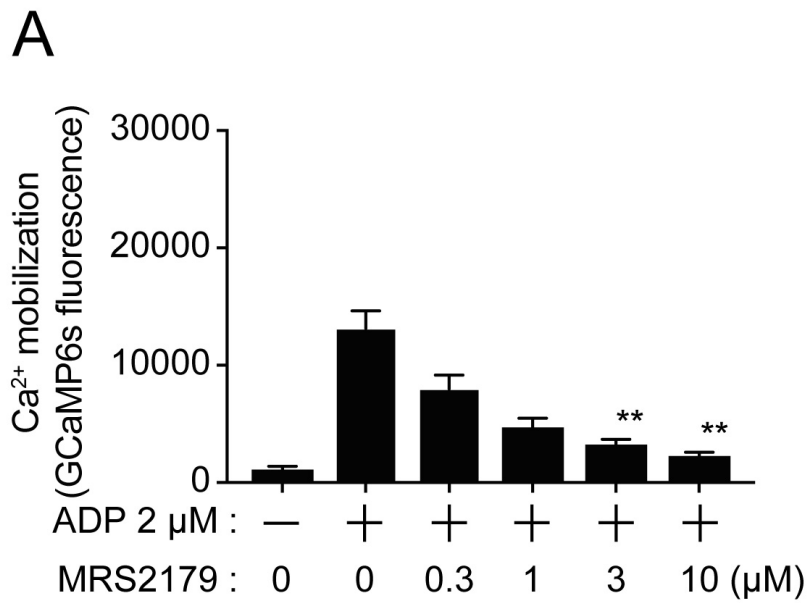


図 12 MRS2179 による ADP 惹起 GCaMP6 蛍光の抑制

GCaMP6s 発現 CMK をグラフに示した濃度の MRS2179 で前処置後、2 μ M ADP (A)、または 20 μ M ADP (B) で刺激した。刺激前後の GCaMP6s 蛍光変化を蛍光プレートリーダーで定量した (n = 3, 平均 \pm 標準誤差)。** $P < 0.01$ 、阻害剤なしで刺激した場合と比較。有意差検定には One way ANOVA と Tukey's multiple comparisons test を用いた。

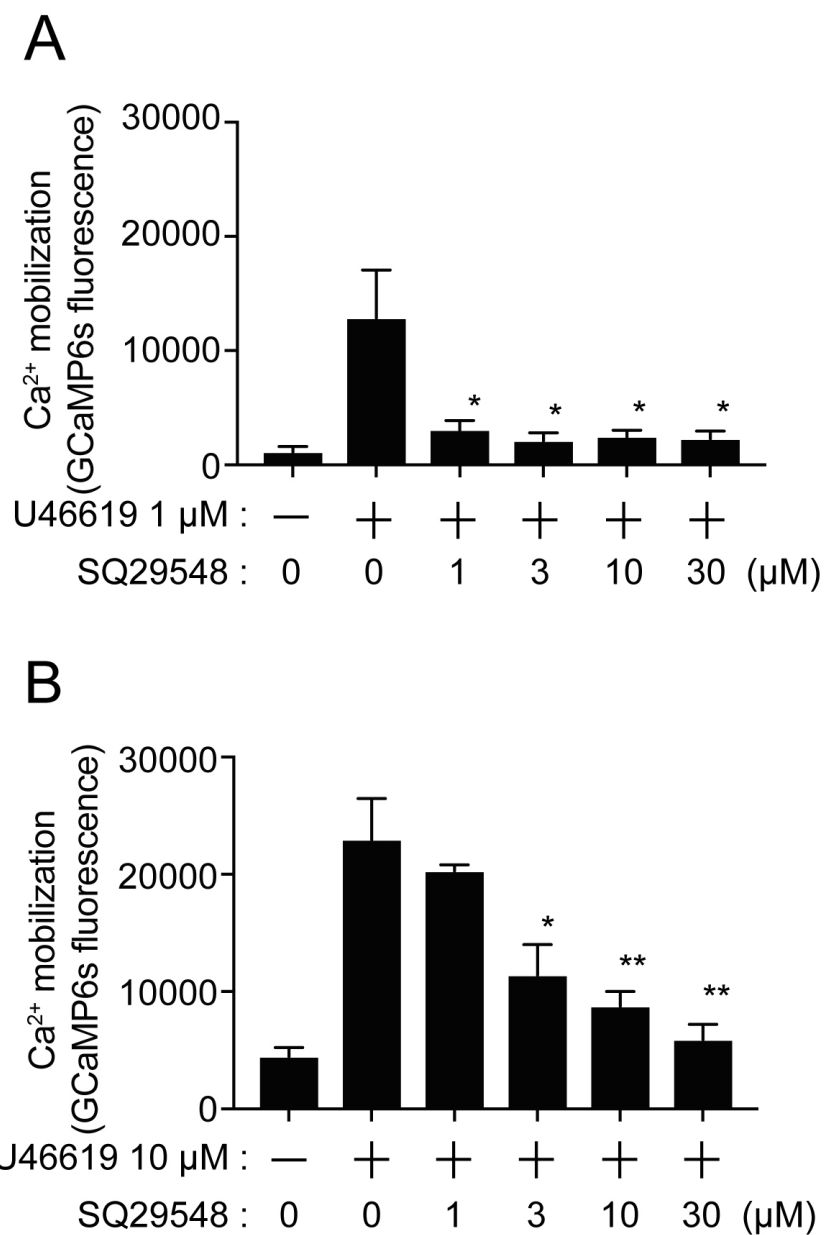


図 13 SQ29548 による U46619 惹起 GCaMP6 蛍光の抑制

GCaMP6s 発現 CMK をグラフに示した濃度の MRS2179 で前処置後、1 μM U46619 (A)、または 10 μM U46619 (B) で刺激した。刺激前後の GCaMP6s 蛍光変化を蛍光プレートリーダーで定量した (n = 3, 平均 ± 標準誤差)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、阻害剤なしで刺激した場合と比較。有意差検定には One way ANOVA と Tukey's multiple comparisons test を用いた。

4. 考察

今回の研究において、血小板活性化シグナルを検出しうる巨核球系細胞株を樹立した。CMK、MEG-01、UT-7/TPO 細胞は血小板と類似の膜タンパク質の発現、ならびに CD32 クロスリンク刺激によるチロシンリン酸化とカルシウム動員、P-セレクチン発現など、血小板と類似したシグナル伝達を示した。様々なシグナル伝達の中で、カルシウム濃度依存性の蛍光プローブ遺伝子を CMK、MEG-01 細胞に安定発現させることで、前処理なしで、細胞内カルシウム濃度の上昇を蛍光プレートリーダーを用いて検出可能となった。血小板は無核の細胞であり、採血後の反応性が数時間に限られる、また、*ex vivo* での遺伝子導入をすることは困難である。以上より、本細胞株は、血小板に代わり、血中に存在する血小板活性化物質や抗血小板薬の効果を簡便に検出するポテンシャルをもつ。

上述の通り、血小板活性化は種々の血栓症の発症に重要であるが、生体内での血小板活性化状態を *ex vivo* での反応性で評価することは難しい。抗凝固薬であるワルファリンは、その抗凝固作用をプロトロンビン時間で評価するが、抗血小板薬はモニタリングなしにすべての患者に同じ用量を投与する。個人間で抗血小板薬に対する反応性が異なることが予測されるため、抗血小板薬の効果をモニタリングすることで、個別化された適切な投与法に結びつくのではないかという考えが生まれた(Gaussem 2006)。中でも 1993 年に Grotmeyer らが、アスピリン内服にもかかわらず、血小板凝集が抑制されない症例を報告して以降、抗血小板薬の薬効が減弱する“抵抗性 (レジスタンス)”の問題が注目

された(Grotemeyer, Scharafinski, and Husstedt 1993; Miyata et al. 2008; Gum et al. 2003)。日常診療で最も用いられるアスピリンはシクロオキシゲナーゼ-1 (COX1) を阻害して抗血小板効果を発揮する(Vane and Botting 2003)。透過度法を用いた血小板凝集能を用いて、アスピリン内服下の血小板凝集能が臨床予後に関連する複数の論文が報告され、“アスピリンレジスタンス”という言葉で注目された(Hankey and Eikelboom 2006)。一方、最終的な血小板凝集は様々な血小板活性化シグナル経路により引き起こされるため、必ずしも薬理作用だけを反映するわけではないことが指摘された(Ohmori et al. 2006; Yano et al. 2008)。現在では、アスピリンの薬理作用、つまり COX1 の阻害は 100 mg の内服で、ほぼすべての患者において十分であることが示されている(Ohmori et al. 2006; Gaziano et al. 2018)。さらに、クロピドグレルについても抵抗性の問題が注目された(Guha et al. 2009)。クロピドグレルは、肝臓でチトクローム P450(CYP)2C19 の酸化過程を経て、活性体となり、血小板 ADP 受容体 P2Y₁₂ を不可逆的に阻害することで抗血小板機能を発揮する。実際に CYP2C19 の機能欠失型遺伝子多型 (SNP) を持つ患者では、クロピドグレル活性体の濃度が低く、抗血小板作用が減弱していることが示された(Hurst et al. 2013)。また、このような患者群は実際に冠動脈ステント挿入後の血管イベントが多いことが報告されている(Mega et al. 2009)。この CYP2C19 の機能欠失型 SNP は欧米人よりも日本人に多く、その臨床的な重要性が着目された(Jinnai et al. 2009)。そこで、クロピドグレルよりも、CYP 代謝の影響を受けにくいプラスグレルやチカグレロルの開発に結びついた(Tagarakis 2010; Tomoda 2009)。一方、その後の血小板機能のモニタリングにより抗血小板薬を追加する大規模な臨床試験の多

く (GRAVITAS 臨床試験や TRIGGER-PCI 臨床試験) が、ネガティブな結果を報告しており (Price et al. 2011; Trenk et al. 2012)、現状の抗血小板機能のモニタリングの限界を示している。

今回の研究では、巨核球系培養細胞株を利用することで、血中の抗血小板薬の効果を間接的に知ることができることが示された。実際に、*ex vivo* で ADP 受容体 P2Y₁ 阻害薬やトロンボキサン受容体阻害薬の存在下で、巨核球系培養細胞のカルシウム動員を濃度依存性に抑制することが示された。薬剤投与を受けた患者から直接血小板を採取しなくても、本細胞株に血清を添加することで、阻害薬の血中濃度を間接的に知ることができる可能性がある。この血清を用いた抗血小板薬モニタリング検査にはいくつかの利点が考えられる。まず、凍結保存が可能であり、検体の輸送が可能である。また、前処置が不要であることから、工程が単純であり検査者の熟練を要さない。さらに、同一施設で検査可能になるため、検査を標準化できる可能性がある。さらに、本細胞株の応用は、健常ドナーからの採血が不要である点、ドナー間の反応性の差異を認めないことも利点と考えられる。本研究成果を更に応用することで、抗血小板薬の効果的なモニタリングや、特定の受容体に対する候補薬剤のハイスループットスクリーニングにも用いられる可能性がある。

また、この手法は血中に存在する血小板活性化物質の検出にも応用できるポテンシャルを持つ。血中に血小板活性化物質が生じる主な疾患として HIT と APS が挙げられる。GCaMP6s が安定発現した巨核球系培養細胞株 (CMK、MEG-01) は CD32 クロスリンクによる刺激を簡便に検出可能であり、ヘパリン存在下で患者血清と反応させることで HIT 抗体を検出できる新たな臨

床検査となる可能性がある。APS においても、特異度、感度に優れる、簡便な検査法が存在しないが、今回樹立した細胞株や内皮細胞と同様に GCaMP6s を発現させた細胞株と、APS 患者血清とを反応させ、細胞の活性化を評価することで、これまで診断が困難であった APS の診断や病態解明に利用できるかもしれない。

本研究では、細胞内カルシウム動員をモニタリングできる細胞株を樹立した。細胞内カルシウム動員は PLC を介した PI ターンオーバーにより生じる(Varga-Szabo, Braun, and Nieswandt 2009)。PI ターンオーバーは、PIP₂ から IP₃ とジアシルグリセロールが生じる反応である。IP₃ が小胞体の IP₃ 受容体に結合し小胞体からのカルシウム動員を導き、ジアシルグリセロールが PKC を活性化し、両者が血小板活性化に結びつく。血小板活性化には PLC β と PLC γ 2 の 2 つの PLC が重要である(Varga-Szabo, Braun, and Nieswandt 2009)。ADP、トロンボキサンなどの 7 回膜貫通型受容体は、Gq を介して PLC β を活性化する(Jin and Kunapuli 1998; Johnson, Leis, and Dunlop 1993)。一方、GPVI や CD32 などのチロシンリン酸化を伴う活性化反応は非受容体型チロシンキナーゼを介する(Liu, Pudiak, and Looney 1994; Dangelmaier et al. 2005)。Src ファミリーによる Syk のリン酸化、さらには LAT などのシグナル複合体を介して PLC γ 2 を活性化させる(Mazharian et al. 2010)。細胞内カルシウム動員は 7 回膜貫通型受容体、チロシンリン酸化反応、いずれの活性化反応を検知するのにも有用である。実際 CMK 細胞では、7 回膜貫通型受容体である ADP 受容体やトロンボキサン受容体刺激、またチロシンリン酸化反応を介する CD32 クロスリンク刺激の両者を感知できた。

一方で、血小板活性化までの過程には PLC を介したカルシウム動員以外にも様々な活性化経路が存在する。特に 7 回膜貫通型受容体に関連した Gi、G_{12/13} の活性化に伴う反応も重要である (Offermanns 2006)。クロピドグレルの標的である ADP 受容体 P2Y₁₂ は Gi と結合し、細胞内の cAMP の低下に関与している (Offermanns 2006)。この P2Y₁₂ を介した cAMP の低下は血小板活性化の持続反応に重要と考えられている。また G_{12/13} は小分子 GTPase である Rho の活性化に関与し、アクチンストレスファイバーの形成に寄与している (Gohla et al. 1999)。G_{12/13} の活性化に重要なリガンドとしてはトロンボキサン A₂ が挙げられる。cAMP の細胞内シグナルを検出するために、cAMP の細胞内プローブとして Flamindo (fluorescent cyclic adenosine monophosphate indicator) が報告されている (Kitaguchi et al. 2013)。これは cAMP の上昇に対して、赤色蛍光強度が上昇する物質である。今回の細胞内カルシウム動員と同様に安定細胞株の作製により、Gi シグナルを簡便に検出できる。また、赤色蛍光のため、GCaMP6s との共発現によって、カルシウム動員と cAMP 変化の両者を同時に同一細胞で検出することができる系が構築できる可能性がある。Rho の活性化を検出するプローブとしては、FRET と GFP を利用した Raichu (Ras and interacting protein chimeric unit) が報告されている (Nakamura et al. 2006; Nakamura and Matsuda 2009)。Raichu はドナーの蛍光分子 CFP と、アクセプターとして YFP を用いる方法である。これは、活性化型の Rho と結合する RBD と YFP、Rho と CFP を結合させておき、両者の結合による蛍光スペクトルの変化で Rho 活性化の程度を可視化することが可能である。細胞内カルシウム動員だけでなく、将来的には複数の血小板活性化シグナルを同時に検出できるような細胞株、

また遺伝子導入マウスなどを作製することで、単一細胞で生じている複雑な血小板活性化過程を可視化し、詳細に検討できる可能性がある。

これまでも、カルシウムプローブを添加し、蛍光プレートリーダーで観察する手法は用いられてきた(Liu and Abell 2006)。しかし、この方法では経過時間に伴う蛍光の退色により、同一条件で検査を行うことが難しいという問題が指摘されていた(Liu and Abell 2006)。本研究のように蛍光プローブを遺伝子導入によって安定的に発現させることで、常に安定した細胞内シグナルの検出が可能である。強力なウイルスプロモーターである CMV プロモーターでは HEK293 細胞では GCaMP6s の過剰発現となり、逆に巨核球系培養細胞である CMK や MEG-01 細胞では低発現となった。細胞株によって、CMV プロモーターの作用が違う原因は明らかではないが、CMV プロモーターは人工多能性幹細胞 (iPS細胞) などの幹細胞においてサイレンシングを受けやすいことが報告されている(Kawabata, Tashiro, and Mizuguchi 2010)。一方、哺乳類細胞で広範に発現が可能である EF1 α プロモーターでは、HEK293 細胞、巨核球系培養細胞株、両者ともにカルシウム動員に応じた GCaMP6s 蛍光強度の十分な変化をもたらした。以上より、蛍光プローブを細胞内に安定して発現させるためには、細胞種によって遺伝子発現にもちいるプロモーターの選択が重要と考えられる。

本研究の問題点として、血小板活性化シグナルのうち細胞内カルシウム動員以外の血小板活性化が評価できていないことが挙げられる。これは、上述の通り、カルシウム動員以外の細胞内活性化シグナルによる血小板活性化も他の異なるプローブの発現で可能となる。また、実際の HIT や APS 患者の血清を用いて、診断の感度や特異度の検出にはいたっていない。HIT 自体の頻度は

へパリン使用患者の 0.1%未満と考えられており (Selleng, Warkentin, and Greinacher 2007)、単一施設だけで前向き検討をすることは困難である、今後は、国内のデータベースを利用して、患者血清を利用したスクリーニングを行っていく必要がある。さらに、巨核球系培養細胞株は類似しているとはいえ、正常の巨核球や血小板とは異なる点もある。例えば、強力な血小板活性化をもたらす CRP は巨核球系培養細胞ではカルシウム動員を引き起こさなかった。CMK、UT-7/TPO では GPVI の発現が乏しいことから (Berlanga et al. 2000; Kanaji et al. 2005)、コラーゲン、CRP などの GPVI 刺激により生じる血小板活性化シグナルは再現できないと考えられる。これらの細胞株は、ホルボールエステルなどの分化刺激によって、一定の分化をきたすが、血小板産生にはいたらない (Berlanga et al. 2000)。最近、iPS 細胞を巨核球系培養細胞に不死化して、その後分化のスイッチを起こし、血小板産生が可能となることが報告された (Sugimoto and Eto 2017)。このような、より血小板に近い巨核球系細胞株に遺伝子導入を行い、さらに、遺伝子導入巨核球を血小板へ分化することで、蛍光プローブを安定的に導入したヒト血小板の供給に結びつく可能性がある。

以上、本研究では、カルシウム蛍光プローブを安定発現した巨核球系培養細胞を樹立した。特に CMK 細胞は、複数の血小板アゴニストに対して、血小板と類似した反応性を示した。本細胞株は、血中に血小板活性化物質が存在する HIT や APS の診断や、新しい抗血小板薬のスクリーニング、抗血小板薬の反応性の検討に用いられる可能性がある。今後は、実際の HIT 抗体との反応性を検討する予定である。また、iPS 細胞由来巨核球株や、その細胞を分化後の

血小板を用い、より血小板に近い細胞を利用することで、さらにより検出系の構築も可能である。今後の研究の進展に期待したい。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重な試薬を提供いただきました東京大学医学部附属病院検査部 矢富 裕 教授、安本 篤 先生、山梨大学医学部臨床検査医学講座 井上克枝 教授に感謝申し上げます。また、研究を直接指導いただきました早川盛禎 講師、鴨下信彦 講師、ならびに病態生化学部門のスタッフに御礼申し上げます。

6. 参考文献

- Akerboom, J., J. D. Rivera, M. M. Guilbe, E. C. Malave, H. H. Hernandez, L. Tian, S. A. Hires, J. S. Marvin, L. L. Looger, and E. R. Schreiter. 2009. 'Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design', *J Biol Chem*, 284: 6455-64.
- Amiral, J., M. Wolf, A. Fischer, C. Boyer-Neumann, A. Vissac, and D. Meyer. 1996. 'Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia', *Br J Haematol*, 92: 954-9.
- Arepally, G. M. 2017. 'Heparin-induced thrombocytopenia', *Blood*, 129: 2864-72.
- Berlanga, O., R. Bobe, M. Becker, G. Murphy, M. Leduc, C. Bon, F. A. Barry, J. M. Gibbins, P. Garcia, J. Frampton, and S. P. Watson. 2000. 'Expression of the collagen receptor glycoprotein VI during megakaryocyte differentiation', *Blood*, 96: 2740-5.
- Carr, M. E., Jr. 1997. 'In vitro assessment of platelet function', *Transfus Med Rev*, 11: 106-15.
- Chaturvedi, S., and K. R. McCrae. 2017. 'Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome', *Blood Rev*.
- Chen, T. W., T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E. R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda, and D. S. Kim. 2013. 'Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity', *Nature*, 499: 295-300.
- Cuker, A., and D. B. Cines. 2012. 'How I treat heparin-induced thrombocytopenia', *Blood*, 119: 2209-18.
- Dangelmaier, C. A., P. G. Quinter, J. Jin, A. Y. Tsygankov, S. P. Kunapuli, and J. L. Daniel. 2005. 'Rapid ubiquitination of Syk following GPVI activation in platelets', *Blood*, 105: 3918-24.
- Dovlatova, N. 2015. 'Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders', *Br J*

Haematol, 170: 150-61.

Favaloro, E. J., G. McCaughan, and L. Pasalic. 2017. 'Clinical and laboratory diagnosis of heparin induced thrombocytopenia: an update', *Pathology*, 49: 346-55.

Gaussem, P. 2006. '[Assessment of platelet function in man]', *Therapie*, 61: 395-400.

Gaziano, J. M., C. Brotons, R. Coppolecchia, C. Cricelli, H. Darius, P. B. Gorelick, G. Howard, T. A. Pearson, P. M. Rothwell, L. M. Ruilope, M. Tendera, G. Tognoni, and Arrive Executive Committee. 2018. 'Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet*, 392: 1036-46.

Ge, S., E. Woo, J. G. White, and C. L. Haynes. 2011. 'Electrochemical measurement of endogenous serotonin release from human blood platelets', *Anal Chem*, 83: 2598-604.

Gohla, A., S. Offermanns, T. M. Wilkie, and G. Schultz. 1999. 'Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation', *J Biol Chem*, 274: 17901-7.

Grotemeyer, K. H., H. W. Scharafinski, and I. W. Husstedt. 1993. 'Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients', *Thromb Res*, 71: 397-403.

Guha, S., S. Mookerjee, P. Guha, P. Sardar, S. Deb, P. D. Roy, R. Karmakar, S. Mani, M. B. Hema, S. Pyne, P. Chakraborti, P. K. Deb, P. Lahiri, and U. Chaudhuri. 2009. 'Antiplatelet drug resistance in patients with recurrent acute coronary syndrome undergoing conservative management', *Indian Heart J*, 61: 348-52.

Gum, P. A., K. Kottke-Marchant, P. A. Welsh, J. White, and E. J. Topol. 2003.

'A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease', *J Am Coll Cardiol*, 41: 961-5.

Gupta, S., R. Tiruvoipati, C. Green, J. Botha, and H. Tran. 2015. 'Heparin induced thrombocytopenia in critically ill: Diagnostic dilemmas and

management conundrums', *World J Crit Care Med*, 4: 202-12.

Hankey, G. J., and J. W. Eikelboom. 2006. 'Aspirin resistance', *Lancet*, 367: 606-17.

Holmsen, H., I. Holmsen, and A. Bernhardsen. 1966. 'Microdetermination of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate in plasma with firefly luciferase system', *Anal Biochem*, 17: 456-73.

Hughes, M., C. P. Hayward, T. E. Warkentin, P. Horsewood, K. A. Chorneyko, and J. G. Kelton. 2000. 'Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia', *Blood*, 96: 188-94.

Hurst, N. L., V. B. Nooney, B. Raman, Y. Y. Chirkov, R. De Caterina, and J. D. Horowitz. 2013. 'Clopidogrel "resistance": pre- vs post-receptor determinants', *Vascul Pharmacol*, 59: 152-61.

Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, D. Shinoda, Y. Umeda, M. Uchino, S. Takasaki, and Y. Ozaki. 2009. 'Novel synthetic collagen fibers, poly(PHG), stimulate platelet aggregation through glycoprotein VI', *FEBS Lett*, 583: 81-7.

Jin, J., and S. P. Kunapuli. 1998. 'Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 8070-4.

Jinnai, T., H. Horiuchi, T. Makiyama, J. Tazaki, T. Tada, M. Akao, K. Ono, K.

Hoshino, Y. Naruse, K. Takahashi, H. Watanabe, T. Kita, and T. Kimura. 2009. 'Impact of CYP2C19 polymorphisms on the antiplatelet effect of clopidogrel in an actual clinical setting in Japan', *Circ J*, 73: 1498-503.

Johnson, G. J., L. A. Leis, and P. C. Dunlop. 1993. 'Thromboxane-insensitive dog platelets have impaired activation of phospholipase C due to receptor-linked G protein dysfunction', *J Clin Invest*, 92: 2469-79.

Kanaji, S., T. Kanaji, B. Jacquelin, M. Chang, D. J. Nugent, N. Komatsu, M. Moroi, K. Izuhara, and T. J. Kunicki. 2005. 'Thrombopoietin initiates demethylation-based transcription of GP6 during megakaryocyte differentiation', *Blood*, 105: 3888-92.

Kaneko, M., T. Takafuta, O. Cuyun-Lira, K. Satoh, M. Arai, Y. Yatomi, and Y.

Ozaki. 2005. 'Evaluation of platelet function under high shear condition in

the small-sized collagen bead column', *J Lab Clin Med*, 146: 64-75.

Kawabata, K., K. Tashiro, and H. Mizuguchi. 2010. '[Differentiation of functional cells from iPS cells by efficient gene transfer]', *Yakugaku Zasshi*, 130: 1527-34.

Kitaguchi, T., M. Oya, Y. Wada, T. Tsuboi, and A. Miyawaki. 2013. 'Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells', *Biochem J*, 450: 365-73.

Komatsu, N., M. Kunitama, M. Yamada, T. Hagiwara, T. Kato, H. Miyazaki, M. Eguchi, M. Yamamoto, and Y. Miura. 1996. 'Establishment and characterization of the thrombopoietin-dependent megakaryocytic cell line, UT-7/TPO', *Blood*, 87: 4552-60.

Kruger, J. C., S. H. Meves, K. Kara, A. Mugge, and H. Neubauer. 2014. 'Monitoring ASA and P2Y12-specific platelet inhibition--comparison of conventional (single) and multiple electrode aggregometry', *Scand J Clin Lab Invest*, 74: 568-74.

Lee, D. H., T. E. Warkentin, G. A. Denomme, C. P. Hayward, and J. G. Kelton. 1996. 'A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry', *Br J Haematol*, 95: 724-31.

Liu, E. C., and L. M. Abell. 2006. 'Development and validation of a platelet calcium flux assay using a fluorescent imaging plate reader', *Anal Biochem*, 357: 216-24.

Liu, Z., D. Pudiak, and R. J. Looney. 1994. 'Protein tyrosine phosphorylation triggered by human Fc gamma RII', *Biochem Biophys Res Commun*, 201: 829-34.

Mackie, I. J., R. Jones, and S. J. Machin. 1984. 'Platelet impedance aggregation in whole blood and its inhibition by antiplatelet drugs', *J Clin Pathol*, 37: 874-8.

Marler, J., J. Unzaga, S. Stelts, and C. S. Oliphant. 2015. 'Consequences of treating false positive heparin-induced thrombocytopenia', *J Thromb Thrombolysis*, 40: 512-4.

Mazharian, A., S. G. Thomas, T. S. Dhanjal, C. D. Buckley, and S. P. Watson. 2010. 'Critical role of Src-Syk-PLC γ 2 signaling in megakaryocyte

migration and thrombopoiesis', *Blood*, 116: 793-800.

Mega, J. L., S. L. Close, S. D. Wiviott, L. Shen, R. D. Hockett, J. T. Brandt, J. R. Walker, E. M. Antman, W. Macias, E. Braunwald, and M. S. Sabatine. 2009. 'Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel', *N Engl J Med*, 360: 354-62.

Miyata, S., T. Miyata, A. Kada, and K. Nagatsuka. 2008. '[Aspirin resistance]', *Brain Nerve*, 60: 1357-64.

Nagano, T., S. Ohga, Y. Kishimoto, T. Kimura, K. Yasunaga, M. Adachi, R. Ryo, and T. Sato. 1992. 'Ultrastructural analysis of platelet-like particles from a human megakaryocytic leukemia cell line (CMK 11-5)', *Int J Hematol*, 56: 67-78.

Nakamura, T., K. Kurokawa, E. Kiyokawa, and M. Matsuda. 2006. 'Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes', *Methods Enzymol*, 406: 315-32.

Nakamura, T., and M. Matsuda. 2009. 'In vivo imaging of signal transduction cascades with probes based on Forster Resonance Energy Transfer (FRET)', *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 14: Unit 14 10.

Offermanns, S. 2006. 'Activation of platelet function through G protein-coupled receptors', *Circ Res*, 99: 1293-304.

Ohmori, T., Y. Yatomi, T. Nonaka, Y. Kobayashi, S. Madoiwa, J. Mimuro, Y. Ozaki, and Y. Sakata. 2006. 'Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients', *J Thromb Haemost*, 4: 1271-8.

Podda, G., E. A. Femia, and M. Cattaneo. 2016. 'Current and emerging approaches for evaluating platelet disorders', *Int J Lab Hematol*, 38 Suppl 1: 50-8.

Poenie, M., and R. Tsien. 1986. 'Fura-2: a powerful new tool for measuring and imaging [Ca²⁺]_i in single cells', *Prog Clin Biol Res*, 210: 53-6.

Price, M. J., P. B. Berger, P. S. Teirstein, J. F. Tanguay, D. J. Angiolillo, D. Spriggs, S. Puri, M. Robbins, K. N. Garratt, O. F. Bertrand, M. E. Stillabower, J. R. Aragon, D. E. Kandzari, C. T. Stinis, M. S. Lee, S. V. Manoukian, C. P. Cannon, N. J. Schork, E. J. Topol, and Gravitas

- Investigators. 2011. 'Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial', *JAMA*, 305: 1097-105.
- Sammaritano, L. R. 2019. 'Antiphospholipid syndrome', *Best Pract Res Clin Rheumatol*: 101463.
- Santos, T. D. S., A. L. Ieque, H. C. de Carvalho, A. M. Sell, M. V. C. Lonardoni, I. G. Demarchi, Q. A. de Lima Neto, and J. J. V. Teixeira. 2017. 'Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis', *J Reprod Immunol*, 123: 78-87.
- Selleng, K., T. E. Warkentin, and A. Greinacher. 2007. 'Heparin-induced thrombocytopenia in intensive care patients', *Crit Care Med*, 35: 1165-76.
- Shattil, S. J., J. A. Hoxie, M. Cunningham, and L. F. Brass. 1985. 'Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation', *J Biol Chem*, 260: 11107-14.
- Sugimoto, N., and K. Eto. 2017. 'Platelet production from induced pluripotent stem cells', *J Thromb Haemost*, 15: 1717-27.
- Tagarakis, G. I. 2010. 'Ticagrelor and prasugrel: two novel, most-promising antiplatelet agents', *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 5: 208-11.
- Tomoda, H. 2009. 'Ticagrelor versus clopidogrel in acute coronary syndromes', *N Engl J Med*, 361: 2385; author reply 87-8.
- Trenk, D., G. W. Stone, M. Gawaz, A. Kastrati, D. J. Angiolillo, U. Muller, G. Richardt, J. A. Jakubowski, and F. J. Neumann. 2012. 'A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study', *J Am Coll Cardiol*, 59: 2159-64.
- Vane, J. R., and R. M. Botting. 2003. 'The mechanism of action of aspirin', *Thromb Res*, 110: 255-8.
- Varga-Szabo, D., A. Braun, and B. Nieswandt. 2009. 'Calcium signaling in platelets', *J Thromb Haemost*, 7: 1057-66.
- Warkentin, T. E., D. M. Arnold, I. Nazi, and J. G. Kelton. 2015. 'The platelet

serotonin-release assay', *Am J Hematol*, 90: 564-72.

Yano, Y., T. Ohmori, S. Hoshide, S. Madoiwa, K. Yamamoto, T. Katsuki, T. Mitsuhashi, J. Mimuro, K. Shimada, K. Kario, and Y. Sakata. 2008.

'Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in patients on dual antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad', *Eur Heart J*, 29: 1729-38.