

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | SHPS-1 negatively regulates integrin $\alpha$ IIB $\beta$ 3 function through CD47 without disturbing FAK phosphorylation  |
| Author(s)    | 加藤, 恒   |
| Citation     | 大阪大学, 2005, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/45382">https://hdl.handle.net/11094/45382</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"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | かとう ひさし<br>加藤 恒  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医学)  |
| 学位記番号      | 第 19297 号  |
| 学位授与年月日    | 平成 17 年 3 月 25 日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学系研究科分子病態医学専攻   |
| 学位論文名      | SHPS-1 negatively regulates integrin $\alpha_{IIB}\beta_3$ function through CD47 without disturbing FAK phosphorylation<br>(SHPS-1 は FAK リン酸化を阻害せずに CD47 を介してインテグリン $\alpha_{IIB}\beta_3$ 機能を抑制する) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 金倉 謙<br><br>(副査)<br>教授 宮坂 昌之 教授 下村伊一郎   |

#### 論文内容の要旨

##### 〔目的〕

血小板に発現するインテグリン  $\alpha_{IIB}\beta_3$  はフィブリノーゲンレセプターとして血栓形成過程において重要な働きを担っている。CD47 は血小板を含む多くの細胞表面に発現する膜蛋白で  $\beta_3$  インテグリンと共沈降されることから発見され、インテグリンの機能を調節すると考えられているが血小板における CD47 の役割は不明である。CD47 に対するリガンドである SHPS-1 (SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase substrate-1) は血管内皮細胞、顆粒球、単球などに発現する膜蛋白であり、今回血小板での CD47 の機能を明らかにするために、SHPS-1 の血小板 CD47 への結合による血小板機能への作用について検討を行った。

##### 〔方法ならびに成績〕

SHPS-1 は膜蛋白であるため SHPS-1 細胞外領域とヒト IgG-Fc 部分との融合蛋白 SHPS-1-Ig をそれぞれヒト・マウス SHPS-1 に対して作製した (hSHPS-1-Ig、mSHPS-1-Ig)。ヒト IgG-Fc 部分と血小板上の Fc レセプターとの結合は IV. 3 Fab により阻害した。hSHPS-1-Ig のヒト血小板への結合は抗 CD47 抗体 B6H12 により阻害され、さらに mSHPS-1-Ig は Wild Type マウス血小板のみに結合し、CD47 欠損血小板には結合しないことより SHPS-1 は血小板 CD47 特異的に結合することが確認された。SHPS-1-Ig の血小板機能に対する作用としてまずヒト血小板凝集への影響を検討したところ、低濃度の ADP・コラーゲン・トロンビン刺激において hSHPS-1-Ig は血小板凝集を抑制した。フローサイトメトリーによる検討で、hSHPS-1-Ig は血小板インテグリン  $\alpha_{IIB}\beta_3$  の活性化、顆粒放出反応を軽度抑制したのみであった。次にインテグリン  $\alpha_{IIB}\beta_3$  の outside-in シグナルの検討としてフィブリノーゲン固相化プレート上へ接着した血小板 spreading を観察した。コントロール血小板は接着後に  $71.2 \pm 6.2\%$  の血小板が spreading したが、hSHPS-1-Ig 結合血小板では  $17.3 \pm 4.9\%$  しか spread しなかった。さらにマウスの血小板を用いた検討では、Wild type マウス血小板ではヒト血小板同様に mSHPS-1-Ig による spread の抑制が見られたが、CD47 欠損マウス血小板では mSHPS-1-Ig を加えても spread は抑制されなかった。SHPS-1 は細胞表面に発現する膜蛋白で、可溶性リガンドとしての存在は確認されておらず、より生理的条件に近い状態での作用を見るため 293T 細胞上に発現させた hSHPS-1、mSHPS-1 のヒト・マウス血小板への作用を検討した。293T 細胞表面に発現した SHPS-1

でも SHPS-1-Ig を用いた場合と同様に CD47 を介した血小板 spread の抑制が見られた。以上より SHPS-1 の血小板 spread の抑制は CD47 を介した特異的な作用であることが明らかとなった。

$\alpha$  IIb  $\beta$  3 を介してフィブリノーゲンに接着した血小板では Src、Syk のリン酸化に続いて FAK のチロシンリン酸化が誘導される。これにより細胞骨格の再構成に関与する cortactin、 $\alpha$ -actinin の活性化が spread につながると考えられる。Spread しているコントロールと hSHPS-1-Ig により spread の抑制されている血小板において免疫沈降後の western blotting を用いた蛋白チロシンリン酸化を検討すると、Src、Syk、FAK のリン酸化に違いは見られなかった。また、Src 依存性に活性化する cortactin は hSHPS-1-Ig により spread が抑制されていてもコントロール同様のリン酸化が起こっていた。一方、FAK 依存性に活性化するとされている  $\alpha$ -actinin のリン酸化は hSHPS-1-Ig により低下していた。これにより、SHPS-1 は FAK の下流の経路に作用した結果、血小板 spread を抑制することが示唆された。

〔総括〕

SHPS-1 の血小板 CD47 への結合は FAK 下流を抑制することにより血小板の outside-in シグナルを抑制した。SHPS-1/CD47 の関連が血小板機能を抑制する新たなメカニズムであると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では血小板上に発現する CD47 と血管内皮細胞などに発現する SHPS-1 との関連がもたらす作用について検討を行っている。本研究では血小板 CD47 に対し、作製した融合蛋白 SHPS-1-Ig を結合させ血小板機能への作用を検討しているが、SHPS-1-Ig の結合によって低濃度のアゴニスト刺激による血小板凝集が抑制されることを見出している。血小板凝集反応における SHPS-1-Ig による抑制作用は、血小板活性化過程においてインテグリン  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 へのリガンド結合後に生じる outside-in シグナルの抑制作用が主であること、また CD47 欠損血小板を用いることでこの作用の CD47 特異性を証明している。さらに、これらの作用が outside-in シグナル伝達経路において FAK 下流へ影響した結果であることを明らかにした。本研究は新たな生理的血小板機能抑制作用を明らかにしており、学位に値すると認める。