

## 血小板活性化機構

小田 淳

**要 旨：**血小板活性化は，動脈系正常止血においても病的血栓症においても，高ずり応力下における，内皮下組織の血流への暴露からはじまる。高ずり応力下で，血小板と内皮下組織の一過性結合(tethering)は von Willebrand 因子(vWF)と血小板膜糖タンパク(GP)Ib-IX 複合体によって媒介される。その後の，血小板活性化と血栓形成機構は極めて複雑であるが，本稿は，この最初のイベントから，血小板の完全な活性化に至るかをごく簡単に紹介する。(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 283-286)

**Key words:** tethering, kindlin3, integrin, adenosine diphosphate (ADP), thromboxane A<sub>2</sub>

### 緒 言

#### 脈管学における血小板活性化の知識の重要性

心筋梗塞，脳梗塞，末梢動脈閉塞などの様々な病的血栓症の予防法と治療法の開発が脈管学の主要目標の一つである。心原性脳塞栓症を除く病的血栓症の2次予防において，抗血小板薬は中心的役割を担っている。抗血小板薬は，血小板活性化を抑制することによって作用する。したがって，毎年，抗血小板薬の大規模第3相臨床試験の結果報告がいくつもあるが，それらの理解のためには血小板活性化の理解が必須である。代表的抗血小板薬アスピリンおよびクロピドグレル服用時に，抗血小板効果が患者間で多様性があることは，広く認知され，その効果は，血小板機能検査により検出されるが，これを理解するためにも，血小板活性化と血栓の関連性の知識は必須である。さらに，抗血小板薬の効果は限定的であるから，より効果的抗血小板薬の研究開発が進行中であり，抗血小板の新規標的を検討するうえでも血小板活性化の知識は欠かせない。

本稿は，脈管学に重要な血小板活性化に関する，最新の成果に基づく概説である。しかし，血小板活性化機構は極めて複雑であり，とても本稿だけでは説明しきれない。本序文および本文を参考に血小板活性化の知識

を深める契機となれば幸いである。

#### 動脈止血および血栓形成の初期における血小板活性化の引き金—tetheringの重要性

正常動脈止血では外傷時，また，心筋梗塞の約7割はプラークの破綻が原因とされるが，どちらでも血管内皮下組織が血流に露出する。この場合，止血および病的血栓止血形成初期で決定的な役割を果たすのは高ずり応力である。高ずり応力とは流速の違う集団に属する物質間にかかり，歪ませ，引きちぎろうとする力であり工学的にはせん断応力と呼ばれる。アデノシン2リン酸(ADP)やトロンボキササンA<sub>2</sub>などの代表的低分子血小板活性化物質は，血中における寿命自体も短い血流速度の極めて高い動脈形成血栓初期には，希釈効果も加わり血小板周囲に長時間保持されない。一方，逆に，高ずり応力によって惹起されるのが，von Willebrand 因子(vWF)と血小板膜糖タンパク(GP)Ib-IX 複合体の結合である<sup>1,2)</sup>。vWFはコラーゲンなどを介して内皮下組織に結合できるので，この結合により，血流中の血小板が内皮下組織と接触して，移動速度が低下することがtetheringである<sup>3)</sup>。これは繋ぎ止めるという意味であり，わが国でも，このまま使用されている。このtetheringは遺伝子改変マウスや阻害剤の検討から，GPIb-IX 複合体依存性である。一

方、vWF に対する依存性は完全ではない。GPIb-IX 複合体にはトロンビンやトロンボスポンディン I (TSP1) など多くの vWF 以外のリガンドがある。すなわち、tethering には同定されていない vWF 以外の GPIb-IX 複合体リガンドも関与するが、TSP1 がそれであるという説は最近否定的である。この tethering とは、具体的には、血小板と内皮下組織の一過性結合の繰り返しである。この時、血小板側から tether と呼ばれる突起が出てきて、その先端が内皮下に接触する。血小板本体自体は円盤状の形態を保ったまま(つまり古典的な意味では活性化していない!)、流血中で自由度を保っており、このため、接触部位より下流に血小板が配置すれば、tether に大きな力が加わり、結合力を上回れば、血小板が内皮下組織から離れることになる<sup>3)</sup>。この tethering による血小板移動速度低下によって、血小板はインテグリンなども介して vWF やコラーゲンなどと、より強固な結合ができるようになる。この際に、インテグリンや GPVI、さらに両者に結合する(たとえば GPVI は Fc 受容体  $\gamma$  鎖と結合)様々な膜糖タンパク、細胞質シグナル分子を介して、血小板を活性化させる<sup>4)</sup>。膜糖タンパクの中で最近注目されているのは、血小板上のリガンドは不明であるが C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) である<sup>4,5)</sup>。GPVI と CLEC-2 は、細胞内ドメイン中に前者は 2 個、後者は 1 個の receptor-associated immunoreceptor tyrosine activation motif (ITAM) を有しており、このモチーフと src や syk などのチロシンリン酸化酵素依存性に、activated T cells (LAT) や Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76) などのチロシンリン酸化を介して phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) や phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) を活性化し、顆粒放出、トロンボキサン A<sub>2</sub> 産生および放出、インテグリン(その中でもとくに  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のコピー数が圧倒的に多い)のリガンド親和性上昇などを惹起して、血小板を強く活性化する。トロンボキサン A<sub>2</sub>、顆粒から放出された ADP さらにトロンビンなどは、7 回膜貫通型受容体と 3 量体 G タンパクを介して PLC  $\beta$  や rho キナーゼなどを活性化させ、血小板活性化のポジティブフィードバックに大きく寄与する。また、GPIb-IX 複合体依存性シグナルに phospholipase D が重要であることが、最近の遺伝子改変マウスの検討結果から示唆されている<sup>6)</sup>。

## Tethering の詳細な解析結果から見えてきた、 血小板活性化非依存性凝集

前項の、tethering に始まる血小板活性化および血栓形成モデルは、関心のある多くに研究者に一般的に受け入れられている。さらに、2009 年に Nesbitt らにより、この tethering の意義を深化する報告がなされた<sup>7)</sup>、すなわち、血栓形成はずり応力の勾配に大きく左右され、血小板球状化などの関与しない、tethering による血小板血栓形成がなされるという。この際、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 とその outside-in シグナルは重要な役割を果たしており、先に述べたようにこのシグナルが注目される理由の一つである。この tethering による血小板血栓形成は、わが国で使用されていない  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 アンタゴニストのほかにわが国でも末梢血管閉塞症などでその誘導体などが使用されるプラスタグランディン (PG)E<sub>1</sub> などでは抑制される。それ以外のトロンボキサン A<sub>2</sub> 合成や ADP 拮抗作用を抑制する薬物では阻害されない。しかし、後者の経路を遮断すると、tethering による血小板血栓形成は、ずり応力勾配消失に伴いすっかり乖離する。したがって、形態変化を伴うような、古典的血小板活性化は、血小板血栓の安定化および成長の過程に関与することが示唆されている。

### 「古典的」血小板の活性化

血小板の活性化に話を戻す。血小板活性化時、インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のフィブリノーゲンに代表されるリガンドへの親和性 (inside-out シグナルと呼ばれる) が上昇し、リガンドが伸立ちして、血小板凝集が起きる。この凝集した、血小板上にもフィブリノーゲンや vWF などが存在するから、tethering などを介して流血中の血小板がさらに動員され、血栓が形成されるようになる。そのうえ、一部の血小板では細胞膜の内側から酸性リン脂質が表面に出現する。この局面こそ凝固因子を濃縮し、トロンビン形成の場の一つである。ADP やトロンボキサン A<sub>2</sub> さらにトロンビンなどは血小板凝集を起こさないような、低濃度でも、血小板を球状化させるのである。周知のように、アスピリンはトロンボキサン A<sub>2</sub> 合成を阻害し、チエノピリジン系の抗血小板薬の標的は ADP 受容体の一つ P2Y<sub>12</sub> である。この両者には tethering などを阻害する効果はなく、その後の血小板活性化を阻害する薬物であることも首肯いただけよう。ちなみに、インテグリンにリガンドが結合して生じる、シグナルは先の inside-

out シグナルと逆に outside-in シグナルと呼ばれる。このシグナルは血小板の伸展や血小板血栓の安定化に重要である。 $\alpha$ IIB $\beta$ 3 の場合、その主要イベントの一つに  $\beta$ 3 の細胞質ドメインのチロシンリン酸化がある。ごく最近、筆者らも、参加した共同研究により、細胞内アダプタータンパク LNK がこのリン酸化に関与し、血栓形成に重要な役割を果たすことが報告されている<sup>8)</sup>。また、CD40 ligand も  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 と結合し、outside-in シグナルに重要であるという報告がある<sup>9)</sup>。

### インテグリン $\alpha$ IIB $\beta$ 3 のリガンド親和性上昇機構

血小板活性化時にどのように  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 (コピー数は少ないが  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 も同様) のリガンド親和性上昇には、低分子量 G タンパク Rap1b が関与する。PLC $\gamma$ 2 や PLC $\beta$  の活性化後に Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor I (CalDAG-GEF1) の作用により、Rap1b がグアノシン三リン酸 (GTP) 型になり、Rap1-interacting adaptor molecule (RIAM) のタリンへの結合、さらにタリンのインテグリン  $\beta$  鎖 ( $\beta$ 3 および  $\beta$ 1 など) への結合が起きる。このタリンとインテグリン  $\beta$  鎖の結合こそはインテグリンのリガンド親和性上昇に決定的である<sup>10)</sup>。しかし、全く別のタンパク kindlin3 の遺伝的変異患者やノックアウトマウスの解析から、タリンとインテグリン  $\beta$  鎖の結合だけでは、インテグリンのリガンド親和性上昇に不十分で、kindlin3 も必須の役割を果たしていることが明らかになっている<sup>11)</sup>。なお、Rap1b の GTP 型への変換早期は CalDAG-GEF1 が、また ADP の P2Y<sub>12</sub> を介したシグナルが持続的変換に関与することが知られている (ただし、CalDAG-GEF1 は持続的変換にも関与するらしい)。

### インテグリン $\alpha$ IIB $\beta$ 3 のリガンド親和性上昇で 終わりか？

実は、インテグリン  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 のリガンド親和性により形成される血小板血栓は実に脆いものであると考えられている。もちろん、outside-in シグナルなどは、これを補強する重要な経路であるが、やはり遺伝子改変マウスの知見を中心にして、血栓の安定化にインテグリン以外の ESAM や EphrinB1 および EphA4/B1 など、数多くの分子が関与すること知られている<sup>12)</sup>。

## 血小板活性化と血小板機能検査

一般的透光度法の凝集計においては、通常は攪拌により乱流が生じて、ごくわずかな、ずり応力存在下で、生理的には存在しないような高濃度の血小板活性化物質を加えて、通常はフィブリノーゲンと  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 のみが関与する凝集を観察するのである。したがって、このような検査は、かなり極端な条件下で、血小板活性化の一側面を検討してきたものと考えざるを得ない。とても、数多くある検査の問題点を指摘する紙面がないが、一般に、透光度法に限らず、血小板機能検査は動脈血栓形成と著しく離れているのである。

### 血小板の代表的活性化抑制経路

7 回膜貫通型受容体と 3 量体 G タンパクは血小板活性化抑制経路にも関与しており、代表的なものはプロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>) やアデノシン受容体などである。これらは、細胞内環状アデノシン一リン酸 (cAMP) 濃度の上昇により血小板の活性化を阻害する。また、一酸化窒素 (NO) は可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化して、環状グアノシン一リン酸 (cGMP) の細胞内濃度を上昇させ血小板の活性化を抑制する。プレタールやジピリダモールなどの抗血小板薬の主要作用機序の一つは、それぞれ cAMP、cGMP の分解を阻害して、この抑制経路を増強することにある。

## 結 語

血小板活性化は、顆粒放出やインテグリンのリガンド親和性 (inside-out シグナル) に関与することが知られている。その一方で、活性化を必ずしも伴わない tethering は、少なくとも一過性の血小板血栓は形成可能であることが強く示唆され、なぜ、抗血小板薬の効果が限定的であり、いかに血小板機能検査が血栓形成と懸け離れているかという本質的な問題を考えるうえに重要な話題である。冒頭に述べたように、本稿などは血小板活性化機構のごく簡単な紹介にすぎず、数多くの話題を割愛せざるを得なかった。本稿を参考に、読者が血小板活性化に関心を寄せていただけることを強く希望するものである。

## 文 献

- 1) Ikeda Y, Handa M, Kawano K, et al: The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under

- varying shear stress. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1234–1240
- 2) Bergmeier W, Chauhan AK, Wagner DD: Glycoprotein Ib $\alpha$  and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thromb Haemost* 2008; **99**: 264–270
  - 3) Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP: Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood* 2002; **99**: 159–167
  - 4) Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY: GPIIb/IIIa and CLEC-2 in haemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2010; **7**: 1456–1467
  - 5) Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, et al: Essential in vivo roles of the c-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem* 2010; **32**: 24494–24507
  - 6) Elvers M, Stegner D, Hagedorn I, et al: Impaired  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 integrin activation and shear-dependent thrombus formation in mice lacking phospholipase D1. *Sci Signal* 2010; **3**: ra1
  - 7) Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ, et al: A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nat Med* 2009; **15**: 665–673
  - 8) Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, et al: Lnk regulates integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J Clin Invest* 2010; **120**: 179–190
  - 9) Prasad KS, Andre P, He M, et al: Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **21**: 12367–12371
  - 10) Lee HS, Lim CJ, Puzon-McLaughlin W, et al: RIAM activates integrins by linking talin to rasGTPase membrane-targeting sequences. *J Biol Chem* 2009; **8**: 5119–5127
  - 11) Malinin NL, Plow EF, Byzova TV: Kindlins in FERM adhesion. *Blood* 2010; **115**: 4011–4017
  - 12) Brass LF, Zhu L, Stalker TJ: Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. *J Clin Invest* 2005; **12**: 3385–3392

## Mechanisms of Platelet Activation

Atsushi Oda

Laboratory of Environmental Biology, Hokkaido University School of Medicine, Hokkaido, Japan

**Key words:** tethering, kindlin3, integrin, adenosine diphosphate (ADP), thromboxane A<sub>2</sub>

Both normal hemostasis and pathological thrombosis in arterial systems are initiated by the exposure of platelets to a subendothelial matrix in the presence of high shear stress. Initially, there is a transient association between the platelets and the matrix via von Willebrand factor and the glycoprotein Ib/IX complex. Subsequently, a very complex turns of events leads to full platelet activation, which is essential for platelet thrombus formation. This review briefly introduces the key events and molecules involved in the development of a platelet plug. (J Jpn Coll Angiol, 2011, **51**: 283–286)