

血小板凝集機構および血液凝固に対する補体系の役割

水野 智博

名城大学薬学部 薬効解析学

The roles of complement for platelet aggregation and coagulation systems

Tomohiro Mizuno

Analytical Pharmacology, Meijo University faculty of Pharmacy

[はじめに]

血小板凝集機構および血液凝固系は、創傷時の止血だけではなく、組織の修復にも関与することで、恒常性の維持に大きく貢献している。一方で、動脈硬化の進展による冠動脈疾患だけでなく、播種性血管内凝固症候群（Disseminated intravascular coagulation: DIC）のような急性疾患の発症にも深く関与しており、血小板凝集と凝固系をコントロールすることで、予後が改善する疾患が数多く存在する。補体系と凝固系のクロストークについては、30年以上前よりその存在が指摘されているが、疾患との関わりについては、比較的歴史が浅い。血小板と補体系の関係についても、同様である。本稿では、血小板凝集機構および凝固系について概説し、補体系との関わり、各種関連疾患における治療ターゲットとしての補体の可能性について述べたい。

[血小板凝集と補体]

血管内皮の損傷によりコラーゲンとフォン・ヴィレブランド因子（vWF）が結合し、次に血小板表面に発現する GPIIb 受容体と vWF との結合、GPVI とコラーゲンの結合により、血小板の一次凝集が成立する。一次凝集の成立により、血小板の GPIIb/IIIa 受容体構造が変化し、フィブリノーゲンとの親和性が高まる。この結果、血小板同士の結合が促され、二次凝集が進展する（図 1）。

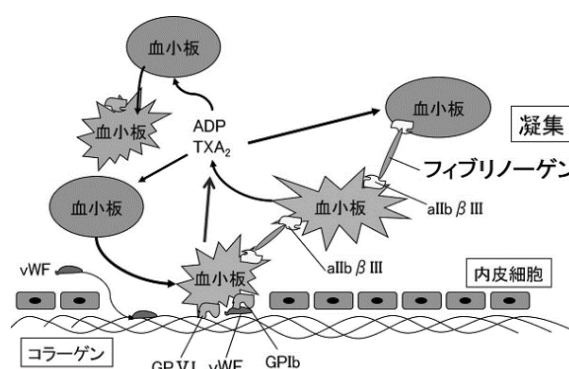


図 1. 血小板凝集機構

ADP: アデノシンニリン酸, GP: グリコプロテイン, TXA₂: トロンボキサン A₂, vWF: ヴォンヴィレブランド因子

上述した血小板凝集機構において、補体の関与が報告されている。血小板の表面には補体関連の受容体が複数発現しており、凝集 IgG の存在下にて、C1q が C1q 受容体へ結合すると、 α IIb/ β 3 インテグリンの活性化、血小板凝集および顆粒の放出が促進される¹⁾。この反応は C1q 単独では起こらないため、循環中の免疫複合体による血小板凝集機構に、C1q および C1q 受容体が関与していることを示唆している。CR2 受容体も血小板凝集および血小板からの ATP 放出に関与している²⁾。また、C3a、C5a 受容体へ C3a および C3a-des-Arg が結合することで、血小板の活性化と凝集が促進されるが³⁻⁵⁾、C5a は血小板のみならず、白血球-血小板複合体の形成も促進する⁶⁾。このように、補体系は血小板を活性化さ

せ、凝集を促進させているが、血小板が補体系を活性化させる経路も存在する。

血小板表面に発現している P-セレクトインは、C3b と結合し、C3a の生成および膜侵襲複合体の形成を促進する⁷⁾。補体系の活性化に伴い、血小板凝集および止血反応が促進されるため、C3 欠損マウスでは出血時間の延長が確認されている¹⁾。また、トロンビン受容体を介して活性化した血小板は、コンドロイチン硫酸を分泌することで、C1q を介し補体系を活性化する⁸⁾。上述した血小板-補体間の相互作用は、凝固系への影響のみならず、感染防御にも重要な役割を果たしている⁹⁾。

血小板表面には補体系を活性化させる受容体だけでなく、活性を制御するタンパクが多数存在する。CD46¹⁰⁾、CD55¹¹⁾さらには CD59¹²⁾は、血小板表面に発現しており、それぞれ C3 レベル、C9 レベルで補体活性を制御している (図 2)。 α IIb β 3¹³⁾およびトロンボスポンジン 1¹⁴⁾は H 因子と結合し、C3 (H₂O) および C3b を不活化している。

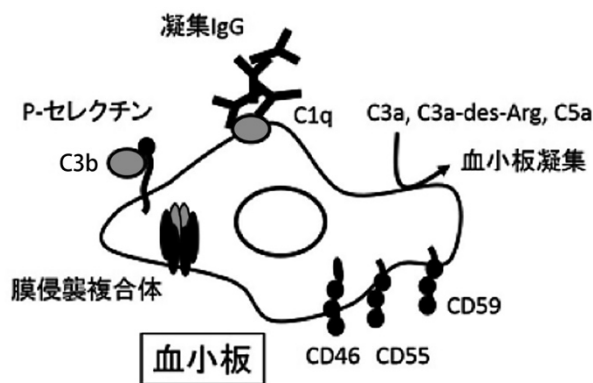


図 2. 血小板と補体関連物質

[血液凝固と補体]

凝固経路は、外因性および内因性経路の 2 つに大別される。外因性経路には組織因子、第 VII 因子が関与し、内因性経路にはカリクレイン、第 IX 因子、第 XI 因子、第 XII 因子が関与する。これらの因子が連鎖的に活性化することで生成された第 Xa 因子および活性型第 XI 因子がプロトロンビンをトロンビンに

変換することで、フィブリノーゲンを分解し、血栓を形成する。

補体経路は古典経路、レクチン経路、第二経路から構成されており、C3、C5 の開裂を経て膜侵襲複合体を形成する。膜侵襲複合体は細胞膜を穿孔させ、細胞溶解を引き起こす。C3 および C5 の開裂の際に生成される C3a、C5a はアナフィラトキシンと呼ばれ、脱顆粒による血管透過性亢進を促進し、好中球の遊走を促進する。

凝固および補体経路は、共に「酵素反応」であり、双方の経路に基質と酵素が存在する。例えば、第 IX 因子、第 X 因子、第 XI 因子、トロンビン、プラスミンは、C3 および C5 の開裂を促進することで、補体活性に関与している (図 3)。一方、MASP-2、C5b-9 はプロトロンビンからトロンビンへの変換を促進し、血液凝固を促進する¹⁵⁾。上述の通り、凝固因子による補体活性化は、セリンプロテアーゼ (第 IX 因子、第 XI 因子、プラスミン) により促進され、組織因子を始めとする内因性経路の補体系への関与は少ないと考えられていた。しかし、細胞膜表面に形成された C5b-7 は、組織因子の活性化に関与することが報告されており¹⁶⁾、補体-凝固系クロストークは多岐に渡ることが示唆されている。

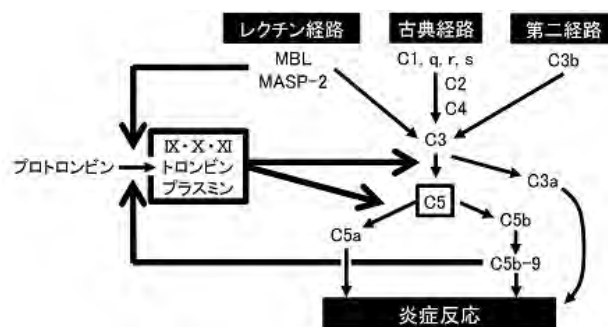


図 3. 補体-凝固系クロストーク

[血栓症と補体]

前述の通り、補体が活性化することにより、血小板凝集および血液凝固反応が促進される。これらの生体反応により引き起こされる血栓症のうち、特に重篤な疾患について概説する。

溶血性尿毒症症候群（HUS）は、感染（病原性大腸菌）や補体制御因子の機能不全が引き金となり、溶血性貧血、血小板凝集に伴う急性腎不全を呈する疾患である。病原性大腸菌によって引き起こされる HUS は、小児に多く、HUS 全体の 9 割以上を占める。腎不全に伴う透析導入例も多いが、基本的に予後は良好であり、経過期間の個人差はあるものの、完全な回復が見込める疾患である。一方、病原性大腸菌以外の要因によって引き起こされる HUS は atypical HUS（aHUS）と呼ばれており、小児のみならず、成人発症もある。患者の 50% 近くが補体関連タンパクの遺伝子変異を持っているとされ¹⁷⁾、大半が末期腎不全に移行し、予後不良な疾患である。

aHUS の発症には、補体第二経路を制御する補体 H 因子（CFH）、I 因子（CFI）、membrane cofactor protein（MCP）の機能異常が関与しており、患者が遺伝的な背景を持っていれば「Primary aHUS」とし、それ以外（薬剤等）の場合は「Secondary aHUS」に大別される¹⁸⁾。どちらの場合も補体活性を抑制することができず、自己の細胞が障害される。特に血管内皮細胞が障害されると、抗血栓作用および抗凝固作用が低下し、血栓が形成されやすくなる。また、補体活性化に伴い凝固系が亢進し、血小板凝集がさらに促進される。非常に稀ではあるが、補体制御因子以外にもトロンボモジュリンの機能異常により aHUS を発症するケースもある¹⁹⁾。

DIC は、生体内の血液凝固および血小板凝集が急激に進行し、全身に血栓が生じる急性疾患である。凝固系が亢進するため、凝固因子が枯渇し、相対的に線溶系が優位となり、出血により命を落とす患者も少なくない。敗血症や悪性腫瘍等の難治性疾患を持つ患者で発症しやすく、発症した場合、基礎疾患の治療が優先される。基礎疾患の治療が奏功すれば、基本的に予後は良好であるが、治療が困難な場合もしくは病勢コントロールが必要な時に、低分子ヘパリン、アンチトロンビン製剤、トロンボモジュリンが使用される。しかし、これらの治療薬が存在する

にも関わらず、DIC 全体の死亡率は約 56% と高率である。

DIC の発症には、Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) と Damage associated molecular patterns (DAMPs) が関与するとされている。PAMPs はリポポリサッカライド (LPS)、dsRNA 等が該当し²⁰⁾、免疫応答細胞がこれらを認識することで、サイトカインや High mobility group box-1 (HMGB1) を放出する。これらの物質は、生体内の異物を排除するために放出されるが、過剰に放出された場合（いわゆるサイトカインストーム）、炎症・凝固反応が著しく亢進し、DIC の発症に繋がる。

DAMPs は、好中球エラスターゼ、壊死細胞由来の HMGB1²¹⁾、neutrophil extracellular traps (NETs) 等の総称であり、炎症や凝固反応、血小板凝集を促進する。PAMPs とは異なり、その名の通り、障害を受けた細胞から放出される²²⁾。NETs は、好中球内の核膜および細胞内小器官の消失、細胞の膨化、形質膜の破綻を介して、細胞外へ放出される（これら一連を NETosis と呼ぶ）。NETs の 1 種であるヒストンは、凝固系の活性化、血小板凝集を促進させ、致死性血栓症の発症・進展に関与している。ヒストンと補体との関連を示す報告は少ないが、C5a 受容体欠損マウスに対して、盲腸結紮および穿刺を行ったところ、野生型マウスに比して、ヒストンの放出が抑制されたことから、C5a がヒストンの放出に関与することが示されている²³⁾。C5 欠損マウスにヒストンを投与し致死性血栓症を誘発させたところ、正常マウスに比して、生存期間が有意に延長したことから、ヒストンによる障害進展に C5 が関与していることも、同様に示されている⁶⁾。加えて、ヒストン投与後の正常マウスにおいて、C5a 濃度が上昇していたことから、凝固系の活性化に伴い、C5 の開裂が促進されたと考えられる（図 4）。

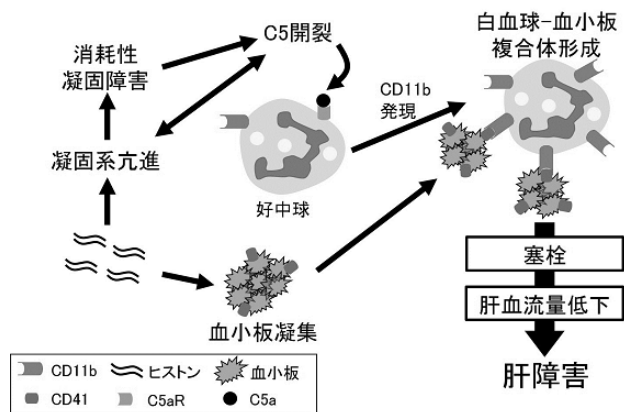


図 4. ヒストン誘発致死性血栓症における C5 の関与⁶⁾

[血栓症治療と補体]

aHUS に対する血漿交換・補充は、30 年以上前から実施されている治療法であり、死亡率の低下、部分寛解が期待できる。しかしながら、変異している遺伝子の種類によって、血漿交換の治療成績が異なる。例えば、CFH、CFI の変異を持つ患者と比較して、MCP の場合は奏率が低いことが報告されている²⁴⁾。また、CFH に対する自己抗体を持つ患者に対しては、血漿交換に加えて、ステロイドや免疫抑制剤が使用されることもある。いずれのケースにおいても、治療抵抗性および再発例が見受けられるため、新規治療薬の開発が進められてきた。

aHUS の新規治療薬として、抗 C5 モノクローナル抗体であるエクリズマブが挙げられる。エクリズマブは、発作性夜間血色素尿症の治療薬として、本邦でも承認されているが、aHUS に対しても著効例が複数報告されている。補体後期経路が活性化することにより、膜侵襲複合体が形成されることで、血管内皮細胞の障害が進行する。エクリズマブは C5 を阻害するため、補体による細胞障害の軽減作用のみならず、C5 の開裂を介した補体-凝固クロストークの抑制作用も期待できるため、現在、治療の第一選択とされている²⁵⁾。

敗血症性ショックに対して、抗補体薬の有効性が報告されているが、DIC に関しては、抗補体薬は臨

床応用されていない。ただし、血管内皮細胞障害、凝固系の亢進および血小板凝集の促進等、aHUS と共通する点が多い。我々は、C5 欠損マウスにヒストンを投与し、致死性血栓症を誘発させたところ、正常マウスと比べて、肝障害、血球減少が有意に少なく、白血球-血小板複合体の形成も抑制されることを報告した⁶⁾。さらに、C5a 受容体アンタゴニストを正常マウスに投与したところ、ヒストンによる上記障害が軽減したことから、ヒストンによる致死性血栓症の発症に C5 および C5a が関与していることが示唆された⁶⁾。先行研究より、敗血症性 DIC 患者では、血中の DNA-ヒストン複合体濃度と生命予後との関連は低かったものの、非敗血症性 DIC 患者では、関連が認められた²⁶⁾。非敗血症性 DIC は、基礎疾患の治療が困難なケースが特に多いため、悪性腫瘍および薬剤由来の DIC に対する抗 C5 および C5a 療法について、今後の検討が期待される。

[謝辞]

第 54 回日本補体学会学術集会にて、日本補体学会より優秀賞を賜り、また、本受賞寄稿を発表させて頂き、感謝致します。

[利益相反]

筆者は本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。

[文献]

- 1) Peerschke EI and Ghebrehiwet B. C1q augments platelet activation in response to aggregated Ig. *J Immunol.* 159: 5594-5598 (1997)
- 2) Nunez D, Charriaut-Marlangue C, Barel M, Benveniste J, Frade R. Activation of human platelets through gp140, the C3d/EBV receptor (CR2). *Eur J Immunol.* 17: 515-520 (1987)
- 3) Patzelt J, Mueller KA, Breuning S, Karathanos A, Schleicher R, Seizer P, Gawaz M, Lan

- ger HF, Geisler T. Expression of anaphylatoxin receptors on platelets in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 238: 289-295 (2015)
- 4) Polley MJ and Nachman RL. Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. *J Exp Med*. 158: 603-615 (1983)
 - 5) Hamad OA, Nilsson PH, Wouters D, Lambris JD, Ekdahl KN, Nilsson B. Complement component C3 binds to activated normal platelets without preceding proteolytic activation and promotes binding to complement receptor 1. *J Immunol*. 184: 2686-2692 (2010)
 - 6) Mizuno T, Yoshioka K, Mizuno M, Shimizu M, Nagano F, Okuda T, Tsuboi N, Maruyama S, Nagamatsu T, Imai M. Complement component 5 promotes lethal thrombosis. *Sci Rep*. 7: 42714 (2017)
 - 7) Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, López J A, Afshar-Kharghan V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med*. 201: 871-879 (2005)
 - 8) Hamad OA, Ekdahl KN, Nilsson PH, Andersson J, Magotti P, Lambris JD, Nilsson B. Complement activation triggered by chondroitin sulfate released by thrombin receptor-activated platelets. *J Thromb Haemost*. 6: 1413-1421 (2008)
 - 9) Verschoor A and Langer HF. Crosstalk between platelets and the complement system in immune protection and disease. *Thromb Haemost*. 110: 910-919 (2013)
 - 10) Yu GH, Holers VM, Seya T, Ballard L, Atkinson JP. Identification of a third component of complement-binding glycoprotein of human platelets. *J Clin Invest*. 78: 494-501 (1986)
 - 11) Nicholson-Weller A, March JP, Rosen CE, Spicer DB, Austen KF. Surface membrane expression by human blood leukocytes and platelets of decay-accelerating factor, a regulatory protein of the complement system. *Blood*. 65: 1237-1244 (1985)
 - 12) Morgan BP. Isolation and characterization of the complement-inhibiting protein CD59 antigen from platelet membranes. *Biochem J*. 282: 409-413 (1992)
 - 13) Mnjoyan Z1, Li J, Afshar-Kharghan V. Factor H binds to platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. *Platelets*. 19: 512-519 (2008)
 - 14) Vaziri-Sani F1, Hellwage J, Zipfel PF, Sjöholm AG, Iancu R, Karpman D. Factor H binds to washed human platelets. *J Thromb Haemost*. 3: 154-162 (2005)
 - 15) Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, Brückner UB, Nilsson B, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J immunol*. 185: 5628-5636 (2010)
 - 16) Langer F, Spath B, Fischer C, Stolz M, Ayuk FA, Kröger N, Bokemeyer C, Ruf W. Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. *Blood*. 121: 2324-2355 (2013)
 - 17) Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, Mele C, Bresin E, Cassis L, Gamba S, Porrati F, Bucchioni S, Monteferrante G, Fang CJ, Liszewski MK, Kavanagh D, Atkinson JP, Remuzzi G; International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 10

- 8: 1267-1279 (2006)
- 18) Goodship TH, Cook HT, Fakhouri F, Fervenza FC, Frémeaux-Bacchi V, Kavanagh D, Nester CM, Noris M, Pickering MC, Rodríguez de Córdoba S, Roumenina LT, Sethi S, Smith RJ; Conference Participants. Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 91: 539-551 (2017)
- 19) Sinibaldi S, Guzzo I, Piras R, Bresin E, Emma F, Dello Strologo L. Post-transplant recurrence of atypical hemolytic uremic syndrome in a patient with thrombomodulin mutation. *Pediatr Transplant.* 17: E177-181 (2013)
- 20) Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449: 819-826 (2007)
- 21) Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418: 191-195 (2002)
- 22) Chen GY and Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 10: 826-837 (2010)
- 23) Kalbitz M, Grailer JJ, Fattahi F, Jajou L, Herron TJ, Campbell KF, Zetoune FS, Bosmann M, Sarma JV, Huber-Lang M, Gebhard F, Loaiza R, Valdivia HH, Jalife J, Russell MW, Ward PA. Role of extracellular histones in the cardiomyopathy of sepsis. *FASEB J.* 29: 2185-2193 (2015)
- 24) Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Macher MA, Niaudet P, Guest G, Boudailliez B, Bouissou F, Deschenes G, Gie S, Tsimaratos M, Fischbach M, Morin D, Nivet H, Alberti C, Loirat C; French Society of Pediatric Nephrology. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 18: 2392-2400 (2007)
- 25) Zhang K, Lu Y, Harley KT, Tran MH. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Brief Review. *Hematol Rep.* 9: 7053 (2017)
- 26) Kim JE, Lee N, Gu JY, Yoo HJ, Kim HK. Circulating levels of DNA-histone complex and dsDNA are independent prognostic factors of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 135: 1064-1069 (2015)