

Title	Critical role of ADP interaction with P2Y <sub>12</sub> receptor in the maintenance of $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation : association with Rap1B activation
Author(s)	釜江, 剛
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47481">https://hdl.handle.net/11094/47481</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	かま 釜 え 江 つよし 剛
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20941 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Critical role of ADP interaction with P2Y <sub>12</sub> receptor in the maintenance of $\alpha_{11b}\beta_3$ activation : association with Rap1B activation (インテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ 活性化の維持には、P2Y <sub>12</sub> レセプターを介する ADP 刺激が重要であり、Rap1B の活性化が関与する。)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 讓  (副査) 教授 高井 義美 教授 宮坂 昌之

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### [ 目的 ]

インテグリン  $\alpha_{11b}\beta_3$  は、血小板凝集に必須の接着レセプターであり、トロンビンなどの種々のアゴニスト刺激により非活性化型から活性化型に変化し、そのレセプター機能を発現する。インテグリン  $\alpha_{11b}\beta_3$  の活性化惹起機構に関しては精力的に研究がなされているが、活性化がどのような機構で維持されるかについての知見は殆どない。

血小板は P2Y<sub>1</sub> と P2Y<sub>12</sub> の 2 つの ADP レセプターを有している。当研究室では P2Y<sub>12</sub> 欠損患者解析により、P2Y<sub>12</sub> 欠損血小板では、凝集実験において一過性の血小板凝集が惹起されるのみでその後血小板凝集の解離がおこること、すなわち安定な血小板凝集が障害されることを明らかにしている。

本研究では、ADP と P2Y<sub>12</sub> 受容体が  $\alpha_{11b}\beta_3$  活性化維持に中心的な役割を果たしているとの仮説のもと、未だ不明である  $\alpha_{11b}\beta_3$  活性化の維持機構の解明を目的とした。

##### [ 方法ならびに成績 ]

P2Y<sub>12</sub> 欠損患者の血小板は、アゴニスト刺激において一過性に凝集した後、解離する。血小板凝集は  $\alpha_{11b}\beta_3$  依存性であるため、 $\alpha_{11b}\beta_3$  が一過性に活性化していると考えられた。そこで、P2Y<sub>12</sub> 欠損患者血小板上の活性化  $\alpha_{11b}\beta_3$  の検出を試みた。P2Y<sub>12</sub> 欠損患者の洗浄血小板を作製し、種々のアゴニスト (ADP、PAR1-TRAP、PAR4-TRAP、U46619) で刺激した。 $\alpha_{11b}\beta_3$  の活性化は、活性化  $\alpha_{11b}\beta_3$  を特異的に認識する抗体 (FITC 標識 PAC1 抗体、以下 PAC1) を 30 分間反応させ FACS で解析した。P2Y<sub>12</sub> 欠損血小板では、ADP 以外のアゴニスト刺激でも PAC1 結合はほとんど認められなかった。このことより、P2Y<sub>12</sub> 欠損血小板では、アゴニスト刺激により惹起される  $\alpha_{11b}\beta_3$  の活性化が、PAC1 結合実験で検出するには、短く、不安定であると考えた。そこから、インテグリン  $\alpha_{11b}\beta_3$  の活性化維持には ADP による P2Y<sub>12</sub> レセプターを介した持続的な刺激が必要であるとの仮説をたてた。

この仮説を検証するために、改変した PAC1 結合実験を施行した。正常洗浄血小板をトロンビンなどで刺激し  $\alpha_{11b}\beta_3$  の活性化を誘導。その 15 分後に P2Y<sub>12</sub> 阻害剤などの種々の阻害剤を添加し、その後 PAC1 抗体、P-selectin

(CD62p) 抗体を加え、FACS で解析した。その結果、P2Y<sub>12</sub> 阻害剤 (AR-C69931MX) は、P-selectin の発現を低下させずに、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  の活性化を約 92%抑制した。一方、 $\alpha_2$ -adrenergic 受容体、セロトニン受容体、トロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体の阻害剤は  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化はほとんど抑制しなかった。

PAC1 結合実験は、通常血小板数 50,000/ $\mu\text{l}$  で行う。血小板が放出した ADP 濃度を低下させる目的で、洗浄血小板をトロンビン 0.2 U/ml で刺激後、トロンビン存在下で血小板数 50,000/ $\mu\text{l}$  から 500/ $\mu\text{l}$  まで希釈を行った。希釈の程度に依存して PAC1 結合は低下した。希釈する緩衝液に ADP 1  $\mu\text{M}$  を加えると低下した PAC1 結合は回復した。この ADP 濃度は、HPLC を用いて実測した放出 ADP 濃度 (血小板数 50,000/ $\mu\text{l}$  あたり  $\sim 1.3 \mu\text{M}$ ) とほぼ同程度であった。一方、U46619 (トロンボキサン A<sub>2</sub> アナログ) 刺激では、放出される ADP 量が 50,000/ $\mu\text{l}$  あたり  $\sim 0.4 \mu\text{M}$  と少なく、血小板数を 20,000/ $\mu\text{l}$  に希釈するのみで PAC1 結合の著明な減少が観察された。

血小板をトロンビンで刺激するとトロンビン受容体 (PAR1 および PAR4) を介して、細胞内 Ca の上昇ならびに PKC の活性をもたらし、血小板を活性化する。そこで、P2Y<sub>12</sub> を介した  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化維持機構を解析するため、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化に重要と考えられる PKC と Rap1B 活性化に対する P2Y<sub>12</sub> 阻害剤の効果を検討した。上記の実験と同様に、血小板を初めにトロンビンで刺激した後、P2Y<sub>12</sub> 阻害剤を加えた。トロンビン刺激により、PKC および Rap1B の持続的な活性化が誘導されるが、P2Y<sub>12</sub> 阻害剤は PKC の活性化には影響を与えず、Rap1B の活性化を著明に抑制した。以上のように、 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化維持と Rap1B 活性化維持の関連性が示唆された。

[ 総括 ]

インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化維持には P2Y<sub>12</sub> を介した ADP の持続的な刺激が必要であることが示された。さらに  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化維持には Rap1B が関与することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  は、血小板凝集に必須の接着レセプターである。インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化の惹起機構に関しては多くの解析がなされているが、インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化の維持機構については、ほとんど研究がなされておらず、そのメカニズムは不明である。

本研究の結果、トロンビンなどのアゴニスト刺激によって惹起されたインテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  の活性化を維持するためには、血小板が放出した ADP による、P2Y<sub>12</sub> レセプターを介した持続的な刺激が必要であることが示された。さらに、インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化を増強する事が報告されている Rap1B の挙動が、インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化状態と同期していることが判明し、インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  の活性化維持機構に Rap1B が関与していることが示唆された。

本研究は、インテグリン  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  活性化維持機構の一部を明らかにしたものであり、学位に値する研究と考えられる。