The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	THE ROLE OF PROTEIN PHOSPHORYLATION AND CYTOSKELETAL REORGANIZATION IN MICROPARTICLE FORMATION FROM THE PLATELET PLASMA MEMBRANE
Author(s)	矢野, 佳子
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39030
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【59】

氏　　名	矢　野　佳　子（やの よしこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　11811　号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	THE ROLE OF PROTEIN PHOSPHORYLATION AND CYTOSKELETAL REORGANIZATION IN MICROPARTICLE FORMATION FROM THE PLATELET PLASMA MEMBRANE **（血小板マイクロパーティクル生成における蛋白質燐酸化と細胞骨格再構築の役割）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松田　暉 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　遠山　正彌

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

血小板は，種々の刺激により止血栓の形成に合目的な特有の形態変化と分泌反応を惹起するが，同時に0.1～0.5ミクロンの形質膜より成るマイクロパーティクル（MP）を遊離することが最近注目されつつある。MP遊離の生理的な役割として，その表面の燐脂質を介しての血栓形成促進が示唆されている。しかしその生成メカニズムに関しては，ほとんど解明されていない。私は走査型電子顕微鏡を用いた観察により，血小板が形態変化をおこしたときの偽足末端よりMPが形成されている像を初めて観察し，MP生成と細胞骨格の再構築による偽足形成との関連が示唆された。本研究では，細胞骨格の再構築の主たる調節機構である燐酸化・脱燐酸化と血小板MP生成の関連を生化学的・形態学的に解明することにある。

【方法ならびに成績】

(1)血小板MPの検出：洗浄ヒト血小板をカルシルムイオノフォアまたは，トロンビン，コラーゲン刺激により活性化させた。活性化に伴い遊離されたMPを血小板膜表面糖蛋白であるglycoprotein（GP）IIb-IIIaとGPIb両者に対するモノクローナル抗体でラベルし，flow cytometryで測定した。その結果GPIIb-IIIaに対するモノクローナル抗体（NNKY 1-32）を用いたほうが，GPIbに対するモノクローナル抗体（AP-1）よりも常に高感度かつ再現性高くMPを検出できたため，抗GPIIb-IIIa抗体を用いて測定する系を確立し，それを用いてMPの測定を行なった。(2)細胞外カルシウム濃度のMP生成における影響：種々の細胞外カルシウム濃度（0～5 mM）において血小板をagonistで刺激し，MP生成量をflow cytometryを用いて測定した。その結果MP生成は，細胞外カルシウム濃度に依存的に増加した。(3)アクチン重合阻害剤のMP生成に対する影響：細胞の形態変化，偽足の形成は，アクチン繊維の重合脱重合により調節を受けると考えられている。このため，アクチン重合阻害剤（サイトカラシンD）のMP生成への影響をflow cytometryで測定するとともに，刺激時，非刺激時の細胞の形態変化に対する影響を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果サイトカラシンDは，agonistの刺激によって遊離されるMPを80%阻害するとともに，刺激時の血小板の偽足形成をほぼ完全に抑制し，この事実よりMP生成と形態変化，特に偽足の形成が非常に関連の深いことが示唆された。(4)セリン・スレオニン脱燐酸化酵素阻害剤のMP形成に対する影響：セリン・スレオニン脱燐酸化酵素阻害剤（カリクリンA，オカダ酸）を用いて，それら阻害剤のMP生成に対する影響をflow cytometryで測定するとともに，血小板の形態，細胞骨格（特にactin fiber，microtubules）に与える影響を走査型，

透過型電子顕微鏡を用いて検討した。この結果，カリクリンA，オカダ酸は，agonist 刺激時の MP の放出を約 2 倍増加させること，ならびに非刺激時の血小板の形態を円盤状から不正形へと変化させること，また刺激時において，より長い偽足の形成を促すことが走査型電子顕微鏡を用いて，初めて観察された。またこれら偽足の形成が microtubules, actin fiber の再構築によって惹起されることも透過型電子顕微鏡にて観察した。また血小板に蛍光色素f ura- 2 AM をあらかじめ負荷し，血小板を刺激した時の細胞内カルシウムの上昇を測定し，これら阻害剤の細胞内カルシウムの上昇に対する影響を検討した。刺激時の血小板内カルシウムの上昇がカリクリンA，オカダ酸により抑制されたことより，これら阻害剤は，細胞内カルシウムと無関係に細胞内蛋白質の燐酸化を亢進することによって MP 生成を促進しているものと考えられた。(5)非特異的燐酸化酵素阻害剤の MP 生成に対する影響：MP 生成における燐酸化の関与をさらに検討するために，非特異的燐酸化酵素阻害剤（K252a）の MP 生成に対する影響を検討した。カリクリンA，オカダ酸は，トロンビン，コラーゲン刺激により放出される MP を増加させるが，K252a は濃度依存性にその増加を抑制し，5 μM にてほぼ完全に抑制した。

【総括】

従来血小板 MP 生成機序に関する報告はほとんどなかったが，flow cytometry を用いた再現性の高い高感度の MP の測定系を用いることにより，MP 生成は細胞内カルシウムの上昇のみならず，細胞内蛋白のセリン・スレオニンの燐酸化により調節されていることがはじめて明らかにされた。これまでは，血小板 MP は細胞膜より直接 budding によって遊離されるのではないかと推測されていたが，偽足末端より遊離する像が走査型電子顕微鏡ではじめて観察された。このことによって刺激受容に伴う血小板の形態変化のうち特に偽足形成が，MP 生成と密接に関連していることが示唆された。細胞の形態変化，偽足形成，細胞骨格の再構築を阻害するサイトカラシンD が同時に MP の生成も抑制することが明らかにされた。一方セリン・スレオニン脱燐酸化酵素阻害剤が microtubules, actin fiber の再構築を介して，血小板の形態変化を惹起し，偽足形成を促進することを透過型電子顕微鏡を用いて解明したとともに MP 生成の増加をおこすことを見いだした。以上の結果より MP 生成には，セリン・スレオニン燐酸化によって生じる microtubules や actin fiber などの細胞骨格の再構築の結果もたらされる形態変化，偽足の形成が深く関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は，新しい血小板反応の 1 つであるマイクロパーティクル（MP）放出のメカニズムを研究したものである。申請者は，すでに血小板をフローサイトメトリーにて測定する系を確立し，従来ほとんど知られていなかった MP 生成機序として，刺激にともなうカルシウムの上昇が重要であることならびにカルシウム依存性中性蛋白分解酵素（カルパイン）の活性化による細胞骨格（フィラミン）の加水分解が部分的に関与していることを報告してきている。本論文はさらに 1 型及び 2 型フォスファターゼ阻害剤（オカダ酸（OA），カリクリン（CLA）），アクチン重合阻害剤を用いて，MP 生成における細胞骨格の燐酸化の役割をフローサイトメトリーと走査型電子顕微鏡を用いて検討した。その結果，アクチン重合阻害剤が，MP の放出を抑制するとともに偽足の形成をも抑制すること，ならびにフォスファターゼ阻害剤が細胞骨格蛋白の燐酸化を介して偽足の形成促進をおこすこと，またその偽足末端より，MP 放出をおこすことを見いだし初めて報告した。また偽足の形成には，燐酸化によって調節を受ける微小管やアクチン繊維の再構築が重要であることを報告した。

本論文は，従来ほとんど研究されていなかった血小板の MP 放出の生成メカニズムを生化学的，形態学的に究明し，MP 生成における細胞骨格燐酸化による偽足形成の関与を示した点で高く評価でき，学位に値すると考えられる。