

学位論文題名

Attenuation of Hypothermia-Induced Platelet Activation
and Platelet Adhesion to Artificial Surfaces in Vitro
by Modification of Hemoglobin to Carry S-Nitric Oxide
and Polyethylene Glycol

(S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させた
ヘモグロビンは低体温により誘導される血小板活性化と
血小板の人工材料表面への粘着を抑制する)

学位論文内容の要旨

血小板の粘着や凝集による血栓形成は、不安定狭心症や急性心筋梗塞などの急性冠症候群や脳梗塞の発生機序に深く関与する。また、血小板は代用臓器や人工臓器の人工材料表面と接触して刺激され粘着・凝集反応を起こす。血栓形成の初期過程に接着分子を介した血管内皮、血小板、白血球等の細胞間相互作用が重要な役割を果たしている。例えば、血小板 β_3 インテグリンであるIib/IIIaは活性化血小板において構造が変化し、フィブリノゲン結合部位が発現し、その結果血小板同士が結合する。Iib/IIIaに対するモノクローナル抗体(7E3)は急性冠症候群の血小板血栓の予防に極めて有効である。これは血栓形成過程に細胞接着機構が極めて重要であることを示唆する。一方、細胞接着分子の一つであるP-セレクトインは血小板の α 顆粒や血管内皮細胞のWeibel-Palade小体の顆粒膜に存在する膜糖蛋白で、血小板がトロンビンや活性酸素の刺激により活性化されると速やかに細胞表面に発現し、白血球膜上のSialyl Lewis^x糖鎖をリガンドとして接着能を発揮する。従って、Iib/IIIaやP-セレクトインは血小板活性化のマーカーとしても使用されている。

一酸化窒素(nitric oxide, NO)は血小板のguanylate cyclaseを活性化させ、細胞質内cGMP濃度を上昇させて血小板凝集、粘着を抑制する。ヘモグロビン(hemoglobin, Hb)はNOをその分子内に容易にトラップし不活化する結果、血小板の活性化を増強する可能性がある。そこで、本研究では血小板 β_3 インテグリンと細胞接着分子であるP-セレクトインに注目し、Hbが血小板活性化をもたらすかを検討した。また、NO放出能を付加したHb修飾体、分子バリアーとしての作用を持つポリエチレングリコール(polyethylene glycol, PEG)を付加したHb修飾体、その両方を付加したHb修飾体は血小板活性化作用がより少ないかについても検討した。さらに、ガラス板、コラーゲンを

コーティングしたガラス板への血小板の粘着・凝集に対する Hb とその修飾体の影響も検討した。Hb としてヒトまたはウシ赤血球より Hb を抽出して膜成分を除去した stroma free Hb を調整し、透析後実験に使用した。健常ヒト多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) を Hb 及びその修飾体とインキュベートした。活性化された血小板表面に発現された P-セレクトリンを、FITC 蛍光標識した抗 P-セレクトリン抗体 (CD62P) とフローサイトメトリを用いて、直接的に活性化血小板を測定した。PAC-1 は GPIIb/IIIa に対するモノクローナル抗体で、静止状態の GPIIb/IIIa にはほとんど結合せず、活性化された GPIIb/IIIa にのみ結合する。すなわち、構造変化を受けた GPIIb/IIIa 上のフィブリノゲン結合部位を認識する。PAC-1 もフローサイトメトリを用いて活性化血小板を直接的に測定した。ガラス板に対する血小板の粘着・凝集の測定には、ガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に Hb またはその修飾体を塗布、乾燥させた後、健常ヒト PRP を加えガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の粘着及び凝集を顕微鏡で観察した。イメージはコンピュータに保存し、画像解析装置により定量評価した。倫理面へ配慮のため研究の重要性を説明し、また静脈採血に伴う危険性も説明し理解を得て、インフォームドコンセントを得た後、健常人から静脈採血を行った。

フローサイトメトリでは体温を想定した 37°C に比較して低体温を想定した 22°C で血小板への CD62P および PAC-1 の結合が増大していた。以下、低体温を想定して実験は 22°C で行った。対照群に比較して、Hb 投与群で血小板への CD62P と PAC-1 の結合が亢進した。SNOHb 投与群、PEGHb 投与群、SNO-PEGHb 投与群では CD62P と PAC-1 の結合の上昇は Hb 投与群に比べ軽度であった。ガラス板及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の粘着についてみると、Hb は有意に血小板の粘着及び凝集を抑制した。また、SNOHb、PEGHb、SNO-PEGHb では Hb よりもその効果が大きかった。

体温を想定した 37°C に比較して低体温を想定した 22°C で血小板の活性化が増大していた。また、Hb 投与により血小板機能に変化することが示唆された。Hb の影響を十分に把握するためにフローサイトメトリを用いた評価系が有効であった。血栓周囲ではトロンビンが活性化されており、また糖尿病では酸化ストレスが増大し、活性酸素が豊富に存在する。トロンビンおよび活性酸素は血小板を活性化させる。したがって、Hb 修飾体を人工赤血球として用いた場合、血栓形成素因、糖尿病、または有意な冠動脈狭窄が存在する場合には Hb がもたらす血小板活性化は、急性冠症候群を誘導する可能性が考えられる。酸素運搬体の適応は健常人のみならず種々の病態生理下で使用されることを念頭に置いて、各種病態モデルでの検討が重要であることが示された。血小板活性化を抑制することは Hb のもたらす副作用を軽減する可能性がある。NO 放出能を付加した Hb 修飾体は NO の血小板に対する好ましい抑制作用により、分子バリアーとしての作用を持つ PEG を付加した Hb 修飾体では PEG の分子バリアー効果により無修飾 Hb に比較して血小板に対する好ましくない作用が少ないと考えられる。更に、その両方を付加した Hb 修飾体は血小板活性化作用がより少ないと考えられた。また、ガ

ラス板、コラーゲンをコーティングしたガラス板への血小板の接着に対する修飾 Hb の影響も顕著であったことから、修飾 Hb は血管内ステント、心臓外科手術における体外循環サーキット、あるいは人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性が大きいことが示された。今後の臨床応用の可能性が大きいことが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 劔 物 修
副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

Attenuation of Hypothermia-Induced Platelet Activation and Platelet Adhesion to Artificial Surfaces in Vitro by Modification of Hemoglobin to Carry S-Nitric Oxide and Polyethylene Glycol

(S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させたヘモグロビンは低体温により誘導される血小板活性化と血小板の人工材料表面への粘着を抑制する)

血小板の粘着・凝集による血栓形成は、急性冠症候群や脳梗塞の発生に関与する。また、血小板は代用臓器の人工材料表面と接触して刺激され粘着・凝集を起こす。一酸化窒素(nitric oxide, NO)は血小板の guanylate cyclase を活性化させ、細胞質内 cGMP 濃度を上昇させて血小板凝集・粘着を抑制する。ヘモグロビン(hemoglobin, Hb)は NO をトラップし不活化する結果、血小板の活性化を増強する可能性がある。そこで、NO 放出能を付加した Hb 修飾体(SNOHb)、分子バリアーとしての作用を持つポリエチレングリコール(polyethylene glycol, PEG)を付加した Hb 修飾体(PEGHb)、その両方を付加した Hb 修飾体(SNO-PEGHb)は血小板活性化作用が Hb に比べより少ないかを検討した。Hb としてヒトまたはウシ赤血球より Hb を抽出して膜成分を除去した stroma free Hb を調整し、透析後使用した。健常ヒト多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP)を Hb 及びその修飾体とインキュベートした。活性化血小板表面に発現された P-セレクチンを抗 P-セレクチン抗体を用いて、また活性化された GPIIb/IIIa を、構造変化を受けた GPIIb/IIIa 上のフィブリノゲン結合部位を認識する抗体を用いて、各々フローサイトメトリを用いて測定した。人工材料表面への血小板の粘着・凝集に対する Hb とその修飾体の影響は、ガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に Hb またはその修飾体を塗布、乾燥させた後、PRP を加え、血小板の粘着・凝集を顕微鏡で観察した。体温を想定した37°C に比較して低体温を想定した22°C で血小板の P-セレクチンおよび活性化された GPIIb/IIIa の発現が増大していた。以下、低体温を想定して実験は22°C

で行った。Hb により血小板の P-セレクチンおよび活性化された GPIIb/IIIa の発現が亢進した。Hb に比べ SNOHb、PEGHb、SNO-PEGHb 投与群では P-セレクチンおよび活性化された GPIIb/IIIa の発現は軽度であった。Hb はガラス板及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の粘着・凝集を有意に抑制した。また Hb よりも、SNOHb、PEGHb、SNO-PEGHb は血小板の粘着・凝集抑制効果が大きかった。低体温を想定した 22°C では体温を想定した 37°C に比較して血小板の活性化が増大していた。また、Hb 投与により血小板機能に変化することが示唆された。NO 放出能を付加した Hb は NO の血小板に対する好ましい抑制作用により、分子バリアーとしての作用を持つ PEG を付加した Hb は PEG の分子バリアー効果により無修飾 Hb に比較して血小板に対する好ましくない作用が少ないと考えられた。Hb 修飾体を人工赤血球として用いた場合、血栓形成素因、糖尿病、または有意な動脈狭窄が存在する場合には Hb がもたらす血小板活性化は、急性血栓症を誘導する可能性があるため、NO や PEG を付加した Hb は血小板活性化作用がより少ないと考えられた。また、人工材料表面への血小板の接着に対する修飾 Hb の影響も顕著であったことから、修飾 Hb は酸素運搬体としての機能のみならず、血管内ステント、心臓外科手術における体外循環サーキット、あるいは人工血管などの人工材料表面のコーティング等に臨床応用出来る可能性が大きいことが示された。口頭発表に際し、安田教授から低体温での血小板活性化の機序、人工酸素運搬体のこれからの開発の方向について質問がなされた。北畠教授からパーフルオロカーボンに比べた Hb 修飾体の特徴と病態に応じた使い分けについて質問がなされた。剣物教授から低体温麻酔における血液凝固系の変化の特徴と本研究で得られたデータの整合性、Hb 修飾体の生体適合性や組織毒性、NO を放出する事による循環制御に対する功罪について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去のデータや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文は *Thrombosis Research* 誌に掲載され国内外で高く評価され、今後この論文で得られた結果は人工材料表面のコーティング、人工酸素運搬体の副作用の軽減、臓器虚血の新たな治療法の開発などに貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。