

氏名	齊藤洋
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 592 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 古川 雄 祐 (委員) 准教授 大嶺 謙 准教授 出崎 克也

論文内容の要旨

1 研究目的

血小板は止血反応に関与する無核の血球細胞である。血小板の活性化は血栓性疾患の発症において重要なため、生体内の血小板活性化を臨床検査として評価し、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る。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に、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、3) 健常ドナーにより血小板反応性が異なること、が挙げられる。血栓性疾患として重要な病態に、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) が挙げられるが、これらの疾患を検査によって確実に診断する手法もない。そこで、本研究では、血小板前駆細胞である巨核芽球系細胞株の細胞内シグナルを簡便に検知することで、HIT などの血栓性疾患の診断や抗血小板薬のスクリーニングに対して、再現性に優れた評価法の確立を目的とした。

2 研究方法

HIT 抗体 (ヘパリンと血小板第 4 因子に対する抗体) による細胞の活性化を模倣するために、CD32 (Fc γ RIIA) に対する抗体 (IV.3) を添加後に CD32 を IgG F(ab')₂ fragment によりクロスリンクした。膜タンパク質の発現はフローサイトメトリー、アゴニスト添加後のチロシンリン酸化はウエスタンブロット、細胞内カルシウム動員は fura2-AM 前処理後に蛍光プレートリーダーにより測定した。カルシウムプローブである GCaMP6s を CMV、または EF1 α プロモーターの下流に発現するプラスミドを構築し、安定的に遺伝子発現する細胞株を得た。GCaMP6s の蛍光強度の変化を GFP 蛍光として、蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダーで測定した。

3 研究成果

各種血球細胞株 (CMK、MEG-01、UT-7/TPO、Jurkat、K562 細胞) 上の血小板特異抗原、CD32 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。巨核球系細胞株には GPIIb (CD41) の発現を認めたが、その発現は血小板よりも低かった。これらの細胞で CD32 をクロスリンクすると、ヒト血小板と類似し

たチロシンリン酸化反応、カルシウム動員を認めた。巨核球系細胞株では細胞刺激後の CD62P (P-セレクチン) は発現したが、血小板凝集を示す GPIIb/IIIa の活性化は認めなかった。そこで、細胞内カルシウム動員を簡便に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た。高感度カルシウムプローブである GCaMP6s を 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、HEK293 細胞、CMK、MEG-01 細胞に遺伝子導入し、安定発現株を得た。EF1 α プロモーターの下流に GCaMP6s を発現させた場合に、細胞内カルシウム動員に伴う GCaMP6s の蛍光強度変化が認められた。CMK 細胞では、CD32 クロスリンクだけでなく、アデノシン二リン酸 (ADP) やトロンボキサン A₂ アナログである U46619 によるカルシウム動員も検出可能であった。次に、GCaMP6s を発現する CMK 細胞を用いて、トロンボキサン受容体や ADP 受容体 P2Y₁ 特異的阻害薬 (SQ29548、MRS2179) による細胞内カルシウム動員の抑制を検討した。これらの阻害薬の添加により、ADP や U46619 刺激による GCaMP6s の蛍光強度の増強を阻害剤の濃度依存性に抑制した。

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す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、ならびに血小板と類似したシグナル伝達を示した。カルシウム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により、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によって検出可能となった。本細胞株は、抗血小板薬の効果を間接的に知るポテンシャルを有する。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した。本細胞株に血清を添加することで、血中の阻害薬の間接的な検出や、抗血小板薬のハイスループットスクリーニングに用いられる可能性がある。さらに、HIT や APS 患者に存在する血中の血小板活性化物質を検知することで、血栓性疾患の確実な診断法や病態解明への応用も期待される。

5 結論

本研究では、カルシウム蛍光プローブである GCaMP6s 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。血小板と異なり、細胞株は凍結保存が可能、かつ性質も一定なことから、検査系の標準化には優れた方法であると考えられる。このような細胞内カルシウムの検出系は、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評価法への応用が期待される。今後は、本細胞株を用いて、実際の HIT 抗体との反応性を検討する予定である。また、より血小板に性質に近い 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ることで、さらにより検出系の構築も目指したい。

論文審査の結果の要旨

血小板機能検査は血栓症の基礎疾患の鑑別や抗血小板薬の効果判定などに必要な検査であるが、検査のたびに健常ドナーから血小板を採取しなくてはならず、簡便性や再現性に問題がある。こ

の点を克服するため、申請者らは血小板機能の測定に使用することが可能な細胞株の樹立を試みた。

細胞表面の CD32 を cross-link した際に血小板と類似したチロシンリン酸化と細胞内カルシウム動員が認められる細胞株をスクリーニングし、巨核球性白血病細胞株 CMK を選定した。CMK 細胞にカルシウム蛍光プローブ GcaMP6s を導入し、安定細胞株を樹立した。この細胞は CD32 cross-link、ADP、TXA2 など複数の血小板アゴニストに反応して細胞内カルシウムの動員を認めた。さらにトロンボキサンや ADP の受容体に対する特異的阻害剤の効果を定量することが出来た。

本研究で樹立された細胞株は血小板検査において新鮮血小板に代って使用することが可能で、検査の標準化に資すると期待される。これまでに類似の系の開発は行われておらず、独創性の高い研究である。英文論文はすでに査読付きの英文国際誌 *International Journal of Hematology* に投稿されており、近々刊行の予定である。学位論文も卒業論文として十分な質を有していると考えられ、血小板のシグナル伝達に関するシエーマと健康ドナーからの血小板採取に関する倫理的配慮についての記載の追加をもって合格とした。

最終試験の結果の要旨

申請者はほぼ学位論文のとおりにより発表を行った。発表は明快で、時間も厳守された。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査員からは、血小板の活性化を細胞内カルシウム動員で測定することの妥当性と技術的 pitfall に関する質問がされたが、申請者はいずれの質問に対しても的確に返答し、有意義な discussion が行われた。

発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。