

博士(医学)      Brzoska Tomasz

## 論文題目

Binding of thrombin-activated platelets to a fibrin scaffold through  $\alpha_{IIb}\beta_3$  evokes phosphatidylserine exposure on their cell surface

(トロンビンにより活性化された血小板の  $\alpha_{IIb}\beta_3$  を介したフィブリン骨格への結合は細胞表面へのフォスファチジルセリンの露出を引き起こす)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

血小板は活性化に伴い膜表面に phosphatidylserine (PS) を露出し、ビタミン K 依存性凝固因子に活性化の場を提供して血栓形成を促進する。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の持続上昇により PS は露出するが、既知の生理的刺激では部分的な露出しか得られず、その機構の詳細は明らかではない。本学医生理学講座では、生体内顕微鏡を用いた血栓形成過程の詳細な解析において、血栓中の中央部に位置する血小板のみ PS を表面に露出し、血栓周辺部の血小板は露出しない事実を明らかにした。また同部位にはフィブリン生成が確認された。これより血小板膜表面への PS 露出は必ず応力等の機械的刺激を含めた周囲の環境により影響されると考えられた。本研究では血小板膜表面への PS 露出に及ぼす血小板周囲のフィブリン骨格の影響を解析した。

[材料ならびに方法]

### (1) 標識血小板の調整

正常ボランティアより得たクエン酸化血液を rhodamine-6G (R-6G) 処理(15 分間、室温暗室)した後、遠心(250g、10 分、22 度)により多血小板血漿 (PRP) を得た。洗浄血小板は PRP を遠心(1,100g、15 分、22 度)後、沈殿血小板を Tyrode's albumin 緩衝液中に浮遊させることで得た。血小板数は血球カウンターで計測した。

### (2) 血小板凝集及びクロット退縮能測定

血小板凝集に対する種々薬剤の影響は Chronolog 社製 Lumi-Aggregometer を用いて評価した。血小板存在下のクロット退縮能に対する種々薬剤の影響は、PRP をトロンビン処理して作成した血漿クロット表面積の経時的縮小度により評価した。

### (3) 共焦点顕微鏡による PS 発現の解析

100 倍油浸対物レンズを装着したオリンパス FV1000 を使用した。R-6G 標識血小板数を  $1.0 \times 10^4/\mu\text{l}$  に調整した PRP をガラス皿上に静置し(37 度)、Tissue Factor あるいはトロンビン処理した後、フィブリン形成と PS 露出をそれぞれ、蛍光標識 fibrinogen 及び蛍光標識 annexin V (ANX) を用いて解析した。

### (4) PS 露出と細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の同時測定

$Ca^{2+}$  指示薬である fluo-4 AM (1  $\mu\text{M}$ )と Fura Red AM(10  $\mu\text{M}$ )を負荷した血小板を含む PRP を用い、(3)と同様に PS 露出を解析すると共に  $[Ca^{2+}]_i$  を同時計測した。4.4 秒毎に撮像し、

FV10-ASW (Olympus) 及び AquaCosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics) を用い解析した。

[結果]

(1) 血小板膜表面への PS 露出に対するフィブリン骨格の影響

R-6G 標識血小板が非標識血小板と同様の凝集能を有することを確認し実験に供した。Tissue Factor あるいはトロンビン処理により、フィブリン網の形成とフィブリンへの血小板の結合、これに続く、ほぼすべての血小板膜表面への ANX 結合が認められた。いずれもトロンビン阻害薬であるアルガトロバン処理で消失した。これより生理的な凝固反応を想定して使用した Tissue Factor による効果も、主にはトロンビン活性によると考え、以後の実験にはトロンビンを用いた。1U/ml のトロンビン処理により、 $3.8 \pm 2.4$  分でフィブリン網の形成とフィブリン網への血小板の結合が認められ、60 分後には  $96.8 \pm 3.6\%$  の血小板に ANX が結合した ( $n=5$ )。アルガトロバン処理 ( $100 \mu\text{M}$ ) によりフィブリン形成が抑制されると共に、60 分後の PS 露出も  $4.4 \pm 3.1\%$  と抑制された ( $n=7$ )。

(2) PS 露出時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定

計測中に動く血小板の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定は困難であったが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化に応じて蛍光強度が逆に変動する2種類の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度指示薬を用いることにより測定が可能となった。ANX 結合に先んじて常に fluo-4/Fura Red 比の継続的な上昇を認め、フィブリン網結合血小板の PS 露出には  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の持続上昇が必要であることが確認された。これは洗浄血小板の ionomycin 処理により得られた結果と一致した。

(3) フィブリン骨格形成並びに血小板との結合を修飾する種々薬剤の影響の解析

血小板のフィブリンあるいはフィブリノーゲンへの結合に関わるインテグリンの  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  拮抗薬である FK633 の影響を解析した。血小板の ADP 及びコラーゲン凝集を阻害する濃度 ( $30 \mu\text{M}$ ) の FK633 は、フィブリン網の形成は抑制しなかった ( $3.8 \pm 2.0$  分)が、PS 露出を特に早期に強く抑制し、60 分後にも有意な抑制を示した ( $75.8 \pm 9.9$ ,  $n=7$ ,  $p < 0.05$ )。別の拮抗薬である RGDS ペプチドも PS 露出を抑制した。フィブリン重合を阻害する GPRP ペプチド ( $3 \text{ mM}$ ) は、血小板のフィブリンあるいはフィブリノーゲンへの結合は抑制しなかったが、フィブリン網の形成と PS 露出を抑制した(60 分後、 $30.7 \pm 4.0\%$ ,  $n=7$ )。血小板のアクチン重合及び骨格変化を抑制するサイトカラシン B ( $100 \mu\text{g/ml}$ )は、フィブリン網の形成は抑制せず、血小板の形態変化と共に PS 露出を抑制した(60 分後、 $35.1 \pm 11.8\%$ ,  $n=7$ )。いずれの薬剤も ionomycin による PS 露出は抑制しなかった。

[考察]

トロンビン刺激後の血小板膜表面への PS 露出には、固定されたフィブリン骨格に  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  を介して結合すること、血小板の形態変化、おそらくこれらにより生じる張力により機械的刺激が関わりと考えられた。これらによる inside-out 並びに outside-in シグナルの連鎖により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の持続上昇が得られると考えられた。フィブリン骨格内の血小板による凝固系活性化増幅機構と考えられた。

[結論]

血小板膜上の PS 露出には、トロンビン刺激だけでは不十分で、フィブリン骨格への結合及び血小板形態変化に伴う機械的刺激が必要であることが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

血小板は活性化に伴い膜表面に phosphatidylserine (PS) を露出し、ビタミン K 依存性凝固因子の活性化の場を提供して血栓形成を促進する。しかし既知の生理的刺激では部分的な露出しか得られず、詳細な機構は明らかでない。医生理学講座では、生体内血栓形成過程の解析により、PS を露出する血小板はフィブリン生成が確認された血栓の中央部にのみ局在する事実を報告した。本研究では血小板膜表面への PS 露出に及ぼす血小板周囲のフィブリン骨格の影響を解析した。

正常ボランティアより得たクエン酸化血液を rhodamine-6G 処理後、多血小板血漿を調整した。組織因子あるいはトロンビン刺激によるフィブリン形成と PS 露出を、蛍光標識 fibrinogen と蛍光標識 annexin V (ANX) を用い共焦点顕微鏡(オリンパス FV1000)にて解析した。いずれの刺激でもフィブリン網の形成と血小板の結合、これに続く血小板膜表面への ANX 結合を認めた。これらはトロンビン阻害薬であるアルガトロバンで阻害された。ANX 結合に先立ち fluo-4/ Fura Red 比の継続的な上昇が確認された。血小板のフィブリンへの結合に関わるインテグリンの  $\alpha_{IIb}\beta_3$  拮抗薬である FK633 は、フィブリン網の形成を抑制せず、PS 露出を抑制した。フィブリン重合を阻害する GPRP ペプチドはフィブリン網の形成と PS 露出を抑制した。血小板のアクチン重合及び骨格変化を抑制するサイトカラシン B は、血小板の形態変化と PS 露出を抑制した。これらの結果よりトロンビン刺激後の血小板膜上への PS 露出には、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  を介したフィブリン骨格への結合と、血小板の形態変化に伴い生じる張力による機械的刺激が必須と結論付けた。これをフィブリン内の血小板による血栓形成増幅機構と位置づけた。

審査委員会では、フィブリン骨格への結合により生じる機械的刺激が血小板膜表面への PS 露出に必須であることを初めて明らかにした点を高く評価した。

論文審査担当者 主査 金山 尚裕  
副査 山本 清二 副査 岩城 孝行