血小板活性化反応における環状ヌクレオチドと Ca^{2+} :

川原 康洋* 山西 淳司* 古田 豊* 福崎 恒*

Effects of cyclic nucleotides on cytoplasmic free calcium in human platelets stimulated by thrombin: direct measurement with quin 2

Yasuhiro KAWAHARA*, Junji YAMANISHI*, Yutaka FURUTA*
and Hisashi FUKUZAKI*

Key words: human platelet, cytoplasmic free calcium, cyclic AMP, cyclic GMP, fluorescent Ca^{2+} indicator

Using intracellularly-trapped, fluorescent Ca^{2+} indicator quin 2, we measured directly cytoplasmic Ca^{2+} in washed human platelets stimulated by thrombin and examined the effects of cyclic AMP and cyclic GMP on cytoplasmic Ca^{2+} levels and ^{14}C -serotonin (5-HT) release. Thrombin (0.2 U/ml) evoked a rise in cytoplasmic Ca^{2+} from the basal level of about 0.1 μM to 1-3 μM which was fast enough to trigger 5-HT release. This rise was inhibited in a dose-dependent manner by preincubation with prostaglandin E_1 (PGE_1) (0.1-10 μM) or dibutyryl-cyclic AMP (0.01-1 mM). Parallel to this, 5-HT release was also inhibited by these drugs. When added to platelets after stimulation by thrombin, PGE_1 caused the rapid decrease of elevated cytoplasmic Ca^{2+} . Sodium nitroprusside (1-100 μM) and SIN (0.1-10 μM), both of which are potent stimulators of platelet guanylate cyclase, or 8-bromo-cyclic GMP (0.01-1 mM) inhibited thrombin-induced increase of cytoplasmic Ca^{2+} and 5-HT release in a dose-dependent manner. These results provide direct evidence that cytoplasmic Ca^{2+} levels in platelets are regulated by cyclic AMP and that an increase in platelet cyclic GMP also inhibits Ca^{2+} mobilization and prevents platelet activation.

*神戸大学医学部第一内科〔〒650 神戸市中央区楠町7丁目〕, Department of Internal Medicine, Division 1, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan. [昭和59年4月6日受付, 昭和59年8月10日受理]

はじめに

近年、虚血性心疾患や脳血管障害などの病態の発現に血小板の機能亢進の関与が明らかにされるにつれ、血小板の活性化とその制御の機構の解明はこれら疾患の病態の解明、治療、予防の上からも重要な問題となっている。従来、thrombin や collagen などによる血小板の活性化反応に際し細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が上昇し、凝集や放出反応を惹き起こすと推定されている¹⁾。一方、prostaglandin (PG) I_2 , PGE_1 などの血小板 cyclic AMP を上昇させる薬剤は血小板の活性化反応を著明に抑制するが、cyclic AMP は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を低下させることにより、その抑制作用を発現すると考えられている²⁾。しかし、最近まで血小板の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定が不可能であったためこれらの仮説に対する直接の証明はなかった。1982 年、Rink ら³⁾ は Ca^{2+} 指示性蛍光色素 quin 2 を用いて血小板の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定に成功し、thrombin による血小板の活性化反応時に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇することを立証した。今回、われわれは quin 2 による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定法を用いて、thrombin による血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に対する cyclic AMP の効果を解析した。同時に血小板の cyclic GMP を上昇させる sodium nitroprusside (SNP) や冠拡張剤 molsidomine の代謝産物 SIN-1 の効果をも検討した。

I. 材料および方法

血小板の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定、放出反応はそれぞれ Rink ら³⁾の方法、Haslam ら⁴⁾の方法に基づき同時に行なった。すなわち、ヒトの多血小板血漿を $[\text{C}^{14}]$ serotonin (58 mCi/mmol, New England Nuclear) と 37°C , 60 分間インキュベートした後、Baenziger と Majerus⁵⁾の方法で洗浄した。ついで $[\text{C}^{14}]$ serotonin を負荷した洗浄血小板を $5 \mu\text{M}$ quin 2 acetoxymethyl ester (同仁化学) を含む Hepes 緩衝液 (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 0.5 mM Na_2HPO_4 , 10 mM Hepes, 5 mM glucose, pH 7.4) と 37°C , 25 分間インキュベートした後同緩衝液で 2 回洗浄して、 $[\text{C}^{14}]$ serotonin,

Fig. 1 Time courses of serotonin release and quin 2 fluorescence response in platelets stimulated by thrombin.

quin 2 の両者を負荷した洗浄血小板を作成した。最後に、1 mM CaCl_2 を含む Hepes 緩衝液に 1×10^8 個/ml の濃度に調整した後、一部を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定に、残りを放出反応に供した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定は thrombin (持田製薬) 刺激時の蛍光 (excitation 339 nm, emission 500 nm) の変化を日立蛍光分光光度計 650-60 で測定した。この際、キュベットは 37°C で保温し、血小板の凝集を防止するため、スターラは試薬投与直後のみ回転させた。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は Tsien ら⁶⁾の方法に従い thrombin 刺激後、digitonin ($50 \mu\text{M}$) で細胞膜を破壊し、外液の Ca^{2+} 濃度を变化させてキャリブレーションを行ない算出した。放出反応は thrombin 刺激によって放出される放射能を刺激前の血小板に含まれる全放射能に対する割合で示した。

各実験は最低 3 回以上行ない、ほぼ等しい結果であったので、代表的実験図および数値を示した。

II. 結 果

血小板の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は静止時約 100 nM であるが、thrombin (0.2 U/ml) 刺激により上昇し $1 \sim 3 \mu\text{M}$ に達した。この上昇は非常に迅速で

Fig. 2 Effect of various concentrations of PGE₁ on thrombin-induced quin 2 fluorescence response and serotonin release.

Fig. 3 Effect of various concentrations of dibutyryl-cyclic AMP on thrombin-induced quin 2 fluorescence response and serotonin release.

同時に測定した放出反応に先行した(図1). 血小板を PGE₁ (小野製薬) (0.1-10 μ M) で前処置すると thrombin による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇, 放出反応は PGE₁ の濃度依存性に抑制された(図2). PGE₁ 作用時, 血小板の cyclic AMP は著明に上昇するが, 実際 dibutyryl-cyclic AMP (Sigma) (0.01-1 mM) も濃度依存性に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇, 放出反応を抑制した(図3). また thrombin 刺激後 PGE₁ を作用させると上昇していた $[Ca^{2+}]_i$ は急速に下降した(図4). 以上

の実験結果は血小板の $[Ca^{2+}]_i$ が cyclic AMP によって調節されていることを直接示すものである.

次に SNP (半井化学) (1-100 μ M) や SIN-1 (武田薬品) (0.1-10 μ M) も thrombin による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇, 放出反応を濃度依存性に抑制した(図5, 図6). これらの薬剤はその抑制効果と平行して血小板の cyclic GMP を上昇させる²⁷⁾が, 実際 8 bromo-cyclic GMP (Baehringer Mannheim) (0.01-1.0 mM) も $[Ca^{2+}]_i$

Fig. 4 Reversal of thrombin-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ by PGE_1 .

Fig. 5 Effect of various concentrations of SNP on thrombin-induced quin 2 fluorescence response and serotonin release.

の上昇, 放出反応を濃度依存性に抑制した (図 7). 以上の実験結果は cyclic GMP も血小板の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制してその活性化を阻害する可能を示唆するものである.

本論文に示した実験はすべて $1\text{ mM } CaCl_2$ の存在下で行なっているが, 外液に $CaCl_2$ を加えない場合も thrombin 刺激により $[Ca^{2+}]_i$ は急速に上昇する. しかし, その程度は $200\sim300\text{ nM}$ と弱い. この上昇も, PGE_1 , dibutyryl-cyclic AMP, SNP, SIN-1, 8 bromo-cyclic GMP によって抑制される.

III. 考 察

従来より, 血小板の $[Ca^{2+}]_i$ は静止時 $10^{-7}M$ 以下に保たれ, thrombin や collagen などの刺

激時上昇して凝集や放出反応を惹起すると推定されている. しかし, その根拠は血小板活性化反応時に生じる種々の Ca^{2+} 依存性の生化学的反應の解析, Ca^{2+} ionophore を用いた実験や筋細胞など他の細胞の活性化機構からの推測であり, 直接には証明されていなかった. 一方, cyclic AMP による血小板活性化の抑制機構に関しても Käser-Glanzmann ら⁸⁾が in vitro で血小板膜分画の Ca^{2+} の取り込みが cyclic AMP により亢進すると報告して以来, cyclic AMP は細胞質からの Ca^{2+} のくみ出しを促進することにより $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制して血小板の活性化を阻害すると推測されてきた. 最近 Rink らが Ca^{2+} 指示性蛍光色素 quin 2 を用いて血小板の $[Ca^{2+}]_i$ の測定に成功し, thrombin に

Fig. 6 Effect of various concentrations of SIN-1 on thrombin-induced quin 2 fluorescence and serotonin release.

Fig. 7 Effect of various concentrations of 8-bromo-cyclic GMP on thrombin-induced quin 2 fluorescence response and serotonin release.

よる血小板の活性化反応時に実際 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することを直接証明した⁹⁾。今回われわれは同様の方法を用いて PGE_1 と dibutyl-cyclic AMP が thrombin による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制することを示し、血小板の $[Ca^{2+}]_i$ が cyclic AMP によって調節されていることを立証した。Cyclic AMP が $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制する機序に関しては、最初 Käser-Glanzmann らが報告した⁹⁾ ように cyclic AMP 依存性蛋白質リン酸化酵素が活性化され、血小板膜分画のある種の蛋白質をリン酸化して Ca^{2+} ポンプの活性を亢進するものと考えられる。実際、 PGE_1 や dibutyl-cyclic AMP の作用時血小板膜分画の蛋白質のリン酸化反応が亢進する²⁾。

Cyclic GMP の血小板における役割は不明で

あるが、本スクレオチドは thrombin や collagen による血小板の活性化反応時に上昇することが報告されている²⁾。しかし、SNP や 8 bromo-cyclic GMP などの血小板の cyclic GMP を上昇させる薬剤が血小板の活性化を抑制することから Haslam ら²⁾は cyclic GMP は血小板の活性化反応時に上昇して feed-back inhibitor としてその活性化を抑制するとする仮説を提唱した。今回われわれは SNP や SIN-1 が cyclic GMP を介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制する可能性を示したが、この結果は Haslam らの仮説を支持するものである。Cyclic GMP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制機構は全く不明であるが、Haslam ら²⁾、Takai ら⁹⁾は血小板に SNP や 8 bromo-cyclic GMP を作用させた際 cyclic AMP 依存性にリン酸化される蛋白質とは異なった蛋白質がリン酸化されることを報告している。したがって、cyclic GMP もその特異的蛋白質リン酸化反応を介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制している可能性が考えられる。SNP や SIN-1 などの薬剤は平滑筋においても cyclic GMP を上昇させて平滑筋を弛緩させることが知られている^{7,10)}。血小板と平滑筋は細胞内における Ca^{2+} の制御機構が類似しているので、これら薬剤による平滑筋の弛緩作用にも cyclic GMP による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の抑制効果が関与している可能性も考えられよう。

結 語

Ca^{2+} 指示性蛍光色素 quin 2 による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定法により, 血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が cyclic AMP によって調節されていることを立証した. さらに SNP や SIN-1 は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を抑制して血小板の活性化を阻害するが, この抑制作用が cyclic GMP を介する可能性を示唆した.

文 献

- 1) Gerrard, J.M., Peterson, D.A. and White, J.G.: Calcium mobilization (Ed. Gordon J. L.: Platelets in Biology and Pathology, vol. 2) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1981, 407~436.
- 2) Haslam, R.J., Salam, S.E., Fox J.E.B. Lynham, J.A. and Davidson, M.M.L: Roles of cyclic nucleotides and of protein phosphorylation in the regulation of platelet function (Eds. Rotman, A., Meyer, F.A., Gilter, C. and Silberberg, A.: Cellular Response Mechanism and their Biological significance), John Wiley and Sons Ltd, 1980, p. 213~231.
- 3) Rink, T.J., Smith, S.W. and Tsien, R.Y.: Cytoplasmic free Ca^{2+} in human platelets: Ca^{2+} thresholds and Ca^{2+} -independent activation for shape-change and secretion. FEBS Lett., **148**; 21~26, 1982.
- 4) Haslam, R.J., Davidson, M.M.L. and Macclenaghan, M.D.: Cytochalasin B, the blood platelet release reaction and cyclic GMP. Nature, **253**; 455~457, 1975.
- 5) Baenziger, N.L. and Majerus, P.W.: Isolation of human platelets and platelet surface membranes. Methods Enzymol., **31**; 149~155, 1974.
- 6) Tsien, R.Y., Pozzan T. and Rink, T.J.: Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. J. Cell. Biol., **94**; 325~334, 1982.
- 7) Nishikawa, M., Kanamori, M. and Hidaka, H.: Inhibition of platelet aggregation and stimulation of guanylate cyclase by antianaginal agent molsidomine and its metabolites. J. Pharmacol. Exp. Ther., **220**; 183~190, 1982.
- 8) Käser-Glanzmann, R., Jakabova, M., George, J.N. and Lüscher, E.F.: Stimulation of calcium uptake in platelet membrane vesicles by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate and protein kinase. Biochim. Biophys. Acta, **466**; 429~440, 1977.
- 9) Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsubara, T. and Nishizuka, Y.: Inhibitory action of guanosine 3', 5'-monophosphate on thrombin-induced phosphatidylinositol turnover and protein phosphorylation in human platelets. Biochem. Biophys. Res. Commun., **101**; 61~67, 1981.
- 10) Schultz, K.D., Schultz, K. and Schultz, G.: Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. Nature, **265**; 750~751, 1977.