



Title	Difference of [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> movements in platelets stimulated by thrombin and TRAP : the involvement of alpha IIb beta3-mediated TXA <sub>2</sub> synthesis
Author(s)	青木, 俊明
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42976">https://hdl.handle.net/11094/42976</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名	あおき 青木 とし 俊明
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 2 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 5 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Difference of $[Ca^{2+}]_i$ movements in platelets stimulated by thrombin and TRAP: the involvement of $\alpha$ IIb $\beta_3$ -mediated $TXA_2$ synthesis (トロンビン及びトロンビン受容体活性化ペプチド刺激時の血小板細胞内カルシウム動態の違い：インテグリン $\alpha$ IIb $\beta_3$ 依存性トロンボキサン $A_2$ 産生の関与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 柳田 敏雄 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 松澤 佑次

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目 的]

- 1) トロンビンは血小板の細胞内カルシウム動員を促進し、血小板活性化および凝集を引き起こすことが知られているが、その受容体にはいくつかのサブタイプ (TR、GPIb 等) が存在することが知られている。TRAP (Thrombin-receptor-agonist-peptide) はそれらの中のプロテアーゼ活性化型のトロンビン受容体 (TR) のみを特異的に活性化させるアゴニストペプチドとして知られている。そこで、Native トロンビンと TRAP 刺激時の血小板内の細胞内カルシウム濃度変化を比較することにより、受容体サブタイプによるシグナル経路の違いについて検討した。
- 2) さらにそれらのシグナル伝達系におけるインテグリン  $\alpha$  IIb  $\beta_3$  およびトロンボキサン  $A_2$  ( $TXA_2$ ) 合成系の関与を、それらの特異的拮抗剤を用いることによって検討した。

### [方法]

- 1) 細胞内カルシウム指示薬 Fura-2 をとり込ませた洗浄血小板をトロンビンおよび TRAP で刺激し、細胞内カルシウム変化および血小板凝集反応を経時的に細胞内カルシウム測定器 (FS-1000、Kowa, Japan) で観察し、両者の反応を比較検討した。また、それらシグナル系に関与するトロンビンレセプターのサブタイプを検討するため、それらの中和抗体である Anti-GPIb (SZ2、AP-1) および Anti-TR (PF-11、Ra  $\alpha$  TR) 抗体の影響を検討した。
- 2) 1) と同様の実験で  $\alpha$  IIb  $\beta_3$  の特異的拮抗剤 (FK633、MK383:  $0.1 \mu M$ ) あるいは  $TXA_2$  拮抗剤 (BM13505:  $10 \mu M$ )、さらには Cyclooxygenase 阻害剤 (Aspirin:  $100 \mu M$ ) 添加条件下で、それらが細胞内カルシウム変化に与える影響を観察した。また同時に  $\alpha$  IIb  $\beta_3$  拮抗作用の確認のため血小板凝集能を比濁度法で、さらに  $TXA_2$  合成能の確認のため、その安定代謝物である  $TXB_2$  産生量を RIA 法で定量した。

### [成 績]

- 1) 血小板内カルシウム濃度はトロンビンの場合、 $0.03 \mu M$  以上の刺激濃度で 2 相性の増加を示した。第 1 相目はトロンビン添加直後から認められ、さらに第 2 相目は血小板凝集反応の立ち上がりとはほぼ同時期に認められた。さらにそれらのカルシウム増加および凝集反応は Anti-GPIb (SZ2、AP-1) および Anti-TR (PF-11、Ra  $\alpha$  TR) 抗

体存在下では著明に抑制された。一方、TRAP 刺激の場合も刺激直後から濃度に依存した細胞内カルシウム濃度の増加が認められ、凝集反応も認められたが、そのカルシウム濃度の増加は 1 相性であった。またそれらは、Anti-TR 抗体による抑制は受けるが、Anti-GPIIb 抗体に対しては何ら影響を受けなかった。

2)  $\alpha$  IIb  $\beta_3$  の特異的拮抗剤である FK633 および MK383 は、トロンビン刺激時の第 2 相目の細胞内カルシウム増加および凝集反応を著明に抑制したが、第 1 相目には影響を与えなかった。また、同時に測定した TXB2 産生はほぼ完全に抑制されていた。さらにトロンビン刺激時の第 2 相目のカルシウム増加は BM13505 および Aspirin 処理により著明に抑制された。一方、TRAP 刺激の増大、凝集反応は FK633 および MK383 のより完全に抑制されるが、細胞内カルシウム増加、TXB2 産生はほとんど影響を受けなかった。

#### [総括]

血小板の細胞内カルシウム濃度はトロンビンおよび TRAP 刺激時では、異なった増加パターンを示し、トロンビン刺激時には TR だけでなく GPIIb もシグナル伝達に関与していることが示唆された。また、トロンビン刺激時の第 2 相目のカルシウム増加は TXA2 産生によって引き起こされ、それには  $\alpha$  IIb  $\beta_3$  からのシグナルが必須であることが示された。一方、TR からのシグナルによる TXA2 産生は  $\alpha$  IIb  $\beta_3$  非依存性であった。以上の結果より、トロンビンレセプターはサブタイプにより、異なるシグナル伝達系を介して細胞内カルシウム増加および TXA2 合成を引き起こすことが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は止血血栓形成に重要なタンパクであるトロンビンを介した、血小板活性化のシグナル伝達系に関する研究結果の報告である。本研究ではトロンビンの刺激をうけた血小板がその受容体のサブタイプの関与の違いにより、異なった細胞内カルシウム濃度変化を引き起こすことを見出し、またさらにはそれらカルシウム濃度変化の違いが、血小板凝集反応およびトロンボキサン A2 産生反応の経時的な反応性の違いに起因することを明らかにしている。これらは、未だ不明な部分が多い生体内での正常および病的血栓形成のメカニズムを考える上で有用な新しい知見のひとつであり、本研究の成果を導き出す際に発揮された学識は、学位の授与に値すると考えられる。