

慢性 ITP 患者における血小板機能

柏木浩和^{1*}, 西浦伸子²

Platelet function in chronic ITP

Hirokazu KASHIWAGI, Nobuko NISHIURA

要約：血小板減少例において標準的な血小板機能検査が確立されていないことから、ITP 患者における血小板機能は十分把握されていない。また、ITP 患者の血小板は正常者の血小板に比べて一般にサイズが大きいことを、正常例と血小板機能を比較する場合には考慮する必要がある。我々は慢性 ITP 患者において、近年開発されたフローサイトメーターを用いた血小板凝集能検査、および血小板サイズを考慮した PAC1/CD62P assay を行い、正常コントロールとの血小板機能を比較した。同じサイズの血小板を比較した場合、ITP 血小板は正常コントロールに比べ、アゴニストに対する反応性が低下していた。しかし血小板サイズの増大によりこの低反応性は補填され、血小板全体で比較した場合には ITP の血小板機能は正常コントロールと同等～亢進していた。また ITP 血小板の低反応性には PA 抗 GPIIb/IIIa 抗体の存在、あるいは TPO-RA の使用が関連している可能性がある。

Key words: ITP, platelet function, flow cytometry, platelet-associated anti-GPIIb/IIIa antibodies, thrombopoietin receptor agonists

1. ITP 患者における血小板機能解析の意義

ITP 患者における治療適応は、血小板数と出血症状により決定される。現在の成人 ITP 治療参照ガイドにおいては、血小板数が 3 万/ μ L 以上で出血症状が軽度～認めない場合は経過観察、2 万/ μ L 未満の場合は治療適応となり、2~3 万/ μ L の場合は出血リスクを勘案して治療を開始する、としている¹⁾。しかし、実際このようなアプローチの有用性に対するエビデンスは十分ではなかった。Hato らは、本邦において 2005~2014 年の間に ITP の難病指定のために提出された臨床個人調査票を用いて、18 歳以上の成人新規診断 ITP 症例 19,415 例という世界に類をみない多数例を対象に、血小板数と出血症状の関連性を検

討した²⁾。紫斑は血小板数に逆相関して直線的に増加するのに対し、歯肉出血などの粘膜出血や消化管出血、頭蓋内出血などの重篤な臓器出血は、血小板数が 2~2.5 万/ μ L 以下で増加しはじめ、1 万/ μ L 以下になると急激にそのリスクが増加することが示された。この結果は、上記の血小板数に基づく治療対応の正当性を示している。一方で、本研究において、頭蓋内出血のリスク因子として、血小板数 1 万/ μ L 以下、60 歳以上および血尿が抽出されたが、18~49 歳の頭蓋内出血症例では血小板数とあまり相関関係がみられなかった²⁾。このことは血小板数以外の要因が、特に若年者の脳出血に関与している可能性を示唆している。実際、複数の論文において、ITP 患者における出血傾向と血小板機能の低下との関連が示されている^{3,4)}。ITP 患者における抗 GPIIb/IIIa 自己抗体の多くはリガンド結合部位近傍を認識しており⁵⁾、稀ではあるが後天性血小板無力症とよばれる強い血小板機能低下をきたす症例が存在する⁶⁾。また抗 GPVI 自己抗体により GPVI 欠損が誘導される場合があることを、我々を含む多くのグループが

¹ 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学

² 吹田市民病院 血液内科

*責任者連絡先：

大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

Tel: 06-6879-3871, Fax: 06-6879-3879

E-mail: kashi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

報告している⁷⁾。しかし一方で、ITPにおいてはむしろ血小板機能は亢進しているのではないかと、いう考えもある。古くは、Harkerらは、ITP患者の出血時間が正常人の血小板数と出血時間の関係から推定される値に比べて短縮していることから、ITP患者の血小板機能が亢進していることを予測した⁸⁾。ITPにおいては血小板寿命が短いことから、若い血小板（網状血小板あるいは幼若血小板と呼ばれる）の割合が多くなっている⁹⁾。このような若い血小板は、時間が経過した血小板よりも血小板機能は亢進していることが想定され、実際、Pengらは、生体内で6日以上経過した血小板は、新鮮な血小板に比べてトロンビンに対する反応性が低下していることを報告している¹⁰⁾。

更に、近年、副腎皮質ステロイド不応性／不耐性ITPに対して、トロンボポエチン受容体作動薬（thrombopoietin receptor agonists: TPO-RA）が広く使用されるようになってきている。ITP患者ではTPO-RAが使用される前から、一般人と比較して血栓症の増加が指摘されているが¹¹⁾、トロンボポエチン（thrombopoietin: TPO）は、*in vitro*で血小板機能を増強することが示されていることから¹²⁾、TPO-RAにより血栓症が更に増加することが危惧されている。従って、特にTPO-RA使用患者における血小板機能を把握することは血栓症予防の観点から重要である。しかしITP患者における血小板機能検査には以下のような技術的な問題があり、このことが一定の見解を得ることの大きな妨げとなってきた。

2. 血小板減少患者における血小板機能測定の問題

血小板機能測定のゴールドスタンダードは比濁法を用いた血小板凝集能検査（light transmission aggregometry: LTA）である。しかしLTAはその原理上、ITPのような血小板減少患者においては信頼できるデータを得ることが難しい。従来からこの問題を克服するために、フローサイトメーター（flow cytometer: FCM）を用いた血小板活性化マーカー測定が広く行われてきた。この方法は血小板数が極めて低値な症例でも検討可能であることから非常に有用な方法であるが、測定方法や解析方法の影響を受

けることから、正常コントロールとの比較には注意を要する。また、GPIIb/IIIaの活性化（一般に活性化GPIIb/IIIaを特異的に認識するPAC1抗体、もしくはフィブリノゲンの結合により測定される）、 α 顆粒放出（一般に血小板表面のCD62P発現により測定される）など、血小板機能の各側面しか検討できず、LTAのような総合的な血小板機能評価は難しい。2013年、De Cuyperらはこれらの問題を解決する一つの方法として、FCMを用いた血小板凝集能検査（FCM-based platelet aggregation assay: FCA）を開発した¹³⁾。これにより血小板数2万/ μ L以下の患者においても血小板凝集能を検討することが可能となった。

3. ITP患者血小板機能の評価法

今回、我々はFCMを用いたこれらの血小板機能検査を用いて、ITP血小板の機能評価を行った¹⁴⁾。最初に我々が用いた機能評価法の概略を以下に示す。

1) FCA (図1)

2万/ μ Lに調整した洗浄血小板を蛍光色素CFSEもしくはPKH-26で一定時間処理した後、AB血清を加え染色反応を停止する。これらを等量、凝集計用ガラスチューブ内で混合した後、各種アゴニスト（PMA, ADPおよびPAR1-TRAP）を加え、一定時間37°C下で攪拌、パラホルムアルデヒドを加え反応を停止し、FCMにて解析を行う。凝集率は、二重染色されたドットの割合として計算した。これにより、PMA刺激では経時的な凝集率の増加、ADPおよびPAR1-TRAPにおいては、2~4分をピークとする血小板凝集が検出される。血小板無力症例では、すべてのアゴニストにおいて血小板凝集は認めず、またP2Y₁₂欠損例では、ADP刺激においてのみ凝集が得られなかったことから、本法によりアゴニスト特異的な血小板凝集が検出できていることが示されている¹⁴⁾。

2) PAC1結合およびCD62P発現（PAC1/CD62P assay）

正常コントロールとできるだけ条件を一定にするために、PRPをPPPで希釈し血小板数を一定にした（2万/ μ L）検体を用いた。FITC-PAC1、PE-CD62P、APC-CD42bを各種アゴニスト〔PMA, ADP, PAR1-TRAPおよびGPVI刺激ペプチド（SRP）〕とともに

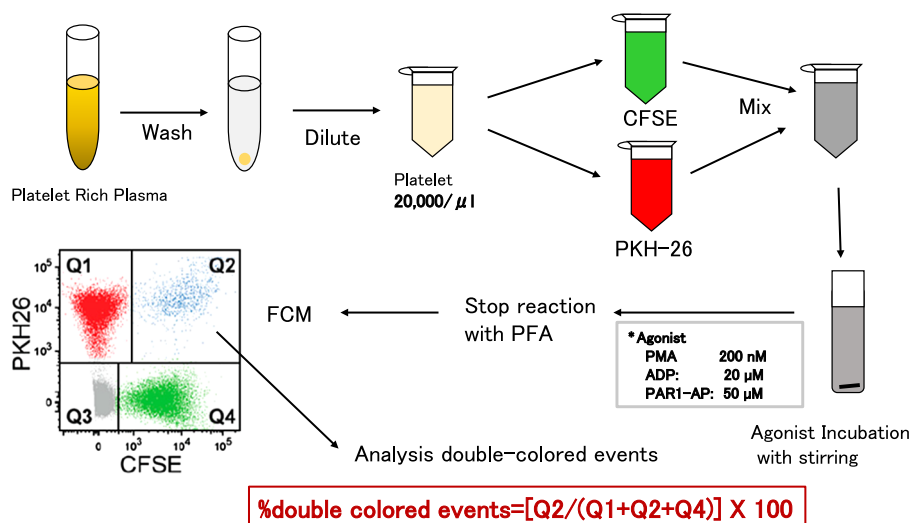


図1 フローサイトメーターを用いた血小板凝集能測定（FCA法）

PRPをCFSEまたはPKH26で染色した後、等量を混合し、37°C、攪拌下でアゴニストを添加、任意の時間でPFAを加え血小板凝集反応を停止する。表示した計算式を用いて血小板凝集率を計算する¹³⁾。

加え、30分間刺激後、FCMを用いて解析した。ITP血小板は正常血小板に比べて明らかにサイズが大きいため、CD42b陽性細胞全体を解析する方法（whole gating法）と、血小板サイズの指標となるFSCを用いて3つの分画に分けることにより、ほぼ同じサイズの血小板を比較する方法（size-adjusted法）の2種類の解析方法を用いて、正常血小板とITP血小板の比較を行った（図2）¹⁴⁾。

4. ITP患者の血小板機能は亢進している？

我々は、慢性ITP患者21名〔女性19名、男性2名、年齢64歳（中央値）〕の血小板機能を健常者20名（女性6名、男性14名、年齢40歳）と比較した。FCAにおいては、PMAおよびADP刺激では、両者間に有意な差は認めなかったが、PAR1-TRAP刺激では、ITPにおいて血小板凝集の増加が認められた。PAC1/CD62P assayにおいては、血小板全体を評価するwhole gating法を用いた解析では、PMA刺激によるPAC1/CD62P、およびPAR1-AP刺激後のCD62P発現においてITP血小板で有意な亢進を認めた。これらの結果は、ITP患者の血小板機能は正常コントロールの血小板と比べその機能に差がない、もしくは亢進していることを示している（図3）。

5. ITP患者の血小板機能は低下している？

前述したようにITP患者血小板は正常血小板に比べて大きいため、whole gating法を用いたPAC1/CD62P assayの結果には血小板サイズの違いが影響している可能性がある。そこでFSCを用いて血小板サイズを揃えたsize-adjusted法を用いて、PAC1/CD62P assayを再評価した。その結果、ADP、PAR1-TRAPおよびSRP刺激後のPAC1結合、ADP刺激後のCD62P発現において、各分画でITP血小板の活性化は正常血小板に比べて劣っていた（図4）。以上の結果から、ITP血小板のアゴニストに対する反応性は、（特にADP刺激において）正常血小板よりも低下していると考えられるが、血小板サイズの増大がその低反応性を補填しており、血小板全体として評価した場合は正常と同等～亢進するという結果になったものと考えられる。FCAにおいては、血小板数を一定とした検体を用いたことから、ITPでは正常コントロールよりも血小板総体積が増加していたと考えられ、このことがITP検体における血小板凝集の亢進に反映していたと想定される。

今回の結果は、血小板機能をどのような視点で評価するかによって、その解釈が異なることを示している。ITP血小板と正常血小板のように種々の条件

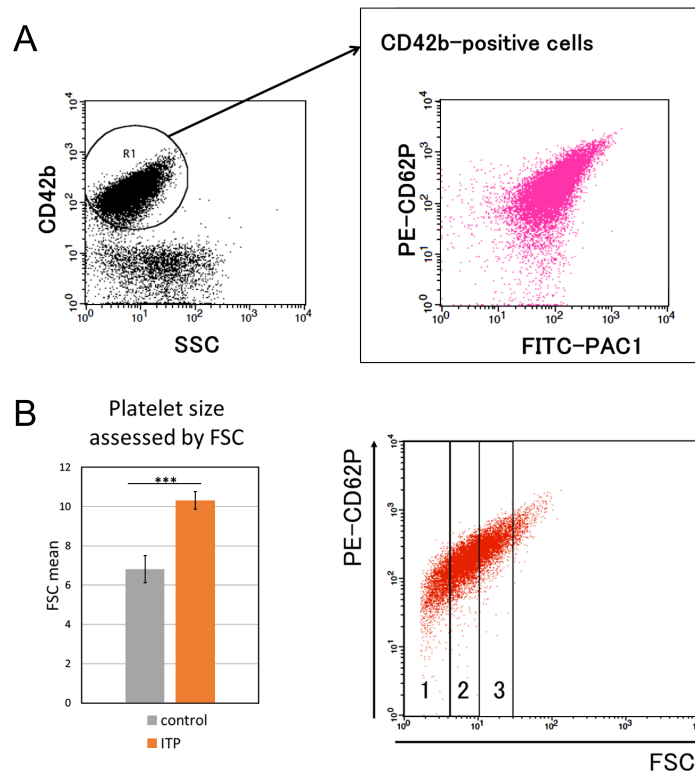


図2 PAC1/CD62P assayにおける解析方法

(A) Whole gating 法：CD42b 陽性細胞全体を解析する。(B) Size-adjusted 法：ITP 血小板はコントロール血小板に比べて、有意にサイズが大きい。FSC で十分な細胞数がえられる3つの分画に分割し、それぞれにおいて解析を行う。

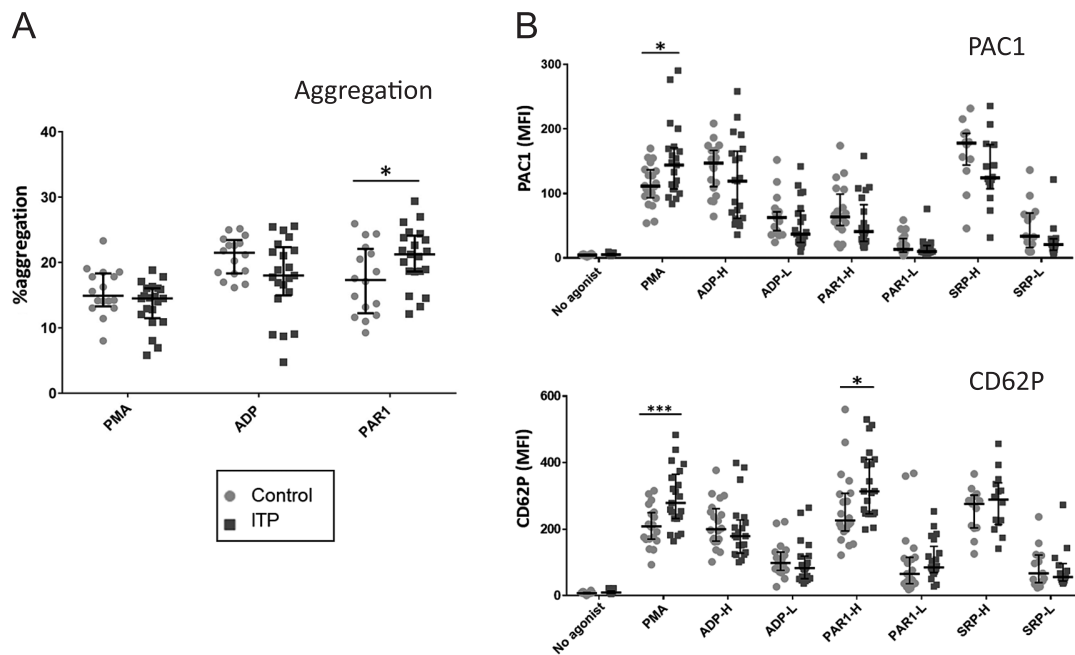


図3 FCA および Whole gating 法を用いた PAC1/CD62P assay¹⁴⁾

(A) PMA および ADP による血小板凝集に差はないが、PAR1-TRAP 刺激では、ITP で有意に亢進していた。(B) PMA 刺激による PAC1/CD62P, および PAR1-TRAP 刺激による CD62P において、ITP では亢進していた。各アゴニストは高濃度 (H), または低濃度 (L) での刺激を行った。* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ 。

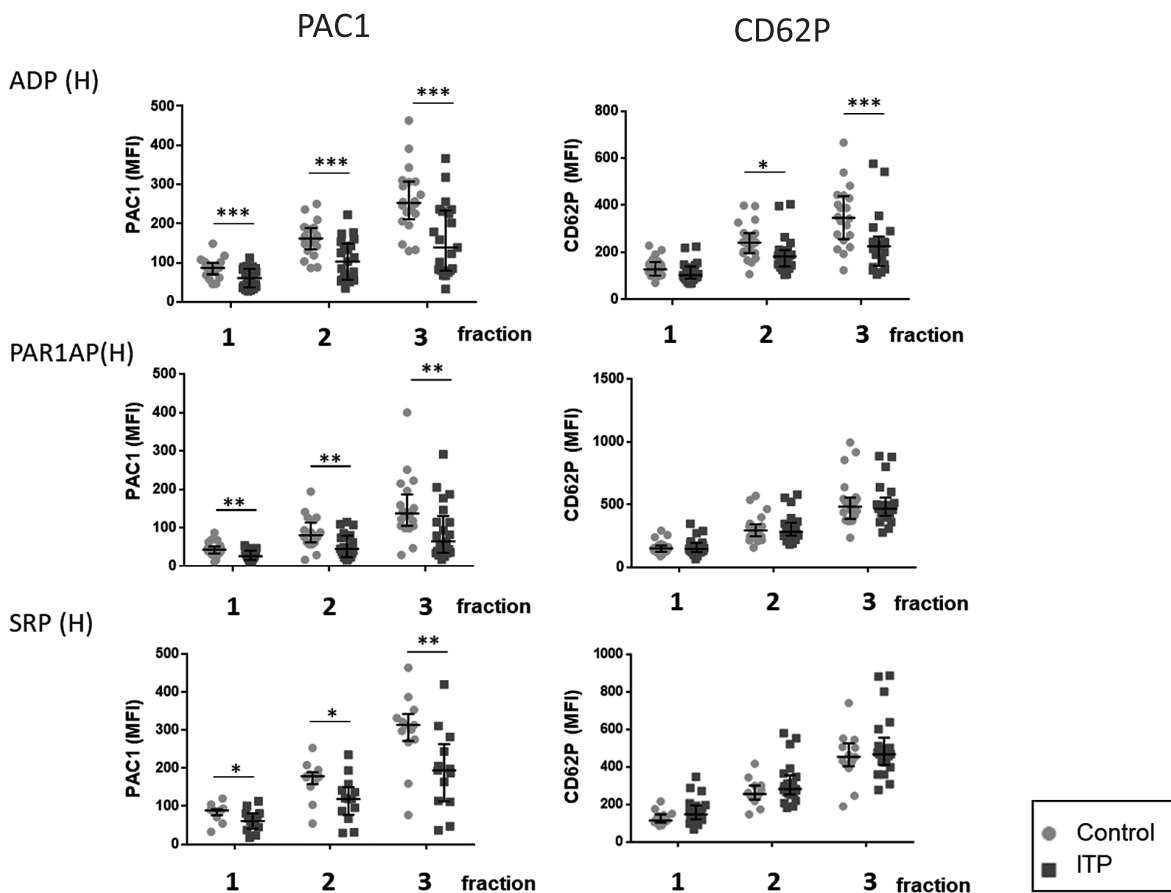


図4 Size-adjusted法を用いたPAC1/CD62P assay¹⁴⁾

血小板サイズを揃えたそれぞれの分画において、PAC1結合はITP血小板において低下を認めた。ADP刺激においてはCD62P発現の低下も認められた。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ 。

の異なる血小板の機能を評価する場合には特にこの点に留意する必要がある、このことが今までのITP血小板の機能評価に関する報告が一定しないことの一因であると思われる。

6. ITP血小板の機能と抗血小板抗体およびTPO-RAとの関連

次に我々は、ITP患者における抗血小板自己抗体の有無およびTPO-RA使用の有無と血小板機能の関連についてサブグループ解析を行った。我々が検討した21例中9例において血小板関連(platelet associated: PA)抗GPIIb/IIIa抗体が検出された。抗体陽性の症例では、抗体陰性の症例と比べて血小板凝集およびADP刺激後のPAC1/CD62Pにおいて有意の

低下を認めた、また21例中11例においてTPO-RA(全員エルトロンボパグ)が使用されていたが、TPO-RA使用患者において、血小板凝集およびADP刺激後のPAC1結合においてコントロールと比べて低下を認めた(図5)。今回の結果は、これらの要因が血小板機能に関与している可能性を示唆する結果であった。しかし、症例数が少ないこと、また多くのTPO-RA使用患者(11例中8例)において、抗GPIIb/IIIa抗体が陽性であったことから、TPO-RAと抗GPIIb/IIIa抗体のいずれが血小板機能により強い影響を与えているのかを明らかにすることはできなかった。

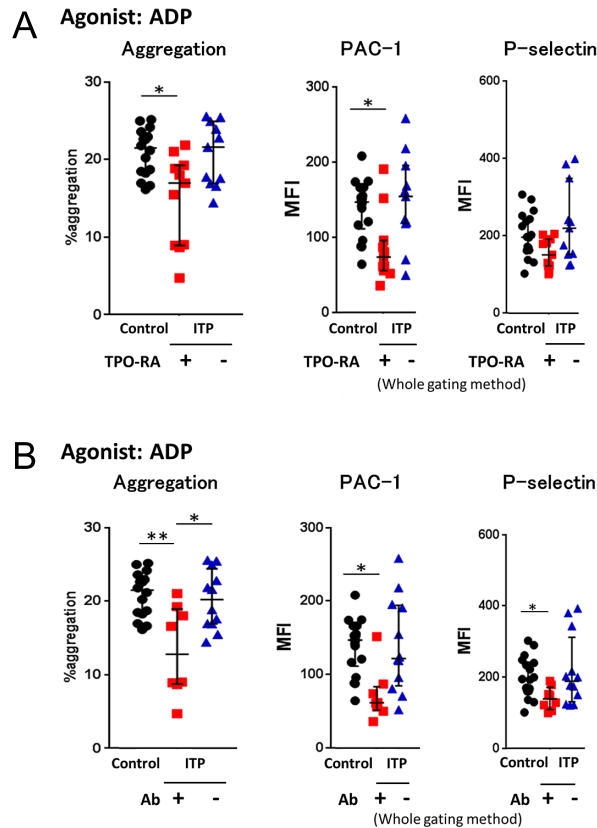


図5 TPO-RA 使用およびPA 抗 GPIIb/IIIa 抗体の有無の影響¹⁴⁾

(A) TPO-RA (エルトロンボパグ) 使用患者において, ADP 刺激による血小板凝集, PAC1 結合の低下を認めた. (B) 抗 GPIIb/IIIa 抗体を有する患者において, ADP 刺激による血小板凝集, PAC1 および CD62P の低下を認めた. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

7. 考察: ITP 血小板の機能に影響を与える要因について

ITP 患者における血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体の多くは GPIIb/IIIa のリガンド結合部位近傍を認識していることから⁵⁾, 自己抗体が血小板機能に抑制的に働く可能性は想定される. 更に, 抗血小板自己抗体により誘導される巨核球の成熟障害により¹⁵⁾, 血小板活性化シグナルが障害されている可能性も考えられる. PAC1 結合だけでなく CD62P 発現も低下していたことは, 後者の可能性を支持する. 一方, TPO-RA 使用により血小板機能が抑制される可能性があるという今回の結果は, TPO が *in vitro* において血小板活性化の促進作用があることから意外に思われる¹²⁾. しかし, エルトロンボパグ使用例の血小板機能を検討した Psaila らの報告を詳細にみても,

ADP 刺激による PAC1 結合および CD62P 発現はエルトロンボパグ開始後, 徐々に低下していることが示されている¹⁶⁾. また, Al-Samkari らはロミプロスチムを使用し, 血小板数が増加した cITP 患者において LTA を行い, ITP 患者の多くにおいて ADP およびエピネフリン凝集が正常例と比べ低下していることを報告している¹⁷⁾. これらの結果は, 生体内における持続的な TPO 受容体からのシグナルが血小板活性化機構に抑制的に働いている可能性を示唆している. 実際, 今回の検討においても, エルトロンボパグ使用前後で血小板機能を検討することができた 1 例において, ADP 刺激後の血小板凝集および PAC1/CD62P の低下を認めた¹⁴⁾. また, Gupta らは, 抗血小板抗体輸注により誘導した血小板減少マウスを用いて, 血小板減少から回復期の幼若血小板においては GPVI シグナルが抑制されていることを示した¹⁸⁾.

我々の検討では、特に GPVI シグナル特異的な低下は認めなかったが、ITP における幼若血小板の増加自体が、血小板機能低下と関連している可能性がある。

8. 結語

ITP 患者の血小板機能はその促進因子（血小板サイズの増大）と抑制因子（抗 GPIIb/IIIa 抗体、あるいは TPO-RA の使用）のバランスにより規定されている可能性を、FCM を用いた解析により示した。今後はより多数例の解析を行う必要があるが、今回紹介した FCA は煩雑な方法であり、一般検査として行うには適さない。より簡便な標準的検査法の確立と、その臨床的意義を明らかにすることが重要な課題である。

著者全員の利益相反（COI）の開示：

柏木浩和：講演料・原稿料など（ノバルティス）

西浦伸子：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) 柏木浩和, 桑名正隆, 羽藤高明, 高蓋寿朗, 藤村欣吾, 倉田義之, 村田満, 富山佳昭: 成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2019 改訂版. *臨床血液* **60**: 877–896, 2019.
- 2) Hato T, Shimada N, Kurata Y, Kuwana M, Fujimura K, Kashiwagi H, Takafuta T, Murata M, Tomiyama Y: Risk factors for skin, mucosal, and organ bleeding in adults with primary ITP: a nationwide study in Japan. *Blood Adv* **4**: 1648–1655, 2020.
- 3) Frelinger AL, Grace RF, Gerrits AJ, Berny-Lang MA, Brown T, Carmichael SL, Neufeld EJ, Michelson AD: Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. *Blood* **126**: 873–879, 2015.
- 4) Middelburg RA, Carbaat-Ham JC, Hesam H, Ragusi MA, Zwaginga JJ: Platelet function in adult ITP patients can be either increased or decreased, compared to healthy controls, and is associated with bleeding risk. *Hematology* **21**: 549–551, 2016.
- 5) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* **120**: 1499–1509, 2012.
- 6) Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: A unique phenotype of acquired Glanzmann thrombasthenia due to non-function-blocking anti- α IIb β 3 autoantibodies. *J Thromb Haemost* **17**: 206–219, 2019.
- 7) Akiyama M, Kashiwagi H, Todo K, Moroi M, Berndt MC, Kojima H, Kanakura Y, Tomiyama Y: Presence of platelet-associated anti-glycoprotein (GP)VI autoantibodies and restoration of GPVI expression in patients with GPVI deficiency. *J Thromb Haemost* **7**: 1373–1383, 2009.
- 8) Harker LA, Slichter SJ: The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. *N Engl J Med* **287**: 155–159, 1972.
- 9) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, Kosugi S, Kashiwagi H, Honda S, Tomiyama Y: Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* **115**: 656–664, 2001.
- 10) Peng J, Friese P, Heilmann E, George JN, Burstein SA, Dale GL: Aged platelets have an impaired response to thrombin as quantitated by P-selectin expression. *Blood* **83**: 161–166, 1994.
- 11) Langeberg WJ, Schoonen WM, Eisen M, Gamelin L, Stryker S: Thromboembolism in patients with immune thrombocytopenia (ITP): a meta-analysis of observational studies. *Int J Hematol* **103**: 655–664, 2016.
- 12) Oda A, Miyakawa Y, Druker BJ, Ozaki K, Ohashi H, Kato T, Miyazaki H, Handa M, Ikebuchi K, Ikeda Y: Thrombopoietin-induced signal transduction and potentiation of platelet activation. *Thromb Haemost* **82**: 377–384, 1999.
- 13) De Cuyper IM, Meinders M, van de Vijver E, de Korte D, Porcelijn L, de Haas M, Eble JA, Seeger K, Rutella S, Pagliara D, Kuijpers TW, Verhoeven AJ, van den Berg TK, Gutiérrez L: A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood* **121**: e70–80, 2013.
- 14) Nishiura N, Kashiwagi H, Akuta K, Hayashi S, Kato H, Kanakura Y, Tomiyama Y: Reevaluation of platelet function in chronic immune thrombocytopenia: impacts of platelet size, platelet-associated anti- α IIb β 3 antibodies and thrombopoietin receptor agonists. *Br J Haematol* **189**: 760–771, 2020.
- 15) McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J: Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* **103**: 1364–1369, 2004.
- 16) Psaila B, Bussel JB, Linden MD, Babula B, Li Y, Barnard MR, Tate C, Mathur K, Frelinger AL, Michelson AD: In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation. *Blood* **119**: 4066–4072, 2012.
- 17) Al-Samkari H, Van Cott EM, Kuter DJ: Platelet aggregation response in immune thrombocytopenia patients treated with romiplostim. *Ann Hematol* **98**: 581–588, 2019.
- 18) Gupta S, Cherpokova D, Spindler M, Morowski M, Bender M, Nieswandt B: GPVI signaling is compromised in newly formed platelets after acute thrombocytopenia in mice. *Blood* **131**: 1106–1110, 2018.