

Title	Platelet Adhesion to Native Type I Collagen Fibrils : ROLE OF GPVI IN DIVALENT CATION-DEPENDENT AND -INDEPENDENT ADHESION AND THROMBOXANE A2 GENERATION
Author(s)	中村, 隆
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43043
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	中 村 隆 <small>なかむら たかし</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 1 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 5 月 6 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	Platelet Adhesion to Native Type I Collagen Fibrils. Role of GPVI in Divalent Cation-dependent and -independent Adhesion and Thromboxane A ₂ generation (血小板の繊維状 I 型コラーゲンへの粘着反応：二価イオン依存性、非依存性粘着およびトロンボキサン A ₂ 生成における GPVI の役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 金 倉 讓 教 授 宮 坂 昌 之

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

コラーゲンは血管内皮下に存在する主要な蛋白質であり、血小板と反応して血小板の粘着凝集反応を強く誘導する活性を持っている。コラーゲンと血小板の粘着反応は止血反応の最も初期の段階で関与する重要な反応と考えられ、以前より多くの研究が行われてきたが、その詳細は不明である。コラーゲン受容体としては、すべにインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ (GPIa/IIa) が確立されているが、ノンインテグリン GPIV、GPVI の関与も示唆されている。これらコラーゲン受容体のシグナル伝達や相互作用に関しては不明点が多い。特に、GPVI に関しては精製、クローニングもなされていない。本研究では、これらを検討するために、まず再現性の高い静止粘着測定系を確立した上で、上述した糖蛋白に特異的な抗体を用いて血小板のコラーゲン粘着反応における GPIa/IIa、GPIV、GPVI の関与について検討した。

[方法]

1) 正常人よりクエン酸採血を行い、新鮮洗浄血小板を調整し、血小板を ^{51}Cr にて標識したのち余剰 ^{51}Cr を除去後 Tyrode-HEPES 緩衝液 (Mg^{2+} 存在下あるいは非存在下) に再浮遊した。GPIa/IIa に対する抗体は New York Mount Sinai Hospital の Barry Coller 博士より、GPVI に対する抗体は京都大学名誉教授大熊稔博士より提供を受けた。GPIV に対する抗体は自家製のものを用了。

2) モノマーまたは繊維状 I 型コラーゲンをプラスチックウェルに固相化したのち非特異的結合を除くためにアルブミン溶液にてブロッキングした。洗浄血小板をウェル内に静置し一定時間後、緩衝液にて十分に洗浄し SDS にて可溶化後シンチレーションカウンターにて粘着率を測定した。

3) 粘着に伴う放出反応を ^{14}C セロトニン標識した血小板を用いて行った。洗浄血小板をウェル内に静置し一定時間後、緩衝液にて十分に洗浄し SDS にて可溶化後シンチレーションカウンターにてセロトニン放出率を測定した。

4) 粘着に伴うトロンボキサン A₂ の測定を ^{51}Cr 標識していない洗浄血小板を用いて行った。細胞外に放出されたトロンボキサン B₂ 濃度を EIA にて測定した。

[結果]

血小板のモノマー I 型コラーゲンと繊維状 I 型コラーゲンに対する粘着は以下に述べる種々の点において大きく異なることが判明した。

1) モノマー I 型コラーゲンに対する粘着反応は Mg^{2+} 存在下で認められたが、放出反応とトロンボキサン A_2 生成は認められなかった。この反応は抗 GPIa/IIa 抗体により完全に抑制された。 Mg^{2+} 非存在下では粘着反応は認められなかった。

2) 一方、I 型繊維状コラーゲンに対する粘着反応には Mg^{2+} が不可欠ではなく、引き続き放出反応とトロンボキサン A_2 生成が認められた。 Mg^{2+} 非存在下での粘着反応は抗 GPVI 抗体により完全に抑制された。 Mg^{2+} 存在下では抗 GPIa/IIa 抗体および抗 GPVI 抗体共存下でのみ完全に抑制された。抗 GPVI 抗体単独では粘着抑制は認められないものの、トロンボキサン A_2 生成が完全に抑制された。

[総括]

1) モノマー I 型コラーゲンに対する粘着は GPIa/IIa を介する Mg^{2+} 依存性の反応であるが血小板は活性化されない。一方、繊維状 I 型コラーゲンに対する粘着には主として、GPIa/IIa および GPVI の両者が関与しており粘着に伴い血小板は強く活性化される。

2) 繊維状 I 型コラーゲンへの血小板粘着に伴うトロンボキサン A_2 生成は GPVI を介した反応である。

論文審査の結果の要旨

何らかの原因で血管内皮細胞が損傷を受けると、血管内皮下組織が露呈され血小板は粘着、凝集して血栓を形成する。その初期反応として、血小板のコラーゲンへの粘着反応は重要である。そこで、本研究は、静止系での血小板の繊維状 I 型コラーゲンへの粘着反応、それに伴う顆粒放出反応およびトロンボキサン A_2 生成における各コラーゲン受容体 (BPIa-IIa、GPIV、GPVI) の関与を抗体を用いて検討した。その結果、1. 繊維状 I 型コラーゲンへの粘着には全ての受容体が関与するが、特に GPIa-IIa と GPVI が主たる役割を果たし、モノマー I 型コラーゲンでは GPIa-IIa のみが関与している、2. 粘着に伴う放出反応は繊維状 I 型コラーゲンでのみ見られ、これは GPIa-IIa と GPVI を介した反応である、3. 粘着に伴うトロンボキサン A_2 生成も繊維状 I 型コラーゲンでのみ見られ、これは GPVI のみを介した反応であることを明らかにした。これらの結果は今まで解析が困難であった複雑な血小板-コラーゲン粘着反応における各コラーゲン受容体の役割を明らかにしている点で高く評価でき、学位に値するものとする。