

氏名・（本籍）	程 原 佳 子（滋賀県）
学 位 の 種 類	医学博士
学 位 記 番 号	論医博第66号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与年月日	平成2年6月28日
学位論文題目	細胞接着蛋白に対する amidinonaphthol 誘導体の抑制作用

審 査 委 員	主査 教授	野 崎 光 洋
	副査 教授	繁 田 幸 男
	副査 教授	細 田 四 郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

合成 serine protease 阻害剤、nafamostat mesilate（以下、nafamostat）をはじめとする amidinonaphthol 誘導体が、活性化血小板への fibronectin 結合を拮抗的に阻害して凝集を抑制することを見出だした。そこで、同じ接着蛋白である fibronectin（以下 Fn）の活性化血小板への結合と、Fn を介する細胞接着に対する amidinonaphthol 誘導体の影響を検討し、その作用機序を解明する。

### 〔方 法〕

ゲル濾過血小板を thrombin で刺激し、125 I でラベルした Fn を加えて 37℃ 30 分 incubate した。この血小板を分離し、結合した放射活性を測定した。阻害剤として amidinonaphthol 誘導体、nafamostat および FUT-5923 を thrombin と同時に添加した。阻害剤の thrombin に対する直接的な作用を除く目的で、thrombin 刺激した後に paraformaldehyde で固定した血小板を作製し、同様に Fn 結合を検討した。また、ADP 刺激固定血小板を作製し、fibrinogen に対する影響もあわせて検討した。細胞接着は、normal rat kidney cell (NRK 細胞) を用い、Fn を coat した polystyrene microtiter well に加えて incubate し、接着した細胞を剥離して、その細胞数を測定した。

### 〔結 果〕

Amidinonaphthol 誘導体は刺激血小板への Fn 結合を濃度依存性に抑制し、その IC<sub>50</sub> は naf-

amostat で  $10^{-5} \sim 10^{-6} \text{M}$  であった。また、この抑制作用は刺激固定血小板でも同様に認められた。しかし、固定前に阻害剤を添加した血小板では、この抑制は認められなかった。ADP 刺激固定血小板においても、非固定血小板と同様に fibrinogen 結合を抑制した。NRK 細胞の接着は amidinonaphthol 誘導体によって濃度依存性に抑制されたが、その  $\text{IC}_{50}$  は  $10^{-3} \sim 10^{-4} \text{M}$  と血小板に比してかなり高濃度を要した。

#### 〔考 察〕

従来、serine protease 阻害剤は血小板膜からのアラキドン酸遊離を阻害することで凝集を抑制するとされている。しかし、amidinonaphthol 誘導体は、アラキドン酸遊離阻害（参考論文 2）だけでなく、phospholipase の活性化を介さない TPA（12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate）による凝集を阻害する他（参考論文 4）、凝集した血小板を解離させる作用をも有する（参考論文 5）。その際、凝集に伴う TritonX 不溶性細胞骨格蛋白分画への fibrinogen の動員が選択的に抑制されており（参考論文 3）、 $^{125} \text{I}$ -fibrinogen を用いた検討でも、amidinonaphthol 誘導体は、刺激血小板への fibrinogen 結合を拮抗的に阻害した。（参考論文 5）

Fn や fibrinogen、von Willebrand 因子などの接着蛋白は、血小板の活性化に伴って血小板表面に形成される膜糖蛋白 IIb-IIIa 複合体に結合し、凝集や粘着に大きな役割を果たしている。近年、Fn の生理的活性ペプチド、Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) がこれら接着蛋白の血小板への結合を拮抗的に阻害することが知られるようになり、IIb-IIIa 複合体には RGDS を認識する、adhesion receptor family に共通した部位が存在するとされている。

Amidinonaphthol 誘導体は、活性化血小板への Fn および fibrinogen 結合を阻害したが、その作用は刺激後に固定した血小板においても認められることから、抗酵素作用に基づくものでなく、IIb-IIIa に対する直接的阻害であると考えられる。また、その作用が血小板だけでなく、NRK 細胞に対しても認められることから、amidinonaphthol 誘導体は、RGDS と同様、この糖蛋白 IIb-IIIa をはじめとした接着蛋白結合部位に直接働いて、接着蛋白の結合を拮抗的に抑制すると考えられる。

#### 〔結 論〕

Amidinonaphthol 誘導体は、細胞膜にある接着蛋白結合部位に対し、接着蛋白と拮抗してその結合を阻害することを解明した。

## 学位論文審査の結果の要旨

Fibrinogen や fibronectin、von Willebrand 因子などの接着蛋白は、活性化血小板の膜表面に存在する糖蛋白 IIb-IIIa 複合体に特異的に結合して、血小板の凝集や粘着に大きな役割を果していることが知られている。

著者は、新しい合成 serine protease 阻害剤の血小板凝集抑制作用を検討するうち、amidinonaphtol 誘導体が凝集を抑制するだけでなく、いったん凝集した血小板をも解離させる作用をも有していることを見出し、接着蛋白の結合部位である糖蛋白 IIb-IIIa への、fibrinogen 結合の拮抗的阻害作用によることを先に報告している。そこで、同じ接着蛋白で IIb-IIIa に結合する fibronectin の活性化血小板への結合に対する影響を検討した。

その結果、amidinonaphtol 誘導体は、活性化血小板への fibronectin 結合を濃度依存性に抑制し、また、血小板を刺激した後に添加することで、いったん結合した fibronectin を解離する作用をも示した。一方、結合部位への直接的な阻害作用をみる目的で、刺激後に paraformaldehyde で固定した血小板（刺激固定血小板）を作製した。この刺激固定血小板へも fibronectin は特異的に結合し、その結合を amidinonaphtol 誘導体は抑制した。このことから、amidinonaphtol 誘導体は、接着蛋白の共通した結合部位である血小板糖蛋白 IIb-IIIa に対して直接的、かつ拮抗的に阻害すると考えられた。

Fibronectin は、血小板だけでなく広く細胞間の接着に関与している。そのうち fibronectin receptor の確認されている normal rat Kidney 細胞を用いて、fibronectin への細胞接着蛋白に対する影響を検討した。Amidinonaphtol 誘導体は、この fibronectin への細胞接着をも抑制した。

これらの結果から、この誘導体は接着蛋白の糖蛋白 IIb-IIIa への結合を直接的に拮抗阻害するのみならず、広く細胞接着蛋白と、その結合部位との結合を阻害する可能性が示唆された。

以上、本研究は、amidinonaphtol 誘導体の特異的な接着蛋白結合阻害作用を解明したもので、今後、接着蛋白結合のメカニズムの解明や、抗血栓療法への応用に寄与するところ大であり、学位論文として価値あるものと認める。