

末梢血液による血小板造血の評価： マウスを用いた基礎的検討

外川 亮, 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 January 20, 2017 & Accepted on February 16, 2017)

要旨

血小板減少症の原因を評価する時に、末梢血中の新生血小板の割合は、鑑別診断の重要な手がかりとなる。しかし、現行のフローサイトメトリー (Flow Cytometry : FCM) による網状血小板比率の測定には、赤血球大の大型血小板を検出できない欠点と、疾患特異性の低さがある。今回我々はこれらの点を改良する為に、大型血小板を含めた上で血小板中の autophagosome 形成率を FCM で検出する方法を考案し、マウスで基礎的検討を行った。その結果、蛍光標

識抗赤血球抗体の追加により、大型血小板と赤血球を分離可能であった。新生血小板では autophagosome 形成率が亢進していた。生体内で新生血小板を標識して経時的に追跡すると、網状血小板比率は産生後 48 時間まで、autophagosome 形成率は産生後 24 時間まで保持されていた。以上から、巨核球からの血小板産生時に autophagy が関与している事が示唆された。また、autophagosome 形成率の方がより時間特異性の高い新生血小板測定方法であることが示唆された。

Key words : *reticulated platelet, nascent platelet*

I. 緒 言

血小板は骨髄中の巨核球より血管内へ幼弱な血小板として放出され、その後循環血液中で成熟してゆく。それゆえ、幼弱な血小板の割合は骨髄での血小板造血能と相関する。血小板造血能を評価することは、血小板減少時の病態生理を理解する上で大切なことである。例えば、血小板減少の患者を見た場合、骨髄中の巨核球造血・血小板造血の低下によるものか、末梢で血小板が破壊されているかの鑑別に、血小板造血能を評価することで診断が可能になることが多い。これまで、網状赤血球の測定法と同じ原理で、血小板中に残存している RNA を蛍光色素で染色して、RNA 残存血小板の比率を測定す

る方法 (網状血小板比率)¹⁾ や、自動血算計算機で測定できる immature platelet 比率²⁾、巨大血小板比率³⁾、などが報告されてきている。網状血小板は血小板中の残存 RNA を測定しているが、RNA が血小板産生後どのくらい長く残存するかの報告はない。網状赤血球は残存 RNA が 48 時間程度存在し測定可能であることから、残存 RNA は 48 時間ほど残存するものと考えられている。赤血球の場合、寿命が 120 日あることを考えれば、その臨床的意義には影響を与えない。しかしながら、血小板の場合は、ヒトおよびマウスでは寿命が 8~9 日と短く、残存 RNA の寿命の長さは非常に重要な因子となる。理想的な指標としては、24 時間程度存在することが望ましい。

近年、autophagy が様々な組織や細胞で認められ疾病との関連が報告されており、血

Corresponding author: Ryo Togawa
whiteokojosan@yahoo.co.jp

血小板にも autophagy の機構が備わっているがその役割は明らかでない⁴⁾。しかし臨床検体で autophagy を評価することは難しく、診断や治療への応用可能な検出方法は少ない⁵⁾。蛍光試薬 monodansylcadaverine (MDC) は autophagosome への集積性を利用して、autophagosome のマーカーとしての有用性が報告されてきたが⁶⁾、近年より background や lysosome 染色性が低い蛍光試薬として Cyto-ID[®] が報告された⁷⁾。Cyto-ID[®] はカチオン性両親媒性トレーサー色素であり、他のカチオン色素同様に脂質二重膜を越えて細胞内へ能動的に透過、拡散する。また血液細胞株を含む多くの細胞で特異的に autophagosome に集積することが報告されている⁸⁾。

この研究では、将来的にヒト検体での応用を見据えて、マウスで基礎研究を行なった。そしてマウスの新生血小板が 24 時間以内でのみ蛍光試薬 Cyto-ID[®] に染色されること、またそれを簡便かつ迅速に測定可能であることを明らかにした。さらに Cyto-ID[®] 陽性血小板比率が、従来の方法である網状血小板比率よりもより時間特異性の高い血小板造血能評価法であることを明らかにした。

II. 方法と材料

材料：雄の 8 週齢 C57BL6 マウスを用いた。この研究は、岩手医科大学動物実験規定に則り動物実験委員会の承認のもとで行われた（動物実験委員会承認番号：26-006）。RNA を染色する Thiazole orange (TO) (Becton-Dickinson, 東京)、Autophagosome を染色する Cyto-ID[®] (Enzo laboratory Science, 米国)、生体内の赤血球標識用の APC-Cy7 標識抗マウス Ter119 抗体 (Becton-Dickinson, 東京) および生体内の血小板標識用の PE 標識抗マウス CD41 抗体 (Becton-Dickinson, 東京)、生体内の血小板標識用の Dylight649 標識抗マウス GPIb 抗体 (Emflet Analytics, 独逸) を使用した。血小

板減少を来たす家兔抗マウス血小板血清 anti-platelet serum (APS) は既報のように作成した⁹⁾。

1. TO 染色法

TO 染色法は Matic の方法¹⁰⁾ に改良を加えて行なった。TO 溶液にマウスから採血した末梢血 5 μ l を加え、さらに血小板分画を正確に分離するために PE 標識抗 CD41 抗体および APC-Cy7 標識抗マウス Ter119 抗体 5 μ l を加えた後、30 分間室温で暗所にて静置した。1ml の 1% パラフォルムアルデヒドを加えて良く震盪してフローサイトメトリー (Flow Cytometry : FCM) のサンプルとした。

2. Cyto-ID[®] 染色法

Cyto-ID[®] 染色液は、0.3% クエン酸含有の Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) で 1/1000 に希釈して使用した。Cyto-ID[®] 染色液 50 μ l にマウスから採血した末梢血 5 μ l に加えた後、37°C、30 分間インキュベータ内に静置し、その後 PE 標識抗 CD41 抗体および APC-Cy7 標識抗マウス Ter119 抗体 5 μ l 加えて 30 分間室温で暗所にて静置した。1ml の 1% パラフォルムアルデヒドを加えて良く震盪して FCM のサンプルとした。

3. RNA あるいは autophagosome 消失時間の測定

マウスに 20 倍に希釈した APS100 μ l を腹腔内に投与し、投与 24 ~ 48 時間後に通常の数%の値まで血液中の血小板数を減少させた (図 1A)。次いで投与 48 ~ 72 時後には血小板の急激な産生が始まり、72 時間時点では、新生血小板により血小板数はこの 24 時間で通常の 40% 前後まで回復した。血小板の 80% 以上が新生血小板である 72 時間後の時点で Dylight649 標識抗マウス GPIb 抗体を 20 μ l 尾静脈注射し、血管内で新生血小板を標識した。以後、10 分後、3, 6, 24, 48, 72 時間後に採血し、上記 1, 2 と同じ染色を加えた後に、標識血小板中の TO 陽性血小板の比率および Cyto-ID[®]

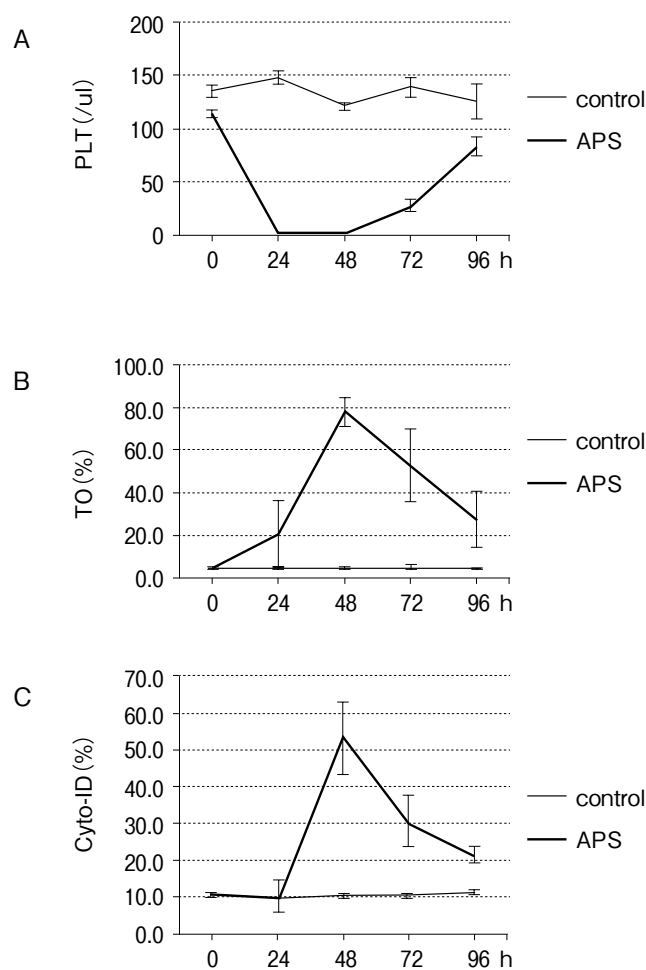


図1. 血小板減少誘発マウスにおける血小板の TO 陽性率および Cyto-ID[®] 陽性率の経時的变化

- A: 血小板数 (PLT)
 B: TO 陽性血小板の割合
 C: Cyto-ID[®] 陽性血小板の割合
 Control: リン酸緩衝液投与群
 APS: 抗血小板血清投与群

陽性血小板の比率を 4 color FCM で求めた。APS の代わりにリン酸緩衝液を腹腔内に投与したマウスを対照とし、Dylight649 標識抗マウス GPIIb 抗体を尾静脈注射し、血管内で血小板を標識し、同様に採血、染色、測定した。それぞれの対照群との差を Turkey Kramer 法で検定した。

4. 免疫性血小板減少症モデルマウスの TO, Cyto-ID[®] 陽性血小板比率
 マウスに 20 倍に希釈した APS100 μ l を腹腔

内に投与し、その後 24, 48, 72, 96 時間後に採血し、血小板数および上記 1, 2 と同じ染色を加え全血小板中の TO 陽性血小板の比率および Cyto-ID[®] 陽性血小板の比率を求めた。

III. 結 果

1. TO 染色法

血小板数が正常なマウスから作成した FCM の展開図を図 2A-D に示す。APS を投与した血小板減少マウスのそれを図 2E-H に示す。図

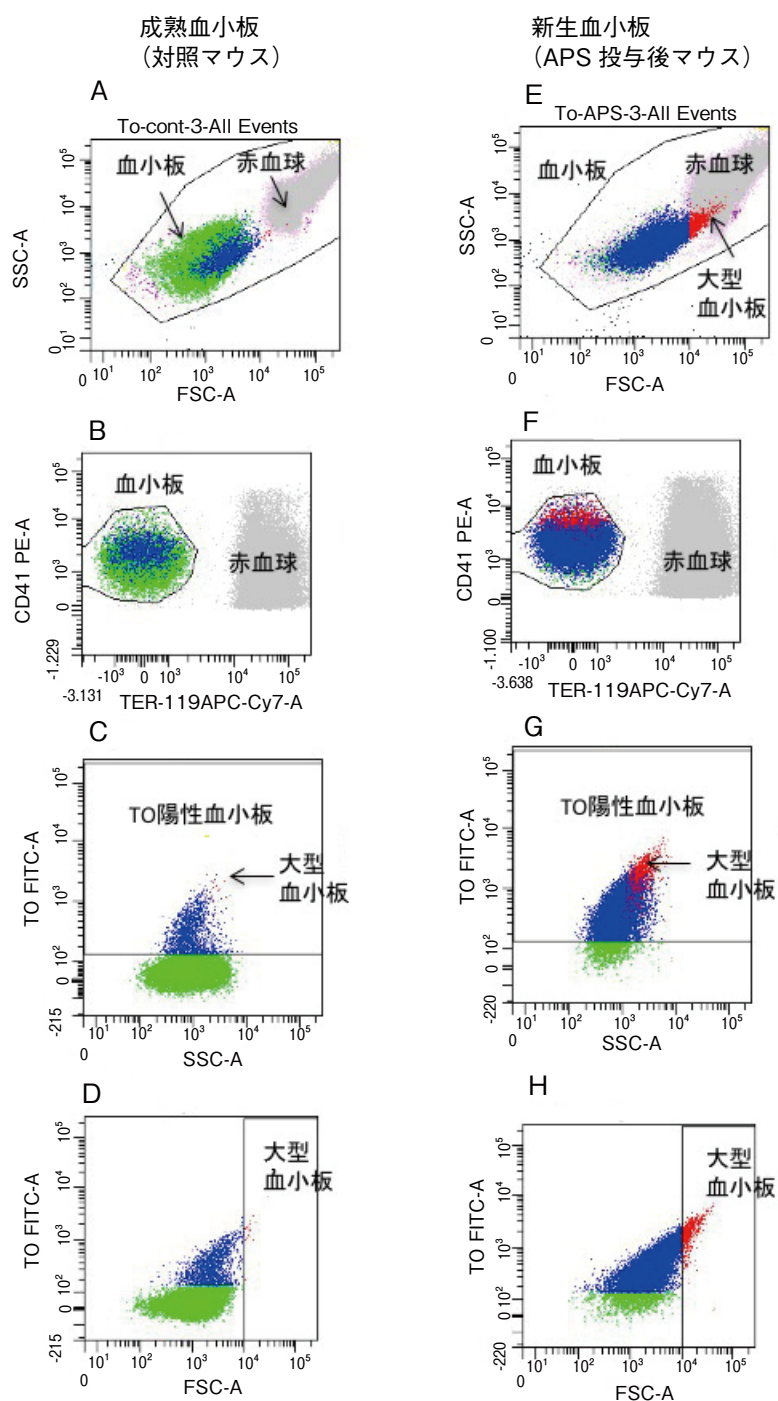


図2. TOによる成熟血小板および新生血小板に含まれる大型血小板の比較

A-D: 成熟血小板 (コントロールマウス) のフローサイト展開図

E-H: 新生血小板 (APS投与後マウス) のフローサイト展開図

2A, Eに前方散乱光 (FSC) と後方散乱光 (SSC) との展開図を示す. 図2B, FにPE標識CD41とAPC-Cy7標識抗マウスTer119抗体で染色した展開図を示す. 図2C, GにTOとSSC,

図2D, HにTOとFSCの展開図を示す.

図2HでCD41陽性血小板中のFSCの高い大型血小板を赤色で示す. 図2Eでは, 赤血球の分画の中に赤色のドットが認められ, 産生直

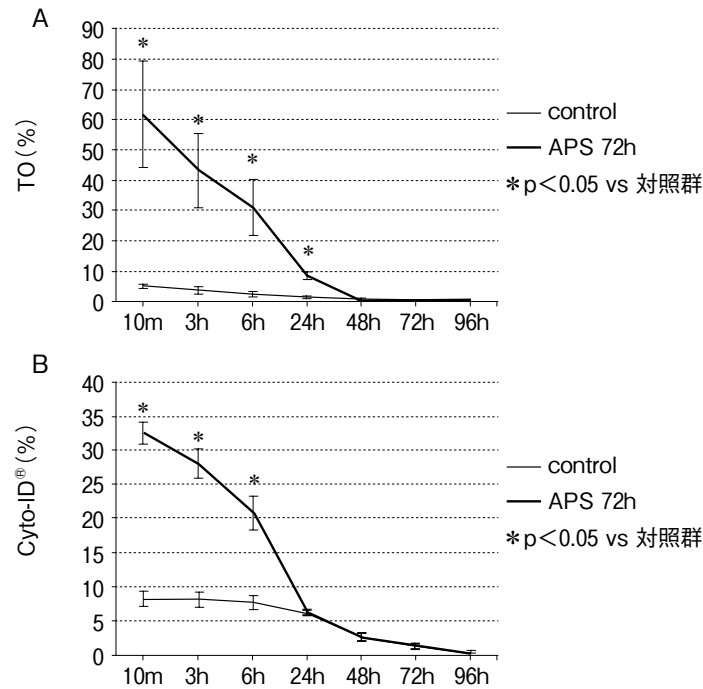


図3. 新生血小板の TO および Cyto-ID® 陽性率の経時的変化

A: TO 陽性率

B: Cyto-ID® 陽性率

Control: リン酸緩衝液投与群

APS: 抗血小板血清投与72時間後群

後の血小板（新生血小板）の大きさは赤血球大まで大きいことが示唆された。また従来法では赤血球より FSC が小さい領域を血小板分画として解析するため、この赤色の大型血小板領域は解析されておらず、TO 陽性血小板割合は過小評価となっている可能性が示唆された。このことから以後は従来の Matic の定法に加え、図 2B, F のように、赤血球と血小板を、標識抗体を使って分離して解析することとした。

2. 新生血小板の TO 染色性の時間経過

APS 投与した 72 時間後（図 1A）に、Dylight649 標識抗マウス GPIIb 抗体をマウス尾静脈から投与し、新生血小板を標識した。投与後、10 分、3、6、24、48、72、96 時間後に静脈から採血し、TO 染色法で血小板の RNA を染色し FCM のサンプルとした。FCM 上で全血小板中の Dylight649 陽性血小板について TO 陽性率を測定した。図 3A, B のデータはそ

れぞれ独立したマウスから得られた mean ± SD を示す。図 3A は時間ごとの陽性率のプロットを示す。投与後 10 分後には 45 ~ 80% の陽性率が徐々に減少し、48 時間後に対照との有意差が消失した（図 3A）。

3. 新生血小板の Cyto-ID® の染色性の時間経過

はじめに TO 染色法と同じ展開方法で、Cyto-ID® 染色による血小板の解析を行った（図 4A-H）。TO 染色法と同じく、赤血球と血小板を標識抗体で区別し（図 4B, F）、Cyto-ID® 陽性血小板比率を求めた（図 4C, G）。

次に方法 3 で述べた方法で、Cyto-ID® 陽性血小板比率を測定した。新生血小板を標識後、10 分後には陽性血小板比率は 30 ~ 35% を示したが、時間とともに減少し、24 時間でコントロールと一致した（図 3B）。これらの結果は、新生血小板の初期の 24 時間にのみ

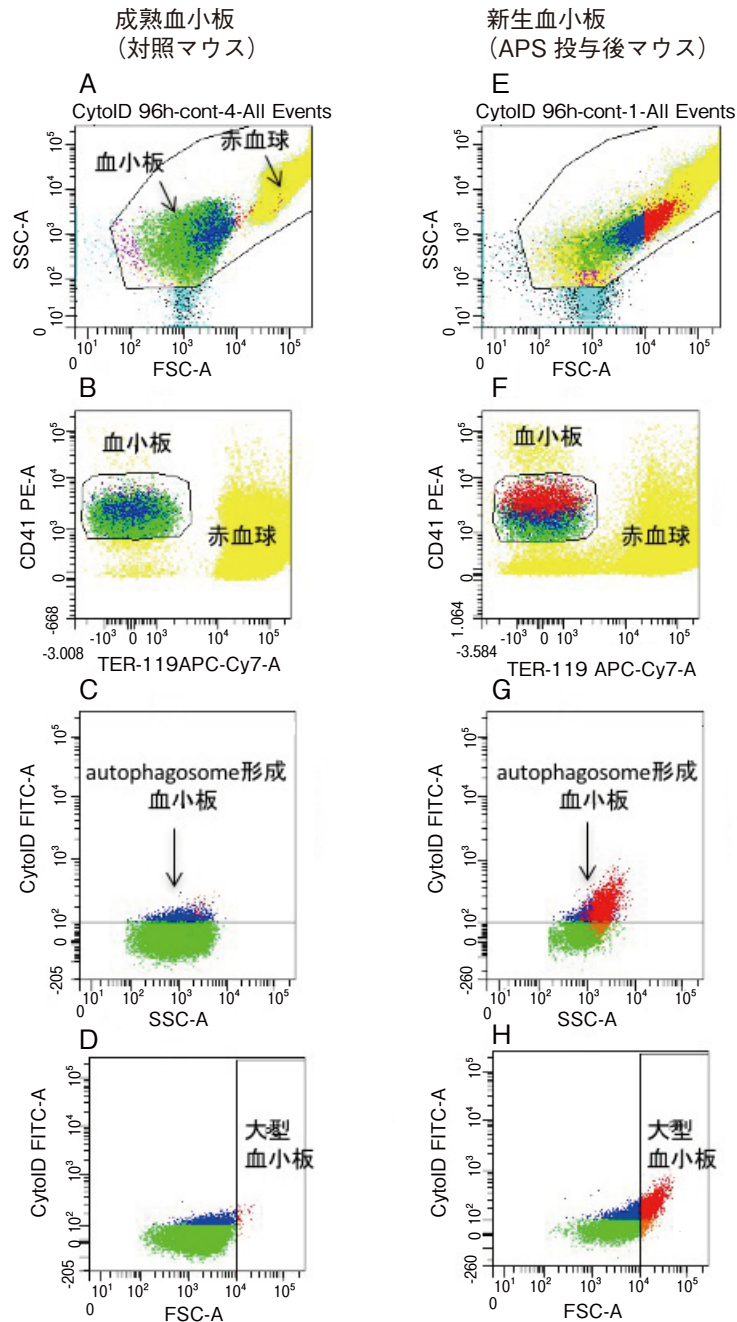


図4. Cyto-ID[®]による血小板の解析

A-D: 成熟血小板 (コントロールマウス) のフローサイト展開図

E-H: 新生血小板 (APS投与後マウス) のフローサイト展開図

autophagosomeの形成が亢進していることが示唆された。

4. RNAの代わりにCyto-ID[®]が新生血小板の指標となりうるか？

そこで、24時間以内の新生された血小板を

Cyto-ID[®]で染色すれば、その陽性比率が血小板造血の新しい指標になるかどうかを血小板減少マウスで検討した。マウスにAPSを腹腔内に投与後、血小板数は数時間で最低になり、72時間後には25万、96時間後には80万と回

復した (図 1A). この時の TO 陽性血小板比率を図 1B, Cyto-ID[®] 陽性血小板比率を図 1C に示す. Cyto-ID[®] 陽性血小板比率は, 血小板数回復直前の 48 時間で上昇し, 以後血小板数回復とともに低下する傾向をとり, TO 陽性血小板比率と同じような曲線を描いた. これは, autophagosome 形成が新生血小板で生じており, Cyto-ID[®] 陽性血小板比率は TO 染色法と同じように血小板産生能を評価可能であることを示す.

IV. 考 察

従来の TO 染色法は, 血小板に残存する RNA を染色する方法で, 抗 CD41 抗体と組み合わせると血小板造血能の評価には比較的有用な評価法であった. しかしながら, 血小板の寿命が 8 日前後に比べ, RNA の残存期間が 2 日と長いことから, 感度の低い検査であり, より厳密に新生血小板のみを同定する新しい評価法が望まれていた. 今回, 検討したのは, autophagosome に特異的に結合する試薬を用いた染色法である. 新生血小板に autophagy が起きているメカニズムは明らかでないものの, autophagosome の新生血小板中に検出される期間は 24 時間であることが, 今回の研究で明らかとなった. TO 染色法では, 直近の 48 時間の RNA が染色されてくるのに対し, Cyto-ID[®] 染色法は直近 24 時間である. このことは, 血小板造血の評価をする際により時間特異性の高い検査法であると言える.

また, 従来の TO 染色法では, 赤血球より小さなサイズの血小板だけをゲーティングするため, 図 2E に示すように赤血球と同じサイズの新生血小板中の大型血小板が測定されていない欠点が明らかとなった. 今回, 抗赤血球抗体を加える事により, 赤血球と大型血小板を分離して解析することが初めて可能となり, 従来の TO 染色法より精度よく新生血小板を評価できる可能性が示唆された. 一方で, この測定方法

は, 従来の TO 染色法と比較し, 測定までの手順が複雑化したため, 今後, より簡略化したプロトコールへの改善が必要になるかもしれない.

今後, これらのメリットを臨的にどのようなように活用するかを考えた時に, 血小板減少症を呈する疾患で鑑別診断への応用が上げられる. 例えば, 標準的な臨床検査法では, 骨髄異形成症候群の初期だと血小板のみが減少して異形成もそれほど強くなければ, 免疫性血小板減少症や再生不良性貧血との鑑別が難しい. また従来の TO 染色法では, 再生不良性貧血と骨髄異形成症候群は両者とも血小板産生が低下し網状血小板比率が低下しており鑑別が難しい. 一方 Cyto-ID[®] 陽性率を併用した場合, 骨髄異形成症候群では autophagosome 形成が亢進している可能性¹¹⁾ があり TO 陽性率低値かつ Cyto-ID[®] 陽性率高値, 免疫性血小板減少症では両者とも高値, 再生不良性貧血では両者とも低値となることが予想される. 加えて, 厳密に大型血小板の検出が可能であるので, 上記疾患に加えて先天性血小板減少症の鑑別や診断に有用である可能性がある.

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内科学講座血液腫瘍内科分野, 石田陽治教授, マウス処置, FCM 解析について指導協力を頂いた千葉浩子様, 平山静香様, 関 裕葵様, 高野 幹様に心から深謝致します.

この研究は, 圭陵会学術振興会研究助成, 及び科学研究費助成事業 1509458 「血小板産生制御機能をもつ micro RNA の探索」の支援を受けて行われた.

利益相反: 著者には開示すべき利益相反はない.

References

- 1) **Kienast J** and **Schmitz G**: Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* **75**, 116-121, 1990.
- 2) **Ibrahim H, Nadipalli S, Usmani S, et al.**: Detection and quantification of circulating immature platelets: agreement between flowcytometric and automated detection. *J Thromb Thrombolysis* **42**, 77-83, 2016.
- 3) **Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, et al.**: Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. *Hematology* **20**, 587-592, 2015.
- 4) **Ouseph MM, Huang Y, Banerjee M, et al.**: Autophagy is Induced upon platelet activation and is essential for hemostasis and thrombosis. *Blood* **126**, 1224-1233, 2015.
- 5) **Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al.**: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in Higher eukaryotes. *Autophagy* **4**, 151-175, 2008.
- 6) **Biederbick A, Kern HF** and **Elsässer HP**: Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* **66**, 3-14, 1995.
- 7) **Guo S, Liang Y, Murphy SF, et al.**: A rapid and high content Assay that measures Cyto-ID[®]-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications. *Autophagy* **11**, 560-572, 2015.
- 8) **Chan LL, Shen D, Wilkinson AR, et al.**: A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy* **8**, 1371-1382, 2012.
- 9) **Levin J, Levin FC** and **Metcalf D**: The effects of acute Thrombocytopenia on megakaryocyte-CFC and granulocyte-macrophage-CFC in mice: studies of bone marrow and spleen. *Blood* **56**, 274-283, 1980.
- 10) **Matic GB, Chapman ES, Zaiss M, et al.**: Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* **34**, 229-234, 1998.
- 11) **Guo L, Cui N, Wang H, et al.**: Autophagy level of bone marrow mononuclear cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **36**, 1016-1019, 2015.

The basic approach to measure nascent platelets by autophagosome detection in blood samples

Ryo TOGAWA and Shugo KOWATA

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

(Received on January 20, 2017 & Accepted on February 16, 2017)

Abstract

To evaluate the cause of thrombocytopenia, reticulated platelets (RPs) as measured using Tiazole Orange (TO) staining and flow cytometry is a useful parameter of thrombopoiesis. However, the conventional method of measuring RPs is limited in detecting nascent platelets with larger volume like erythrocytes. Platelets have an autophagic machinery which plays an indispensable role in hemostasis, although it is unclear when platelets undergo autophagy. To elucidate the relation between autophagy and thrombopoiesis, we quantified RPs or platelets with autophagosomes in nascent platelets in mice with forced platelet production. Mice were injected with anti-mice platelet serum

(APS) and blood was obtained during recovery from thrombocytopenia. Nascent Platelets (PLTs) with autophagosomes were assessed using Cyto-ID[®] staining, and those with residual RNAs were assessed using TO staining. Labeled anti-erythrocyte antibodies were used to distinguish large volume platelets from erythrocytes. TO and Cyto-ID[®] positivity ratio in nascent PLTs were higher compared to that in control PLTs. In vivo labeling study demonstrated that residual RNAs or autophagosomes in nascent platelets remain for 48h and 24h respectively. These results suggested that autophagy is involved in thrombocytopenia. Autophagosome positivity ratio is more specific for detecting nascent PLTs than RPs.
