

鎌状赤血球貧血症におけるトロンボスポンジンの赤血球・ 内皮細胞粘着効果

杉原 佳子

鎌状赤血球貧血症にみる血流障害は赤血球と血管内皮細胞との間の異常な粘着性によるものであり、粘着蛋白であるトロンボスポンジン (TSP) がそれに大きく関与していることを明らかにする目的で鎌状赤血球貧血24人、網赤血球増多症8人、正常者24人からの赤血球を用い TSP の添加により粘着性がどう変化するかを赤血球・内皮細胞粘着試験法にて調べた。その結果、鎌状赤血球の粘着性は TSP の添加で高まり、この性質は抗 TSP 抗体、抗 TSP receptor 抗体、および RGDS, CSVTCG のペプチドにより明らかに抑制されることがわかった。また、自己多血小板血漿中では抗 TSP 抗体、抗 TSP receptor 抗体、抗ビトロネクチン (VN) receptor 抗体および RGDS, CSVTCG のペプチドにより抑制された。さらに、比重分離によって得られた網赤血球による赤血球・内皮細胞粘着試験、免疫細胞学的検索、およびプラスチックプレート法による検索結果から鎌状赤血球貧血の網赤血球の膜表面に TSP receptor が存在することが示唆された。一方、非鎌状網赤血球増多症および正常の赤血球では内皮細胞への異常粘着性は明らかでなく、TSP による粘着性への効果も認められず、TSP receptor の存在は証明できなかった。

この研究の結果は TSP が鎌状赤血球の内皮細胞への粘着性に大きく関与することを示していると考えられた。今後さらに *in vivo* で検討し明らかにしていく必要がある。

(平成4年10月29日採用)

Role of Thrombospondin in Sickle Cell Disease

Keiko Sugihara

To determine whether the vaso-occlusion seen in sickle cell diseases may be mediated by enhanced red blood cell (RBC) adhesivity to the endothelium, and whether thrombospondin (TSP), a sticky plasma protein, participates in this process, I evaluated the effect of TSP on RBC adherence in a "red cell-endothelium adherence test" system. Adherence of sickle cells, which were dissolved in buffer/albumin, was greatly enhanced by the addition of TSP, and this property was abolished by the intervention of antibodies against TSP and TSP receptors, as well as by the peptides RGDS and CSVTCG. The adherence of sickle RBCs in autologous platelet-rich plasma was inhibited by anti-TSP antibody, anti-TSP receptor antibody, anti-vitronectin receptor antibody and the peptides RGDS and CSVTCG.

Studies using density-separated RBC subpopulations and immobilized proteins, and an immunocytochemical study revealed that sickle reticulocytes, in fact, carried TSP receptors. In normal and high reticulocyte controls, TSP did not affect adherence to the endothelium and TSP receptors were not expressed.

The results of the present study suggest that TSP may have a significant effect on the adhesiveness of sickle RBCs in the plasma. Therefore circulatory disturbance seen in sickle cell disease may be an active phenomenon rather than a passive process hitherto believed. Further studies under *in vivo* conditions are required. (Accepted on October 29, 1992) *Kawasaki Igakkaishi* 18(4): 279-288, 1992

Key Words ① Sick cell disease ② Adhesiveness ③ Thrombospondin
④ Endothelium ⑤ Reticulocyte

はじめに

鎌状赤血球貧血は特に黒人にみられる優性遺伝性疾患で、血液中に多数の鎌状赤血球の出現と強度の進行性溶血性貧血を伴うことで特徴づけられている。現在この疾患は異常ヘモグロビン症、分子病としてとらえられ、ヘモグロビンのβ鎖のN末端から6番目のGluがValにおき変わることによって生ずるHbSによって起こることが明らかにされている。臨床症状の特徴のひとつに血流障害がある。従来、この病態は酸素欠乏状態ではHbSの溶解度が低下しゲル化することによって起こるものと考えられてきた。つまりゲル化したヘモグロビンは、赤血球を鎌状に変形させるため、それが毛細血管で物理的に捕捉され、その結果血管内腔を閉塞させ、血流障害を起こすというものである。しかし、1980年、Hebbelらは、鎌状赤血球と血管内皮細胞との間には異常な粘着性があることを発見し、これが血流障害の原因であると報告した。¹⁾ 彼らの考えに従えば、鎌状赤血球の血管内閉塞現象は受動的なものでなくむしろ能動的といえる。すなわち粘着能の高い赤血球が血管内皮細胞に付着することによって血流が障害され、さらに赤血球の形態変化、硬化を増強させるため赤血球の通過障害、血流の障害が進行していくと考えられるのである。彼らの報告以来、この現象はいろいろな内皮細胞と様々な実験モデルを使っ

て研究が進められている。^{2)~5)}

赤血球と血管内皮細胞との粘着性といってもそれに関与する因子にはさまざまなものが考えられる。しかも、それらが単独で関与するのみならず、相互に作用しあっている可能性もある。^{2),6)} これらの因子の中には、赤血球、内皮細胞、血漿蛋白、特に粘着蛋白(sticky protein)、血管の大きさや血流の速度などが含まれ、まずそれぞれの因子に分けて検討しなければならない。今回、著者は粘着蛋白の中でも血小板の凝集や細胞の粘着に関与する分子量45万の蛋白であるトロンボスポンジン(thrombospondin:以下TSPと略す)^{7)~9)}に注目し研究を始めた。同じ粘着蛋白の中でも、フィブリノーゲン(fibrinogen:以下FBと略す)やフィブロネクチン(fibronectin:以下FNと略す)についての報告はあるが、²⁾ TSPは比較的最近になって発見され、赤血球と内皮細胞との間の粘着性という観点からは深く検討されていないからである。また、鎌状赤血球貧血で多血小板血漿(platelet rich plasma:以下PRPと略す)中の浮遊赤血球の方が乏血小板血漿(platelet poor plasma:以下PPPと略す)中の浮遊赤血球より内皮細胞に対する粘着性が増すことが知られている¹⁰⁾ため、血小板に関係した蛋白、または血小板が放出する物質が影響するのではないかと考えられたからである。さらに、血漿内における鎌状赤血球の粘着性がカルシウムキレート剤によって抑制される事実¹¹⁾は、カルシウム依存性とされ

ている TSP の関与を強く示唆している。また、鎌状赤血球貧血症で網赤血球が増加することが指摘されており他の疾患によるものとそれが同じか否かが最近話題ともなっている。以上のような事実を背景として、著者はまず TSP receptor が鎌状赤血球貧血症、他の網赤血球増多症および正常の赤血球の膜表面に存在するののかについて検討した。次に、網赤血球のみに注目し、TSP との関係を検討することにした。その結果、TSP が鎌状赤血球の内皮細胞への粘着性に大きく関与することが示唆されたのでここに報告し、今後の展望について考察を加えたい。

材料および方法

Minnesota 大学医学部附属病院内科外来、Hennepin county 病院および Ramsy county 病院に訪れた鎌状赤血球貧血 (homozygous)、網赤血球増多症 (鎌状赤血球貧血症以外の網赤血球増多: control high-reticulocyte) および正常の供血者各 24 人、8 人、24 人を対象とした。

I. 各赤血球膜表面の TSP receptor の存在

a. TSP による赤血球と内皮細胞との間の粘着効果の検討

1. 赤血球浮遊液の調整

各供血者から得たクエン酸加静脈血を 10 倍量の Hanks 緩衝液 (以下 HBSS と略す) で 2 度、さらに Hanks/Alb 緩衝液 (0.5% bovine serum albumin を加えた Hanks 緩衝液: 以下 HBSS/A と略す) で洗浄後、遠心し、上清および buffy coat を吸引し、白血球など他の細胞成分を完全に取り除いた。各洗浄赤血球浮遊液はそれぞれ 4 つに分注され、最終的には各分注赤血球浮遊液をそれぞれ HBSS/A、自己 PRP、自己 PPP および自己血清で希釈し、Hct 2.5% になるように調整した。

2. 内皮細胞の培養

American Type Culture Collection (Rockville, MD) より購入したヒト臍静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell: 以下 HUVEC と略す) を使用した。HUVEC を

96-well flat-bottom Costar (Cambridge, MA) plate にて培養し、融合単層細胞からなり形態学的に変化のないことを確かめ、8 代培養までのものを利用した。培養液は F12 培養液 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) で、ヘパリン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、10% 胎児牛血清 (fetal bovine serum, Gibco, Grand Island, NY)、ペニシリン (120 units/ml)、ストレプトマイシン (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、Endothelial Cell Growth Supplement (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SIGMA) を加えたものである。

3. 赤血球・内皮細胞粘着試験および各抗体、ペプチドによる抑制効果

以下の実験は赤血球浮遊液、内皮細胞 (HUVEC) とともに常に 37°C の状態に保って行った。flat-bottom Costar plate の各 well で培養中の融合単層 HUVEC を HBSS にて 2 度、HBSS/A にて 1 度洗浄した後、2.5% の濃度の各赤血球浮遊液 300 μl を各 well に静かに重層した。各群少なくとも 3 well を使用し、複数回検査している。37°C の恒温槽で 40 分間静置し、さらに 83 μl の HBSS/A をややドーム状に水面が盛り上がるように静かに加え、プラスチックフィルムを液面に泡ができないように張り付けた後、plate を反転させた。これをさらに 37°C の恒温槽で 30 分間静置した。次に、plate をそのままの位置に置いたままプラスチックフィルムを静かに剝離し、まず内容を吸引しさらに綿棒にて HUVEC に触れないように気をつけながら well の壁に付着している余分の赤血球を拭きとった。HUVEC が脱落していないことを顕微鏡下に確かめた後、0.5% SDS を 200 μl ずつ各 well に加え、数時間室温に放置し、Thermo-max kinetic microplate reader で各 well に付着した赤血球の量をヘモグロビンの吸光度として計測した。また、赤血球浮遊液 300 μl のヘモグロビンの吸光度、HUVEC の存在する well と、HUVEC の存在しない well のみの吸光度をブランクとして計測し、これらより付着した赤血球の付着率 (%) を計算した。

粘着性の抑制試験では、抗体として OKM 5

(TSP receptor に対するマウスモノクローナル抗体, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ), α TSP (抗 TSP ウサギポリクローナル抗体), 7E3 (抗 GP II b III a マウスモノクローナル抗体), それぞれコントロールとして同免疫動物の免疫グロブリンを使用した。またペプチドとして, Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly 鎖 (以下 CSVTCG と略す), そのコントロールとして Trp-His-Trp-Leu-Glu-Leu 鎖 (以下 WHWLQL と略す-SIGMA 製) または Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly 鎖 (以下 VGVAPG と略す-SIGMA 製), Arg-Gly-Asp-Ser 鎖 (以下 RGDS と略す-SIGMA 製), そのコントロールとして Ala-Gly-Ser-Glu 鎖 (以下 AGSE と略す-SIGMA 製) を使用した。OKM5 は $6.7\mu\text{g/ml}$, その他の抗体は45倍希釈, ペプチドは $66\mu\text{g/ml}$ の最終濃度になるように赤血球浮遊液を調整した。なお, これらの調整は実験直前に行った。

b. 免疫細胞学的検索

赤血球の TSP receptor の存在を蛍光抗体法によって調べた。まず, 20%の洗浄赤血球浮遊液を作製し, $7\mu\text{g/ml}$ の FITC 標識 OKM5 とコントロールとして FITC 標識抗 cat IgG 抗体 (マウスモノクローナル抗体, SIGMA 製) を加えたものを室温にて40分間反応させた。遠心後, 赤血球を採用し, 再び HBSS/A に浮遊し, FACS-Star laser flow-cytometry system で解析した。また, FITC で標識されていない抗体 OKM5, α CD51 (抗 VN receptor マウスモノクローナル抗体, AMAC, Westbrook, ME) については間接法を用い染色をした。

II. sickle 網赤血球と TSP の関係

a. TSP による網赤血球と内皮細胞との粘着効果の検討

1. 赤血球の分離

網赤血球は Corash らの方法¹²⁾ に準じ赤血球を分離することによって得た。400 ml の蒸留水に, arabinogalactan (Consulting Associates, Tacoma, WA) を 250 g を加え, 少なくとも30分間穏やかに沸騰させた。室温になるまで放置し, ピーカーの重さを除いた合計重量が843 g と

なるように蒸留水を加えた。これに牛血清アルブミン (bovine serum albumin: 以下 BSA と略す) 23.5 g, glucose 1.25 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.725 g, 0.3 MK_2HPO_4 - KH_2PO_4 41.3ml を加え溶解させ, 1 N の NaOH で pH 7.4 に調整した。浸透圧が 290 mOsm/kg になるように NaCl を加えたものを solution I とした。蒸留水 600 ml, NaCl 4.86 g, Na_2HPO_4 0.732 g, NaH_2PO_4 0.131 g, glucose 1.20 g, BSA 18.00 g を混合し, pH 7.4, 浸透圧 290 mOsm/kg に調整したものを solution II とした。solution I と II を混合し, 1.090, 1.112, 1.115, 1.118, 1.120, 1.123, 1.125 mOsm/kg の溶液を作製した。遠心用チューブにまずクッションとして solution I を置き, その上に比重の重い順からゆっくりと重層した。白血球を除去した洗浄赤血球で Hct 値 30% の浮遊液を調製し, それを重層した arabinogalactan の上に重ね, 74000 g 4°C で30分間超遠心した。上層, 中層そして下層より赤血球を採取し, HBSS/A にてよく洗浄し使用した。

2. 赤血球の内皮細胞粘着試験

I-a-3 に記載した方法に準じた。

b. 網赤血球膜表面の TSP receptor の存在

1. 蛋白吸収プラスチックプレート法

$100\mu\text{g/ml}$ の濃度の TSP, VN とコントロールとして BSA を $10\mu\text{l}$ ずつペトリ皿 (FALCON1007, Becton Dickinson) にのせ, 37°C で3時間静置し蛋白をプラスチックに吸収させた。非特異的付着を防ぐために 1% BSA で浸透した後,^{13),14)} Hct 値で 2.5% の赤血球浮遊液を $10\mu\text{l}$ ずつその spot に落下し, 37°C で50分間静置した。そして, HBSS/A 中にペトリ皿をつけすみやかに余分な赤血球を取り除き, その後直ちに new methyleneblue 染色をほどこし, 乾燥固定した。光学顕微鏡的に1000倍にて25視野以上観察し, 付着した赤血球数をかぞえ, その中の網赤血球率を算出した。粘着性の抑制試験では前述の抗体やペプチドを同濃度で使用した。

2. 免疫細胞学的検索

0.002% の ethidium bromide と FITC 標識

OKM 5 で二重染色し、I-b と同様に解析した。ethidium bromide により網赤血球の顆粒は蛍光を発する。

結 果

I. 各赤血球膜表面の TSP receptor の存在

a. TSP による赤血球と内皮細胞との間の粘着効果

(1) HBSS/A, PRP, PPP および血清による赤血球の粘着性の変化

sickle RBC の HUVEC に対する粘着率は HBSS/A 中では $0.09 \pm 0.03\%$ 、血漿中では $0.12 \pm 0.05\%$ で、正常 RBC に比し、HBSS/A 中 ($p < 0.001$) および自己 PRP ($p < 0.001$) とも有意に粘着性を示した。しかし、高網赤血球血と正常 RBC との間に有意差を認めなかった。また、sickle RBC では、自己 PRP 中のものは HBSS/A 中のそれより粘着性が高かった ($p < 0.005$)。高網赤血球血で自己 PRP 中のものは HBSS/A 中のそれとでは有意な差は認められなかった。

(2) HBSS/A 赤血球の TSP による粘着性の変化

HBSS/A 赤血球における TSP の効果をみた結果が Figure 1 である。sickle RBC では TSP $1 \mu\text{g/ml}$ を添加したもものでは、添加していないものより有意に粘着性の増加がみられた ($p < 0.001$)。正常 RBC ではこのような効果はみられず、高網赤血球血ではやや粘着性が高まったものの、両者に有意な差はなかった。また、sickle RBC において、TSP の濃度を 0 から $1 \mu\text{g/ml}$ まで変化させたところ、濃度に比例して粘着性は増加したが、高網赤血球血では変化はみられなかった (Fig. 2)。コントロールとして同蛋白濃度の BSA を加えて粘着性を調べたが、全く変化はなかった。

(3) HBSS/A および PRP 中での各種の抗体とペプチドによる赤血球の粘着性への抑制効果

この実験では sickle RBC のみを使用した。

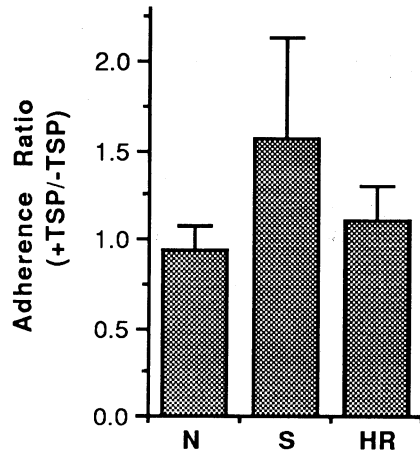


Fig. 1. Effect of TSP on the adherence of normal, sickle, and reticulocytic RBCs. In this experiment, RBCs were suspended in HBSS/A with and without $1 \mu\text{g/ml}$ of TSP. The effect of TSP on adherence was expressed as the % adherence in samples with TSP divided by that in samples without TSP. TSP significantly affected the adherence of sickle RBCs (S), but it had no effect on that of normal (N) and reticulocytic (HR) RBCs.

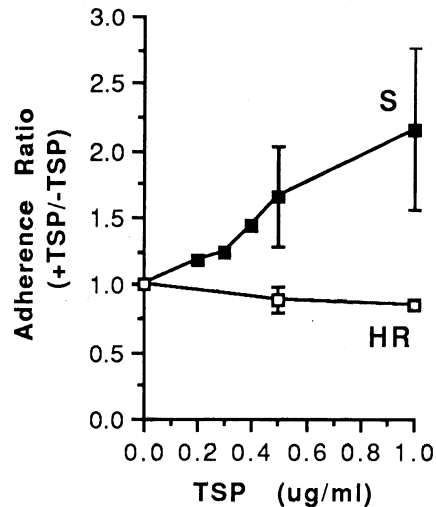


Fig. 2. Dose-dependency of adherence in sickle and reticulocytic RBCs by TSP addition.

The adherence ratio consistently became maximal at about $1 \mu\text{g/ml}$ in sickle RBCs (S), but it was unchanged in reticulocytic RBCs (HR).

Table 1. Inhibition of TSP-mediated adhesiveness by antibodies and peptides in sickle RBCs dissolved in HBSS/A with TSP (1 μ g/ml) and plasma.

The degree of adherence inhibition in TSP-HBSS/A solution and in plasma without any active agents was regarded as 0.00 and that in HBSS/A without TSP as 1.00. The degree of inhibition produced by active agents was converted to the inhibition ratio on this scale and was compared with the control (* $p < 0.001$, ** < 0.05).

Active agents	Adherence Inhibition	
	in HBSS/A	in Plasma
anti-TSP	1.01 \pm 0.18*	0.21 \pm 0.12**
OKM 5	0.86 \pm 0.36*	0.41 \pm 0.17*
7E3	0.17 \pm 0.07	0.16 \pm 0.07**
CSVTCG	0.94 \pm 0.27*	0.22 \pm 0.15**
RGDS	0.82 \pm 0.35*	0.30 \pm 0.15**

Table 1 に結果を示した。1 μ g/ml TSP 添加 HBSS/A 中における sickle RBC の HUVEC への粘着性は、 α TSP ($p < 0.001$, $n = 3$), OKM 5 ($p < 0.001$, $n = 8$) によって有意に抑制された。しかし、7E3 による抑制効果はみられなかった。一方、RGDS と CSVTCG の 2 種のペプチドでも有意に抑制効果がみられた ($p < 0.001$ 各 $n = 7$)。なお、TSP を加えていない HBSS/A 中ではいずれの物質の抑制効果も認められなかった。自己 PRP 中では OKM 5 ($p < 0.001$), α TSP ($p < 0.05$), 7E3 ($p < 0.05$), RGDS ($p < 0.05$), CSVTCG ($p < 0.05$) 全てで抑制効果を示した。

b. 免疫細胞学的検索

sickle RBC を OKM 5 で免疫細胞学的に染色してみると、陽性細胞は全赤血球の 3.1%, 2.4%, 4.2% にみられた。しかし、 α CD51 に対しては陽性細胞はみられなかった。

高網赤血球血中には OKM 5 陽性細胞はほとんど認められなかった。

II. sickle 網赤血球と TSP との関係

a. TSP による網赤血球と内皮細胞との粘着効果の検討

TSP 1 μ g/ml 添加 HBSS/A 中と TSP 無添加 HBSS/A 中の粘着率の比で比較した。上層つまり比重の軽い網赤血球の多い赤血球 (網赤

血球率 13.5%) は粘着比 1.48 で中層の粘着比 1.15, 下層の粘着比 1.02 に比べ有意に HUVEC に粘着性を示した。

b. 網赤血球膜表面の TSP receptor の存在

1. 蛋白吸収プラスチックプレート法

Figure 3 にその結果を示した。TSP spot にはコントロールに比べ付着している赤血球中の網赤血球の占める割合が増加していたが、VN spot では有意な増加は認められなかった。TSP による粘着性の増加は OKM 5 と CSVTCG によって明らかに抑制されたが、RGDS, 7E3 では抑制効果はみられなかった (**Table 2**)。

2. 免疫細胞学的検討

二重染色法では ethidium bromide 陽性細胞つまり網赤血球の 20.6%, 27.3%, 30.2% が OKM 5 陽性であった。また逆に OKM 5 陽性の細胞の 84.6%, 63.1%, 49.7% が ethidium

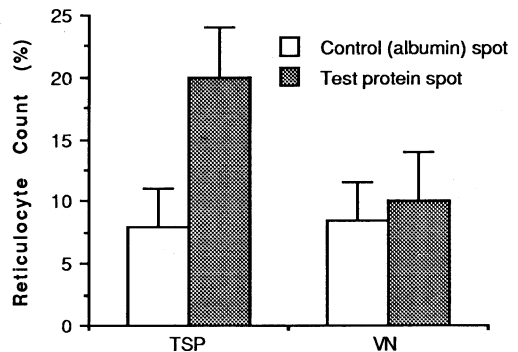


Fig. 3. Adhesiveness of sickle reticulocytes to immobilized TSP and VN.

Table 2. Inhibition of reticulocyte adherence to immobilized TSP by antibodies and peptides. OKM 5 and CSVTCG significantly inhibited the adherence of reticulocytes to immobilized TSP (* $p < 0.001$).

Active agents	Inhibition of adherence (%)
OKM 5	103.0 \pm 18.7*
7E3	4.5 \pm 17.3
CSVTCG	100.3 \pm 12.7*
RGDS	7.2 \pm 9.6

bromide 陽性であった。

考 察

赤血球の内皮細胞への異常な粘着性を理解することは鎌状赤血球症の病態を把握するうえで重要である。⁴⁾ 今回の検討で sickle RBC が内皮細胞に異常粘着性を持つこと、それが TSP の存在のもとではさらに粘着性を増すことをまず示した。

sickle RBC の HUVEC への粘着性は著者の重力を利用した粘着試験系においても正常 RBC より強く認められた。また HBSS/A 中より粘着蛋白などを含む PRP 中の方がさらに粘着性を増した。これらの結果は既報告のそれとよく一致している。^{11,2)} さらに、sickle RBC は TSP により HUVEC への粘着性を増し、TSP 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは濃度依存性であった。また、この粘着性は抗 TSP receptor 抗体である OKM 5、および TSP type 1 repeats の一部で近年 TSP の receptor への結合を抑制すると報告されているペプチド CSVTCG¹⁵⁾ によって抑制された。免疫細胞学的にも sickle RBC の一部は OKM 5 陽性であった。それらの結果から sickle RBC の膜表面には TSP receptor が存在し、TSP を介して血管内皮細胞への異常粘着性がさらに増強すると推測される。また、TSP receptor は VN receptor である GP II b III a と交差すると考えられており、RGDS により抑制されるといわれている。^{16,17)} しかし、今回の検索では免疫細胞学的に $\alpha\text{CD}51$ (VN receptor に対する抗体) は sickle RBC に反応せず、赤血球の膜表面のみの因子を反映する蛋白吸収プラスチック法においても RGDS では抑制されず、VN にも粘着性を示さなかった。このことは sickle RBC の膜表面の TSP receptor には VN receptor と交差するような部分はないことを示唆している。

鎌状赤血球貧血症では TSP 添加 HBSS/A 中で網赤血球率に比例して HUVEC へ付着する赤血球が増加した。また蛋白吸収プラスチック法でも TSP に網赤血球が特異的に付着すること

が認められた。さらに、免疫細胞学的にも網赤血球すべてが TSP receptor を有するわけではなかったが、TSP receptor を有している多くの細胞は網赤血球であった。これらのことから TSP receptor の多くは網赤血球に存在し、TSP を介する内皮細胞への粘着性は特に網赤血球によるものと考えられる。TSP receptor は FN receptor と同様に赤芽球に認められているが、末梢赤血球には存在しない。^{18,19)} また、今回の検討では同一症例における網赤血球率と TSP による内皮細胞への粘着性には明らかな相関はみられたが、症例相互の間では網赤血球率と TSP による内皮細胞への粘着性に明らかな相関関係はなかった。これらのことは、免疫細胞学的にも示されたようにすべての網赤血球に TSP receptor が存在するのではないためと考えられる。つまり、網赤血球率がそのまま TSP receptor の量を示すわけではない。しかし、TSP receptor は鎌状赤血球貧血症において細胞が成熟していくに従ってなくなるのか、成熟とは関係なく初めから存在する細胞と存在しない細胞があるのかは明らかではない。

網赤血球は鎌状赤血球貧血症ばかりでなく他の疾患でも末梢血に増加してくる。それでは正常の網赤血球も sickle 網赤血球と同じく粘着性を持つのかということが次の問題になってくる。これを調べる目的で高網赤血球血の症例を検討したのである。今回の実験では高網赤血球血と正常 RBC との間には有意な差は認められなかった。また、免疫細胞学的に直接 TSP receptor を証明することもできなかった。つまり、正常網赤血球の血管内細胞への異常粘着性は明らかでなくまた TSP による粘着性への効果も認められない。

鎌状赤血球症では網赤血球が増加するが、他の疾患と違って幼若網赤血球(stress reticulocyte) が出現するといわれている。高網赤血球血では明らかな TSP receptor が認められず、鎌状赤血球貧血症で TSP receptor が認められた事実は TSP receptor の質の問題も否定できないがこの stress reticulocyte つまり幼若網赤血球が

TSP receptor を多く有していることを示唆しているのかもしれない。

HUVEC は一般には CD36 (TSP receptor) を有していないと言われている。また、前述したように赤血球膜には TSP receptor は存在するが、VN receptor と交差する部分はないと考えられる。一方、RGDS が赤血球・内皮細胞試験で HBSS/A, PRP 中いずれにおいてもある程度の抑制効果を示した結果は一見これと矛盾するようだが、HUVEC が VN receptor を有しており、^{16),20),21)} VN receptor は TSP receptor と交差する部位を含んでいるという事を考慮に入れると、TSP は VN receptor にも付着し、これが RGDS で阻害されたと考えれば納得のいくものである。しかし、赤血球・内皮細胞試験で、VN receptor に対する抗体 7E3 が HBSS/A 中では粘着性に対する抑制効果はなかったにもかかわらず、血漿中では抑制効果を示している。これはおそらく血漿中では、TSP の分子が他の血漿蛋白や内皮細胞の影響を受けるからであろう。これはむしろ、たとえば、他の粘着蛋白が内皮細胞と結合しそれに赤血球が TSP を介して接着するのかもしれない。今回の実験では血管内皮細胞側の因子の十分な検索がなされておらず、内皮細胞側の膜表面も大切な因子であり、それぞれの因子の相互作用にも注目せねばならないであろう。

以上のような *in vitro* で sickle RBC は TSP により HUVEC への粘着性をしたが、これは鎌状赤血球貧血症病態生理に矛盾はしない。TSP receptor である CD 36 は今のところ大きな血管の内皮細胞には存在しないが、微小血管の内皮細胞には存在するという報告がある。^{22),23)} 従って、

TSP による赤血球の内皮細胞の粘着性の増強こそが微小血管で血流障害を来しやすい鎌状赤血球貧血症の病態を説明するものであろう。赤血球の血管内皮細胞への粘着性の増加は TSP 濃度依存性であり、その濃度は生理学的におこりうるであろう範囲内の変化である。正常血漿中の TSP 濃度は 20~300 ng/ml といわれている。²⁴⁾ 鎌状赤血球貧血症の患者の TSP の血漿濃度は測定されていないが、血小板が活性化されていること²⁵⁾ から血漿の TSP は上昇していると推測される。このように考えるとさらに、鎌状赤血球貧血症患者では TSP が増加し、それによって赤血球が内皮細胞にさらに粘着しやすくなっていると推測される。いずれにせよ、血漿における赤血球・内皮細胞粘着実験で抗 TSP receptor 抗体と CSVTCG が著明にそれを抑制したことは、TSP は血漿中で重要な役割を担っていると考えられる。

sickle RBC の内皮細胞への異常な粘着性に関与する因子の解明は病態把握のみならず、治療のうえでも重要である。著者の結果は明らかに TSP が赤血球・内皮細胞の粘着性、特に網赤血球に関与していることを示唆するものであるが、さらに血管内皮細胞側の因子やより生態にちかい血流のある状態での検索が今後必要と考えられる。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご検閲を賜った川崎医科大学病理学教室、山下貢司教授、真鍋俊明助教授、実験の機会を与えて下さり直接ご指導を賜ったミネソタ大学医学部血液内科、Robert P. Hebbel 教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Hebbel, R. P., Yamada, O., Moldow, C.F., Jacob, H.S., White, J.G. and Eaton, J.W.: Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium. Possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *J.Clin. Invest.* 65: 154-160, 1980
- 2) Hebbel, R.P.: Beyond hemoglobin polymerization: The red cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 77: 214-237, 1991

- 3) Barabino, G.A., McIntire, L.V., Eskin, S. G., Sears, D.A. and Udden, M. : Endothelial cell interactions with sickle cell, sickle trait, mechanically injured, and normal erythrocytes under controlled flow. *Blood* 70 : 152-157, 1987
- 4) Kaul, D.K., Fabry, M.E. and Nagel, R.L. : Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions : Pathophysiological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 3356-3360, 1989
- 5) Mohandas, N. and Evans, E. : Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells : Requirement for both cell membrane charges and plasma factors. *Blood* 64 : 282-287, 1984
- 6) Sugihara, K. and Hebbel, R.P. : Multiple mechanisms of sickle erythrocyte adherence to vascular endothelial cells. *Clin. Hemorheol.* 12 : 185-189, 1992
- 7) Lawler, J. : The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood* 67 : 1197-1209, 1986
- 8) Lawler, J. and Hynes, R.O. : Structural organization of the thrombospondin molecule. *Semin. Thrombosis and Hemostasis* 13 : 245-254, 1987
- 9) Mosher, D., Sun, X., Sottile, J. and Hogg, P.J. : Structure-function of thrombospondins : Regulation of fibrinolysis and cell adhesion. *Adv. in Molec. Cell Biol.* in press, 1992
- 10) Antonucci, R., Walker, R., Herion, J. and Orringer, E. : Enhancement of sickle erythrocyte adherence to endothelium by autologous platelets. *Am. J. Hematol.* 34 : 44-48, 1990
- 11) Mohandas, N. and Evans, E. : Sickle erythrocyte adherence to vascular endothelium. Morphologic correlates and the requirement for divalent cations and collagen-binding plasma proteins. *J. Clin. Invest.* 76 : 1605-1612, 1985
- 12) Clark, M.R., Unger, R.C. and Shohet, S.B. : Monovalent cation composition and ATP and lipid content of irreversibly sickled cells. *Blood* 51 : 1169-1178, 1978
- 13) Roberts, D.D., Sherwood, J.A., Spitalnik, S.L., Panton, L.J., Howard, R.J., Dixit, V.M., Frazier, W.A., Miller, L.H. and Ginsburg, V. : Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature* 318 : 64-66, 1985
- 14) Barnwell, J.W., Asch, A.S., Nachman, R.L., Yamaya, M., Akikawa, M. and Ingravallo, P. : A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions *in vitro* as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 84 : 765-772, 1989
- 15) Asch, A.S., Silbiger, S., Heimer, E. and Nachman, R.L. : Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 182 : 1208-1217, 1992
- 16) Lawler, J., Weinstein, R. and Hynes, R.O. : Cell attachment to thrombospondin : The role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J. Cell Biol.* 107 : 2351-2361, 1988
- 17) Smith, J.W. and Cheresch, D.A. : The Arg-Gly-Asp binding domain of the vitronectin receptor. Photoaffinity cross-linking implicates aminoacid residues 61-203 of the B subunit. *J. Biol. Chem.* 263 : 18726-18731, 1988
- 18) Kieffer, N., Beltaieb, A., Legrand, C., Coulombel, L., Vainchenker, W., Edelman, L. and Breton-Gorius, J. : Developmentally regulated expression of a 78 kDa erythroblast membrane glycoprotein immunologically related to the platelet thrombospondin receptor. *Biochem. J.* 262 : 835-842, 1989
- 19) Rosenblatt, M., Vuillet-Gaugler, M.H., Leroy, C. and Coulombel, L. : Coexpression of two fibronectin receptors, VLA-4 and VLA-5, by immature human erythroblastic precursor cells. *J. Clin. Invest.* 87 : 6-11, 1991
- 20) Charo, I. F., Bekeart, L. S. and Phillips, D.R. : Platelet glycoprotein IIb/IIIa-like proteins mediate endothelial cell attachment to adhesive proteins and the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 262 :

- 9935—9938, 1987
- 21) Cheresch, D.A. : Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 6471—6475, 1987
 - 22) Swerlick, R.A., Lee, K.H., Wick, T.M. and Lawley, T.J. : Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 *in vivo* and *in vitro*. *J. Immunol.* 148 : 78—83, 1992
 - 23) Knowles, D.M.II., Tolidjian, B., Marboe, C., D'Agati, V., Grimes, M. and Chess, L. : Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM 1 and OKM 5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium. *J. Immunol.* 132 : 2170—2173, 1984
 - 24) Saglio, S.D. and Slayter, H.S. : Use of radioimmunoassay to quantify thrombospondin. *Blood* 59 : 162—166, 1982
 - 25) Francis, R.B., Jr. : Platelets, coagulation, and fibrinolysis in sickle cell disease : Their possible role in vascular occlusion. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2 : 341—353, 1991