

氏名 (本籍)	陰 山 泰 成 (岐阜県)		
学位の種類	博 士 (医学)		
学位授与番号	甲第 936 号		
学位授与日付	平成 26 年 1 月 15 日		
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Rac regulates collagen-induced HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase in human platelets		
審査委員	(主査) 教授 大 沢 匡 毅		
	(副査) 教授 武 内 康 雄	教授 星 博 昭	

### 論文内容の要旨

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 2 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 2 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(GPV1 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。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 陰山 泰成は、コラーゲン刺激によるヒト血小板活性化の分子機序を解明するために、インテグリンシグナルの下流分子である Rac1 に注目し、生化学的手法によってその分子機能を解析した。その結果、コラーゲン刺激によってヒト血小板中の Rac1 が速やかに活性化されることを認めるとともに、ヒト血小板を Rac1 阻害剤で処理することによりコラーゲン刺激による血小板凝集や血小板からの炎症誘導物質の放出が有意に抑制されることを見いだした。本研究は血小板活性化に対し Rac1 が中心的な役割を果たしていることを示しており、新規抗血小板剤開発のための創薬標的分子としての Rac1 シグナル系の有効性を示唆している。以上のように、本研究成果は、外傷時の血小板活性化の機序の理解や、救急医学領域における重症患者に対する新たな治療法の開発に貢献するものであり、今後の救急医学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

Yasunari Kageyama, Tomoaki Doi, Shigeru Akamatsu, Gen Kuroyanagi, Akira Kondo, Jun Mizutani, Takanobu Otsuka, Haruhiko Tokuda, Osamu Kozawa, Shinji Ogura : Rac regulates collagen-induced HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase in human platelets  
International Journal of Molecular Medicine 32, 813-818 (2013)