

学位論文要約

Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

甲第 936 号

氏 名: 陰 山 泰 成  
Full Name Yasunari Kageyama

学位論文題目: Rac はヒト血小板中でコラーゲンが誘導した p44/p42 MAP キナーゼを介して HSP27 のリン酸化を規定している

Thesis Title Rac regulates collagen-induced HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase in human platelets

学位論文要約:

Summary of Thesis

血小板機能の異常な亢進は、救急医学領域の重症患者において頻繁に認められる病態であり、多臓器不全や急性炎症等の重篤な二次的疾患を引き起こす原因となる重要な予後不良因子である。このような重症患者に対しては、抗血小板剤を投与することによって血小板機能の抑制を図ることが二次的疾患を予防するために中心的役割を担っている。しかし、既存の抗血小板剤の効果は限定的であることから、血小板の活性化機構を特異的に阻害することができる効果的な新規抗血小板剤が、臨床の場において強く望まれている。そのためには、血小板活性化の分子機構を解明し、有効な創薬標的分子を同定することが必要となる。

血小板の活性化は、血管内皮細胞の障害によって基底膜上に露出したコラーゲンと血小板上に存在するコラーゲンレセプター(GPVIおよびインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ )が結合することによって引き起こされる。これまでの研究では、血小板をコラーゲンで刺激すると、p44/p42 Mitogen-Activated Protein Kinase (以下、MAPK)の活性化を経てHeat Shock Protein 27 (以下、HSP27)のリン酸化が誘導されることが示されている。また、特異的な阻害薬を用いてp44/p42 MAPKの活性化を抑制すると血小板からのPlatelet-Derived Growth Factor-AB (以下、PDGF-AB)や可溶性CD40L (以下、sCD40L)の放出が起こらなくなることから、本シグナル伝達経路の活性化がこれら急性炎症誘導物質の血小板からの分泌に必須な役割を果たしていることが明らかにされている。これらの結果から、本シグナル伝達経路を標的とした創薬は、新規抗血小板剤を開発のための有効なアプローチ法であると考えられている。しかし、コラーゲン刺激がどのようにしてp44/p42 MAPKシグナル伝達経路の活性化に至るのか、その分子的制御機構については十分に理解されておらず、その詳細を解明することが今後の課題である。そこで、本研究においては、コラーゲンレセプターの一部であるインテグリン $\beta 1$ の下流においてシグナルを伝達する役割を果たしているRac1に注目し、血小板の活性化に対するRac1の分子的機能について解析を行った。

【対象と方法】

- 1) 健常者から早朝空腹時に安静下に静脈血を採取し、室温において155 gで12分間の遠心分離を行うことによって多血小板血漿(PRP)を調整した。
- 2) PRPにコラーゲンを添加し血小板凝集反応を誘導した後、継時的に血小板タンパク質抽出液を調整し、免疫沈降法およびウエスタンブロット法によって活性型Rac1の継時的変化を解析した。
- 3) PRPにさまざまな濃度(0~70 $\mu$ M)のRac1の特異的阻害薬(NSC23766)を添加し前処理を行った後、PRPにコラーゲンを添加し血小板の活性化を誘導した。NSC23766による前処理が血小板の活性化に及ぼす影響を調べるために、それぞれのサンプルについてレーザー光散乱システムを用いて血小板凝集度を測定した。また、同様な処理を行ったサンプルから遠心分離法により上澄液を分離した後、ELISA法によってPDGF-ABおよびsCD40Lの濃度を定量した。さらに残ったタンパク質を可溶化し、ウエスタンブロット法によってp44/p42 MAPKおよびHSP27のリン酸化のレベルを解析した。

【結果】

- 1) ヒト血小板において、コラーゲン刺激後、時間依存的にRac1が活性化されることを認めた。
- 2) コラーゲン刺激によって誘導される血小板の凝集はNSC23766の濃度依存性に抑制された。
- 3) 血小板の活性化を伝達するシグナル分子であるp44/p42 MAPKの活性化およびHSP27のリン酸化は、それぞれがNSC23766の濃度依存性に抑制された。
- 4) 血小板からのPDGF-ABの分泌およびsCD40Lの遊離は、血小板に添加したNSC23766の濃度依存性

に低下した。

#### 【考察】

本研究の結果から、コラーゲン刺激によって誘発される血小板活性化シグナル伝達系において、Rac1はコラーゲンレセプターとp44/p42 MAPKの間で機能することにより下流のシグナル伝達経路を制御していることがわかった。また血小板の活性化にともなって起こるPDGF-ABやsCD40Lなどの急性炎症誘導物質放出も、Rac1阻害剤によって有意に低下することが明らかになった。以上の結果より、Rac1は血小板活性化を伝達する分子として必要な役割を果たしていることが示され、重症救急患者において認められる凝固機能の亢進や急性炎症を予防する手段としてRac1阻害剤の有効性が示唆された。

#### 【結論】

ヒト血小板において、Rac1は、コラーゲン刺激によるp44/p42 MAPKを介したHSP27のリン酸化を誘導するとともに、血小板からのPDGF-AB分泌及びsCD40L遊離を制御する役割を果たしていることが示された。

International Journal of Molecular Medicine 32, 813–818 (2013).