

血小板と新型コロナウイルス感染

井上克枝*, 白井俊光, 佐々木知幸

Platelets and COVID-19

Katsue SUZUKI-INOUE, Toshiaki SHIRAI, Tomoyuki SASAKI

Key words: platelets, COVID-19, SARS-CoV-2, micro thrombosis

1. はじめに

2019年12月に中国において、severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) による新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019: COVID-19) が発生し、瞬く間にパンデミックとなった。COVID-19は肺の炎症に起因する発熱や呼吸器症状を呈するが、翌2020年4月には、重症COVID-19患者の25%が静脈血栓塞栓症を合併し、しばしば死因となることが報告された¹⁾。その後同様の報告が相次ぎ、COVID-19関連凝固異常 (COVID-19-associated coagulopathy: CAC) という概念が形成された。CACは播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation: DIC) でもなく、血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy: TMA) でもないユニークな性質を持ち^{2,3)}、「軽度のDIC+肺血管床に局限したTMA」と評されている²⁾。血小板減少、D-dimerの上昇、重症者ではプロトロンビン時間のわずかな延長が認められるが、いずれも敗血症のDICよりも軽度で、フィブリノゲンは高めで出血症状はない。国際血栓止血学会のDIC診断基準に照らすと、当てはまらない場合が多い。一方、CACはTMAの特徴も示し、7名のCOVID-19患者のオートプシーでは全例に、肺などの微小血管系に血小板に富む血栓を認めた⁴⁾。また、TMAの特徴であるLDHの上昇や、ADAMTS13の低下傾向が認められる⁵⁾。しか

し、TMAのように破碎赤血球や著しい血小板減少は認められない³⁾。おそらく肺血管床に局限してTMA様病態が生じるためと推測されている。

CACの主な原因は、1) ウイルスによる血管内皮障害、2) 高度な炎症免疫反応、3) 過凝固状態と言われる⁶⁾。過凝固状態とは、トロンビン産生の亢進や、プロテインC活性の低下、抗リン脂質抗体の産生などである^{6,7)}。このような条件下では当然血小板も活性化されることが予想され、実際、COVID-19患者では、活性化血小板由来放出物質であるplatelet factor 4 (PF4)、extracellular vesicleの血中濃度や、血小板上でのphosphatidylserine、P-selectinの発現の上昇など、生体内で血小板が活性化を示唆する報告が無数にある⁸⁻¹¹⁾。本総説では、混沌としたCOVID-19の病態における血小板の関与について、まとめてみたい。

2. 血小板はSARS-CoV-2によって直接活性化されるのか？

「軽度DIC+肺血管床に局限したTMA」であれば、当然生体内で血小板活性化が惹起されると予想されるが、SARS-CoV-2による血小板の直接の活性化機序はないのだろうか？また、SARS-CoV-2が血小板に感染する可能性はないのだろうか？

SARS-CoV-2 RNAがCOVID-19患者の血小板でPCRにより検出されたという報告がある^{8,9)}。2021年Agbaniらは、3次元イメージングで、ICU入室のCOVID-19患者の活性化血小板内にSARS-CoV-2を検出した¹²⁾。2022年Zhuらの報告によると、PCR、共焦点顕微鏡、電子顕微鏡を用いて非生存COVID-19患者20名中19名の血小板にSARS-

*責任者連絡先：
山梨大学大学院総合研究部医学域臨床検査医学
〒409-3898 山梨県中央市下河東1110
Tel: 055-273-9884, Fax: 055-273-6924
E-mail: katsuei@yamanashi.ac.jp

CoV-2 RNA を検出されたが、生存者 22 名の血小板ではすべて検出されなかった¹³⁾。オートプシーでは、骨髄、肺の巨核球とも SARS-CoV-2 に感染していたため、SARS-CoV-2 感染血小板は感染巨核球から産生され、そのままウイルス遺伝子を引き継いだと推測されていた。感染血小板がそのままマクロファージに貪食され、さらなる感染を広げる原因になることも示唆された。さらに、SARS-CoV-2 粒子が血小板内に取り込まれている電子顕微鏡写真の報告もある¹⁴⁾。しかし、2021 年 Bury らは、24 人の COVID-19 患者（5 人は ICU）の血小板を用いて、RT-PCR や感度の高い digital PCR で行っても、SARS-CoV-2 は検出されなかったと報告している¹⁵⁾。先の 2 つの論文より重症度は低いと考えられ、少なくとも重症あるいは死亡 COVID-19 患者では、血小板中に SARS-CoV-2 が存在すると考えられる。

エンベロープを持つ RNA ウイルスである SARS-CoV-2 は、その表面に発現する S 蛋白が、宿主の膜貫通型メタロプロテイナーゼ transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) によって切断され、その断面が angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) に結合して細胞内に侵入する。血小板への感染も同経路をたどるのだろうか。Zhang らは、血小板に明らかな ACE2 と TMPRSS2 の mRNA が認められたと報告しているが¹⁶⁾、血小板上には ACE2 RNA も蛋白も発現はないとする報告が多い^{8, 14, 17)}。Koupenova らは、ウェスタンブロットと免疫染色で健常人のヒト血小板での ACE と TMPRSS2 の発現を示したが、人によってばらつきがあった¹⁴⁾。mRNA の発現は確認できず、おそらく他の細胞に発現する ACE2 を何らかの形で取り込んだと考えられる。ウイルス粒子はこの ACE2 を介して、あるいはマイクロパーティクルに結合したウイルス粒子を飲み込み、血小板内に取り込まれると推測されている。肺に存在する巨核球に SARS-CoV-2 が感染して、そのまま血小板に引き継がれたという説もある⁸⁾。巨核球は emperipoiesis と呼ばれる好中球など他の細胞を飲み込む性質を持ち、飲み込んだ細胞の成分が巨核球内に取り入れられるが、その際にウイルス粒子が巨核球内に持ち込まれた可能性もある¹⁸⁾。ACE2 以外にも、CD147, glycoprotein (GP) Ib, CD26 が、血小板上 SARS-

CoV-2 の受容体として働くとの報告がある¹⁹⁻²¹⁾。

ウイルス粒子自身による血小板活性化に関する報告について述べる。Zhang らは、SARS-CoV-2 ウイルス粒子そのもの、あるいは S 蛋白が、生理的アゴニストによる凝集の potentiation 活性を持つこと、血小板 GPIIb/IIIa 活性化や P-selectin の発現を惹起すること、フィブリノゲン上の血小板伸展や血餅退縮を促進することを報告している¹⁶⁾。Maugeri らは、SARS-CoV-2 を血小板に加えると、活性化の指標となる High Mobility Group Box 1 (HMGB1) 陽性血小板や soluble P-selectin の増加、血小板内 VWF の低下（放出による）が認められると共に、リコンビナント S 蛋白が血小板凝集を惹起すると報告している。これらの反応は抗 CD147 抗体で抑制されることから、S 蛋白受容体として機能していると推測している²¹⁾。一方、受容体・リガンドによる活性化でない機序も報告されている。Koupenova らは、取り込まれた血小板がアポトーシスを起こし、その際の放出反応が血小板を活性化すると報告している⁹⁾。

以上、重症患者では、血小板・巨核球に SARS-CoV-2 の取り込みが認められるが、受容体 ACE2 の発現は議論があり、飲み込みや、CD147 など別の受容体の存在が示唆されている。ウイルス粒子、特に S 蛋白の直接作用による血小板活性化も報告があり、明らかな血小板凝集の惹起については、コンセンサスを得ないまでも、放出反応など検出方法によっては活性化が認められる。

3. SARS-CoV-2 感染時の生体内環境によって惹起される血小板活性化

ウイルス粒子自体ではなく、ウイルスに対する生体反応により惹起される血小板活性化機序について述べる（図 1）。

1) NETs, 補体による血小板活性化（敗血症様病態）

COVID-19 重症患者では、血管内皮に補体の沈着が認められ、血中補体 C5a が高値となるなど、著しい補体の活性化が示唆される²²⁾。Skendros らは、SARS-CoV-2 が主として mannan-binding lectin (MBL) などに結合して補体レクチン経路が活性化され、産生された C5a が好中球を活性化し、組織因子 (tissue

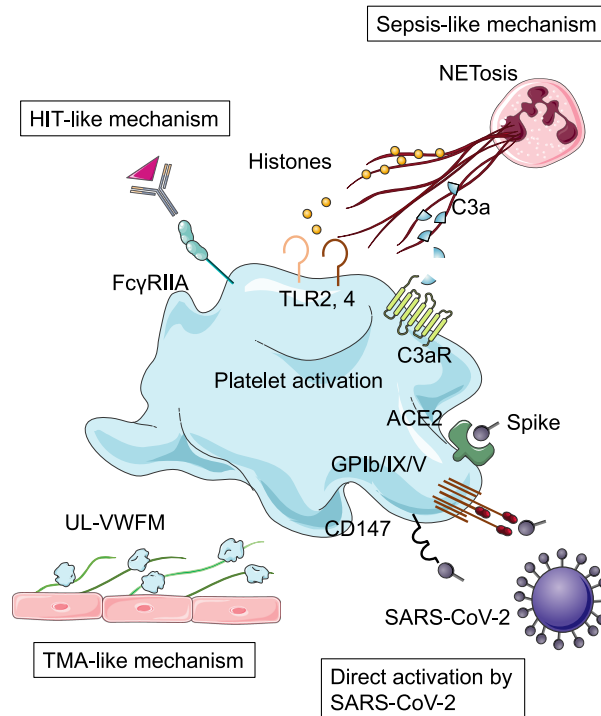


図1 COVID-19における血小板活性化機序

SARS-CoV-2による直接の血小板活性化の他、ウイルスが惹起する、敗血症様病態、ヘパリン起因性血小板減少症（HIT）、血栓性微小血管障害症（TMA）により二次的に活性化される。敗血症様病態では、NETsの形成（NETosis）時にNETsと共に放出された、ヒストンや補体C3aがそれぞれの血小板上受容体、Toll-like receptor 2, 4（TLR2, 4）とC3a受容体（C3aR）を介して血小板を活性化する。他は本文参照。図の一部は以下のサイトより得た画像を用いて作成された。

Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

factor: TF)の産生とTFを伴ったneutrophil extracellular traps (NETs)の放出が生じることを報告した²³⁾。TFが凝固系を活性化して生じたトロンビンが血小板を活性化する。さらに補体活性化で生じたC3aや、histoneなど血小板活性化物質を結合しているNETsは血小板を活性化する。活性化血小板はさらにNETsの産生を促進するpositive feedback loopとなる。

2) Unusually large von Willebrand factor multimers (UL-VWFM)による血小板活性化(TMA様病態)

COVID-19におけるサイトカインストームで生じた、IL-8, TNF α , IL-6/soluble IL-6 receptor complexは、血管内皮を刺激して、Weibel-Palade bodiesからUL-VWFMを放出させる²⁴⁾。通常UL-VWFMはADAMTS13により適度な分子量に切断されるが、IL-6がADAMTS13活性を抑制するため、UL-VWFMが血管内皮上に蓄積して、血小板が粘着して微小血

小板血栓を形成することで、TMA様病態を呈する。SinkovitsらとNavyらは、COVID-19患者で、重症度に比例して血中ADAMTS-13活性が低下し、VWF抗原量や活性（コラーゲン結合能）が上昇することを報告した^{25, 26)}。さらに、補体の過剰活性化を示すC3a/C3比が上昇していた²⁵⁾。適度な補体の活性化はウイルス感染細胞の排除に働くが、過剰な活性化は血管内皮障害をもたらし、VWFの放出を促進すると考えられる。

3) 抗体による活性化（ヘパリン惹起血小板減少症（heparin-induced thrombocytopenia: HIT）様病態）

HITは、抗PF4/ヘパリン抗体がFc受容体Fc γ receptor IIA（Fc γ RIIA）に結合して血小板を活性化することで、血小板の消費性減少と血栓症を引き起こす疾患である。COVID-19において、類似の病態が存在することが示唆されている²⁷⁾。Navyらの報告

によると、HIT が否定された 6 名の重症 COVID-19 患者の血清は、セロトニン放出アッセイで、ヘパリン非依存性に血小板を活性化したが、その活性化は FcγRIIA の中和抗体 IV.3 により抑制された²⁶⁾。FcγRIIA は低親和性 Fc 受容体であることから、理論的には抗原が結合した抗体しか結合しない。当然ではあるが、患者血清には抗 S 蛋白抗体が検出されることから、S 蛋白・抗 S 蛋白抗体複合体が FcγRIIA に結合して、血小板を活性化しているというストーリーが想起されるが、直接の証明はない。Althaus らは COVID-19 患者の IgG 分画が、FcγRIIA 依存性に、血小板にアポトーシス様反応 (phatidylserine の表出、ミトコンドリア内膜電位の脱分極など) を惹起することを報告した²⁸⁾。こちらも何らかの抗原抗体複合体が血小板を活性化することを示唆している。

4. 抗血小板薬は COVID-19 関連凝固異常 (CAC) に有効か？

CAC ではウイルス自身やそれに対する生体反応により、血小板は活性化され、活性化血小板がさらなる血栓形成や免疫反応を助長する^{10,11)}。例えば、血小板に活性化に伴って細胞表面に表出される HMGB1 や、放出された PF4 は NETs を誘導する²⁹⁾。HMGB1 や PF4 は陽性荷電を持ち血管内皮のヘパリン様物質に結合してアンチトロンビンの結合を抑制して血栓傾向を助長する。血小板活性化に伴って表出する CD40 ligand や P-selectin は血管内皮を活性化する。以上を鑑みると、抗血小板薬は CAC の特効薬となり得るように思えてくる。

しかしながら、約 15,000 人の COVID-19 入院患者に対してアスピリンの使用を検討した非盲検ランダム化比較試験、RECOVERY によると、アスピリンは 28 日の次点の死亡率や侵襲的人工呼吸管理の使用率とは関連が認められなかった³⁰⁾。この原因として、すでにヘパリンなどが投与されている場合、抗血小板薬の追加はさらなる抗免疫血栓抑制効果を生まないと推測している。あるいは、血小板以外による血栓形成や肺胞障害が病態悪化に重要である可能性や、抗血小板薬を開始するタイミングが遅い可能性を挙げている。別の 578 人の COVID-19 入院患者

に対する抗血小板薬 (アスピリン、P2Y₁₂ 阻害剤) と抗凝固薬 (低分子量ヘパリン、直接経口抗凝固薬) の効果に関する臨床研究でも、50 日後の生存と抗血小板薬の使用に関連はなかった²⁹⁾。それに対して抗凝固薬を使用した患者は、50 日後の生存者の割合が有意に高値であった²⁹⁾。この論文では、exhausted platelets という考え方が示されている。重症の COVID-19 患者では、生体内で血小板活性化が生じているという多くの報告があるが、意外なことに *in vitro* で重症 COVID-19 患者の血小板を刺激すると、放出反応が減弱しているという報告がある^{29,31)}。おそらく、生体内での慢性的な血小板活性化のために、さらなる刺激に反応しない exhausted platelets になっていると考えられる。特に血小板の phosphatidylserine 表出が抑制されるという報告もあり、凝固促進のトリガーにはなりにくいかもしれない。以上より、少なくとも進行した重症 COVID-19 では、抗血小板薬の効果がないと推論されている。

5. まとめ

CAC における血小板活性化の機序として、SARS-CoV-2 による直接の活性化 (S 蛋白、感染によるアポトーシス) も示唆されているが、ACE2 の発現はコンセンサスを得られておらず、GPIb や CD147 など別の受容体の関与が大きい。SARS-CoV-2 に対する生体反応による血小板活性化機序としては、1) NETs や補体による活性化 (敗血症類似)、2) UL-VWF による活性化 (TMA 類似)、3) 抗原抗体複合体による活性化 (HIT 類似) がある。しかし、抗血小板薬は COVID-19 患者の予後や侵襲的人工呼吸管理の有無に影響を及ぼさず、重症 COVID-19 患者における exhausted platelets や投与のタイミングが一因と考えられた。

著者の利益相反 (COI) の開示：

井上克枝：臨床研究 (治験) (診断薬臨床試験 CLECSTRO LSI メディエンス)

その他の著者の利益相反の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- 1) Cui S, Chen S, Li X, et al.: Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* **18**: 1421–1424, 2020.
- 2) Levi M, Thachil J, Iba T, et al.: Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol* **7**: e438–e440, 2020.
- 3) Falter T, Rossmann H, Menge P, et al.: No evidence for classic thrombotic microangiopathy in COVID-19. *J Clin Med* **10**: 671, 2020.
- 4) Rapkiewicz AV, Mai X, Carsons SE, et al.: Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: A case series. *EClinicalMedicine* **24**: 100434, 2020.
- 5) Fogarty H, Ward SE, Townsend L, et al.: Sustained VWF-ADAMTS-13 axis imbalance and endotheliopathy in long COVID syndrome is related to immune dysfunction. *J Thromb Haemost* **20**: 2429–2438, 2022.
- 6) Conway EM, Mackman N, Warren RQ, et al.: Understanding COVID-19-associated coagulopathy. *Nat Rev Immunol* **22**: 639–649, 2022.
- 7) Bouck EG, Denorme F, Holle LA, et al.: COVID-19 and sepsis are associated with different abnormalities in plasma procoagulant and fibrinolytic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **41**: 401–414, 2021.
- 8) Zaid Y, Puhm F, Allaey I, et al.: Platelets can associate with SARS-CoV-2 RNA and are hyperactivated in COVID-19. *Circ Res* **127**: 1404–1418, 2020.
- 9) Koupenova M, Freedman JE: Platelets and COVID-19: Inflammation, hyperactivation and additional questions. *Circ Res* **127**: 1419–1421, 2020.
- 10) Barale C, Melchionda E, Morotti A, et al.: Prothrombotic phenotype in COVID-19: Focus on platelets. *Int J Mol Sci* **22**: 13638, 2021.
- 11) Ebeyer-Masotta M, Eichhorn T, Weiss R, et al.: Activated platelets and platelet-derived extracellular vesicles mediate COVID-19-associated immunothrombosis. *Front Cell Dev Biol* **10**: 914891, 2022.
- 12) Agbani EO, Schneider P, McDonald B, et al.: Activated platelets harbor SARS-CoV-2 during severe COVID-19. *Thromb Haemost* **122**: 308–309, 2022.
- 13) Zhu A, Real F, Capron C, et al.: Infection of lung megakaryocytes and platelets by SARS-CoV-2 anticipate fatal COVID-19. *Cell Mol Life Sci* **79**: 365, 2022.
- 14) Koupenova M, Corkrey HA, Vitseva O, et al.: SARS-CoV-2 initiates programmed cell death in platelets. *Circ Res* **129**: 631–646, 2021.
- 15) Bury L, Camilloni B, Castronari R, et al.: Search for SARS-CoV-2 RNA in platelets from COVID-19 patients. *Platelets* **32**: 284–287, 2021.
- 16) Zhang S, Liu Y, Wang X, et al.: SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J Hematol Oncol* **13**: 120, 2020.
- 17) Manne BK, Denorme F, Middleton EA, et al.: Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood* **136**: 1317–1329, 2020.
- 18) Gu SX, Tyagi T, Jain K, et al.: Thrombocytopeny and endotheliopathy: Crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation. *Nat Rev Cardiol* **18**: 194–209, 2021.
- 19) Campbell RA, Boilard E, Rondina MT: Is there a role for the ACE2 receptor in SARS-CoV-2 interactions with platelets? *J Thromb Haemost* **19**: 46–50, 2021.
- 20) Li T, Yang Y, Li Y, et al.: Platelets mediate inflammatory monocyte activation by SARS-CoV-2 spike protein. *J Clin Invest* **132**: e150101, 2022.
- 21) Maugeri N, De Lorenzo R, Clementi N, et al.: Unconventional CD147-dependent platelet activation elicited by SARS-CoV-2 in COVID-19. *J Thromb Haemost* **20**: 434–448, 2022.
- 22) Jodele S, Köhl J: Tackling COVID-19 infection through complement-targeted immunotherapy. *Br J Pharmacol* **178**: 2832–2848, 2021.
- 23) Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, et al.: Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest* **130**: 6151–6157, 2020.
- 24) Fujimura Y, Holland LZ: COVID-19 microthrombosis: Unusually large VWF multimers are a platform for activation of the alternative complement pathway under cytokine storm. *Int J Hematol* **115**: 457–469, 2022.
- 25) Sinkovits G, Réti M, Müller V, et al.: Associations between the von Willebrand factor-ADAMTS13 axis, complement activation, and COVID-19 severity and mortality. *Thromb Haemost* **122**: 240–256, 2022.
- 26) Nazy I, Jevtic SD, Moore JC, et al.: Platelet-activating immune complexes identified in critically ill COVID-19 patients suspected of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* **19**: 1342–1347, 2021.
- 27) Millington-Burgess SL, Harper MT: A double-edged sword: Antibody-mediated procoagulant platelets in COVID-19. *Platelets* **32**: 579–581, 2021.
- 28) Althaus K, Marini I, Zlamal J, et al.: Antibody-induced procoagulant platelets in severe COVID-19 infection. *Blood* **137**: 1061–1071, 2021.
- 29) Schrottmaier WC, Pirabe A, Pereyra D, et al.: Platelets and antiplatelet medication in COVID-19-related thrombotic complications. *Front Cardiovasc Med* **8**: 802566, 2021.
- 30) RECOVERY Collaborative Group: Aspirin in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): A randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* **399**: 143–151, 2022.
- 31) Nicolai L, Leunig A, Brambs S, et al.: Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation* **142**: 1176–1189, 2020.