

氏 名	た ぶち 新 田 淵
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2644 号
学位授与の日付	平成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Direct demonstration of involvement of protein kinase C α in the Ca ²⁺ -induced platelet aggregation (カルシウム刺激により誘導される血小板凝集反応に protein kinase C α が関与することの直接的証明)
論文調査委員	(主 査) 教 授 前 川 平 教 授 中 尾 一 和 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

[研究の背景と目的]

血小板は止血や血栓症における重要なプレーヤーだが、無核でタンパク質産生能を持たない微小細胞のため、外来遺伝子導入などの分子生物学的手法の適用も外部からのタンパク質導入も困難であり、その活性化における分子メカニズムは大部分が未解明である。そこで我々は容易に外来物質を導入できるよう形質膜を透過型にした血小板を用いて、血小板活性化反応の一つである凝集反応を解析するアッセイ系を確立した。従来膜透過性の低分子を用いた薬理学的実験により、Protein Kinase C (PKC) が血小板凝集の必須因子であることが示唆されてきた。しかし阻害薬は厳密な意味では特異性を保証しない。さらに PKC 特異的な活性化物質として使用されてきた Phorbol ester の標的物質として、近年 PKC と同様に Phorbol ester 結合ドメインである C1 ドメインを持った Ras-GRP, Chimaerin 等のシグナル伝達物質が新たに見いだされた。この為、従来の手法で蓄積された PKC の知見は再検討を求められている。本研究では透過型血小板を用いたアッセイ系を適用して、PKC が血小板凝集反応における必須因子であるかの検討を行った。

[方法と結果]

ストレプトコッカス属の産生する Streptolysin O (SLO) は細胞膜のコレステロールと結合し、一定温度以上の環境下では重合して円筒形構造を形成して膜に直径約30nmの孔をあける。そこで洗浄血小板と SLO を 4℃下でインキュベートして SLO を形質膜に結合させ、結合しなかった SLO を洗浄して除去したうえで細胞内部環境にあわせたバッファー中で30℃に加温すると、細胞内部の膜には障害を与えずに形質膜だけを透過型に出来る。透過型血小板では小孔を介した拡散反応により小分子や細胞内蛋白は自由に細胞内外を出入りしうが、細胞内小器官は細胞内にとどまる。血小板活性化は様々なアゴニストによって惹起される細胞内Caイオン濃度の上昇を引き金とするが、透過型血小板では細胞内外のCaイオン濃度が等しくなるため、Ca塩添加を刺激とした。そのため本研究は細胞内Caイオンの上昇以後の凝集反応の解析である。凝集反応は凝集度に従ってサンプルの光透過度が変化するのを検出する、従来型の凝集計を用いて評価した。まず反応後のサンプルを光学顕微鏡で観察すると凝集塊を認め、integrin α IIb β 3 の阻害ペプチドである RGDS 存在下では凝集反応が阻害されることから、確かに本アッセイ系内で integrin α IIb β 3 を介した血小板凝集反応が生じていると結論した。凝集度はCaイオン濃度依存性を示したが、そのCaイオン濃度は生理的な凝集反応において報告されているものと一致し、その点でも生理的条件下の血小板凝集反応を mimic していると考えられた。その上で、このアッセイ系では凝集反応惹起に細胞質添加が必須であり、細胞質内に必須因子の存在する事が示唆された。なおその凝集度は添加細胞質濃度依存性を示した。つぎに PKC を免疫沈降で除去した細胞質は凝集活性を失ったが、精製した PKC を加えると凝集性は復活した。一方細胞質を加えず、精製 PKC を単独で添加しても凝集活性は認められなかった。以上より、細胞質中に血小板凝集に関する必須因子が存在し、PKC は十分因子ではないがその必須因子の一つであることを直接的に示した。

[結論]

我々は、透過型血小板を使用した血小板凝集反応アッセイ系を確立し、PKCが凝集反応の十分因子ではないが、必須因子の一つであることを直接的に示した。

論文審査の結果の要旨

血小板は止血反応や血栓症に重要な役割を果たすにもかかわらず、その活性化の、特に細胞内の分子メカニズムの多くは未解明である。これはタンパク産生能が無く遺伝子導入等の分子生物学的手法が使い難い血小板では、細胞膜透過性の小分子を使った薬理学的手法に頼らざるを得ない事が一因である。

従来この手法で Protein Kinase C (PKC) は血小板凝集の必須因子とされてきた。しかしPKC阻害薬の厳密な特異性には疑問が残る上、PKCの特異的活性化物質と信じられた Pnorbol ester がRas-GRP, Chimaerin等のシグナル伝達物質も活性化する事が最近判明した。以降、一般にPKCの知見は再検討を求められている。

申請者らはStreptolysin-0処理にて作成した膜透過血小板を用い、カルシウム刺激による凝集反応を解析する系をまず確立した。この系では凝集成立に細胞質が必要であった。次にPKCを抗体によって除去した細胞質は凝集活性を失ったが、さらに精製PKCを加えると活性は復活した。一方精製PKC単独では凝集活性を示さなかった。以上より、細胞質中に血小板凝集に関する必須因子が存在し、PKCは十分因子ではないが必須因子の一つであることが直接的に示された。従来の薬理学的方法の限界を越えたアッセイ系は、血小板という無核の特殊な細胞の活性化機構を解明するにあたり、今後も強力な手段になると考えられる。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年7月7日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。