



Title	Involvement of Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger in Inside-out Signaling Through the Platelet Integrin α IIb β 3
Author(s)	白鹿, 正通
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43204
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"〉 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	しら が まさ みち 白 鹿 正 通
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 6 6 4 1 号
学位授与年月日	平成 14 年 1 月 31 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	Involvement of Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger in Inside-out Signaling Through the Platelet Integrin α II b β 3. (血小板インテグリン α II b β 3 活性化における Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger の関与)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 倉智 嘉久 教授 金倉 讓

論文内容の要旨

【目的】

血小板膜に発現しているインテグリン α II b β 3 は fibrinogen や von Willebrand 因子の受容体として機能し、血小板機能の中核を担っている。非活性化状態の血小板において α II b β 3 は流血中に豊富に存在するリガンドとは結合しないが、血小板が活性化すると α II b β 3 は立体構造を変化させリガンド結合能を獲得する。この α II b β 3 の活性化は “Inside-out signal” を介しているが、その詳細は依然不明である。本研究において私は α II b β 3 の活性化経路に Na⁺/Ca²⁺ Exchanger が関与していることを示唆する新知見を得た。

【方法ならびに成績】

α -chymotrypsin による α II b β 3 の活性化は amiloride によって阻害される。

ヒト洗浄血小板を 60 U/ml α -chymotrypsin にて処理し、¹²⁵I-fibrinogen の結合数を測定した。37°C で 10 分間処理すると血小板 1 個あたり 7,124 ± 2,254 分子の ¹²⁵I-fibrinogen が結合した。この結合は PGE₁ や apyrase によって影響を受けないことから、従来の仮説として chymotrypsin が α II b β 3 を直接修飾し構造を変化させると考えられていた。この仮説を検証する目的で種々の薬剤の効果を検討したところ、高濃度の amiloride が濃度依存性に fibrinogen の結合を阻害することが明らかとなり、その 50% 阻害濃度は 0.53 mM であった。

α -chymotrypsin による α II b β 3 の活性化に対する細胞内外のナトリウムイオン濃度勾配の影響

Amiloride は Na⁺ の transporter の機能を阻害することが知られているため、細胞外の Na⁺ を tetramethylammonium (TMA) ion に置き換えた条件下で血小板を chymotrypsin で処理し、fibrinogen の結合数を測定した。その結果、細胞外の Na⁺ 濃度が 14 mM の条件で処理した場合の fibrinogen の結合数は 140 mM の生理的条件で処理した場合の約 2 倍であった。さらに 0.1 mM ouabain 存在下で処理した場合、約 4 倍の fibrinogen が結合した。この結果から、Na⁺ の細胞内から細胞外への流出を促す状態ではより多くの α II b β 3 が活性化することが示唆された。

α -chymotrypsin 処理血小板における Na⁺/Ca²⁺ Exchange

Amiloride によって阻害され、かつ Na⁺ を流出させることが知られているイオンチャンネルとして Na⁺/Ca²⁺

Exchanger がある。そこで、血小板を chymotrypsin で処理することによる $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange を測定する目的で、細胞外の Na^+ 濃度を 140mM または 7mM に調整した Hepes buffer にて血小板を chymotrypsin で処理し、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みを測定した。chymotrypsin 処理により $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の influx は細胞外の Na^+ 濃度が 140mM で処理した場合約 2 倍に増加し、細胞外の Na^+ 濃度が 7mM で処理した場合、約 4 倍増加した。これらの結果から、血小板を chymotrypsin にて処理すると、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange が惹起されることが明らかとなった。

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange の阻害剤による $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化に対する影響

次に、amiloride よりも特異的な $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange の阻害剤である dichlorobenzamil (DCB) と bepridil を用いて $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化に対する阻害効果を検討した。Chymotrypsin 処理血小板において、これら阻害剤は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange を阻害する濃度範囲で $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化を阻害した。さらに、これらの阻害剤は thrombin、ADP、U46619 といった検討した全ての血小板のアゴニストによる $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化を阻害した。

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange の阻害剤による血小板の形態変化及び放出反応に対する影響

血小板は活性化すると、その形態を瞬時に変化させるとともに、顆粒の放出を引き起こす。そこで、血小板の形態変化や放出反応における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange の関与について検討する目的で、DCB 存在下における thrombin 刺激血小板の形態を電子顕微鏡にて観察した。その結果、DCB は thrombin によって引き起こされる血小板の形態変化や放出反応を阻害しなかった。このことから、アゴニストによる顆粒の放出反応や形態変化を起こす経路には $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange は関与していないと考えられた。

【総括】

本研究によって $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange が、血小板の凝集反応に必須であるインテグリン $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化に関与していることが明らかとなった。またこのイオンのトランスポーターは血小板の形態変化や顆粒の放出反応には関与しないことから、 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化に特異的に関与することも明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、血小板における fibrinogen や von Willebrand 因子の受容体であるインテグリン $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の機能調節機構について解析したものである。その結果、1) α -chymotrypsin による $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化モデルにおいて、 Ca^{2+} influx mode の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange が関与していること、2) 生理的なアゴニストによる $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の活性化が $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange の阻害剤で阻害されること、3) アゴニストによって惹起される血小板の顆粒の放出や形態変化は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange の阻害剤によって阻害されないこと、を明らかにした。

本研究によって得られた結果は、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger が $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 活性化シグナルに特異的に関与するという新しい仮説を樹立し、インテグリンの機能調節機構を解明する手がかりとなりうると考えられ、学位の授与に値すると認める。