

氏 名	なが い ひろ ふみ 永 井 博 史
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 591 号
学位授与の日付	平 成 10 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	血小板粘着における血小板膜タンパク質の機能に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 川 寄 敏 祐 教授 市 川 厚 教授 藤 井 信 孝

論 文 内 容 の 要 旨

血小板は、内皮下組織と接触すると、粘着→活性化→凝集という過程を経て血栓が形成され、止血の中心的役割を果たす。これはポリスチレンや塩化ビニール等の人工材料に血小板が接触した時も同様である。血小板の粘着は、止血の初期に起こる現象であるため、このメカニズムや関与する因子を調べることは疾病や抗血栓性材料の解析に重要である。しかし、これまで一般的に血小板粘着能の測定と呼ばれてきた方法(ガラスビーズ法等)は、血小板の粘着と凝集を同時に測定したものであり、厳密には粘着能のみを測定したものではなかった。

申請者は、血小板の凝集を抑制し粘着のみを評価する系を確立し、この系を用いて人工材料や内皮下組織への血小板粘着を調べた。その結果、粘着に関与する血小板膜タンパク質、血漿タンパク質、マトリックスタンパク質を明らかにすることができた。また、コラーゲンへの粘着能の欠失した患者血小板の膜タンパク質を解析し、GPIa-IIa複合体($\alpha_2\beta_1$ インテグリン)が欠損していることを明らかにした。

1. 人工材料表面への血小板粘着に関する研究

プロスタグランジンE₁を加え血小板の活性化を抑制し凝集を起こさないようにした場合でも、血漿と接触させた材料表面に血小板の粘着が起こることを見いだした。粘着率の測定は、⁵¹Crで標識した血小板を用いて行った。凝集の起こっていないことは走査電顕により確認した。この活性化非依存性の血小板粘着の測定系により、粘着を凝集と区別して観察することが可能となった。

この系を用い、材料表面(ポリスチレン)への活性化非依存性血小板粘着に関与している血小板膜タンパク質と、材料に吸着した血漿タンパク質との関係について、抗体、患者血小板、患者血漿等を用いて調べた。その結果、フィブリノゲンに対する多クローン性抗体で粘着が抑制されたこと、およびフィブリノゲン欠損症患者(afibrinogenemia)血漿を用いた場合、粘着がほとんど認められなかったことから、材料に吸着する血漿タンパク質の中で、フィブリノゲンが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、血小板膜タンパク質GPIIb-IIIa複合体に対する単クローン抗体による粘着の阻害、およびGPIIb-IIIa複合体欠損症の患者血小板で粘着が認められないことから、血小板膜タンパク質の中ではGPIIb-IIIa複合体が、この活性化非依存性の血小板粘着においてフィブリノゲンのレセプターとして機能していることが示された。

2. 内皮下組織への血小板粘着に関する研究

ヒト内皮細胞を培養したプレートから細胞を剥がし、残った内皮下組織への活性化非依存性の血小板粘着を調べた。その結果、プレートにコートしたコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンへの血小板粘着を抑制する抗GPIa-IIa複合体抗体、抗GPIc-IIa複合体($\alpha_5\beta_1$ インテグリン)抗体、抗GPIc-IIa複合体($\alpha_6\beta_1$ インテグリン)抗体は、それぞれ内皮下組織への粘着を部分的に抑制した。また、コートしたコラーゲンに粘着しないGPIa-IIa複合体欠損血小板を用いて、内皮下組織への粘着を調べたところ、正常な血小板にくらべ減少していた。フィブロネクチン、ラミニンに対する抗体も部分的に粘着を抑制した。これらの結果は、マトリックスタンパク質としてコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、また血小板膜タ

ンパク質として、GPIa-IIa複合体、GPIc-IIa複合体、GPIc'-IIa複合体が内皮下組織への血小板粘着に関与していることを示している。

3. コラーゲン不応症患者血小板に関する研究

固相化したコラーゲンへの粘着、およびコラーゲン惹起血小板凝集を起こさない患者血小板の膜タンパク質を解析しGPIa-IIa複合体が欠損していることを見いだした。この患者血小板ではGPIa-IIa複合体が欠損しているが、GPIc-IIa複合体とGPIc'-IIa複合体は存在しており、GPIa (α_2) 側の異常によることを示している。これらの結果は、GPIa-IIa複合体がコラーゲンレセプターであり、粘着に関与していることを支持している。

以上のように、本研究は、血小板粘着の解析方法を開発し、粘着に関わる血漿・マトリックス因子および血小板表面タンパク質を同定したものであり、血栓形成や止血の形成過程を調べる上で有益な基礎的知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

血管が損傷を受けたり、人工材料と血液が接触した時には、まず血小板がその部位に粘着する。続いて血小板の活性化がおり、血小板凝集を引き起こし、血栓の形成へと至る。この過程に関与する血漿タンパク質や血小板膜タンパク質を調べることは、抗血小板剤の開発、抗血栓性材料の開発等において重要であり、またその機能の検査は疾病の診断に用いられる。しかしながら、これまで血小板粘着能試験と呼ばれてきた方法は厳密には粘着と凝集を同時に測定する系であった。そのため、そこに係わる因子を解析しようとする場合、凝集に関与する血小板数が粘着に関与する血小板数に比べ圧倒的に多いため、粘着に関与する因子のみを調べることは困難であった。しかしながら、粘着は血栓形成の最初のステップであり、この過程を解析可能にすることは重要である。申請者はこのような観点から、新たな実験系の作成を試み、PG（プロスタグランジン）E1を反応系に加えることにより血小板凝集を抑制し、粘着のみを解析できる系を確立し、そこに関与する因子を明らかにすることに成功した。

本研究では、まず、人工材料および内皮下組織への粘着を解析し、次いでコラーゲンへの粘着能の欠失した患者血小板の膜タンパク質を解析し、次の結果を得ている。(1) 血漿と接触させた人工材料表面への活性化非依存性血小板粘着は、材料表面を抗フィブリノーゲン抗体で処理した時および血小板を抗GPIIb-IIIa抗体で処理した時に阻害された。(2) フィブリノーゲン欠損症患者血漿と接触させた人工材料表面、およびGPIIb-IIIa欠損症患者血小板を用いた場合、血小板の粘着は認められなかった。(3) 内皮下組織への活性化非依存性の血小板粘着は、抗GPIa抗体、抗GPc抗体、抗GPIc'抗体で抑制された。(4) コラーゲン不応症患者血小板の内皮下組織への粘着は減少した。また、抗フィブロネクチン抗体、抗ラミニン抗体は内皮下組織への血小板粘着を抑制した。(5) コラーゲン不応症の患者血小板の膜タンパク質を2次元電気泳動、免疫沈降、フローサイトメトリーにより解析した結果、GPIaが欠失していることが示された。

これらの結果は、血小板粘着機構に次のようなタンパク質の関与を明らかにしたものである。即ち、血漿と接触した人工材料表面への粘着には血漿タンパク質としてフィブリノーゲン、血小板膜タンパク質としてGPIIb-IIIaが重要な役割を果たしていること、内皮下組織への活性化非依存性血小板粘着には、内皮下組織タンパク質としてコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、また血小板膜タンパク質としてGPIa-IIa、GPIc-IIa、GPIc'-IIaが関与していることを示した。また、血漿と接触した材料表面への血小板粘着、内皮下組織への血小板粘着の評価系はそれぞれ、抗血栓性材料、抗血小板剤のスクリーニング系として有用であることを示した。更に、コラーゲン不応症患者では血小板のGPIaが欠失していることにより、GPIa-IIaがコラーゲンのレセプターとして働いていることが示された。

以上の研究は、血小板粘着に関与する血漿タンパク質、血小板膜タンパク質の性質を始めて明らかにしたものであり、抗血小板剤の開発、抗血栓性材料の開発等において重要な知見を得たものである。よって本論分は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成10年7月2日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。