

ヘパリン起因性血小板減少症に対する新規診断法の開発

大森 司

自治医科大学医学部 生化学講座 病態生化学部門

【研究の背景】

ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)は、ヘパリンを使用中にヘパリンと血小板第 4 因子(PF4)との複合体に対して生じた抗体(HIT 抗体)が血小板を活性化し、血栓による消費性の血小板減少症をきたす疾患である。免疫学的測定による HIT 抗体の検出は偽陽性が多く、診断確定には用いられない。血小板凝集・セロトニン放出を利用した機能的アッセイも感度に問題がある¹⁾。

【目 的】

実臨床において HIT を確実に診断するための新たな検査手法の開発を目的とする。

【方 法】

- 1) カルシウムセンサーを発現する細胞のクローニング:CMV、または EF1 α プロモーターで GCaMP6 を発現するプラスミドを作製し、これを巨核芽球系培養細胞である CMK にトランスフェクションした。薬剤選択の後に複数のクローンから高発現が得られているクローンを選び出した。
- 2) CMK 細胞の評価:Fc γ RIIA に対するモノクローナル抗体(IV.3)を用いて CMK 上の Fc γ RIIA をクロスリンクする刺激をリファレンス刺激として、細胞内カルシウムを Fura2 で測定した。また、クローニングした細胞株での GCaMP6 蛍光強度の変化を測定し、さらに反応性のよいクローンを選び出した。

【結 果】

まず、血小板と類似のシグナリングカスケードを持つ細胞株を選定するため、種々の細胞における CD32 受容体刺激に対する反応性を評価した。IV.3 mAb と IgG F(ab')₂ fragment により CD32 をクロスリンクすると、CMK 細胞ではヒト血小板と同様、それぞれ PLC γ 、Syk、CD32 のチロシンリン酸化を示す約 140, 75, 40kbp の一過性チロシンリン酸化を認めた。同チロシンリン酸化反応は Jurkat 細胞株や K562 細胞株では見られなかった。また、カルシウム感受性蛍光試薬 Fura2-AM 蛍光強度比を用いた細胞内カルシウム動員の測定では、CMK 細胞株ではヒト血小板と同様細胞内カルシウム動員を認めた。以上により、CMK 細胞の CD32 シグナリングはヒト血小板と類似していると考えられた。

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、GCaMP6s という高感度カルシウムセンサーに着目した。GCaMP6s は細胞内カルシウム動員を GCaMP6s 蛍光強度 (励起波長/蛍光波長 485/510 nm) で定量可能である。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、CMK 細胞に GCaMP6s の遺伝子導入を行った。イオノマイシン刺激による GCaMP6s の蛍光変化は EF1 α プロモーターでは高感度に認められるが、CMV プロモーターの場合には刺激による変化は認めなかった。次に、この細胞株を種々のアゴニストで刺激を行い、GCaMP6s の蛍光変化を測定した。ADP、U46619、CD32 クロスリンク刺激では、刺激後の GCaMP6s の蛍光変化を認めた。以上より、ADP、トロンボキサン、CD32 クロスリンクに反応し、カルシウム動員が簡便に観察できる細胞株が樹立できた。アゴニスト刺激が受容体を介した反応かどうかを確認するために受容体アンタゴニストによる阻害が生じるかを検討した。GCaMP6s 発現 CMK 細胞を TP 受容体の特異的阻害剤は濃度依存性に、トロンボキサンアナログ U46619 による GCaMP6s の蛍光増加を

抑制した。同様に、ADP 受容体 P2Y₁ の特異的阻害剤も、濃度依存性に、ADP 刺激による反応を抑制した。プレリミナリーではあるが、HIT 抗体とヘパリン同時添加による GCaMP6s の蛍光変化は認めなかった。

【考 察】

今回我々は血小板活性化シグナルを検出する巨核球系細胞株の樹立に成功した。本細胞は血小板活性化のシグナリングの大半が通過する細胞内カルシウム動員を、蛍光プレートリーダーを用いて検出可能である。従って、血小板機能評価や血小板活性化を伴う疾患の検査において、健常ドナーからの採血という煩雑さを軽減できる可能性がある。また、細胞株を用いることで、標準化された検査を実現できる可能性がある。これまでも、カルシウム指示蛍光試薬をロードし、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。しかし、この方法では経過時間に伴う蛍光の退色により、常に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る²⁾。さらに、エンドポイントである細胞株が発する蛍光強度を測定することで、検査者の熟練を要さない。そして、蛍光プレートリーダーによる検査であるので、比較的小規模の施設にも導入できる可能性が高い。本研究のさらなる発展により、血小板活性化を伴う疾患の簡便で迅速、正確な診断とこれに伴う適正な治療に結びつくと考えられる。今回、HIT 抗体とヘパリンとの同時添加によるカルシウム動員については血小板ほどの上昇を認めなかったが、現在のところ 1 つのモノクローナル抗体を用いたのみであり、今後、HIT 抗体との反応性をさらに検討していきたい。本研究の主な結果は、日本血液学会学術集会において報告した³⁾。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本細胞株は前処置なしに血小板活性化を模倣することができることから、抗血小板薬スクリーニングへの応用が期待される。特に、二次的な血小板活性化物質であるトロンボキサンや ADP への反応性が認められることは大きい。また、インディケータを cAMP の感知、などに変えることにより、他の血小板活性化シグナルの検出にも応用可能である。今後、更に検討を行い HIT や APS の診断や薬剤スクリーニングなどに応用したい。

【参考・引用文献】

- 1) Favaloro, E. J., McCaughan, G. & Pasalic, L. Clinical and laboratory diagnosis of heparin induced thrombocytopenia: an update. *Pathology* 49, 346–355, 2017.
- 2) Liu, E. C. & Abell, L. M. Development and validation of a platelet calcium flux assay using a fluorescent imaging plate reader. *Anal Biochem* 357, 216–224, 2006.
- 3) Saito, H., Yasumoto, A., Yatomi, Y., & Ohmori, T. Establishment of a megakaryoblastic cell line to conventionally assess platelet calcium signaling. *Rinsyo Ketsueki* 58, 429, 2017 (abstract).