

学位論文題名

The studies on the mechanism
of platelet activation induced
by exogenous arachidonic acid with special reference
to intraplatelet Ca^{2+} mobilization

(血小板内 Ca^{2+} 動態からみた外因性アラキドン酸による
血小板活性化機序の研究)

学位論文内容の要旨

I. 緒言

アラキドン酸は(AA), 生理的アゴニストによる刺激後, 細胞膜リン脂質から遊離し, prostaglandine endoperoxidesやthromboxane A_2 (TXA_2)に変換され, 血小板活性化を引き起こす物質である. 外因性に投与されたAAは急速に血小板内に取り込まれ, 内因性AAと同様な血小板活性化を引き起こすと推定されており, AAの活性化機序の研究に有用である. 一方, 外因性AAによる凝集・放出からみた血小板活性化は, 低濃度と高濃度で二相性のパターンをとることが知られており, その機序についてはAA刺激後cyclic AMPの上昇に伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$)上昇が阻害され, 活性化反応が抑制されるという説が有力であるが, 抑制される Ca^{2+} 動員の由来に関しその詳細は明らかではない. また, 高濃度AAによる血小板活性化の際に動員される $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の源についても, 詳細は明かではない. この二点についてfura-2, aequorin, chlortetracycline (CTC), $^{45}\text{Ca}^{2+}$ という四種の Ca^{2+} プローベを用い, アラキドン酸による血小板活性化の際の Ca^{2+} 動態を検討した.

II. 方法

15% acid-citrate-dextrose液加に採取した健康人静脈血から得た多血小板血漿(PRP)に目的とする $20\mu\text{M}$ quin 2/AM, $4\mu\text{M}$ fura-2/AM, $50\mu\text{M}$ CTCを加え, 37°C , 30分間孵置した. PRPを遠心し血小板ペレットを回収後, Ca^{2+} 無添加Hepes Tyrode液(145mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO_4 , 10mM Hepes/Na, 0.5mM NaH_2PO_4 - NaHPO_4 , 5mM glucose, pH 7.4)中に懸濁し, 血小板浮遊液とした. 血小板浮遊液の血小板数と外液 Ca^{2+} 濃度を調整後, assayに供した. quin 2は励起波長330nm, 検出波長490nmの一波長励起による蛍光測定を, fura-2は二波長励起(励起波長340nmと380nm, 検出波長500nm)による蛍光測定を行い, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を測定した. 細胞外 Ca^{2+} 動員を除外するため, 刺激前30秒に1mM EGTAを加え外液 Ca^{2+} 濃度を $1\mu\text{M}$ 以下とした上での計測も行った. aequorin発光蛋白による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の測定は, 2mM EGTAと6% dimethyl sulfoxideを用いてaequorinを血小板内に導入する方法により計測した. CTC蛍光は, 分光蛍光光度計を用い, 励起波長400nm, 検出波長530nmで行った. 未処置の Ca^{2+} 無添加血小板浮遊液に $^{45}\text{CaCl}_2$ を加え, 室温で30分間静置後血小板内放射活性量測定に供した. 血小板内外の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ に由来する放射活性値は, silicone oil遠心法で行った. 凝集は, 透光度法で測定し, cyclic AMPはradioimmunoassay法にて測定した.

III. 結果

1. fura-2蛍光による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ と凝集は, $20\mu\text{M}$ アラキドン酸刺激を境に二相性の変化を

示した。

2. aequorin発光による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ はアラキドン酸の濃度依存性に増加を示し、特に $20\mu M$ 以上では強い増加がみられた。凝集はfura-2導入血小板の凝集と同様に $20\mu M$ で一旦下降する二相性変化を示した。
3. CTC蛍光測定による膜結合性 Ca^{2+} 放出の変化は外液 Ca^{2+} 非存在下に、細胞膜内側結合 Ca^{2+} 放出のみを測定した。 $10\mu M$ までのアラキドン酸刺激ではCTC蛍光の減衰は殆どみられなかったが、 $20\mu M$ 以上では刺激直後、著しいCTC蛍光の減衰がみられ、 $40\mu M$ でほぼプラトーに達した。
4. ^{45}Ca による Ca^{2+} fluxの検討では、アラキドン酸濃度に従って ^{45}Ca uptakeは増加を示し、特に $20\mu M$ 以上ではuptakeの著しい増加がみられた。
5. 血小板内cyclic AMP濃度は、 $0.5\mu M$ アラキドン酸より増加を示し、 $30\mu M$ をピークとして濃度依存性に増加した。
6. 低濃度アラキドン酸と高濃度アラキドン酸刺激による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ とCTC蛍光減衰および $^{45}Ca^{2+}$ uptakeの三者について比較検討した。 $2\mu M$ 低濃度アラキドン酸刺激後のfura-2蛍光は外液の Ca^{2+} の有無に拘らず単峰性蛍光上昇を示し、CTC蛍光減衰は殆どみられなかった。 $^{45}Ca^{2+}$ による血小板内 Ca^{2+} 量の変化は、初期小ピークの後、急速に減少し再び上昇する変化を示した。 $40\mu M$ 高濃度アラキドン酸刺激後のfura-2蛍光では、急速な増加がみられ、外液 Ca^{2+} 非存在下では刺激直後の蛍光増加を保ったままとなり、外液 Ca^{2+} 存在下では、著しい蛍光増加を示した。CTC蛍光減衰は刺激直後より急激にみられた。 ^{45}Ca による血小板内 Ca^{2+} 量の変化は、大量の Ca^{2+} influxの生じない刺激20秒以内では減少がみられた。
7. cyclooxygenase inhibitorであるアスピリンの影響をquin 2を蛍光色素として用いた $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化で観察した。低濃度アラキドン酸刺激後の蛍光増加はアスピリン添加により完全に抑制された。高濃度アラキドン酸刺激後の蛍光増加は殆ど抑制はみられなかった。一方、stable TXA_2 である STA_2 の低濃度刺激では、fura-2蛍光は $2\mu M$ アラキドン酸刺激後の蛍光変化をより鋭くした単峰性の変化であり、 ^{45}Ca による血小板内 Ca^{2+} 量の変化も類似していた。

IV. 考察

低濃度アラキドン酸刺激では、cyclooxygenaseを介して TXA_2 に変換後、細胞膜 TXA_2 receptorを介してphospholipase C(PLC)活性化を促し、inositol 1,4,5-triphosphate(IP_3)を生成し、dense tubular system(DTS)等のオルガネラからの Ca^{2+} 動員を惹起したものと考えられた。さらに、CTC蛍光減衰がみられなかったことから、CTC分子はオルガネラ膜に分布していないことも示唆された。一方、高濃度アラキドン酸では、アラキドン酸が細胞膜に直接作用して、細胞膜結合性 Ca^{2+} poolからの Ca^{2+} 放出を引き起こし、且つ Ca^{2+} channelを介した Ca^{2+} 流入の促進と推測された。さらに、両濃度刺激でも血小板内 $^{45}Ca^{2+}$ 量は、刺激直後に減少しており、 Ca^{2+} pumpの存在を示唆した。aequorinは細胞膜直下の高濃度 Ca^{2+} 域の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ を反映しており、細胞膜結合性 Ca^{2+} poolからの Ca^{2+} 遊離と Ca^{2+} channelを介した Ca^{2+} 流入とを主に計測しているものと考えられているが、 $20\mu M$ アラキドン酸刺激ではその動員量の少ないことから Ca^{2+} pumpで排除され、fura-2で計測し得る細胞内全体の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇とならなかった可能性も示唆された。一方、同濃度のアラキドン酸刺激のfura-2で計測される $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇が抑制されたことから、 TXA_2 を介した IP_3 によるオルガネラからの細胞内 Ca^{2+} 動員の抑制が起きたと考えられた。cyclic AMPが IP_3 生成を抑制した成績から、cyclic AMPがPLC活性化を阻害したものと考えられ、同様の機序の関与が推察された。

V. 結語

1. 低濃度アラキドン酸刺激による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 増加は、 TXA_2 とPLCを介したDTS等のオルガネラからの Ca^{2+} 動員がその主体であり、高濃度アラキドン酸刺激による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 増加は、膜結合 Ca^{2+} からの放出と外液からの流入がその主体であった。
2. CTC分子はオルガネラ膜に分布せず、細胞膜のみに分布し、アラキドン酸の直接的な膜に対する作用で濃度依存性に Ca^{2+} を放出することが示唆された。
3. aequorin法で計測される $[Ca^{2+}]_{cyt}$ は細胞膜直下の高濃度 Ca^{2+} 域の変化のみを計測し

ていると推測された。

4. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ flux測定で得られた早期の血小板内 Ca^{2+} 量の経時的変化から Ca^{2+} pumpの存在が示唆された。
5. $10\sim 20\ \mu\text{M}$ アラキドン酸刺激での $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 増加の抑制と血小板凝集の低下には, cyclic AMP濃度の増加によるPLC活性化阻害が関与し, cyclic AMP濃度増加を促進する薬剤の臨床的有用性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 小 山 富 康
副 査 教 授 石 橋 輝 男

学 位 論 文 題 名

The studies on the mechanism
of platelet activation induced
by exogenous arachidonic acid with special reference
to intraplatelet Ca^{2+} mobilization

(血小板内 Ca^{2+} 動態からみた外因性アラキドン酸による
血小板活性化機序の研究)

I. 研究目的

外因性アラキドン酸による凝集・放出からみた血小板活性化は、低濃度と高濃度とで二相性のパターンをとることが知られているが、その詳細な機序については明らかではない。さらに、アラキドン酸による血小板活性化の際に動員される細胞質内カルシウムの源についても明かではない。この二点についてfura-2, aequorin, chlortetracycline(CTC), $^{45}\text{Ca}^{2+}$ という四種のCaイオン測定プローブを用いて、アラキドン酸による血小板活性化の際の Ca^{2+} 動態を検討した。

II. 材料及び方法

- 1) 細胞質内 Ca^{2+} 濃度測定: 多血小板血漿(PRP)に蛍光色素 $4\mu\text{M}$ fura-2/AMを導入し、二波長励起による蛍光測定を行った。発光蛋白aequorinは、 2mM EGTAと 6% dimethyl sulfoxideを用いてaequorinを血小板内に導入し、aequorin測定用光電計を用いて測定を行った。
- 2) CTC蛍光の測定: PRPに $50\mu\text{M}$ CTCを導入し、外液 Ca^{2+} 濃度をゼロとした上での計測のみを蛍光光度計にて行った。
- 3) ^{45}Ca による血小板内放射活性量の測定: ^{45}Ca でラベルした血小板内の放射活性量は、silicone oil遠心法で計測した。
- 4) 凝集は透光度法で測定し、cyclic AMPの測定はradioimmunoassay法にて測定した。

Ⅲ. 結果及び考察

- 1) fura-2蛍光による細胞質内 Ca^{2+} 濃度と血小板凝集は、 $10\mu\text{M}$ アラキドン酸刺激まで濃度依存性に増加したが、 $20\mu\text{M}$ アラキドン酸刺激で最も減少を示した後、再び濃度依存性に増加を示す二相性の変化が認められた。
- 2) aequorin発光により測定される細胞内 Ca^{2+} 濃度は二相性変化はみられず、アラキドン酸濃度依存性に増加を示し、特に $20\mu\text{M}$ を越える濃度では強い増加が認められた。aequorinはその分子量の大きさから細胞膜直下の高濃度 Ca^{2+} 域の Ca^{2+} 濃度を計測していると考えられ、細胞質内のび慢性 Ca^{2+} 濃度を計測しているfura-2と異なる結果となったと推定された。
- 3) $10\mu\text{M}$ までの低濃度アラキドン酸刺激ではCTC蛍光の減衰は殆どみられなかったが、 $20\mu\text{M}$ を越える濃度では著しいCTC蛍光の減衰がみられ、 $40\mu\text{M}$ ではほぼプラトーに達した。
- 4) ^{45}Ca による Ca^{2+} fluxの検討では、アラキドン酸濃度に従って ^{45}Ca uptakeは増加を示し、特に $20\mu\text{M}$ を越える濃度ではuptakeの著しい増加がみられた。
- 5) 低濃度アラキドン酸刺激後のfura-2蛍光は外液の Ca イオンの有無に拘らず単峰性の蛍光上昇を示し、CTC蛍光減衰は殆どみられなかった。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ による血小板内 Ca^{2+} 量の変化は初期小ピークの後、急速に減少し再び軽度上昇する変化を示した。これらの結果から、低濃度アラキドン酸刺激による細胞質内カルシウム濃度増加は、内因性 Ca^{2+} 動員がその主体であると考えられた。
- 6) 高濃度アラキドン酸刺激後のfura-2蛍光は、外液 Ca^{2+} 非存在下で刺激直後の蛍光増加を保ったままとなり、外液 Ca^{2+} 存在下では、著しい蛍光増加を示した。CTC蛍光減衰は刺激直後より急激にみられ、 ^{45}Ca による血小板内 Ca^{2+} 量の変化でも、大量の Ca^{2+} influxがみられた。これらの結果から、高濃度アラキドン酸での Ca 動員は、細胞膜に結合した Ca^{2+} の遊離と外液 Ca^{2+} 流入がその主体と考えられた。
- 7) 低濃度アラキドン酸刺激後の細胞質内カルシウム濃度増加は低濃度アスピリン添加により完全に抑制されたが、高濃度アラキドン酸刺激後では抑制はみられなかった。
- 8) stable TXA_2 である STA_2 の低濃度刺激での、fura-2蛍光と ^{45}Ca による血小板内 Ca^{2+} 量の変化は低濃度アラキドン酸刺激後の変化と類似していたことから、低濃度アラキドン酸刺激での細胞内カルシウム動員は、 TXA_2 を介したものと推定された。
- 9) 血小板内cyclic AMP濃度は、 $0.5\mu\text{M}$ アラキドン酸から濃度依存性に増加した。cyclic AMPはイノシトール1,4,5三リン酸(IP_3)およびDiacyl glyceride生成を抑制することが知られており、 $20\mu\text{M}$ 前後のアラキドン酸刺激でのfura-2で計測される細胞質内カルシウム濃度増加が少なかったのは、cyclic AMPが TXA_2 を介するPhospholipase C(PLC)活性化を阻害し、オルガネラからの Ca^{2+} 動員を抑制したものと推定された。

Ⅳ. 結語

- 1) 低濃度アラキドン酸刺激による細胞内カルシウム濃度増加は、 TXA_2 とPLCを介したDTS等のオルガネラからの Ca^{2+} 動員がその主体であり、高濃度アラキドン酸刺激による細胞内カルシウム濃度増加は、膜結合 Ca^{2+} からの放出と外液からの流入がその主体であった。
- 2) aequorin法で計測される細胞内カルシウム濃度は細胞膜直下の高濃度 Ca^{2+} 域の変化のみ

を計測していると推測された。

3) 20 μ M前後のアラキドン酸刺激での細胞内カルシウム濃度増加の抑制と血小板凝集の低下には、cyclic AMP濃度の増加によるPLC活性化阻害が関与し、cyclic AMP濃度増加を促進する薬剤の臨床的有用性が示唆された。