

新たな血小板活性化のモニタリングマーカー：A novel biomarker for monitoring platelet activation

心筋梗塞をはじめとする動脈硬化性疾患では、酸化ストレスの亢進に伴う血管炎症によって血小板が活性化し、動脈硬化の進展や血栓形成に関与する。そのため、臨床現場で簡便に測定可能な血小板活性化マーカーの開発が求められている。1980年代から心筋梗塞の再発を減らす薬剤として抗血小板薬が使用され、PF4や β -TGなど多くの血小板活性化マーカーが研究されてきたが、採血操作が煩雑であったり、検体の保存が困難であったり、検査法が特殊であったりなどの課題により臨床現場での適用は困難とされた。

心血管イベント発症リスクを低下させるためのLDLコレステロール低下療法の進歩は目覚ましく、極めて高リスクの患者ではLDLコレステロール70 mg/dL未満を目標とすることが推奨されている。目標を達成しても心血管イベント発症リスクの低下は約30%にとどまる。血小板活性化に伴う凝固塊（微小クロット）の形成は重要な残余リスクの候補の一つと考えられる。

我々は、これまでに活性化血小板から放出される血漿セロトニンが有用な血小板活性化マーカーとなることを証明した。

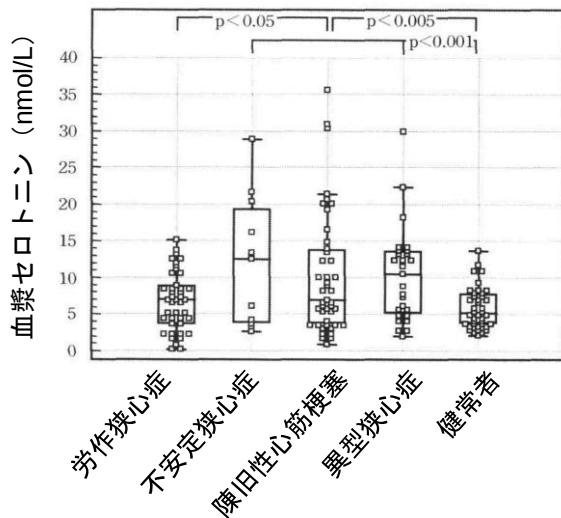
さらに今回、血漿セロトニンの代用マーカーとして、活性化血小板由来セロトニンがグルタミン残基に結合したセロトニル化フィブリノゲンを見出した。

今後、セロトニル化フィブリノゲンをを用いた新たな検査法を開発するとともに、その病態学的意義および心血管イベント残余リスクとの関連を明らかにする。

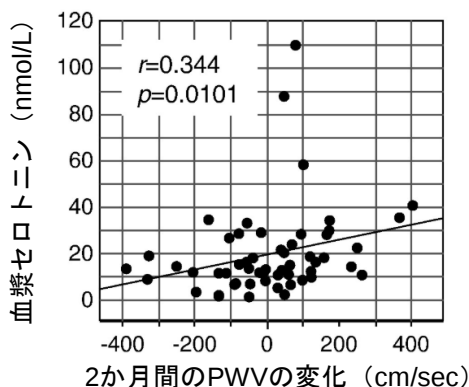
種々の冠動脈疾患患者は健常者に比べて血小板から放出された血漿セロトニンが高値を示した。

Rinsho Byori 52: 693-703, 2004

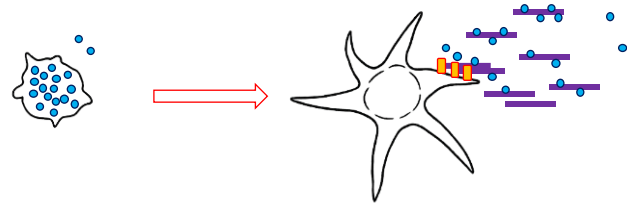
多くの臨床研究により血漿セロトニンが血小板活性化マーカーとなることが明らかとされた。しかし、専用の採血管、高感度HPLCが必要なため臨床現場での適用は困難であった。



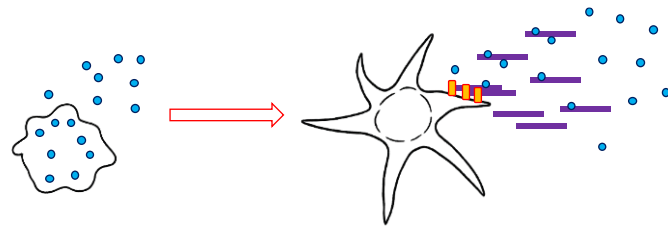
治療中の糖尿病患者の脈波伝播速度が悪化した症例は血漿セロトニンが高く、血小板活性化が亢進していた。Int J Cardiol 157: 312-313, 2012



血小板は血管内皮細胞が障害を受けて剥離した部位において、血液凝固反応を開始する初期トリガーとして重要な役割を担う。



ほとんど活性化していない血小板が完全に活性化すると多くのセロトニンが放出され血小板膜にあるトランスグルタミナーゼにより血液凝固因子にセロトニレーションが生じる。高度にセロトニレーションされた血液凝固因子は血漿中に留まると推測される。



ある程度活性化した血小板は含まれるセロトニンの量が少ない。完全に活性化するとそのセロトニンが放出され血小板膜にあるトランスグルタミナーゼにより血液凝固因子にセロトニレーションが生じるがその程度は低下する。

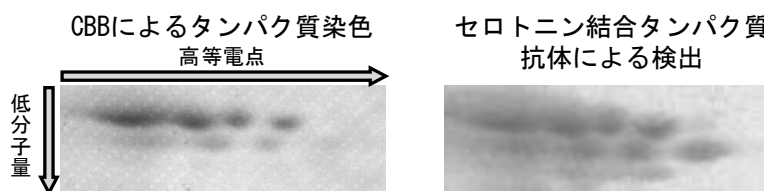
- セロトニン
- トランスグルタミナーゼ
- フィブリノゲン

クエン酸血漿にセロトニンを予め加え、カルシウムイオンにより血液凝固を生じさせ上清を二次元電気泳動で解析した。

セロトニンを加えることによりセロトニンβ鎖のスポットは増加し、特に低分子量および高等電点のスポットのほうが特に増加傾向に見られた。セロトニン結合タンパク質ポリクロナール抗体によるウェスタンブロット解析において、低分子量および高等電点のスポットでより強いスポットが検出された。この結果は、低分子量および高等電点のセロトニンβ鎖でより多くのグルタミン残基がセロトニル化していることを示している。



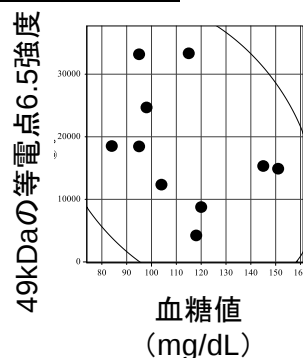
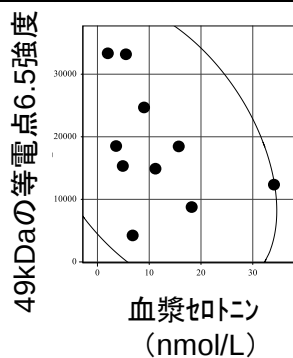
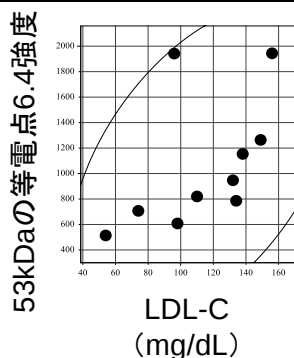
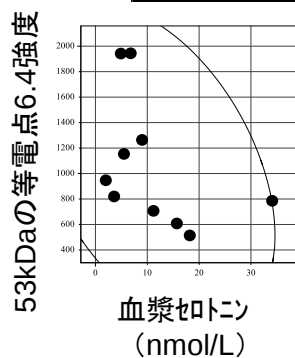
二次元電気泳動によるフィブリノゲンβ鎖の電気泳動スポットパターン



血漿のフィブリノゲンβ鎖の電気泳動スポットパターン

学内ボランティア10名による血漿セロトニンおよびその他の動脈硬化関連指標との関連性を調べた。血漿セロトニンは、53kDaの等電点6.4と49kDaの等電点6.5のスポット強度と逆相関を示した。53kDaの等電点6.4はLDL-Cと正相関を示し、49kDaの等電点6.5は血糖値とも逆相関を示した。LDL-Cは直接的な血小板活性化を促し、糖尿病の病態悪化は血管炎症に伴う間接的な血小板活性化を促していると推定された。

分子量	等電点	血漿セロトニン	年齢	BMI	血糖値	HDL-C	LDL-C	TG
53kDa	6.0	-0.067	0.109	-0.201	0.571	0.055	0.018	-0.309
	6.4	-0.576	-0.109	-0.226	0.024	0.012	0.685	0.079
49kDa	6.0	-0.152	-0.109	0.116	-0.049	0.134	-0.164	-0.321
	6.3	-0.346	0.164	0.024	-0.596	-0.134	0.370	0.139
	6.5	-0.612	-0.006	0.067	-0.523	-0.104	0.200	-0.042



現在、糖尿病患者60名を対象とした臨床研究を計画中している。今後、フィブリノゲンβ鎖のセロトニル化されているグルタミン残基の位置を特定しモノクロナール抗体を作成する。さらに、ELISAおよびラテックス凝集法による測定系を確立する。右の写真は、将来想定される試薬・検査キットのイメージである。

