

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

マウス全血中の血小板前駆体の解明

下山 格, 古和田周吾

岩手医科大学医学部, 内科学講座: 血液腫瘍内科分野

(Received on February 9, 2015 & Accepted on February 23, 2015)

要旨

巨核球は proplatelet と呼ばれる細胞突起形成を行い, その先端で血小板の形成・放出を行っている (proplatelet theory) といわれているが, 実際に血小板が巨核球からどのように成熟血小板になっていくかの過程は未だ不明な点が多い. また, 流血中に血小板前駆体と思われる細胞突起が認められたとの報告も殆どない. 我々はクエン酸 Na 採血で 37°C に維持した検体を用いて塗抹標本を作成すると, 紐状の血小板前駆体を認める事が出来た. また, EGFP 陽性マウスの血小板前駆体を *in vitro* で培養させてみ

ると, 経時的に形態を変化させ最終的に分裂・変形するなどの変化を起し, 血小板に成熟していくことが認められた. また, C57BL/6 マウスに EGFP 陽性血小板前駆体を輸血すると, 数時間以内は EGFP 陽性血小板数の増加が認められ, 6 時間ほど維持された. その後ゆっくり減少が認められ, 前駆体が成熟血小板に変化していくことが示唆された. これらの結果から血小板前駆体は分裂能・変形能を有し, 成熟血小板に変化することが強く示唆された.

Key words : proplatelet, EGFP transgenic mice

I. 緒 言

血小板は無核の細胞であり, 止血機能に特化した血液細胞である. 近年その良く知られた生理的役割に加えて, 動脈硬化や血栓性疾患, 免疫や発生などへの関与が明らかとなってきている¹⁾.

哺乳類において, 血小板は骨髓髄質中 (血管外) で造血幹細胞から分化した巨核球より産生される²⁾. 成熟した巨核球は, 骨髓静脈洞の血管壁外側に位置し, 血管壁から血管内に貫通する細胞突起 (proplatelet) を形成する. その proplatelet の先端で突起の放出がおり, 分離しながら血小板産生が行われるといわれており, それが主要な血小板産生様式であるとみなされてきた³⁾. しかし, その血小板前駆体と思われる, 放出された細胞突起から, 成熟血小板が産生されていく過程には, 現在でも多数の疑問が残っている.

この事象が始まる場が骨皮質に囲まれた流血中であることと, proplatelet から放出された血小板前駆体は, 速やかに流血で運ばれて形態的变化を起す事, proplatelet や血小板自体が採血手技で容易に形態を変化しやすい事などの理由から, proplatelet から血小板産生までの過程を生体内で観察する必要があるが, 今まで様々な実験手技的な限界があった.

我々は 2 光子顕微鏡と電子顕微鏡を用いて, 生体内 live imaging でマウス骨髓内の血小板前駆体の産生過程を詳細に検討した⁴⁾. その結果, 成熟血小板の多くは巨核球から円盤形の細胞として放出されるのではなく, 血小板前駆体の放出がなされていた. また, 血小板の必要量に応じて構造が異なる複数の種類の血小板前駆体を使い分けている事を明らかにした. しかしながら, 実際の流血中に血小板前駆体が存在したとの報告は今まで殆ど認められない.

骨髓静脈洞で産生された血小板前駆体は、大静脈から心臓・肺を経て大循環へ至る。これまで、この循環過程の血液中で血小板前駆体の存在を示唆した報告はわずか2例のみである^{5, 6)}。通常我々臨床の現場で行われる採血の手法では、proplatelet様の血小板前駆体は認められず、大型で円盤形の血小板が新生血小板であると考えられてきた。一方、培養巨核球から分離されるproplateletの断片解析によって、血小板前駆体の存在が強く示唆されてきている⁷⁾。これら生体内で産生された血小板前駆体がどのように成熟血小板へと分裂していくのかは、検討された報告がない。

今回我々はマウス全血中に存在するはずの血小板前駆体を同定・分離し、その前駆体の分裂能・変形能について検討した。そして、①血液中には血小板前駆体が存在し、②それらはマウスの循環血液中で成熟血小板へと分裂・変形する能力をもつことを確認した。

II. 研究材料・方法

材料：8週齢のC57BLマウス（オス，日本クレア，東京），及び同系でEGFP遺伝子を β アクチンプロモーターを用いて全身に発現させたマウス（C57BL/6-TgN [beta-act-EGFP] 01Obs）⁸⁾を用いた。このマウスは成熟赤血球以外の血球がEGFPを発現しており，巨核球・血小板系もEGFPを発現する⁴⁾。

1. 全血から血小板前駆体の分離

吸入麻酔下でマウスの心臓あるいは眼窩から全血採血を行った。抗凝固薬にはEDTAを終濃度1.2%，またはクエン酸ナトリウムを終濃度0.3%となる様に添加した。採血直後，室温30分後と1時間後に遠心（ $\times 150g$, 10分）を行い，血小板富血漿（platelet rich plasma：PRP）上層，下層，単核球層（buffy coat：BC）に分注採取をした。それぞれの分画を速やかに塗抹，Wright-Giemsa染色し，形態を評価した。採血時から37°C加温を行い，同様の

評価を行った。

2. 血小板前駆体の培養

1) で分離したEGFP発現マウス由来の血小板富血漿分画1 μ lを0.3%のクエン酸ナトリウムを含むIscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) 3mlに添加して，ガラスボトムdishに入れた。一体型蛍光顕微鏡（BZ-X700，キーエンス，東京）のステージ上に培養装置を取り付け（INUG2, TOKAIHIT, 静岡），培養下（37°C, 20%CO₂）でガラスボトムdish内の血小板前駆体を経時的に撮影した。励起光は最小に設定し，対物レンズは20倍，蛍光フィルターはGFPを用いた。

3. EGFP発現血小板／血小板前駆体輸血と経時的血小板数変化の測定

1の方法で分離したEGFP発現マウス由来のPRP上層とBCを同系のC57/BL6マウス（8週齢オス）の尾静脈注射により輸血を行った。その後経時的に麻酔下で採血を行った。輸血したサンプル，輸血後の採血した全血は，自動血球計算機（pocH-100iV Diff, Sysmex, 神戸）で血球数をカウントした。またPhycoerythrin (PE)ラベルCD61（BD, 東京）で染色を行った後，フローサイトメトリー（FACScantoII, BD, 東京）を用いて，CD61陽性（血小板／血小板前駆体分画）を分離した。その後血小板／血小板前駆体中のEGFP陽性細胞の割合を解析した。それから経時的なEGFP陽性血小板／血小板前駆体の実数を計算し，輸血直後の血小板数を100%として減少率をTurkey Kramer法で求めた。

III. 結果

1. マウス全血中にも骨髓で産生された血小板前駆体は存在する

はじめに，現在世界的な標準採血方法であるEDTAを抗凝固剤として用いた採血での塗抹標本では，これまで広く知られているように，全ての静止期血小板は円盤状形態を示してい

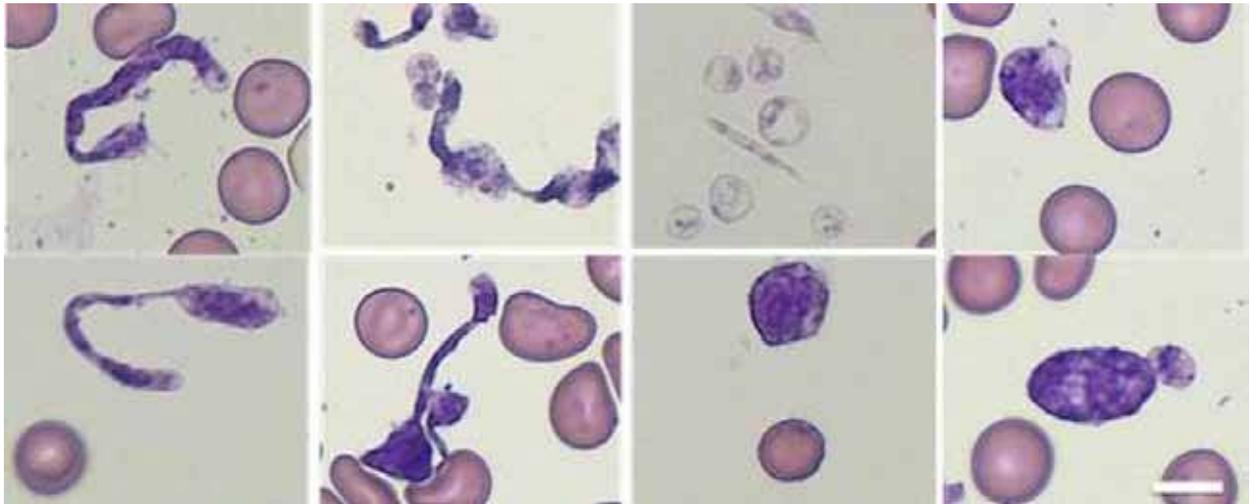


図1. マウス全血の塗抹標本 (Wright-Giemsa 染色).
様々な形態を示す血小板前駆体. スケールバー 5 μ m.

た. 過去の報告ではクエン酸 Na 採血検査で紐上の大きな血小板前駆体が認められており^{5, 6)}, 実際クエン酸 Na 採血を行い, 塗抹標本作成すると, 血小板の半分は円盤型であるが, 残り半分は紐状を含めて, 様々な形態が示された (図1). これは骨髓組織内や培養巨核球で認められる proplatelet (血小板様粒子が数珠状に連なって見える形態) と同様の形態を示した (図1).

また採血後の標本作成時の検討として, 温度と時間が関連している事がわかった. クエン酸 Na での採血であっても, 室温に5分以上静置すると速やかに全ての血小板は円盤の形態へ変化してしまい, 37°C加温した状態では, 血小板の一部が紐上の形態を維持できる事がわかった. そのため, 以後は全て採血後に速やかに37°Cで維持された検体を用いた.

この結果から, 形態的に骨髓の巨核球から放出された紐状の血小板前駆体は全血内に存在する可能性が示唆された. また, 通常の血液検査法では認められない理由は①抗凝固剤, ②標本作成までの時間・温度が関与している事が明らかとなった.

2. 血小板前駆体は分裂能をもつ

全血中に認められた血小板前駆体とおもわれ

る細胞は, 実際に分裂し血小板となる能力があるのか, *in vitro* での実験を行った.

EGFP マウス (血液細胞中白血球と血小板がEGFPを発現) の全血を遠心して, 紐状の血小板前駆体を採取, 蛍光顕微鏡下培養チェンバー内で培養して経時的に撮影した (図2-A, B). 最初複数の粒状の連なりを認める proplatelet 様の形態をした血小板は (図2-B, 0h) その後次第にバーベル型の形態へと変化し (4h58m), しばらくは粒子間にごく細かい細胞質でつながっていたが (4-6h), 最終的には分離し (8-9h), 血小板の形態となった.

この観察から, 1で認められた紐状の血小板前駆体には分裂能があることが示された.

3. 血小板前駆体はマウス生体内で分裂し血小板数を増加させる

血小板前駆体と思われる proplatelet 様血小板は, マウス生体内でも分裂する能力があるのかを調べた.

EGFP マウスの全血を遠心し, PRP 上層と下層, BC の3層に分けた. PRP 上層・下層はともに通常の円形の小型血小板が多いが (図3-A), BC には図1に示す紐状の proplatelet 様の形態をした大型血小板が多く存在している事

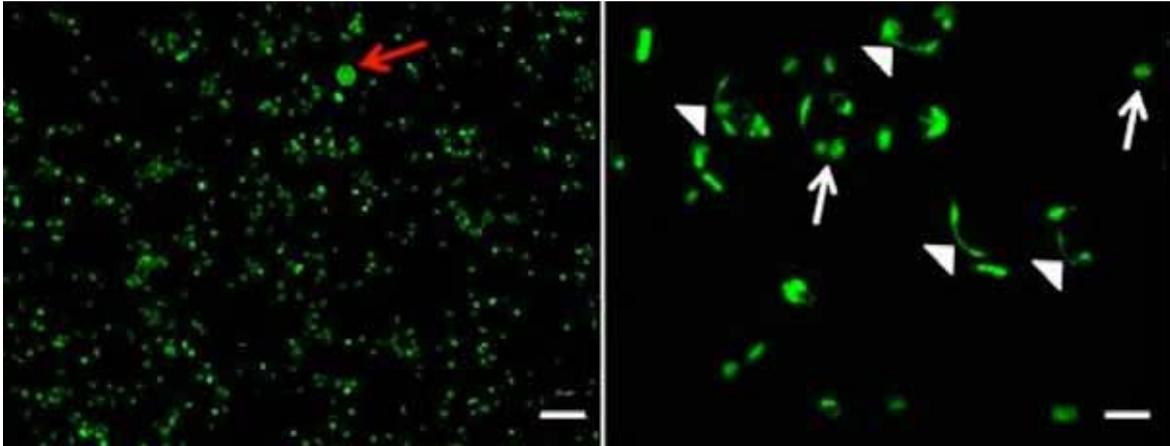


図 2-A. EGFP マウスの富単核球層内の血小板前駆体。
 右図 白矢印：円盤形の血小板. 白矢頭：proplatelet 様形態. スケールバー 5 μ m.
 左図 赤矢印：白血球. スケールバー 20 μ m.

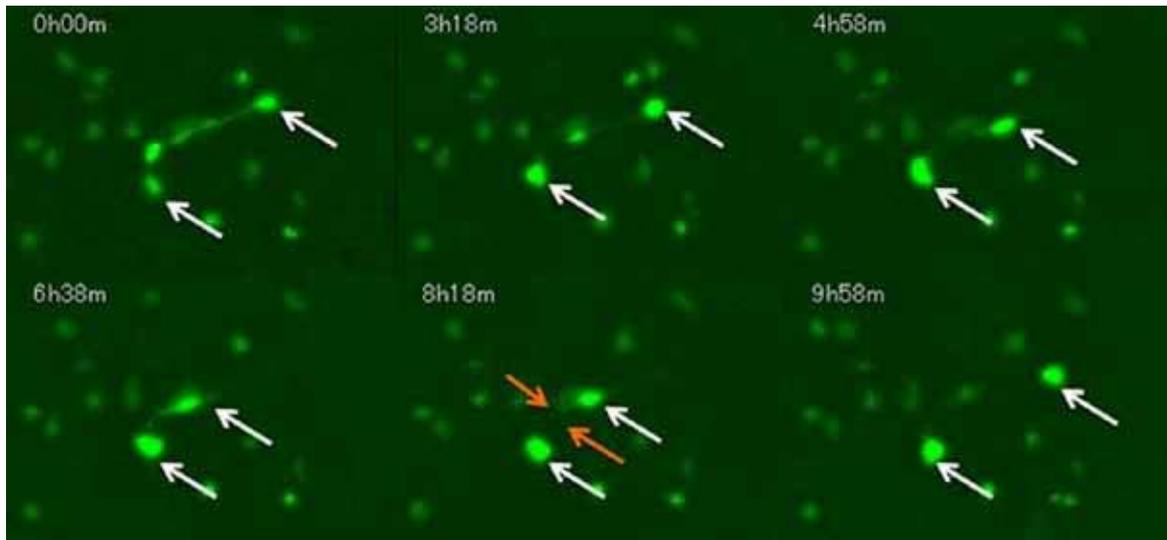


図 2-B. EGFP マウス全血から分離した血小板前駆体の経時的変化。
 1 時間後, 数珠状の proplatelet 様形態が認められる. 3 時間後, 連結部の紐は次第に細くなり,
 4 時間後にはバーベル状の形態となる. 6 時間後には連結部が一旦短くなり, 8 時間後に中央で
 分離する. そして 9 時間後, 最終的に 2 つの大型の血小板となった. 白矢印は両端の beads で,
 赤矢印は切断部を示す.

がわかった. 次に PRP 上層と BC の血小板をそれぞれ同系の C57BL6 マウスに輸血を行い, 経時的に EGFP 発現血小板の数を解析し, その血小板の動態を調べた (図 3-B). 通常サイズの血小板を多く含む PRP 上層分画 (図 3-A, 最上の細胞集団) を輸血すると, マウス血小板数は輸血直後にピークとなり, その後緩やかに減少を認めた (図 3-B, 緑線). 大型の血小板

前駆体を多く含む BC 分画 (図 3-A, 最下の細胞集団) を輸血すると, 輸血直後から血小板数の増加が認められ, 6 時間後に最も血小板数が増加しその状態が 12 時間持続し, その後緩やかに減少が認められた (図 3-B, 赤線). この結果, BC の大型血小板は 6 時間以内に個々の血小板分裂を開始することで, 血小板数を増加させた事が示唆される.

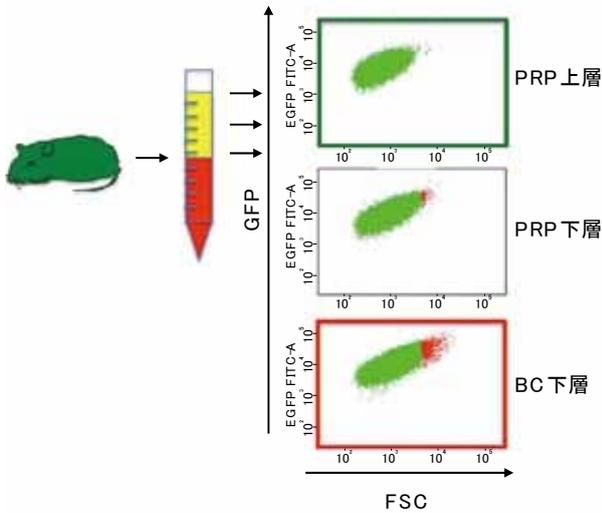


図 3-A. 遠心後の各分画の血小板サイズ

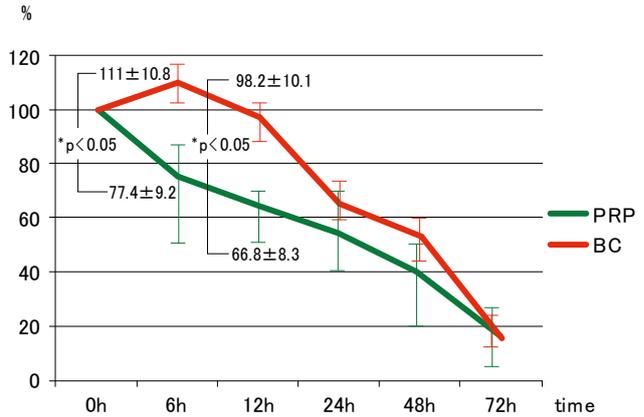


図 3-B. 輸血した EGFP 陽性血小板の減少率
 輸血直前の血小板数を 100% として
 輸血 6 時間後: BC 群 111 ± 10.8%, PRP 群 77.4 ± 9.2% (p<0.05)
 輸血 12 時間後: BC 群 98.2 ± 10.1%, PRP 群 66.8 ± 8.3% (p<0.05)

IV. 考 察

今回我々は、マウス全血中から血小板前駆体の同定をし、その前駆体を分離した。また *in vitro* で前駆体が分裂能を持つ事、*in vivo* で分裂の結果、血小板数が上昇する事を確認した。

今回我々が検討した事として、採血法で抗凝固薬にクエン酸 Na を使用し、採血管を 37°C に維持、可及的速やかに標本作製することで、骨髓静脈洞で分離された状態と同様の、proplatelet 様形態を観察する事が出来た。また、クエン酸 Na 存在下の培養で円形から proplatelet へ変化し、その後個々の血小板に分裂する過程が確認出来たが、EDTA 存在下ではこの現象の確認が出来なかった。血液学及び臨床検査医学研究の初期から血小板形態学で用いられる抗凝固薬は EDTA がゴールドスタンダードである。また、採血された検体は採血が行われた後直ちに標本が作成されるとは限らず、室温まで低下する。この条件では血小板は円形の形態を示す事となる。これらから我々が行った方法で観察した血小板前駆体は artifact ではなく、実際にマウスの生体内で行われている細胞形態を反映している物と考えられた。

近年、高速度撮影が可能な 2 光子顕微鏡の生体内ライブイメージングを用いて、腸管膜動静脈の血管内を流れる血小板と実験的血栓形成過程を、血小板一個レベルで可視化した論文が報告されている⁹⁾。その報告の中では血管内を流れる殆どの血小板は円形状の形を呈しており、今回我々がみた形態とは異なっている。原因として考えられるのは、骨髓静脈洞以後の毛細血管を通過する機会の差が考えられる。以前から肺の毛細血管では巨核球や巨核球の細胞断片の存在を示す報告や¹⁰⁾、肺動脈と肺静脈と比べると肺静脈の方で血小板数が増加している報告がされてきた¹¹⁾。我々の予備的検討でも肺の毛細血管内に血小板前駆体を数多く認めた。これらの事から、骨髓を出た血小板前駆体は、肺の毛細血管を通過する際に円盤状の成熟血小板へと変化していると考えれば、既に肺を通過した後の腸間膜動静脈では円盤状の成熟血小板へ変化した後であると考えられる。また別の理由として考えられるのは、血管内の流速中では機械的ストレスがかかり、紐状の血小板前駆体も一時的に円盤状の血小板へと変化している状態である可能性が考えられる。つまり前駆体から血小

板へと分裂するためには、毛細血管や静脈で機械的ストレスのかからない一時的定着をする場と時間を得る必要があり、その時に紐状の分裂可能な状態に再び変化することが予想される。これらから、血小板前駆体は血管内のどこかで分裂するが、その分裂を生じる場所や条件に関しては今後さらに検討する必要がある。

これまで、大型の新生血小板は血栓形成能力が高いと考えられてきた¹²⁾。近年、冠動脈症候群発症前や脳梗塞発症前には新生血小板増加が認められており、発症予知のマーカーとしての報告が増えてきている^{13, 14)}。我々の検討において、細胞構造が異なる複数の種類の血小板前駆体が存在しているものの⁴⁾、血小板前駆体の種類と疾患との関連性やメカニズムに関しては

未だに不明のままである。今後、血小板前駆体ごとの血栓形成能力と血栓性疾患との関連の有無について、解明する必要がある。

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜りました諸先生方に心から深謝するとともに、本研究に際し御指導と御協力を賜りました岩手医科大学解剖学講座：人体発生学分野、磯貝純夫准教授、並びに岩手医科大学内科学講座：血液腫瘍内科分野、石田陽治教授、千葉浩子様、平山静香様に心から深謝致します。

利益相反：著者には開示すべき利益相反はない。

References

- 1) **Levin J**: The evolution of mammalian platelets. *Platelet* 2013.
- 2) **Kaushansky K**: Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis, pp.147-152, *Hematology 2009* ash education, 2009.
- 3) **Radley JM and Scurfield G**: The mechanism of platelet release. *Blood* **56**, 996-999, 1980.
- 4) **Kowata S, Isogai S, Ishida Y, et al.**: Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow. *Thrombo Haemost* **112**, 743-756, 2014.
- 5) **Tong M, Seth P and Penington DG**: Proplatelets and stress platelets. *Blood* **69**, 522-528, 1987.
- 6) **Behnke O and Forer A**: From megakaryocytes to platelets : platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol (Suppl.)* **61**, 3-23, 1998.
- 7) **Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, et al.**: Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol* **191**, 861-874, 2010.
- 8) **Okabe M, Ikawa M, Kominami K, et al.**: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-319, 1997.
- 9) **Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al.**: In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood* **119**, e45-56, 2012
- 10) **Zucker-Franklin D and Philipp CS**: Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol* **157**, 69-74, 2000.
- 11) **Handagama PJ, Feldman BF, Jain NC, et al.**: Circulating proplatelets: isolation and quantitation in healthy rats and in rats with induced acute blood loss. *Am J Vet Res* **48**, 962-965, 1987.
- 12) **Kraytman M**: Platelet size in thrombocytopenias and thrombocytosis of various origin. *Blood* **41**, 587-598, 1973.
- 13) **Bray PF**: Platelet hyperreactivity: predictive and intrinsic properties. *Hematol Oncol Clin North Am* **21**, 633-645, 2007.
- 14) **Ozkan B, Arik OZ, Gözükar MY, et al.**: Mean platelet volume is related with ischemic stroke in patients with sinus rhythm. *Blood Coagul Fibrinolysis*, doi:10.1097/MBC.000000000000108, 2014

The conversion from platelet progenitors to mature platelets in mouse blood

Tadashi Shimoyama and Shugo Kowata

Division of Hematology and Oncology,
Department of Internal Medicine, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on February 9, 2015 & Accepted on February 23, 2015)

Abstract

It has been widely accepted that bone marrow (BM) megakaryocytes (MKs) form proplatelets and release mature platelets *in vitro*. Our previous intravital imaging study, however, revealed that BM MKs released platelet progenitors, but not platelets, *in vivo*. To confirm this, we carefully observed the peripheral blood smears using sodium citrate as an anti-coagulant, and found platelet progenitors among mature platelets in enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic mice. The size and shape of platelet progenitors were consistent with those of our previous study. *In vitro* culture of EGFP

platelet progenitors revealed that they changed the morphology and finally transformed and made a division. In transfusion of EGFP platelet progenitors into wild mice, the EGFP platelet counts increased in a few hours, were maintained for 6 hours, and decreased thereafter, while EGFP platelet counts decreased just after the transfusion of EGFP mature platelets. These results suggest that platelet progenitors might be divided into mature platelets in the peripheral blood *in vivo*. These data suggest that BM MKs produced platelet progenitors, which were transformed to mature platelets *in vivo*.
