

Subcommittee on Platelet Physiology

Chair: Dr. Sofia Ramström (Sweden)

Co-Chair: Joe Aslan (USA), Hervé Falet (USA), Pierre Fontana (Switzerland)
Rutvi Gautam Dave (India), Emma Josefsson (Sweden), Georges Jourdi (France),
Dianne van der Wal (Australia)

幹事 富山 佳昭

2024 年 6 月 25 日 火曜日 PM4:30 – PM6:30 [PM6:30 – 8:30 (日本時間)]

対面+Webinar バンコク (タイ)

1. Session Welcome

今回の ISTH は、対面参加か Web 参加に分かれており、リアルタイムでの Web 配信はなかったため、2 日ほど遅れて配信されたオンデマンド録画を視聴した。

Speaker : Georges Jourdi, PharmD, PhD France

始めに、Co-chair である Dr. Georges Jourdi より、Platelet Physiology SSC の開会の挨拶と、今回の発表内容に関して説明があった。

2. Platelet Physiology SSC: 2024 update

Speaker: Sofia Ramström, PhD, Associate Professor – School of Medical Sciences,
Cardiovascular Research Centre Örebro University, Sweden

引き続き、Chair person である Dr. Ramström より、Platelet Physiology SSC に関する最新の活動の概要が説明された。Platelet Physiology SSC の目的は、「血小板のバイオロジーとその機能に関してあらゆる観点より研究し、血小板の血栓、止血およびその生理的な役割を解析すること」であることが示された。求められている使命としては、臨床的に重要な問題に対応、現在のデータを評価し欠けている点や論争になっている点に対応、国際共同研究の遂行、研究成果の公表、検査の標準化などである。Platelet Physiology SSC の Co-chair メンバーが紹介され (上記参照)、Pierre Fontana, Rutvi Gautam Dave, Rutvi Gautam Dave が新たに co-chair となったことが紹介された。本 SSC の業績として、前々回の Chair であった、Dr. Paolo Gesele が中心となって行った業績が報告された。Gesele P, Falcinelli E, Bury L, Alessi M, Guglielmini G, Falaise C, Podda G, Fiore M, Mazziotta F, Sevivas T, Bermejo N, De Candia E, Chitlur M, Lambert M P, Barcella L, Glembotsky AC, & Lordkipanidzé M. (2024). Association of laboratory test results with the bleeding history in patients with inherited platelet function disorders (the Bleeding Assesment Tool - LABoratory tests substudy):

communication from the Platelet Physiology ISTH-SSC. Res Pract Thromb Haemost 8(1), 102305.このプロジェクトにて、遺伝的な血小板機能異常症の診断には、ISTH-BAT による評価に加え、標準的な血小板機能検査による評価が、将来の出血リスク評価に有用であることを示唆することができた。

さらに今年 accept になった業績として、Baker RI, Choi P, Curry N, Gebhart J, Gomez K, Henskens Y, Heubel-Moenen F, James P, Kadir RA, Kouides P, Lavin M, Lordkipanidze M, Lowe G, Mumford A, Mutch N, Nagler M, Othman M, Pabinger I, Sidonio R, . . . O'Donnell JS. (2024). Standardisation of Definition and Management for Bleeding Disorder of Unknown Cause: Communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2024.03.005>.このプロジェクトは4つのSSCの合同で行われたプロジェクトである。

さらに、Dr. Matt Rondina が主導した、血小板トランスクリプトームに関する標準化プロジェクトである STRIDE study が JTH 誌に受理されたことや、Dr. Marina Camera の冠動脈疾患 (CAD) に焦点を当てた血小板活性化のバイオマーカーに関してのシステムティックレビューやメタ解析に関するプロジェクトや Dr. Joseph Aslan が Models of Thrombosis & Hemostasis SSC と共同で血小板プロテオーム研究の標準化にむけて取り組んでいることが報告された。また、血小板型フォンウィルブランド病の新たなネーミングや血小板減少患者における血小板凝集検査法の標準化も進行中であること、さらに Dr. Paolo Gresele が ISTH-BAT に関して遺伝性血小板機能異常症患者の個人レベルでのメタ解析に関するプロジェクトの投稿準備中であることを紹介した。

一方では、会員に向けて積極的に SSC に参加することや、Co-Chair へ積極的に応募してほしいことが述べられた。現時点で Co-Chair として2名募集中であることが示され、興味のある場合には積極的に参加してほしいこと、Platelet Physiology SSC の会員数は398名とのことである。

3. Update: Consensus protocol for quantification/detection of surface platelet glycans by using lectins

Speaker: Dianne E. van der Wal, PhD – ANZAC Research Institute

昨年からのプロジェクトとして、Dr. van der Wal は、レクチンを用いた血小板表面のグリカンの定量/検出の標準化プロトコールに関して、発表した。

グリカンとは炭水化物であり、1980年台には血小板グリコカリシンが同定されたが、最近では血小板グリカンの研究は、より注目を集めるようになってきている。特に血小板の脱シアル酸化が注目されているが、血小板の脱シアル酸化の機序としては、1. 菌血症、2. 血小板の老化、3. SLC35A1 や GNE の遺伝子変異、4. 抗 GPIIb α 抗体による作用、5. 血小板の低温貯蔵、6. 血小板活性化、などが報告されている。

血小板表面のグリカンを検出する主なレクチンとしては、1. RCA-1（ガラクトースを認識）と ECL（Gal 81,4GalNac）が汎用されている。正常コントロールにて RCA を用いて β ガラクトースを測定した研究では、RCA 濃度は $12.5\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いており、RCA 結合は採血後 24 時間安定していた。RCA 結合は FCS、つまり血小板の大きさとの比率にて算出し検討したが、性差や血液型では差を認めなかった。一方、RCA 結合は、血小板活性化や血小板プロコアグラント活性と相関するとの成績も報告されている。

一方、正常コントロール血小板とレクチン（RCA-1 や s WGA）の結合は、個人差が大きいことが示されている。また、用いるレクチンのロット番号による差や、日差変動も示されている。

上記の基礎データを踏まえ、測定標準化に向けて行ったサーベイ結果が報告された。

使用してるレクチンは、RCA-1 が最も多く、次いで ECL であった。多くは FITC を直接結合して検出しており、その濃度は $0.5\text{--}10\mu\text{g}/\text{ml}$ とまちまちであった。多くは洗浄血小板を用いていたが、チューブあたりの血小板数は $500\sim 5\times 10^7$ とまちまちであった。陰性コントロールとして健常人や溶出した糖鎖を用いているラボもあるが少数であった。陽性コントロールは、ノイラミニダーゼ処理が多かったと報告した。

Speaker: Alexandre KAUSKOT, PhD – INSERM U1176, Hôpital Bicêtre

Dr.Kauskot はパリとシドニーで解析したプロトコールの結果を報告した。パリでは洗浄血小板、シドニーではアフェレーシス血小板を希釈して用いた。RCA-1 は血小板濃度により蛍光強度が異なり、血小板数が多いと蛍光強度が減弱した。さらにレクチン濃度が高濃度になると、血小板凝集（agglutination）が起こることが明らかになった。陽性コントロールとして 4 種類のノイラミニダーゼ（ロッッシュ社製 2 種類、シグマ社製、New England Biolabs 社製）の検討を行い New England Biolabs 以外のノイラミニダーゼはフローサイトメトリーにて検出されたが、New England Biolabs は上手く検出できないとの成績であった。陽性コントロールとして冷蔵血小板も検討したが、室温の血小板と冷蔵血小板を経時的に解析したが、両者のレクチン染色には差が無く、ノイラミニダーゼ処理が簡便であるため、ノイラミニダーゼを陽性コントロールとする結論になった。

以上をまとめると、

1. レクチンの終濃度（新鮮なレクチンで 10 倍濃度で保存）

ECL $2\mu\text{g}/\text{mL}$, RCA $5\mu\text{g}/\text{mL}$

2. 血小板濃度

$50,000\sim 200,000/\mu\text{L}$

3. 緩衝液

Tyrode 緩衝液 : Ca^{2+} なし

4. コントロール

陽性コントロール：ノイラミニダーゼ処理血小板 ノイラミニダーゼ ($0.05\text{--}1\text{ U}/\text{mL}$)

陰性コントロール：β-Lactose (200 mM)

5. 反応系

最終の反応 volume：50 μL

反応時間：室温 20 分 Tyrode 緩衝液 450 μL で反応をストップ

4. Update: International multi-center validation of flow cytometry methods for the detection of Tissue-factor positive platelets (中間報告)

Speaker: Marina Camera, PhD – Università degli Studi di Milano

Speaker: Marta Brambilla, PhD – Centro Cardiologico Monzino IRCCS

Dr.Camera と Dr. Brambilla はフローサイトメトリーを用いた TF 陽性血小板検出法の国際多施設評価の中間報告を行った。TF 陽性血小板は古くから解析されているが、いまだにその同定に苦慮する研究者も多い。TF は巨核球の proplatelet の先端に検出され、さらに近傍の血小板に移行し、TF 陽性血小板は大型であることが示されている。TF 陽性血小板数は、5 年間のフォローアップ期間における全死亡および心血管死亡の独立した危険因子であることが示されている。

TF 陽性血小板検出を困難にしている要因としては、解析検体（全血か洗浄血小板）、用いる抗体（PhycoErythrin 標識か StarFluo488 標識か）、用いるフローサイトメトリーの違いなどが考えられる。この問題を検証すべく本プロジェクトを開始した。2023 年 9 月～10 月に参加施設を募集し、2024 年 3 月より活動を開始した。参加施設はヨーロッパを中心に 20 施設（その内 2 施設は辞退）。トレーニング期間と評価期間に分けて行った。トレーニング期間では、予め抗体を反応させた検体を各施設に送付した。できるだけ簡単にするため、全血で StarFluo488 標識抗ヒト TF 抗体を反応させて送付した。フローサイトメトリーは多岐にわたっていたが、各施設でのフローサイトメトリーを用いたが、検体を正しく検出できたのは 1 施設のみであったため、6-peak rainbow beads によるフローサイトメトリーの調整を行った。その結果、9/15 施設(60%)で TF 陽性血小板が期待どおり検出できたが、残りの施設の検出感度は充分ではなく、用いたフローサイトメトリーの検出感度に問題がある可能性が考えられた。評価期間では、抗体を反応させる前の固定血小板を送付して陰性コントロール、TF 弱陽性血小板、TF 強陽性血小板を送付し、triplicates で評価を行った。評価した 9 施設でほぼ良好な結果が得られた。

以上の中間解析より、フローサイトメトリーの検出性能および正確な検定が必須であり、また検体の正確な処理も必須であることが示された。今後は、まだ検討できていない施設での解析や、手順をビデオ投稿できる雑誌 (JOVE) への投稿を予定しているとの発表であった。

5. Update: Standardization of Washed Platelet Preparation Methods for Proteomic Analysis (The SWAP study)

Speaker: Joe Aslan, PhD – Oregon Health & Science University

血小板プロテオミクスに関しての洗浄血小板サンプルの調整に関しての標準化についてのプロジェクトとして、The SWAP study (Standardization of Washed Platelet Preparation Methods for Proteomic Analysis)を行っている。残念なことに、主任研究者である Dr. Joe Aslan が今回は不参加であり、代わりに Dr. Sofia Ramström がその進捗状況を紹介した。血小板プロテオームとは、血小板検体に含まれるすべての蛋白群を意味し、3000 種類以上（おそらくは 10000 種類以上）の蛋白が存在する。血小板プロテオミクスとは、血小板プロテオームの解析を意味し、その方法として、ゲルろ過電気泳動やブロット、イメージング、ELISA などがあり、マススペクトメトリーにより蛋白を同定する。血小板プロテオミクスは近年発展を遂げているが、血小板サンプルの調整法（抗凝固剤の種類やその保存法、温度など）やプロテオーム解析の方法ははまだ標準化されていない。The SWAP study では、3~4 の異なる血小板洗浄法に関して血小板プロテオミクスに関するデータの類似点や相違点をサーチし、その後、プロトコールを統一し 3~4 の研究施設にて洗浄血小板作製の差異がプロテオミクス解析に影響を与えるか前向きに研究し、最終的にはプロテオミクス研究に適した血小板検体の作製法を確立する予定のことである。

5. Update: International multicenter assessment of methods to detect platelet dense granule deficiencies

Sofia Ramström, Dianne van der Wal, Marie Lordkipanidzé, Rutvi Dave

Speaker : Dianne van der Wal

Speaker : Sofia Ramström

Dr. Ramström と Dr. van der Wal は dense granule(δ -granule)欠損症の国際多施設共同による進捗状況を報告した。Dense granule 欠損症の検出方法としては、Lumiaggrometry, Luciferin/luciferase-based assay, HPLC, radiolabeled serotonin (5-HT) assay, 電顕 (TEM) が用いられていたが、放射性セロトニンの取り込みや放出反応は 1970 年以前に確立され、「gold standard」となっているが、最近では、放射性物質を使うアッセイは用いられなくなっている。また、電顕での解析もハードルが高い。そのため、本プロジェクトでは、現在汎用されている検査法につき国際多施設共同による検証を行うこととした。基本はフローサイトメトリーであるが、それに加える検出法としては、HPLC による ATP/ADP あるいは 5-HT の解析、lumiaggrometry, Fluorometric 5-HT release, ELISA による 5-HT, フローサイトメトリーでのメパクリン、CD63 測定などである。

当初の計画を提示した際、多くのラボが興味を示したが、各施設には **dense granule** 欠損症を数例しか解析していないこと、またフローサイトメトリー以外の他の方法をすべて行っているラボが少ないことが判明した。そのため、各検証の測定は以下の3か所で行うことに変更した。HPLC 解析はフランス、ELISA はイタリア、MS-MS はオランダ。

解析方法は、フローサイトメトリーを用いて、血小板の同定と **p-selectin** 検出（可能な限り **GPIIb-IIIa** 活性化も）を目指し、抗体としては抗 **GPIb** 抗体、抗 **P** セレクチン抗体、抗 **CD63** 抗体、**PAC-1** 抗体を用い、メパクリン染色も非活性化と **25 μ M SFLLRN** (**TRAP-6**) 刺激を行うこととした。そのほかに、血小板数、**25 μ M SFLLRN** で刺激した **PRP** の上清、**PRP lysate** も収集し、HPLC, LC-MS/MS, ELISA にて解析する予定である。

当初参加ラボは14施設であったが、倫理委員会で承認済みなのは4施設で、現在検体収集を始めた施設は2施設に留まっており、計画が難航していることが説明された。

6. Potential new projects – input from the ISTH community

新規プロジェクトとして以下の6つのプロジェクトが紹介された。

1) Update of the recommendations of the ISTH SSC on platelet physiology for the standardization of light transmission aggregometry.

Georges Jourdi, Emma Josefsson, Eleonora Petito

Speaker: Georges Jourdi.

Dr.Jourdi は、新規プロジェクトの提案として、透過光血小板凝集に関しては、

Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D, Nurden P, Rao AK, Schmaier AH, Watson SP, Lussana F, Pugliano MT, Michelson AD.

Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A

Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of

SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013. doi: 10.1111/jth.12231.が2013年に発表されているが、研究室間での国際的な諸問題に関する調整に関しては考慮されておらず、また発表

当時においてエビデンスに乏しい記述もあるため、2009年以降に発表された論文の文献検索を行い、上記ガイドラインに関してその内容をアップデートするプロジェクトを報告した。

2) Generation of an international expert consensus protocol for platelet-leukocyte aggregates measurement by flow cytometry. (SSC Vascular Biology との共同提案)

Eleonora Petito, Georges Jourdi, Sofia Ramström

Speaker: Eleonora Petito

血小板-白血球凝集形成は心血管病変、自己免疫疾患、ウイルス感染など様々な血栓性炎症疾患の病態形成に関与しており、予後や診断、さらには新規治療法の標的として重要で

ある。そのため、血小板-白血球凝集をフローサイトメトリーにて解析する方法のガイドラインを作成する新規プロジェクトが提案された。

3) How to soluble platelet-derived proteins relate to platelet reactivity in cardiovascular patients?

Pierre Fontana, Georges Jourdi, Sofia Ramström

Speaker: Pierre Fontana,

Dr.Fontana は血小板活性化のマーカーとして α 顆粒内容物 (PF4, β -thromboglobulin, MMP-2, SCUBE1, thrombospondin など) や膜蛋白 (sP-selectin, sGPV, glycofibrin, sGPVI, sCD40L など)、その他 (血清 TXB2, GDF-15 など) が存在する。初めにシステムティックレビューにて血小板機能と可溶性マーカーの検索を行い、個々の患者の情報も解析する。また、TXA2 経路、ADP 経路、その他に分け各可溶性マーカーと血小板機能の関係を検索する。次のステップとして、心血管病変患者を解析し可溶性マーカーの有用性を検討するとのプロジェクトを提案した。

4) Standardization of flow cytometric method to study reticulated platelets

Emma Josefsson, Sofia Ramström, Georges Jourdi, Eleonora Petito

Reticulated (immature) platelets は RNA が豊富な、巨核球から新たに産生された血小板であり、巨核球造血や血小板のターンオーバー、さらには向血栓性作用を示す。Reticulated platelets の増加は、喫煙者、糖尿病、急性冠症候群、敗血症などで認められる。検出方法は、フローサイトメトリーにてチアゾールオレンジと血小板マーカーとしての CD41 あるいは CD61 抗体を用いる方法や、SYTO13 を用いる方法、さらには自動化血球測定装置【Sysmex(IPF), Mindray(OPF), Abbott(retPLT), ADVIA(RtcPlts)】を用いる方法もある。しかしながら方法の標準化は行われていない。そのため、文献検索を行い、国際的に専門家のコンセンサスを得て、測定方法の標準化を行うとのプロジェクトを提案した。

5) Role of antiplatelet monitoring in stroke and endovascular repair: Literature review and international survey.

Rutvi Gautam Dave, Pierre Fontana, Georges Jourdi

最後に Dr.Dace は、冠動脈疾患における抗血小板薬のモニターは 20 年前より行われており、推奨度はクラス IIb であることが確立しているが、一方、脳梗塞は血栓塞栓がメインであり、また脳動脈瘤の血管内修復術に関しては、血栓の合併症は 1-9%で出血は 2.2-9.5%と報告されている。しかしながら、これらの疾患に関しての最適な抗血小板療法は確立していない。そのため、文献検索を中心に脳梗塞や脳動脈瘤の血管内修復術における抗血小板療法の意義を検討するプロジェクトを提案した。

最後に Chair person の Dr.Sofia Ramström が締めくくりの挨拶をして閉会となった。