

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 高野 勝弘

本研究は、重要な血小板活性化マーカーのひとつとして近年注目を集めるようになってきた血小板マイクロパーティクル (Platelet microparticle, 以下 PMP) の産生機構解明を目的に、*in vivo* に近づけた条件での実験系における各種生理的血小板活性化物質による PMP 産生や抑制剤の影響をフローサイトメトリーを用いて検討し、下記の結果を得た。

(1) 全血で生理的濃度の細胞外カルシウムが存在する条件での PMP 測定系は *in vivo* での PMP 産生をより正確に反映していると考えられるが、この条件下では collagen により顕著な PMP 産生が見られた。一方、強力な血小板活性化物質である SFLL では、強い血小板凝集がおこるにも関わらず、PMP 産生は低いレベルにとどまった。以上より、PMP 産生は、collagen 受容体への刺激ではおこり、主要な thrombin 受容体 PAR1 への刺激ではおこらないこと、PMP 産生と血小板凝集の強さは必ずしも相関しないことが示された。

(2) PMP 産生と2つの主要な collagen 受容体 GP Ia/IIa と GP VI の関連を調べるため、それぞれの受容体の刺激剤である rhodocytin 及び convulxin を用いて検討したところ、convulxin のみで著明な PMP 産生がみられ、GP VI が PMP 産生に大きく関与していることが示された。また、血小板活性化反応の初期に働くと考えられる GP Ib, GP IIb/IIIa と PMP 産生の関係を検討するためこの両者それぞれの抑制剤を用いたところ、これら抑制剤はそれぞれ PMP 産生を著明に抑制し、GP Ib, GP IIb/IIIa はともに PMP 産生に大きく関与していることが示された。

(3) Collagen 刺激による PMP 産生は、全血では顕著にみられたが PRP では低いレベルにとどまり、PRP に赤血球を加えると PMP 産生増加がみられたことから、全血での collagen による顕著な PMP 産生には赤血球の存在が重要であると考えられた。全血に ADP スカベンジャーを加えると PMP 産生は抑制され、PRP を少量の ADP と collagen で刺激すると collagen 単独刺激にくらべ PMP 産生は著しく増加し、赤血球は ADP の供給源として作用し PMP 産生増加をおこしていることが示唆された。また、2つの ADP 受容体 P2Y₁ と P2Y₁₂ の関与につき、それぞれの特異的阻害剤を用いたところ、ともに collagen による PMP 産生を著明に抑制し、両方を用いると抑制効果はさらに強まったことから、collagen 作用の増強に関しては両受容体は相乗的に働いていることが示された。

(4) 血小板 procoagulant 活性を Annexin V の結合により測定したところ、PMP 産生と一致がみられ、また、PMP 自体もほとんどが procoagulant 活性を有しており、PMP と procoagulant 活性は強く相関していることが示唆された。また、calpain は PMP 産生の主要なメカニズムの一つとして報告されているが、collagen による PMP 産生においては、Western blotting による検出で calpain の活性化はみられず、calpeptin による抑制効果もみられず、従って calpain は collagen による PMP 産生には大きく関与していないことが示された。

以上、本論文は PMP 産生に関する collagen 受容体 GP VI や GP Ib, IIb/IIIa の役割をはじめとして上記のような種々の興味深いデータを提供するものであり、血栓性疾患の病態解明及び予防／治療、また血小板活性化機構の解明の分野においても重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。