原著

細胞接着蛋白に対する amidinonaphtol 誘導体の抑制作用

程原 佳子* 藤山 佳秀* 細田 四郎* 安永幸二郎**

Effect of amidinonaphtol derivatives on the cellular interaction with adhesive proteins

Keiko HODOHARA*, Yoshihide FUJIYAMA*,
Shirou HOSODA* and Kohjiro YASUNAGA**

Key words: fibronectin binding, amidinonaphtol derivatives, nafamostat mesilate, adhesive proteins, platelets

We have recently reported that nafamostat mesilate (FUT-175), a synthetic serine protease inhibitor, inhibited the binding of fibrinogen to ADP-stimulated human platelets in an antagonistic manner. In respect to the similar effect of FUT-175 to Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), synthetic peptide constituted cell attachment domain of fibronectin, on fibrinogen binding to stimulated platelets, we have examined the effects of synthetic protease inhibitors on both fibronectin binding to thrombin-stimulated platelets and fibronectin-mediated cell attachment.

To exclude the direct inhibitory effect of the agents against thrombin, paraformaldehyde-fixed thrombin-stimulated platelets which expressed fibronectin-binding sites were used in this study. Among the synthetic inhibitors examined, FUT-175 and FUT-5923 which have amidinonaptol in their structure as active inhibitory sites, blocked the binding of ^{125}I -fibronectin to thrombin-stimulated platelets dose-dependently. ^{125}I -fibrinogen binding to ADP-stimulated fixed platelets was also inhibited by both FUT-175 and FUT-5923. These data indicated that the inhibition of amidinonaphtol derivatives was not via blockade of binding site expression.

Attachment of normal rat kidney fibroblasts to fibronectin-coated plate was inhibited by these amidinonaphtol derivatives, dose dependently. The agents were also affected fibronectin dependent cellular spreading.

These results suggest that the inhibitory effects of amidinonaphthol derivatives on the cellular interaction with these adhesive proteins might be related to conformational characteristics, not to their inhibitory activities against proteases.

* 滋賀医科大学第二内科 (〒520-21 大津市瀬田月輪町); Second Department of Internal Medicine, Shiga University of Medical Science, Shiga, Japan.

** 関西医科大学第一内科：First Department of Internal Medicine, Kansai Medical College, Osaka, Japan.
 受付：1989. 7. 21. 受理：1989. 10. 23.

はじめに

Fibrinogen や fibronectin, von Willebrand 因子など接着蛋白は、血小板の活性化にともなう膜表面の receptor に特異的に結合し、凝集や粘着などの血小板機能に大きな役割を果たしている¹⁾²⁾。

われわれは、合成 serine protease 阻害剤である nafamostat mesilate の強い血小板凝集抑制作用を検討するうち、その作用点が、血小板膜への fibrinogen 結合抑制にあることを報告した³⁾。しかも、その作用は、この薬剤の抗酵素作用にもとづくものでなく、血小板膜の fibrinogen 結合部位に対する直接的な作用であろうと推測された。今回、fibrinogen と同じ接着蛋白である fibronectin (以下 Fn) を介した細胞接着、および活性化血小板への結合に対する amidinonaphtol 誘導体の影響を観察し、その作用機序について検討した。

I. 方 法

1. Fibronectin (Fn) による細胞接着に対する影響

Normal rat kidney cell (NRK cell) を、 $10^6/\text{ml}$ になるように minimal essential medium に浮遊させ、あらかじめ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒト fibronectin (ミドリ十字) で coating した polystyrene microtiter well に加え、5% CO_2 下に 37°C 1時間 incubate した。PBS で3回洗浄した後、trypsin を含む PBS で接着した細胞を剥離して血球計算板で細胞数を count した。阻害剤として、nafamostat mesilate, FUT-5923 (鳥居薬品) および RGDS (Penninsula) は生理的食塩水で溶解し、細胞浮遊液に添加した。また、接着した細胞を3% paraformaldehyde で固定、1% toluidine blue で染色して観察した。

2. 血小板 Fn 結合に対する影響

ヒト Fn は Iodogen (Pierce) を用いて ^{125}I (Amarsham) でラベルした。血小板への Fn 結合は、Plow らの方法⁴⁾ に準じて検討した。すなわち、正常人より ACD を用いて採血し、PRP を1回洗浄した後、Tangen らの方法に

準じて⁵⁾ ゲル浮過血小板を作製、1% BSA を含む Tyrode's buffer に $1 \times 10^9/\text{ml}$ になるように浮遊させた。血小板浮遊液を、3mM MgCl_2 3mM EDTA 存在下に 10^{-7}M ^{125}I -Fn および 2 U/ml thrombin と 37°C 30分間 incubate し、20% sucrose に重層して 11,000 g 5分間遠心して血小板を分離、結合した ^{125}I -Fn の放射活性を測定した。固定血小板は、ゲル浮過血小板を 3mM MgCl_2 3mM EDTA 存在下に 2 U/ml thrombin で5分間刺激した後、0.5% paraformaldehyde で30分間固定、20 mM NH_4Cl で中和した後洗浄し、1% BSA を含む Tyrode's buffer に浮遊させた。阻害剤はそれぞれ生理的食塩水に溶解して用いた。

3. 活性化固定血小板 fibrinogen 結合に対する影響

ゲル浮過血小板・1mM CaCl_2 存在下に 10 μM ADP で5分間刺激した後、同様に固定した血小板を ^{125}I -fibrinogen 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と30分間 incubate、20% sucrose を用いて分離し、結合 fibrinogen の放射活性を測定した。

II. 結 果

1. Fn による細胞接着に対する影響

Fn-coated well には添加した NRK cell の約58%が接着したが、これに対し、nafamostat mesilate, FUT-5923, RGDSは濃度依存性に接着を抑制した(図1)。その IC_{50} は RGDS で $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$, nafamostat mesilate $4 \times 10^{-4}\text{M}$, FUT-5923 10^{-3}M であった。固定染色すると、control ではほとんどの細胞が spread して接着しているのに対して nafamostat mesilate 添加によって細胞の spread および接着が抑制された(図2)。

2. 血小板 Fn 結合に対する影響

血小板を thrombin 2 U/ml で刺激した際、非固定血小板では、 $39,296 \pm 582$ molecules/platelet、固定血小板では $19,912 \pm 75$ molecule/platelet の fibronectin が結合し、Ginsberg らの報告⁶⁾ とほぼ合致した。Thrombin による活性化固定血小板において、 ^{125}I -Fn と同時に非標識 Fn 10^{-5}M あるいは nafamostat mesilate 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (10^{-4}M) を添加することによって結合

Fig. 1 Inhibition of cell attachment to polystyrene microtiter wells coated with fibronectin. Single cell suspension containing 10^4 normal rat kidney cells was placed in a flat-bottom microtiter well that had been coated with $10 \mu\text{g/ml}$ fibronectin with or without inhibitors. After 1 hour, unattached cells were washed away and attached cells were then detached from the wells with 0.125 % trypsin and counted by visual mean. The mean $\pm$ SE of five determinations was shown.

Fig. 2 Attachment of NRK cells to polystyrene microtiter wells coated with fibronectin. Polystyrene microtiter cells were coated with fibronectin ($10 \mu\text{g/ml}$), and NRK cells were added to the wells with (B) or without (A) nafamostat mesilate (10^{-4}M , $50 \mu\text{g/ml}$). After 1 hour, unattached cells were removed by washing and the remaining cells were fixed and stained.

は抑制された (表 1). この thrombin 活性化固定血小板に ^{125}I -Fn を加えると, その結合は約 20 分で plateau に達した. これに対し, ^{125}I -Fn と同時に nafamostat mesilate を添加することによって, Fn 結合は抑制された (図 3). この抑制作用は濃度依存性であり, その IC_{50} は非固定血小板で $5 \times 10^{-6}\text{M}$ ($2.5 \mu\text{g/ml}$), 活性化血小板で $2 \times 10^{-5}\text{M}$ ($10 \mu\text{g/ml}$) であった

(図 4).

Nafamostat mesilate と同じ amidinonaphtol 基を有する FUT-5923 も Fn 結合を濃度依存性に抑制したが, 50% 抑制には $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度を要した. また, RGDS も濃度依存性に抑制を示し, $50 \mu\text{g/ml}$ で約 50% が抑制された (表 2).

Fig. 3 Time course of fibronectin binding in the presence or absence of nafamostat mesilate. Gel-filtrated platelets were stimulated with thrombin (2 U/ml) for 5 minutes and then fixed with paraformaldehyde. These stimulated fixed platelets were incubated with 10^{-7} M 125 I-fibronectin in the presence (○) of absence (●) of nafamostat mesilate (10^{-4} M, 50 μ g/ml) for the indicated time. The mean $\pm$ SE of triplicate determinations was expressed.

Table 1 Effect of nafamostat mesilate on fibronectin binding to thrombin-stimulated platelets. Thrombin (2 U/ml)-stimulated fixed platelets were incubated at 37°C for 30 minutes with 125 I-fibronectin (10^{-7} M) and indicated inhibitors. Binding measured as described under Fig. 4. The mean $\pm$ SE of triplicate determinations is shown.

Addition		Fn bound (molecules/platelet)
Living cells	None	39,296 $\pm$ 582
Fixed cells	None	19,912 $\pm$ 795
	Unlabeled Fn (10^{-5} M)	4,176 $\pm$ 120
	Nafamostat mesilate (10^{-4} M)	5,436 $\pm$ 80

Table 2 Effect of inhibitors on fibronectin binding to thrombin-stimulated fixed platelets. Thrombin (2 U/ml)-stimulated fixed platelets were incubated with 10^{-7} M 125 I-fibronectin and the indicated inhibitors. The mean $\pm$ SE of triplicate determinations is shown.

Addition		Fn bound (molecules/platelet)
None		12,261 $\pm$ 609
FUT-5923	100 μ g/ml	8,837 $\pm$ 411
	50 μ g/ml	9,639 $\pm$ 432
	10 μ g/ml	12,020 $\pm$ 110
RCDS	100 μ g/ml	2,522 $\pm$ 241
	50 μ g/ml	6,152 $\pm$ 173
	10 μ g/ml	8,210 $\pm$ 59

3. 活性化固定血小板 fibrinogen 結合に対する影響

非固定血小板では、ADP 10 μ M 刺激によって約 7.5 pmole/ 10^8 platelets の fibrinogen が結合したが、ADP 刺激固定血小板では約 3.3 pmole/ 10^8 platelets が結合した。これに対し

て、nafamostat mesilate は固定前に ADP とともに 10^{-4} M (50 μ g/ml) を添加すると、fibrinogen 結合は 2.7 pmole/ 10^8 platelets とわずかに抑制するが、固定後に添加することによっても濃度依存性に結合を抑制した (図 5)。

Fig. 4 Inhibition of fibronectin binding by nafamostat mesilate. Gel-filtrated platelets were stimulated with 2 U/ml thrombin for 5 minutes in the presence of 3 mM MgCl_2 and 3 mM EDTA, and then fixed with paraformaldehyde. After washing, the fixed platelets were resuspended in Tyrode's buffer containing 1 % BSA. These thrombin-stimulated fixed platelets (●) were incubated at 37°C with 10^{-7}M ^{125}I -fibronectin and the indicated concentration of nafamostat mesilate. Living cells (○) were stimulated with 2 U/ml thrombin in the presence of MgCl_2 and EDTA. After 30 minutes incubation, triplicate aliquotes of the mixture were layered onto 20 % sucrose and centrifuged for 3 minutes at 11,000 g. The tube tip were amputated and bound ligand measured as radioactivity. Data are expressed as the mean $\pm$ SE.

Fig. 5 Inhibition of fibrinogen binding to ADP-stimulated platelets by nafamostat mesilate. Fixed platelets were prepared by stimulating the platelets with $10\text{ }\mu\text{M}$ ADP for 5 minutes prior to treatment with paraformaldehyde. These fixed platelets (●) were incubated at 37°C for 30 minutes with $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ ^{125}I -fibrinogen and the indicated concentration of nafamostat mesilate. Living cells (○) were stimulated with $10\text{ }\mu\text{M}$ ADP in the presence of 1 mM CaCl_2 . After incubation, platelet bound ligand was separated by centrifugation through 20 % sucrose for 3 minutes at 11,000 g. The mean $\pm$ SE of triplicate determinations was expressed.

III. 考 察

Nafamostat mesilate は, serine protease 阻害剤として開発された guanidinobenzoate 基と amidinonaphtol 基とを合わせ持つ合成化合物であるが, 強力な酵素阻害作用のほか⁷⁾, 血小板に対しても強い凝集阻害作用を持つ⁸⁾. この凝集阻害の機序を検討するうち, この薬剤が一旦凝集した血小板を解離させる作用を持つことを見だし, これが刺激によって結合した fibrinogen を解離させる機序によることを報告してきた³⁾. この作用は, 前処理を必要としないことから, 酵素阻害作用を介さないと思われ, また guanidinobenzoate 誘導体と amidinonaphtol 誘導体の比較検討から, 後者に特異的な作用であって, 何らかの構造的特徴から拮抗的に阻害するのではないかと推測された³⁾. 今回の fibronectin 結合阻害作用からも, nafamostat mesilate は thrombin 刺激血小板だけでなく, 刺激後に固定した血小板への fibronectin 結合や, fibrinogen 結合を抑制したことから, これら接着蛋白の活性化血小板への結合抑制は, この薬剤の有する抗酵素作用によるものでなく, 血小板膜上に発現した結合部位への直接的な作用と考えられた.

また, nafamostat mesilate と同じ amidinonaphtol 誘導体である FUT-5923 も刺激固定血小板に対する fibronectin 結合抑制作用を有することから, 接着蛋白抑制作用はこれらの誘導体に特異的と思われた.

Bennett らは, aspirin や indomethacin が血小板への fibrinogen 結合を部分的に抑制することを報告し, アラキドン酸代謝産物が fibrinogen 結合部位発現に役割を果たしていることを示唆した⁹⁾. Nafamostat mesilate もまた, 血小板活性化において phospholipase 活性を阻害して膜からのアラキドン酸代謝を抑制するため⁸⁾, fibrinogen 結合抑制の一部分は, アラキドン酸代謝を介しての fibrinogen に対する receptor の発現が減少することによって考えられた. 今回の検討において, 血小板を固定する前に ADP とともに投与することで fibrinogen 結合が約20%抑制されたのは, このアラ

キドン酸代謝に対する作用を介しての抑制と考えられる.

これら合成蛋白分解酵素阻害剤の fibrinogen に対する直接的な結合が関与している可能性も否定できない. しかし, 固定血小板において fibrinogen だけでなく fibronectin に対しても抑制作用を有したこと, しかもその抑制に必要な濃度は fibrinogen と fibronectin ではほぼ同等であったことから, 接着蛋白に対する直接作用よりも, これら蛋白の共通の結合部位である血小板膜上に作用点を有すると考えられる.

血小板膜上にある糖蛋白 II b-IIIa (以下 GP II b-IIIa) は, 広く接着蛋白の結合部位として認められており, fibrinogen¹⁰⁾ や fibronectin⁴⁾, von Willebrand 因子¹¹⁾, vitronectin¹²⁾ などが結合することが報告されている. これらの結合は, 生理的活性ペプチドである Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) によって共に抑制されることから⁶⁾¹³⁾, その結合部位は GP II b-IIIa 上の RGDS を認識する receptor site に共通すると考えられている²⁾. 今回のわれわれの検討で amidinonaphtol 誘導体は, 血小板だけでなく NRK 細胞の fibronectin への接着をも阻害した. この作用にはかなり高濃度を必要とし, 細胞自体に与える影響も考慮する必要があるが, 血小板への fibrinogen や fibronectin 結合抑制から考え合わせ, RGDS に相似した抑制作用であると思われる. これらのことから, amidinonaphtol 誘導体は, 血小板 GP II b-IIIa をはじめとした接着蛋白結合部位に働き, その阻害作用を発揮するのではないかと考えられた.

文 献

- 1) George, J. N., Nurden, A. T. and Phillips, D.R.: Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N. Engl. Med.*, **311**; 1084~1098, 1984.
- 2) Phillips, D. R., Charo, I. F., Parise, L. V. and Fitzgerald, L. A.: The platelet membrane glycoprotein II b-IIIa complex. *Blood*, **71**; 831~843, 1988.
- 3) 程原佳子, 藤山佳秀, 細田四郎, 安永幸二郎:

- 血小板フィブリノーゲン結合に対するセリンプロテアーゼ阻害剤の抑制作用. 血液と脈管, **20**; 213~219, 1989.
- 4) Plow, E. F. and Ginsberg, M. H.: Specific and saturable binding of plasma fibronectin to thrombin-stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.*, **256**; 9477~9482, 1981.
- 5) Tangen, O., Berman, H.J. and Marphy, P.: Gel filtration: A new technique for separation of blood platelets from plasma. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **25**; 268~278, 1971.
- 6) Ginsberg, M. H., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. and Plow, E. F.: Inhibition of fibronectin binding to platelets by proteolytic fragments and synthetic peptides which support fibroblast adhesion. *J. Biol. Chem.*, **260**; 3931~3936, 1985.
- 7) Fujii, S. and Hitomi, Y.: New synthetic inhibitors of C1r, C1 esterase, thrombin, plasmin, kallikrein and trypsin. *Biochem. Biophys. Acta*, **661**; 342~345, 1981.
- 8) 程原佳子, 藤山 佳秀, 細田 四郎, 安永 幸二郎: Nafamostat mesilate (FUTHAN) のヒト血小板凝集抑制機序. 薬理と治療, **15**; 597~606, 1987.
- 9) Bennett, J. S., Vilair, G. and Burch, J. W.: A role for prostaglandins and thromboxanes in the exposure of platelet fibrinogen receptors. *J. Clin. Invest.*, **68**; 981~987, 1981.
- 10) Bennett, J. S. and Vilaire, G.: Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J. Clin. Invest.*, **64**; 1393~1401, 1979.
- 11) Ruggeri, Z. M., Bader, R. and De Marco, L.: Glanzmann thromboasthenia. Deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**; 6038~6041, 1982.
- 12) Pytela, R., Pierschbacher, M. D., Ginsberg, M.H., Plow, E. F. and Ruoslahti, E.: Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa is a membrane of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science*, **231**; 1559~1562, 1986.
- 13) Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. A. and Ginsberg, M. H.: The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**; 8057~8061, 1985.
-