

氏 名	いし い あき こ 石 井 明 子
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 658 号
学位授与の日付	平 成 13 年 9 月 25 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	プラスミンによる血小板活性化機構に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 市 川 厚 教 授 佐 藤 公 道 教 授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

血栓症の治療に用いられる血栓溶解剤は、理論的には急性期の抗血栓療法として理想的な薬剤であるとされるが、副作用として再閉塞が問題となっている。その原因として、血栓溶解剤によるプラスミノゲン活性化に際して生成されるプラスミンが、血栓を溶解するという本来の目的だけでなく、副次的な作用として血小板を活性化することにより血栓溶解後の再閉塞をおこす可能性が考えられている。本研究では、血栓溶解剤の有用性確保を目指し、プラスミンが血小板を活性化する機構の解明とその防止法の検討を試みた。

まず、プラスミンによる血小板活性化の基本的諸性質を検討し、プラスミンが線溶系で働く場合に必要のプロテアーゼ活性やリジン結合活性が血小板を活性化する際にも必要であることを明らかにした。プラスミンによる血小板凝集においては、細胞内からのシグナルによって活性化される血小板膜糖蛋白質 GPIIb/IIIa が関与していること、また、血小板にプラスミン結合部位が存在することから、血小板にはプラスミン受容体が存在し、プロテアーゼ活性に起因するシグナルを介して血小板が活性化されていると考えられた。

次に、血小板活性化の最初の段階である形態変化の機構について解析し、血小板をプラスミンで刺激後、細胞外からの Ca^{2+} 流入および細胞内からの Ca^{2+} 動員により細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起り、その濃度変化の時間的推移が形態変化の進展とよく一致することを見出した。しかし、5,5'-dimethyl-BAPTA で細胞内 Ca^{2+} をキレートした場合、細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇は完全に抑制されたが、形態変化は部分的に抑制されるに止まり、形態変化には Ca^{2+} 依存的な経路の他に、 Ca^{2+} 非依存的な経路が存在することが明らかとなった。Rho-kinase の特異的な阻害剤である Y-27632 を用いてプラスミンによる血小板形態変化への Rho-kinase の関与を検討したところ、プラスミンによる血小板形態変化は Y-27632 により阻害された。しかし、その阻害が完全なものではなかったため、5,5'-dimethyl-BAPTA で細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を抑制した状態で Y-27632 の効果を調べたところ、形態変化が完全に阻害された。血小板形態変化において重要であるとされている myosin light chain のリン酸化についても、5,5'-dimethyl-BAPTA 存在下で Y-27632 により完全に阻害され、形態変化と同様の薬剤感受性が見られた。従って、プラスミンによる血小板形態変化には、 Ca^{2+} 依存性の経路と Ca^{2+} 非依存性の経路があり、後者には Rho-kinase が関与していると考えられた。

さらに、血栓形成に最も重要な血小板凝集について検討し、プラスミンによる血小板凝集が ADP 分解酵素 apyrase により阻害されることを見出した。止血系因子であるコラーゲン、トロンビンによる血小板凝集は、プラスミンによる血小板凝集を十分抑制できる濃度の10倍濃度の apyrase においても抑制されず、プラスミンによる血小板凝集が apyrase に対して高感受性であることが明らかとなった。また、血小板をプラスミンで刺激すると血小板内部からの顆粒放出が検出されること、プラスミンによる血小板凝集が ADP アンタゴニストにより阻害されることが明らかとなり、プラスミンによる血小板凝集においては血小板内から顆粒分泌が起り、顆粒由来の ADP が必須の働きをすることと考えられた。一方、血小板を ADP で前処理することにより、単独では凝集を起こさない濃度のプラスミンで凝集が起こることが明らかとなり、ADP にはプラスミンによる血小板凝集を potentiation (増強) する作用があることが示された。ADP 存在下で惹起されるプラスミンに

よる血小板凝集が P2TAC (P2Y₁₂) 受容体の選択的アンタゴニストである AR-C69931 によって特異的に阻害されたことから、プラスミンによる血小板凝集の増強に関与する ADP 受容体サブタイプは P2TAC であることが明らかとなった。P2TAC 受容体が Gi に共役していること、Gi 共役型受容体を活性化するエピネフリンによってもプラスミンによる血小板凝集が増強されたこと、また、プラスミンが Gi 活性化作用を示さなかったことから、プラスミンによる血小板凝集においては、Gi を介したシグナルがプラスミンと協調的に働くことが重要であり、顆粒由来の ADP が P2TAC 受容体を介してこの役割を担っていると考えられた。

以上の基礎的知見に基づき、血栓溶解剤投与後の再閉塞防止のためにプラスミンによる血小板活性化を抑制する方策として、ADP 分解酵素、ADP 受容体 P2TAC サブタイプの拮抗薬が有効である可能性が示された。特に、ADP 分解酵素は、止血系因子であるトロンビンやコラーゲンによる血小板凝集を阻害せず、出血傾向を起こすことなく再閉塞を防止することができる可能性があり、血栓溶解剤の有用性確保に有効であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

血栓溶解剤は急性期の抗血栓療法において理想的な薬剤であるが、副作用としての再閉塞が問題となっている。再閉塞の発症は、薬剤によるプラスミノゲン活性化に際して生成されるプラスミンが血小板を活性化することにより起こるとされているが、そのメカニズムはこれまで不明であった。本論文は、プラスミンの血小板活性化機構について解析したものである。

著者は、まずプラスミンの血小板活性化の基本的性質について検討し、プラスミンは血小板にあるその受容体と結合して、プロテアーゼ活性化に起因する細胞内シグナルにより活性化される細胞膜蛋白質 GPIIb/IIIa を介して血小板を活性化することを明らかにした。次いで、血小板の活性化反応である血小板形態変化について解析し、プラスミンによる形態変化は細胞内 Ca²⁺ 濃度の増大とよく対応しているが、Ca²⁺ キレート剤を用いた実験から、形態変化は Ca²⁺ 依存的な経路だけでなく Ca²⁺ 非依存的な経路によっても惹起されていることを見出した。さらに、この Ca²⁺ 非依存的な経路は Rho-kinase の特異的な阻害剤である Y-27632 により阻害されたことから、血小板形態変化には Rho-kinase が密接に関わっていることを示唆した。

著者は、次いで、プラスミンによる血小板凝集が ADP 分解酵素の apyrase により阻害されること、また、プラスミンが血小板顆粒の放出を促進し、プラスミンによる血小板凝集が ADP アンタゴニストにより阻害されることなどを見出したことから、血小板顆粒由来の ADP が凝集に必須であることを示唆した。さらに、単独では凝集を起こさない濃度のプラスミンが ADP の存在下で強い凝集を起こすことを見出し、この ADP は P2TAC 受容体を介して作用していることを明らかにした。また、P2TAC 受容体が Gi と共役するという事実に基づき、Gi 共役型のエピネフリンによっても血小板凝集の起こる可能性を仮説しそれを確認できたことから、凝集のメカニズムには、プラスミンによって放出される顆粒由来の ADP が P2TAC 受容体と結合し、Gi 共役型のシグナルを増強する経路のあることを初めて見出すことに成功した。

これらの研究成果は、血栓溶解剤投与後の再閉塞防止の方策として ADP 分解酵素および ADP 受容体 P2TAC 阻害剤の有効性を示唆したものであり、血栓溶解剤の有用性確保にとって非常に有益な基礎的知見となるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成13年8月31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。