

Inhibition of ADP-induced Platelet Aggregation by Plasma Fibronectin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8175

ヒト血小板の凝集反応に対する血漿フィブロネクチンの意義

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

熊 走 一 郎

(平成2年1月24日受付)

ヒト血小板が凝集する際にはフィブリノゲン (fibrinogen, Fbgn) をはじめいくつかの接着性蛋白が関与することが知られているが、その詳細については不明である。今回血中に比較的豊富に存在する接着性蛋白である血漿フィブロネクチン (plasma-fibronectin, P-FN) の血小板凝集における意義を検討する目的で、ヒト洗浄血小板のアデノシン 5'-ニリン酸 (adenosine 5'-diphosphate, ADP) 凝集に対する血漿フィブロネクチンの影響について検討した。あらかじめ ADP 凝集が生じることを確認した条件 (フィブリノゲン $143 \mu\text{g/ml}$, ADP $10 \mu\text{M}$) で血漿フィブロネクチンを $0-600 \mu\text{g/ml}$ の範囲で添加すると、血漿フィブロネクチンの用量依存性に二次凝集の発現は遅延し、 $600 \mu\text{g/ml}$ の添加によりその二次凝集は完全に抑制された。また血漿フィブロネクチン濃度を $720 \mu\text{g/ml}$ と一定にしてフィブリノゲン濃度を $143-920 \mu\text{g/ml}$ の範囲で変化させたところ、血漿フィブロネクチンは低濃度のフィブリノゲン存在下での ADP 凝集に対してより強い抑制効果を示した。血漿フィブロネクチンとフィブリノゲンの濃度を一定として ADP 濃度を $6.7 \mu\text{M}-25 \mu\text{M}$ と変化させた場合は、血漿フィブロネクチンは低濃度の ADP 刺激による血小板凝集に対してより強い抑制効果を示した。血漿フィブロネクチンの凝集抑制が放出反応とどのような関係にあるかについても検討したが、二次凝集が抑制された条件では放出反応も明らかに抑制されていた。しかし、いずれの実験においても、血漿フィブロネクチンは一次凝集にほとんど影響を及ぼさなかった。以上の実験結果および血漿フィブロネクチンとフィブリノゲンの親和性が高い条件においても凝集抑制に変化がなかったこと、今回の実験条件では両者の親和性は非常に低いことより、血漿フィブロネクチンは ADP によって正常に刺激された血小板とフィブリノゲンとの結合を阻害することにより凝集を抑制していることが示唆された。今回の実験で二次凝集が完全に抑制された時の血漿フィブロネクチンおよびフィブリノゲンの濃度をそれぞれ血漿中のそれと比較すると、血漿フィブロネクチンは約2倍、フィブリノゲンは約20分の1であり、特殊な病態または局所的な環境を想定する以外にこの濃度は生理的ではない。しかし、今回の実験結果より血漿フィブロネクチンは低濃度の ADP 刺激にて惹起された凝集反応に対してより強い抑制効果を示しており、また生体内において血小板が刺激として受ける ADP 濃度は今回の実験条件にくらべて著しく低いことより、血漿フィブロネクチンは低濃度の ADP により刺激された血小板を凝集までいたらしめず、凝集が過度に進展することを防ぐ調節因子としての生理作用をもつ可能性が示唆された。

Key words ADP-induced platelet aggregation, Fibrinogen, Plasma fibronectin, Release reaction of platelets, Washed human platelet

Abbreviations: ϵ -ACA, ϵ -amino-n-caproic acid; ADP, adenosine 5'-diphosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; BSA, bovine serum albumin; Bz, benzamidine hydrochloride; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; FN, fibronectin; Fbgn, fibrinogen; GP, glycoprotein; L-L, luciferin-luciferase; ME, mercaptoethanol; P-FN, plasma fibronectin;

血小板は止血機構において重要な役割を果たすが、その主な機能は血小板どうしが接着する凝集と、血小板が他の細胞又は基質と接着する粘着にある。血中及び血小板中にはいわゆる接着性蛋白が存在し、血小板の機能発現に重要な役割を果たしている¹⁾。すなわち血小板はそれ単独では他の血小板及び細胞に特異的に接着することは出来ず、接着性蛋白の介在があって初めて凝集及び粘着が可能になるのである。接着性蛋白及びその受容体に関する研究は近年急速な進歩が見られつつある。接着性蛋白については、1984年に Ruoslahti らがフィブロネクチン (fibronectin, FN) の細胞結合部位が RGD (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸) のわずか3つのアミノ酸からなる小さな配列である事を示した²⁾。その後のフィブリノゲン (fibrinogen, Fbgn)³⁾、von Willebrand 因子 (von Willebrand factor, vWF)⁴⁾、トロンボスポンジン (thrombospondin, TSP)⁵⁾、などいくつかの蛋白にも同様の配列があることがわかってきた⁶⁾が、そのいずれもが血小板の凝集及び粘着に深くかかわっている⁷⁻¹⁰⁾。一方受容体に関しては、そのヘテロダイマーな構造とアミノ酸配列の相同性により、血小板膜表面上に存在する粘着性蛋白受容体の一つである糖蛋白 (Glycoprotein, GP) IIb/IIIa は、線維芽細胞上に存在するフィブロネクチン受容体などと共にインテグリンスーパーファミリーと呼ばれ^{11,12)}、血漿フィブロネクチン (plasma fibronectin, P-FN)^{13,14)}、フィブリノゲン²¹⁻²⁴⁾、vWF²⁵⁻²⁷⁾などが結合し、やはり血小板の凝集及び粘着に深くかかわっている²⁸⁻³⁰⁾。ただし血小板の場合、GP IIb/IIIa は活性化されることによって初めて接着性蛋白と結合することが出来る³¹⁻⁴¹⁾。生体内で血管壁が破綻した場合、その修復機能において最も重要な役割を果たすものの一つに止血血栓の形成がある。止血血栓は血小板凝集塊を中心として形成されるが、その血小板凝集塊は活性化された血小板膜上の GP IIb/IIIa にフィブリノゲンが結合し、血小板間を架橋することによって形成されると考えられている⁴²⁻⁴⁴⁾。血漿中のフィブリノゲンを除くために血小板を緩衝液で洗浄し、最終的に緩衝液で再浮遊させた洗浄血小板をアデノシン 5'-三リン酸 (adenosine 5'-diphosphate, ADP) で刺激した場合、フィブリノゲンを再添加しないと血小板は凝集せず、その最大凝集率は添加したフィブリノゲン量に相関する⁴⁵⁻⁴⁷⁾。トロン

ビン刺激の場合はフィブリノゲンを再添加する必要はないが、おそらく血小板中に存在するフィブリノゲンが凝集に関与しているものと考えられており⁴⁸⁻⁵⁰⁾、フィブリノゲンは血小板凝集塊形成にとって必須の因子と考えられる。フィブリノゲンと同様に血漿中に存在し、また同じ接着性蛋白の一つである vWF は、ADP およびトロンビン刺激時に活性化血小板上の GP IIb/IIIa への結合をフィブリノゲンと競合することや^{25,26)}、無フィブリノゲン血症患者の血小板凝集塊形成に重要な役割を果たすこと²⁷⁾が報告されており、種々の刺激物質で活性化された血小板膜表面に対する反応性は、親和性の違いはあるものの⁵¹⁾フィブリノゲンとほぼ同一である。ところが、同様に血漿中に存在する接着性蛋白の一つである血漿フィブロネクチンに関しては、その血小板凝集における意義や活性化血小板に対する結合性は依然として明らかでない。血漿フィブロネクチンは洗浄血小板のトロンビン凝集を抑制すると報告されている⁵²⁾が、一方では血漿フィブロネクチンに対する単クローン抗体が洗浄血小板のトロンビン凝集を抑制するとする報告がある⁵³⁾。また、トロンビンによって刺激された血小板には結合するが ADP 刺激された血小板には結合しないと報告があり⁵⁴⁾、同じ接着性蛋白であるフィブリノゲンや vWF とは活性化血小板に対する結合性が違うことが想定されているがその詳細は不明である。そこで今回の実験では、血小板凝集における血漿フィブロネクチンの意義を検討する目的で、洗浄血小板の ADP 凝集能及び放出反応に対する血漿フィブロネクチンの影響に関して検討した。

材料および方法

I. 材料

ゲラチンセファロースゲル (Gelatin sepharose 4B)、アルギニンセファロースゲル (Arginine sepharose 4B) 及びセファロースゲル (Sephacrose 4B) は Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden) より購入した。カラムは、Econo-column (BIO-RAD, Richmond, U.S.A.) を使用した。フェニルメタンスルホニルフルオリド (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)、アピラーゼ、アデノシン 5'-三リン酸 (adenosine 5'-triphosphate, ATP)、アデノシ

Plt, platelet; PMSF, phenylmethyl sulfonyl fluoride; PRP, platelet rich plasma; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, tris-buffered saline; Tris, 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol; vWF, von Willebrand factor

ン 5'-二リン酸 (adenosine 5'-diphosphate, ADP), ルシフェリンルシフェラーゼは Sigma (St. Louis, U.S.A.) より, ベンズアミジン塩酸塩 (benzamidinium hydrochloride, Bz) は Aldrich chemical company (Milwaukee, U.S.A.) より, 6-アミノ-N-カプロン酸 (ϵ -amino-n-caproic acid, ϵ -ACA), アクリルアミド, N, N'-メチレンビスアクリルアミド, ドデシル硫酸ナトリウム, N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン, 過硫酸アンモニウム, 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 2ME), L-アルギニン, エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した. ヘパリン (sodium heparin) は NOVO-NO-RDISK a/s (Bagsvaerd, Demmerk) より, 3.8%赤沈用チトラートは, 国際試薬株式会社 (神戸) より購入した. フィブリノゲンは Kabi Vitrum (Stockholm, Sweden) より Grade L のものを購入し, クエン酸を含んでいるため 150mM NaCl/20mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol (Tris)-HCl pH7.4 (Tris-buffered saline, TBS) にて透析後使用した. その他試薬は, すべて生化学実験用又は分析用を使用した.

II. 血漿フィブロネクチンの精製

血漿フィブロネクチンは, Sixma らの方法⁵⁹⁾ に準じ, 一部改変を加えて行った. すなわち, 有効期限のきれた新鮮凍結血漿を溶解し, EDTA 50mM, PMSF 0.2mM, Bz 5mM, ϵ -ACA 5mM, (いずれも終濃度) になるように添加し, 遠心機 (Model RS-18 Tomyseiko, Tokyo) にて 7000rpm 15分 (4°C) 遠心した. 上清を集め, 脱脂綿にて脱脂した後に脱気をおこなった. Sepharose 4B 及び Gelatine sepharose 4B はあらかじめ 50mM Tris-HCl (pH7.4) 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.2mM PMSF, 5mM Bz, 5mM ϵ -ACA, (緩衝液 A) で室温下に平衡化しておき, 脱気後の検体を Sepharose 4B をプレカラムとして Gelatine sepharose 4B に添加した. 添加後, プレカラムをのぞき, Gelatine sepharose 4B を充分量の緩衝液 A で洗浄した. さらに充分量の 50mM Tris-HCl (pH7.4), 1M NaCl にて洗浄し, 最終的に 50mM Tris-HCl (pH7.4), 1M L-アルギニンにて溶出した. 吸光度計にて吸光度の高いフラクションを集め, 大量の 50mM Tris-HCl (pH7.4) に対して 4°C にて数回透析した. 透析後あらかじめ 50mM Tris-HCl (pH7.4) にて平衡化した Arginine sepharose 4B に添加し, 充分量の 50mM Tris-HCl (pH7.4) で洗浄したのち 50mM Tris-HCl (pH7.4) 150mM NaCl (TBS) にて溶

出した. 精製した血漿フィブロネクチンの濃度は 280nm の吸光度において 1mg/ml=1.28 として計算し, 適当量に分注して -80°C にて凍結保存した.

III. ヒト洗浄血小板の調製法

ヒト洗浄血小板の調製は, Mustard の変法⁵⁹⁾⁵⁷⁾ によっておこなった. すなわち, 血小板機能に影響するとおもわれる薬剤を少なくとも 2 週間以上飲んでいない健康者の肘静脈より, あらかじめ 3.8% の赤沈用クエン酸ナトリウムを 2ml 入れた注射筒で 20ml になるように採血し, 800rpm で 15 分間遠心して多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) を得た. その PRP の pH を 1M クエン酸にて 6.5 にし, その後 2400rpm で 15 分間遠心して上清を捨て血小板のペレットを得た. そのペレット洗浄用緩衝液 (140mM NaCl, 1.28mM KCl, 0.42mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 11.9mM NaHCO_3 , 1.0mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02mM $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5.6mM glucose, 1% BSA) に終濃度 25U/ml となるようにヘパリン, 1U/ml となるようにアピラーゼを加えたものに再浮遊させ, 37°C で 30 分間静置し, 2200rpm で 10 分間遠心した. 上清を捨て, 洗浄用緩衝液に終濃度 1U/ml となるようにアピラーゼのみを加えたものに再浮遊し, 37°C で 30 分静置し, 同様に遠心した. 遠心後上清を捨て, 最終的に洗浄用緩衝液より $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ をのぞいたものにて再浮遊させて血小板浮遊液とし, 実験に使用した.

IV. 血小板凝集能の検討法

血小板凝集能は, 血小板凝集計 (Hematracer IV, NBS, Tokyo) をもちいて, 透光度の変化により測定した. 血小板浮遊液 150 μ l を 37°C で静置し, 2 分後に攪拌を開始した. 3 分後に血漿フィブロネクチン溶液または対照の TBS を 25 μ l 添加. 4 分後にフィブリノゲン溶液 25 μ l 添加し, 5 分後に ADP 溶液を 25 μ l 添加して血小板凝集を惹起させた. その後の観察は最低 7 分間行った.

V. 血小板放出反応の検討法

血小板放出反応は, ルシフェリンルシフェラーゼ法によって検討した⁶⁰⁾. すなわち, ATP により蛍光を発する酵素であるルシフェリンルシフェラーゼを添加し, その蛍光の強さによって血小板の濃染顆粒から放出された ATP の量を算定する方法である. 定量は, 発光が最大に達したのちに既知濃度の ATP を添加し, その発光の増加分を内部標準として行われる. これまで一般に, この方法は PRP に対して行われている方法であり, はじめからルシフェリンルシフェラーゼを添加しておき, その後に凝集惹起物質を添加してその蛍光の変化を凝集能と共に経時的に検討する (図

1a). 今回洗浄血小板の ADP 凝集に対して同様の方法を試みたところ凝集は惹起されず、それに伴って起こる ATP 放出も認められなかった (図 1b). またあらかじめルシフェリルシフェラーゼを加えずに血小板凝集を惹起させ、その途中にルシフェリルシフェラーゼを添加したところ、添加後の血小板凝集は抑制された (図 1c). 以上より、ルシフェリルシフェラーゼが凝集を阻害していると考えられた. しかし途中でルシフェリルシフェラーゼを添加した場合、添加した時点での蛍光は認めており、添加時における ATP 量は評価できると考えられた. そこで凝集能を測定しはじめてのち種々の時間をおいてルシフェリルシフェラーゼを添加して検討したところ、開始後 6 分後にルシフェリルシフェラーゼを添加する条件が最も安

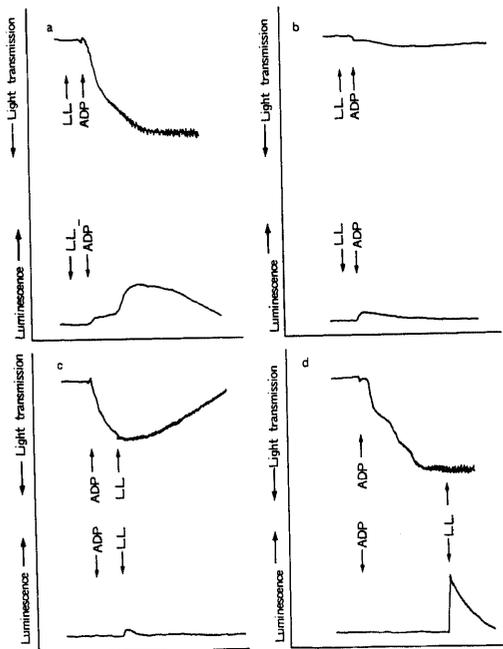


Fig. 1. Measurement of ATP released from washed human platelets a) At the start of the assay, $50\mu\text{l}$ of luciferin-luciferase solution (L-L) was added to $400\mu\text{l}$ of platelet rich plasma. After 30 seconds, $50\mu\text{l}$ of ADP solution was added. b) At the start of the assay, $50\mu\text{l}$ of L-L was added to $400\mu\text{l}$ of washed human platelet. After 30 seconds, $50\mu\text{l}$ of ADP solution was added. c) $50\mu\text{l}$ of ADP solution was added 30 seconds after the start of the assay. And after 1 minute, L-L was added. d) $50\mu\text{l}$ of ADP solution was added 30 seconds after the start of the assay. And after 6 minutes, L-L was added.

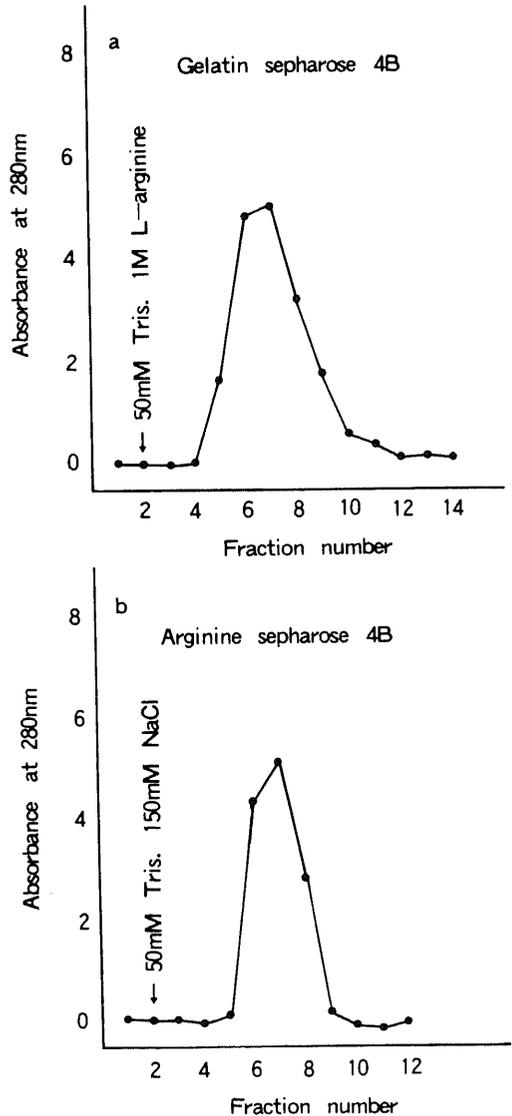


Fig. 2. Elution profile of plasma fibronectin from column chromatography. a) Gelatin sepharose 4B affinity chromatography. 160ml of outdated fresh frozen plasma that had been made 5mM in Bz, 0.2mM in PMSF, 50mM in EDTA, and 5mM in $\epsilon\text{-ACA}$ was applied to a column of gelatin sepharose 4B (20ml bed volume). Plasma fibronectin was eluted with 1M L-arginine and collected into 3ml fractions. b) Arginine sepharose 4B affinity chromatography. Fractions that contained plasma fibronectin from the gelatin sepharose 4B column were pooled, dialyzed, and passed through a column of arginine sepharose 4B (18ml bed volume). Fibronectin was eluted with 50mM Tris, 150mM NaCl, and collected into 2.5ml fractions.

定した ATP 放出の最大値を評価できることを見いだした (図 1d)。従って今回の血小板放出反応は以下の条件において検討した。すなわち、血小板浮遊液 300 μ l を 37°C にて孵置すると同時に攪拌を開始、30 秒後に血漿フィブロネクチン溶液又は対照の TBS を 100 μ l 添加、1 分後にフィブリノゲン溶液を 150 μ l、2 分後に ADP 溶液を 50 μ l 添加して凝集を惹起させた。6 分後にルシフェリルシフェラーゼ 50 μ l 添加して発光させ、6.5 分後に内部標準の為に ATP 50 μ l を添加してその蛍光強度により ATP 放出量を算定した。

成 績

I. 血漿フィブロネクチンの精製

Gelatin sepharose 4B 単独、およびさらにその後に Arginine sepharose 4B を用いた場合の血漿フィブロネクチンの溶出状況を図 2a および図 2b に示した。いずれの場合においても、吸光度上は一つのピークとして溶出されたが、その各々を図 3 に示すごとく SDS 電気泳動にて評価すると、Gelatin sepharose 4B のみで精製した場合はある程度の夾雑物を含んでいた。さらに Arginine sepharose 4B のアフィニティークロマトグラフィーを行った後は還元元下では分子量約 42 万の一本のバンドのみを、還元元下では分子量約 21 万付近にわずかに分離した 2 本のバンドのみを認めた。血漿フィブロネクチンは、その C 末端近くのアミノ酸数がわずかに違う 2 本のポリペプチドからなっており⁶⁹、しかも分子量は各々約 21 万であるので、この電気泳動の結果は血漿フィブロネクチンの性質をよく反映している。したがって以下の実験には、Gelatin sepharose 4B 及び Arginine sepharose 4B の二種類のアフィニティークロマトグラフィーを行い精製した血漿フィブロネクチンを使用した。

II. 洗浄血小板 ADP 凝集能に対する血漿フィブロネクチンの影響

図 4 は、あらかじめ ADP 凝集が起こることを確認した条件において血漿フィブロネクチンを濃度を変えて添加し、その ADP 凝集に対する影響を検討したものである。血漿フィブロネクチンは、その濃度依存性に 2 次凝集にいたるまでの潜時を延長させ、400 μ g/ml の終濃度で 2 次凝集をほとんど抑制した。さらに 600 μ g/ml の終濃度では 2 次凝集を完全に抑制した。しかし 1 次凝集は、いずれの濃度の場合にも明らかな影響を受けなかった。さらに終濃度で 925 μ g/ml までの血漿フィブロネクチンを添加したが 1 次凝集にはほとんど影響を示さなかった。また、観察し得た時間内

に 2 次凝集が出現した場合は、その最大凝集率には変化がなかった。血漿フィブロネクチンは、その接着性蛋白の性質により血小板に作用していることが考えられたが、特に低温の条件下でフィブリノゲンに対する親和性も有することから、以下の実験を行った。血漿フィブロネクチンをフィブリノゲンと 4°C の条件で一晩孵置し、各々別々に同一の条件にしておいたものと比較検討した。図 5 に示すように血漿フィブロネクチンをフィブリノゲンとともに一晩孵置した場合もその血小板凝集に対する影響に特に差はなく、血漿フィブロネクチンが直接フィブリノゲンに作用することにより血小板凝集に影響している可能性は少ないものと考えられた。図 6 は、血漿フィブロネクチン濃度を 720 μ g/ml と一定にして、フィブリノゲン濃度を変化さ

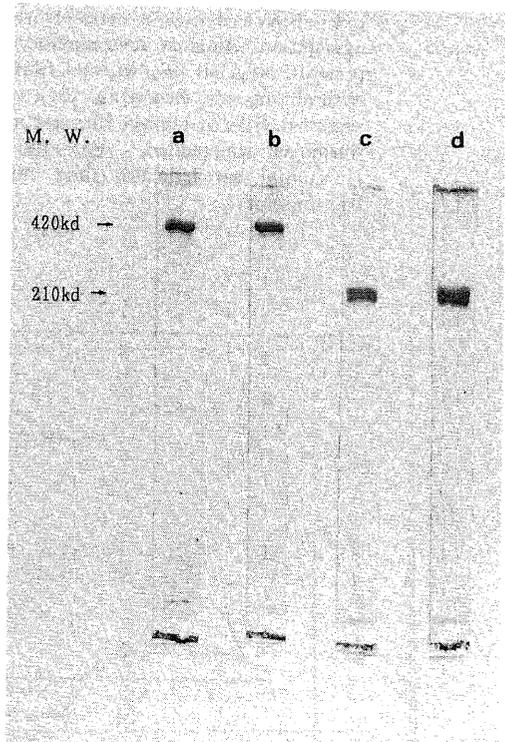


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified plasma fibronectin. Lane (a), plasma fibronectin from gelatin sepharose 4B, non-reduced. Lane (b), plasma fibronectin from arginine sepharose 4B, non-reduced. Lane (c), plasma fibronectin from gelatin sepharose 4B, reduced. Lane (d), plasma fibronectin from arginine sepharose 4B, reduced. A 4/5% gel was used and each slot was loaded with 2.5 μ g of protein. Samples were reduced with 2% 2-mercaptoethanol.

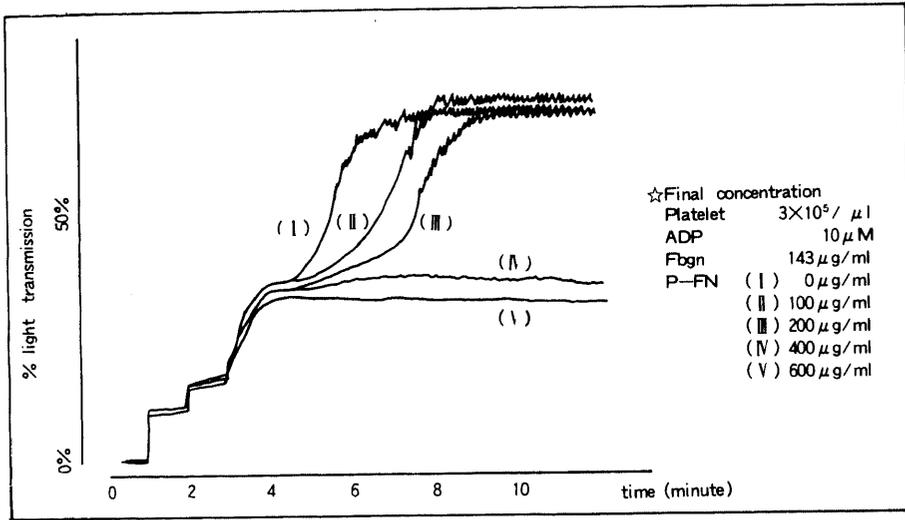


Fig. 4. Effect of various concentrations of plasma fibronectin (P-FN) on platelet aggregation. Various concentrations of plasma fibronectin were tested in the presence of ADP ($10\mu\text{M}$) and fibrinogen ($143\mu\text{g/ml}$). The assay was started with string and incubating $150\mu\text{l}$ of platelet suspension at 37°C . After two minutes, $50\mu\text{l}$ of plasma fibronectin was added. After three minutes, $25\mu\text{l}$ of fibrinogen was added. And after four minutes, $25\mu\text{l}$ of ADP was added. Horizontal bar indicates time (minute), and vertical bar indicates % light transmission.

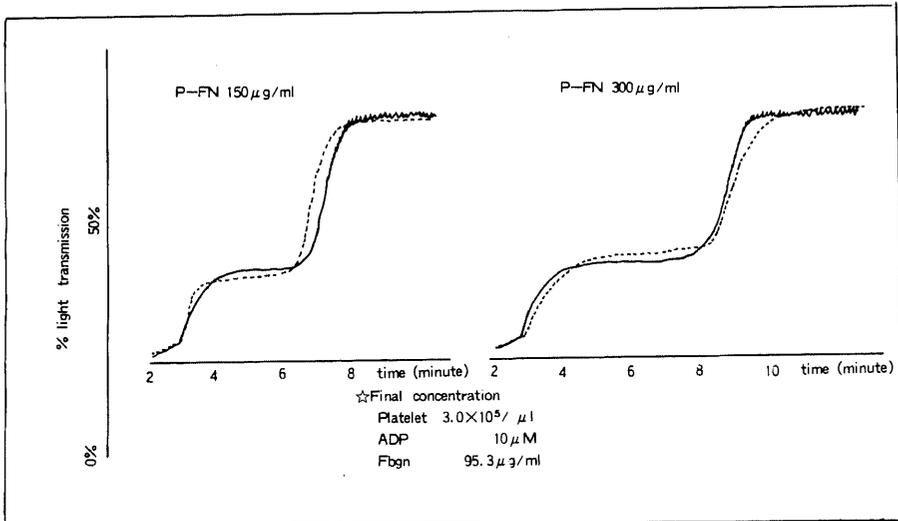


Fig. 5. Effect of incubation of plasma fibronectin with fibrinogen on inhibition of platelet aggregation by plasma fibronectin (P-FN). Solid line: Plasma fibronectin was incubated with fibrinogen over night at 4°C . Dotted line: Plasma fibronectin and fibrinogen were incubated separately over night at 4°C . Left figure: Final concentration of P-FN was $150\mu\text{g/ml}$. Right figure: Final concentration of P-FN was $300\mu\text{g/ml}$. Horizontal bar indicates time (minute) and vertical bar indicates % light transmission.

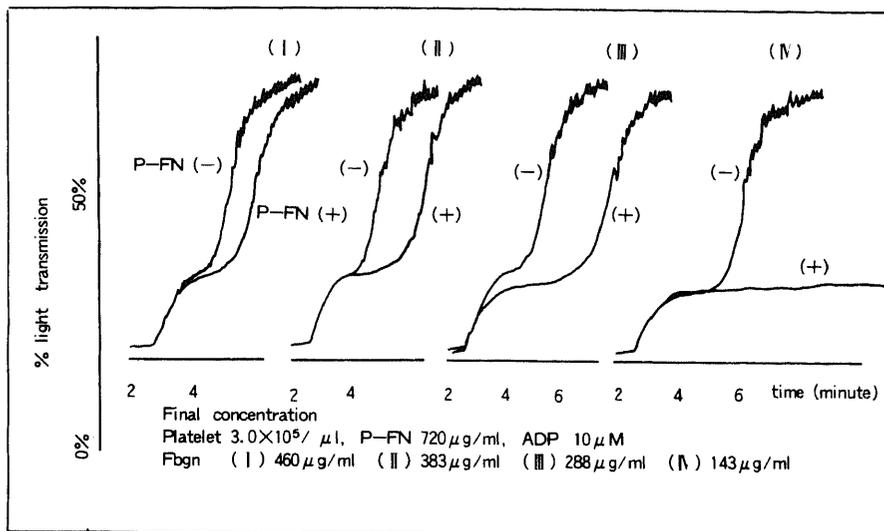


Fig. 6. Effect of various concentrations of fibrinogen on inhibition of platelet aggregation by plasma fibronectin (P-FN). Various concentrations of fibrinogen were tested in the presence of ADP ($10 \mu\text{M}$) and plasma fibronectin ($720 \mu\text{g/ml}$). Horizontal bar indicates time (minute), and vertical bar indicates % light transmission.

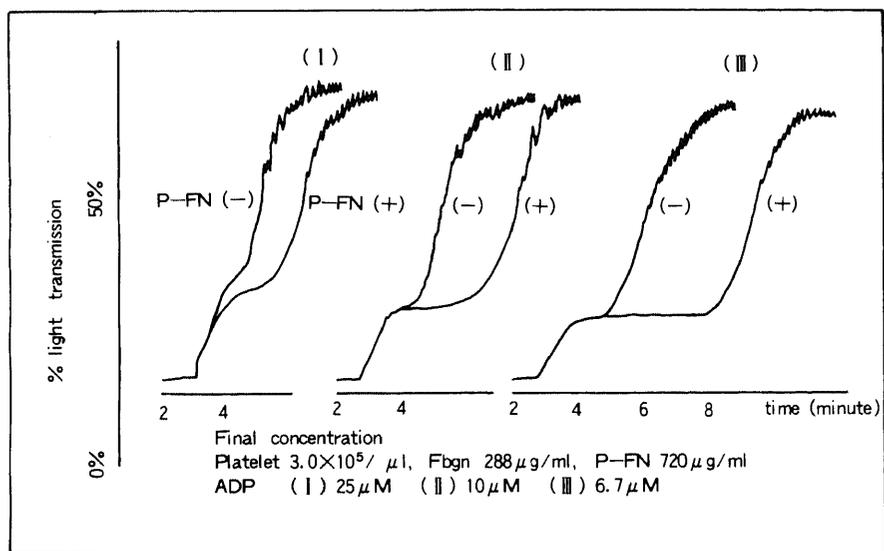


Fig. 7. Effect of various concentrations of ADP on inhibition of platelet aggregation by plasma fibronectin. Various concentrations of ADP were tested in the presence of fibrinogen ($288 \mu\text{g/ml}$) and plasma fibronectin ($720 \mu\text{g/ml}$). Horizontal bar indicates time (minute) and vertical bar indicates % light transmission.

せた場合の凝集能の変化を示している。フィブリノゲン濃度の低下にしたがって対照の凝集自体の潜時も若干の延長を認めるが、血漿フィブロネクチンの抑制的作用はフィブリノゲンの濃度の低い場合により顕著に認められた。しかしこの場合においても1次凝集は血漿フィブロネクチン添加により明らかな影響を受けることはなかった。図7に示すように、血漿フィブロネクチン濃度及びフィブリノゲン濃度を一定にしてADP濃度を変化させた場合は、より低い濃度のADPで刺激した場合に血漿フィブロネクチンの抑制的影響が顕著に認められた。

III. 洗浄血小板 ADP 凝集時の放出反応に対する血漿フィブロネクチンの影響

図8は添加した血漿フィブロネクチンの濃度とADP放出量の関係を示している。血漿フィブロネクチンを加えていない対照の凝集では約 $1.7 \mu\text{mol}$ 当量/ 10^{11} cellのATP放出を認めたが、二次凝集が抑制された条件すなわち480及び $720 \mu\text{g/ml}$ の血漿フィブロネクチンを添加した条件ではATP放出は強く抑制されていた。 $360 \mu\text{g/ml}$ の血漿フィブロネクチンを添加した場合に放出反応が抑制されたものと抑制されなかったものが見られたが、放出反応が抑制された場合はすべてその二次凝集も抑制されており、放出反応が抑制されなかった場合はすべて二次凝集も抑制されなかった。すなわち、血漿フィブロネクチンは、二次凝集を抑制したときのみ、つねに放出反応も抑制した。

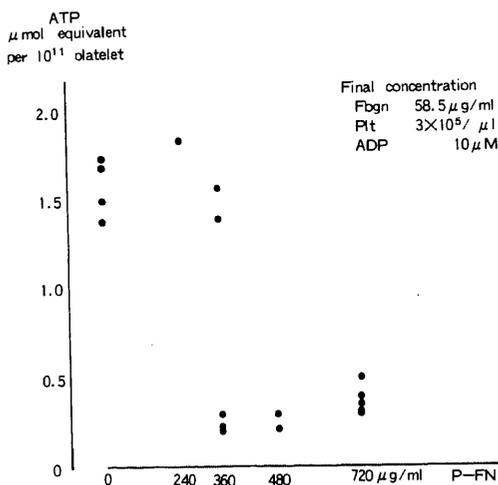


Fig. 8. Effect of plasma fibronectin on release reaction of platelets.

考 察

血漿フィブロネクチンは、はじめは細胞が腫瘍化するに伴ってその細胞表面量が減少してゆく蛋白質として注目された⁶⁰⁾が、現在では代表的な接着性蛋白質として細胞の接着や癌細胞の転移、組織の修復などにおける役割が精力的に研究されている⁶¹⁾。さらに最近では、この蛋白質が結合すること自体が細胞にとって一つの情報であり、その後の細胞の生理作用に影響を与えることが注目されている。血小板との関連についてもこれまでにいくつかの報告があるが、凝集という点だけに関してみてもその報告はさまざまであり、一定の見解は得られていない。血小板凝集に対して抑制的に働くとする報告も見られるが逆に凝集に必要であるとする報告もある。今回の実験の結果より、初めてヒト洗浄血小板のADP凝集を血漿フィブロネクチンが抑制することが明らかとなった。以下にその抑制機構に関して、さらにその生理的意義についてこれまでの報告との異同を交えて考察する。今回凝集能の検討にもちいた系の中にはヒト洗浄血小板、ADP、血漿フィブロネクチンおよびフィブリノゲンが含まれている。血漿フィブロネクチンは一次凝集にはほとんど影響を及ぼすことなく二次凝集を抑制したが、もし血漿フィブロネクチンがADPに対する血小板の反応性またはADPそのものに影響を及ぼして二次凝集を抑制していたのであれば、ADPが血小板を刺激することによって惹起される一次凝集がほとんど影響を受けなかったことが説明出来ない。すなわち血小板は血漿フィブロネクチン存在下においてもADPにより正常に刺激されたと考えられる。さらに血漿フィブロネクチンの抑制が用量依存性であったこと及び測定系中のフィブリノゲンが比較的低濃度である場合により顕著だったことを考えると、血漿フィブロネクチンは正常にADP刺激された血小板とフィブリノゲンの相互作用になんらかの影響を与えたと考えられる。血漿フィブロネクチンが血小板とフィブリノゲンのいずれに作用していたかという点に関しては、血漿フィブロネクチンとフィブリノゲンの親和性を非常に高くした条件においてもその抑制に特に変化を認めなかったことや、また今回の実験条件では両者の親和性はほとんど無視できる程度である⁶²⁾ことより、血漿フィブロネクチンはフィブリノゲンに対してではなく血小板に作用していたものと考えられた。血小板凝集は、活性化された血小板上に存在するGPII b/IIIaにフィブリノゲンが結合し血小板間を架橋することによって形成されると考えられている⁶³⁾⁻⁶⁴⁾こと、および精製したGPII

b/IIIa に血漿フィブロネクチンが結合すること²⁰⁾を考えあわせると、血漿フィブロネクチンは ADP により刺激された血小板膜表面の GPII b/IIIa に結合することによってフィブリノゲンの GPII b/IIIa への結合を阻害し、その結果二次凝集が阻害されたものと考えられた。しかしながら現時点では ADP 刺激された血小板に対して血漿フィブロネクチンが結合するという直接的な証拠は得られていない。Plow らはトロンビンで刺激された血小板に血漿フィブロネクチンが特異的に結合することを報告している⁶⁴⁾が、その報告のなかで ADP で刺激した場合は血漿フィブロネクチンは血小板に結合しなかったと述べている。もしそうであれば、血漿フィブロネクチンは血小板、ADP、フィブリノゲンのいずれとも作用することなく凝集のみを阻害したことになり、その抑制機構が説明できない。一方最近、血小板に種々のずり応力を加える実験が行われているが、その結果血小板膜上の接着性蛋白受容体の性質は受けるずり応力によって大きく変化することが明らかとなってきた^{65,66)}。小さなずり応力をうけている血小板 GPII b/IIIa はフィブリノゲンと高い親和性をもって結合し、vWF はほとんど結合しないが、大きなずり応力を受けている血小板の GPII b/IIIa はフィブリノゲンに対する親和性は非常に低く vWF と高い親和性をもって結合する。血漿フィブロネクチンと血小板の結合に対するずり応力の影響は明らかとはなっていないが、フィブリノゲンや vWF と同様にずり応力によって変化する可能性は充分考えられる。Plow らの行った実験は静置した血小板を用いており、凝集能測定は一定のずり応力のかかった条件で行われているため、血漿フィブロネクチンが凝集計のなかでは ADP により刺激された血小板に結合している可能性が考えられる。したがって今後凝集能測定と同一の条件で結合を評価し、抑制機構を明らかにする必要がある。一方、血漿フィブロネクチンが血小板凝集に及ぼす生理的な意味については依然として明らかではない。Cohen らは、血漿フィブロネクチンを除去した血漿に血小板を再浮遊させたのちにトロンビンや ADP で刺激して凝集能を検討しているが、その結果、血漿より血漿フィブロネクチンを除いても凝集能には変化は認められなかったとし、血漿フィブロネクチンは生体内での血小板凝集に重要な役割を演じていることはない⁶⁷⁾と考察している。今回の実験結果によれば、血漿フィブロネクチンが ADP 終濃度 $10\mu\text{M}$ で刺激した血小板凝集の二次凝集を完全に抑制した条件は血漿フィブロネクチンが $600\mu\text{g/ml}$ と血漿中の濃度の約 2 倍、フィブリノゲンが $143\mu\text{g/ml}$ と血漿中濃度の

約 20 分の 1 であり、特殊な病態または局所的な環境を想定する以外この条件は考えにくいし、Chone らの結果も納得できる。しかし、これから直ちに血漿フィブロネクチンの血小板凝集に対する生理的意義を否定することは出来ない。今回の実験結果によれば血漿フィブロネクチンの抑制的影響は低濃度の ADP 刺激時においてより顕著であったし、また生体内で血小板が受ける ADP 刺激の濃度は、今回の実験を含み一般に実験に使用される濃度よりはるかに低いと考えられることから、血漿フィブロネクチンは生体内において軽度刺激された血小板の凝集を抑制することにより血小板の反応性を調節している可能性が考えられる。

結 論

ヒト洗浄血小板の ADP 凝集に対する血漿フィブロネクチンの影響を血小板凝集計及び血小板放出反応測定計を用いて検討し、次のごとく結果を得た。

1. 血漿フィブロネクチンは、ヒト洗浄血小板 ADP 凝集の二次凝集を用量依存性に抑制した。
2. 血漿フィブロネクチンの抑制効果は低濃度のフィブリノゲンの存在する条件においてより顕著であった。
3. 血漿フィブロネクチンの抑制効果は低濃度 ADP 刺激時においてより顕著であった。
4. いずれの条件においても血漿フィブロネクチンは一次凝集に対してほとんど影響を与えなかった。
5. 血漿フィブロネクチンが二次凝集を抑制した条件では放出反応も明らかに抑制されていた。

以上の結果より、血漿フィブロネクチンはヒト洗浄血小板の ADP 凝集を抑制することが明らかとなった。また、血漿フィブロネクチンが凝集計内において ADP 刺激された血小板に結合している可能性が示唆され、また生理的にも血小板活性化を調節している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究について終止御指導をいただいた東京都臨床医学総合研究所山崎博男副所長、同研究所循環器病研究部門田上憲次郎室長、片桐康博主任研究員に心から感謝いたします。本研究の遂行にあたり御協力いただきました馬場糸子研究員、金沢大学第三内科第四研究室の各位に謝意を表します。なお、本論文の要旨は、第 12 回日本血栓止血学会において報告した。

文 献

- 1) Plow, E. F., Ginsberg, M. H. & Marguerie,

- G. A.: Expression and function of adhesive proteins on the platelet surface. In D. R. Phillips & M. A. Shuman, (eds.), *Biochemistry of Platelets*, 1st ed., p225-256, Academic Press, San-Diego, 1986.
- 2) **Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E.:** Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, **309**, 30-33 (1984).
 - 3) **Doolittle, R. F., Watt, L. W. K., Cottrell, B. A., Strong, D. D. & Riley, M.:** The amino acid sequence of α -chain of human fibrinogen. *Nature*, **280**, 464-468 (1984).
 - 4) **Rixon, M. W., Chan, W., Davie, E. W. & Chung, D. W.:** Characterization of a complementary deoxyribonucleic acid coding for the α -chain of human fibrinogen. *Biochemistry*, **22**, 3237-3244 (1983).
 - 5) **Sadler, J. E., Shelton-Inloes, B. B., Sorace, J. M., Harlan, J. M., Titani, K. & Davie, E. W.:** Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 6394-6398 (1985).
 - 6) **Lawler, J. & Hynes, R. O.:** The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell. Biol.*, **103**, 1635-1648 (1986).
 - 7) **Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. D.:** Arg-Gly-Asp, A versatile cell recognition signal. *Cell*, **44**, 517-519 (1986).
 - 8) **Gartner, T. K. & Bennett, J. S.:** The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11891-11894 (1985).
 - 9) **Ginsberg, M., Pierschbacher, M. D., Marguerie, G. & Plow, E. F.:** Inhibition of fibronectin binding to platelets by proteolytic fragments and synthetic peptides which support fibroblasts adhesion. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3931-3936 (1985).
 - 10) **Haverstick, D. M., Cowan, J. F., Yamada, K. M. & Santoro, S. A.:** Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived the cell-binding domain of fibronectin. *Blood*, **66**, 941-946 (1985).
 - 11) **Plow, E. F., Pierschbacher, N. D., Marguerie, G. & Ginsberg, M. H.:** The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 8057-8601 (1985).
 - 12) **Fressinaud, E., Sadler, J. E., Girma, J. P., Baumgartner, H. R. & Meyer, D.:** Synthetic RGS-containing peptides of von Willebrand factor inhibit platelet adhesion to collagen. *Thromb. Haemostas.*, **58**, 214 (1987) (abstr).
 - 13) **Galvin, N. J., Dixit, V. M., O'Rourke, K. M., Santoro, S. M., Grant, G. A., & Fraizer, W. A.:** Mapping of epitopes for monoclonal antibodies against human platelet thrombospondin with electron microscopy and high sensitivity amino acid sequencing. *J. Cell. Biol.*, **101**, 1434-1441 (1985).
 - 14) **Leung, L. L. K.:** Role of thrombospondin in platelet aggregation. *J. Clin. Invest.*, **74**, 1764-1772 (1984).
 - 15) **Dixit, V. M., Haverstick, D. M., O'Rourke, K. M., Henessy, S. W., Grant, G. A., Santoro, S. A., & Frazier, W. A.:** A monoclonal antibody against human thrombospondin inhibits platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **82**, 3472-3476 (1985).
 - 16) **Tuszynski, G. P., Rothman, V. L., Murphy, A., Siegler, K. & Knudsen, K. A.:** Thrombospondin promotes platelet aggregation. *Blood*, **72**, 109-115 (1988).
 - 17) **Hynes, R. O.:** Integrins : A family of cell surface receptors. *Cell*, **48**, 549-554 (1988).
 - 18) **Pytela, R., Pierschbacher, M. D., Ginsberg, M. H., Plow, E. F. & Ruoslahti, E.:** Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: Member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptor. *Science*, **231**, 1159-1562 (1986).
 - 19) **Gardner, J. M. & Hynes, R. O.:** Interaction of fibronectin with its receptor on platelets. *Cell*, **439-448** (1985).
 - 20) **Parise, L. V. & Phillips, D. R.:** Fibronectin-binding properties of the purified platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *J. Biol. Chem.*, **114011-114017** (1985).

- 21) **Coller, B. S.** : Interaction of normal, thrombasthenic, and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen. *Blood*, **55**, 169-178 (1980).
- 22) **Nachman, R. L. & Leung, L. L. K.** : Complex formation of platelet membrane GPIIb and IIIa with fibrinogen. *J. Clin. Invest.*, **69**, 263-269 (1982).
- 23) **Gogstad, G. O., Brosstad, F., Krutnes, M. B., Hagen, I. & Solum, N. O.** : Fibrinogen-binding properties of human platelet GPIIb/IIIa complex. A study using C. I. E., *Blood*, **60**, 663-671 (1982).
- 24) **Parise, L. V. & Phillips, D. R.** : Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor. *J. Biol. Chem.*, **260**, 10698-10707 (1985).
- 25) **Gralnick, R., Williams, S. B. & Coller, B. S.** : Fibrinogen competes with vWF for binding to the GPIIb/IIIa complex when platelets are stimulated with thrombin. *Blood*, **64**, 797-800 (1984).
- 26) **Plow, E. F., Srouji, A. H., Meyer, D., Marguerie, G. & Ginsberg, M. H.** : Evidence that three adhesive proteins interact with a common recognition site on activated platelets. *J. Biol. Chem.*, **259**, 5388-5391 (1984).
- 27) **DeMarco, L., Girolami, A., Zimmerman, T. S. & Ruggeri, Z. M.** : vWF interaction with GPIIb/IIIa complex. *J. Clin. Invest.*, **77**, 1272-1277 (1986).
- 28) **Coller, B. S., Peerschke, E. I., Scudder, L. E. & Sullivan, C. A.** : A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoprotein IIb and/or IIIa. *J. Clin. Invest.*, **72**, 325-338 (1983).
- 29) **Bennett, J. S., Hoxie, J. A., Leitman, S. F., Vilaire, G. & Cines, O. B.** : Inhibition of fibrinogen binding to stimulated human platelets by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 2417-2421 (1983).
- 30) **McEver, R. P., Bennett, E. M. & Martin, M. N.** : Identification of two structurally and functionally distinct sites of human platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5269-5275 (1983).
- 31) **Pidard, D., Montgomery, P. R., Bennett, J. S. & Kunicki, T. J.** : Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb/IIIa complex, with intact platelet. *J. Biol. Chem.*, **258**, 12582-12586 (1983).
- 32) **Bennett, J. S. & Vilaire, G.** : Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J. Clin. Invest.*, **64**, 1393-1401 (1979).
- 33) **Nurden, A. T., Rosa, J. P., Fournier, D., Legrand, C., Didry, D., Parquet, A. & Pidard, D.** : A variant of Glanzmann's thrombasthenia with abnormal glycoprotein IIb/IIIa complex in the platelet membrane. *J. Clin. Invest.* **79**, 962-969 (1987).
- 34) **Ginsberg, M. H., Lightsey, A., Kunicki, T. J., Kaufman, A., Marguerie, G. & Plow, E. F.** : Divalent cation regulation of the surface orientation of platelet membrane glycoprotein IIb. Correlation with fibrinogen binding function and definition of a novel variant of Glanzmann's thrombasthenia. *J. Clin. Invest.*, **79**, 1103-1111 (1986).
- 35) **Weiss, H. J., Turitto, V. T. & Bsumgartner, H. R.** : Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb/IIIa, Ib, and storage granules. *Blood*, **67**, 322-330 (1986).
- 36) **Laerence, J. B. & Gralnick, H. R.** : Monoclonal antibodies to the glycoprotein IIb/IIIa epitopes involved in adhesive protein binding: Effects of platelet spreading and ultrastructure on human arterial subendothelium. *J. Lab. Clin. Med.*, **109**, 495-503 (1987).
- 37) **Bennett, J. S. & Vilaire, G.** : Exposure of platelet fibrinogen receptor by ADP and epinephrine. *J. Clin. Invest.*, **71**, 1393-1401 (1979).
- 38) **Shattil, S. J. & Brass, L. F.** : Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J. Biol. Chem.*, **262**, 992-1000 (1987).
- 39) **Phillips, D. R. & Baughan, A. K.** : Identification of two steps requiring divalent cations. *J. Biol. Chem.*, 10240-10246 (1983).
- 40) **Shattil, S. J., Hoxie, J. A., Cunningham, M. & Brass, L. F.** : Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11107-11114 (1985).
- 41) **Coller, B. S.** : A new murine monoclonal

antibody reports an activation-dependent change in the conformation and/or microenvironment of platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *J. Clin. Invest.*, **76**, 101-108 (1985).

42) **Mustard, J. F., Packham, M. A., Kinlough-Rathbone, R. L., Perry, D. W. & Regoecz, E.**: Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood*, **52**, 453-466 (1978).

43) **Peerschke, E. I. B.**: The platelet fibrinogen receptor. *Semin. Hematol.*, **22**, 241-259 (1985).

44) **Nachman, R. L., Leung, L. L. K., Kloczewiak, M. & Hawiger, J.**: Complex formation of platelet membrane IIb and IIIa with the D domain. *J. Biol. Chem.*, **259**, 8584-8588 (1984).

45) **Marguerie, G. A., Plow, E. F. & Edginton, T. S.**: Human platelets possess an inducible and saturable receptors specific for fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5357-5363 (1979).

46) **Peerschke, E. I., Zucker, M. B., Grant, R. A., Egan, J. J. & Jhonson, M. M.**: Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. *Blood*, **55**, 841-847 (1980).

47) **Niiya, E., Hudson, E., Bader, R., Byers-Ward, V., Koziol, J. A., Plow, E. F. & Ruggeri, Z. M.**: Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood*, **70**, 475-483 (1987).

48) **Courtois, G., Ryckewaert, J. J., Woods, V. J., Ginsberg, M. H., Plow, E. F. & Marguerie, G. A.**: Expression of intracellular fibrinogen on the surface of stimulated platelets. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 61-67 (1986).

49) **Stenberg, P. E., Shuman, M. A., Levine, S. P. & Bainton, D. F.**: Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelet. *J. Cell. Biol.*, **98**, 748-760 (1984).

50) **Isenberg, W. M., McEver, R. P., Phillips, D. R., Shuman, M. A. & Bainton, D. F.**: The platelet fibrinogen receptor: An immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. *J. Cell. Biol.*, **104**, 1655-1663 (1987).

51) **Schulken, J., Jordan, J. & Montgomery, R. R.**: Interaction of von Willebrand factor with

human platelets in plasma milieu. *J. Clin. Invest.*, **73**, 421-428 (1984).

52) **Santoro, S. A.**: Inhibition of platelet aggregation by fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 135-140 (1983).

53) **Dixit, V. M., Haverstick, D. M., O'Rourke, K., Hennessy, S. W., Broekelmann, T. J., McDonald, J. A., Grant, G. A., Santoro, S. A. & Frazier, W. A.**: Inhibition of platelet aggregation by a monoclonal antibody against human fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3844-3848 (1985).

54) **Plow, E. F. & Ginsberg, M. H.**: Specific and saturable binding of plasma fibronectin to thrombin stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.*, **116**, 135-140 (1983).

55) **Nivelstein, P. F. E. M., D'Alessio, P. A. & Sixma, J. J.**: Fibronectin in platelet adhesion to human collagen type I and II. *Arteriosclerosis*, **8**, 200-206 (1988).

56) **Mustard, J. F., Perry, D. W., Ardlie, N. G. & Packham, M. A.**: Preparation of suspensions of washed platelet from humans. *Br. J. Hematol.*, **22**, 193-204 (1972).

57) **Kinlough-Rathbone, R. L., Packham, M. A. & Masterd, J. F.**: Platelet aggregation. In L. A. Harker & T. S. Zimmerman (eds.), *Methods in Hematology, Measurements of Platelet Function*, 1st ed., p64, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.

58) **Charo, I. F., Feinman, R. D. & Petweiler, I. C.**: Inter-relations of platelet aggregation and secretion. *J. Clin. Invest.*, **60**, 866-873 (1977).

59) **Peterson, T. E., Skorstengaard, K. & Vibe-Pedersen, K.**: Primary structure of fibronectin. In D. F. Mosher, (ed.), *Fibronectin*, 1st ed., p1-45, Academic Press, San Diego, 1989.

60) **Engvall, E. & Ruoslahti, E.**: Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer.*, **20**, 1-5 (1977).

61) **Juliano, R. L.**: Membrane receptors for extracellular matrix macromolecules: relationship to cell adhesion and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **907**, 261-278 (1987).

62) **Ruoslahti, E. & Vaheri, A.**: A interaction of fibronectin with fibrinogen and fibrin. *Identity*

with cold insoluble globulin of human plasma. *J. Exp. Med.*, **141**, 497-501 (1975).

63) Moake, J. L., Turner, N. A., Stathopoulos, N. A., Nolasco, L. & Hellums, J. D.: Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood*, **71**, 1366-1374 (1988).

64) Weiss, H. J., Hawiger, J., Ruggeri, Z. M.,

Turitto, V. T., Thiagarajan, P. & Hoffman, t.: Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *J. Clin. Invest.*, **83**, 288-297 (1989).

65) Cohen, I., Potter, E. V., Glaser, T., Entwistle, R., Davis, L., Chediak, J. & Anderson, B.: Fibronectin in von Willebrand's disease and thrombasthenia: Role in platelet aggregation. *J. Lab. Clin. Med.*, **97**, 134-140 (1981).

Inhibition of ADP-induced Platelet Aggregation by Plasma Fibronectin

Ichiro Kumabashiri, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **99**, 173—185 (1990)

Key words fibronectin, washed human platelets, ADP-induced platelet aggregation, release reaction of platelets, fibrinogen

Abstract

It has been well known that some kinds of adhesive protein are involved in platelet aggregation, but the exact role of them is still unclear. In this paper, the effect of plasma fibronectin on ADP-induced aggregation and the release reaction of washed human platelets was investigated. In the presence of fibrinogen ($148 \mu\text{g/ml}$) and ADP ($10 \mu\text{M}$), plasma fibronectin prolonged the lag-time of the secondary aggregation in a dose-dependent manner, and completely inhibited the secondary aggregation at a concentration of $600 \mu\text{g/ml}$. At a fixed concentration of plasma fibronectin ($720 \mu\text{g/ml}$), its inhibitory effect was more evident when a lower concentration of fibrinogen or ADP was present. The secretion of ATP from the platelets was also inhibited by plasma fibronectin, when the secondary aggregation was inhibited. Plasma fibronectin did not inhibit primary aggregation under any of the conditions. The inhibitory effect of plasma fibronectin remained unchanged even when the affinity of plasma fibronectin to fibrinogen was enhanced by the incubation of plasma fibronectin with fibrinogen over night at 4°C . From these results and from the low affinity of plasma fibronectin to fibrinogen under experimental conditions, it is concluded that plasma fibronectin inhibited the binding of normally ADP-stimulated platelets to fibrinogen, and consequently inhibited the platelet aggregation. The physiological role of plasma fibronectin upon platelet aggregation remains unclear. A concentration of $600 \mu\text{g/ml}$ of plasma fibronectin was necessary to completely inhibit platelet aggregation induced by ADP in the presence of $143 \mu\text{g/ml}$ of fibrinogen. Considering that the concentrations of plasma fibronectin were twofold and the fibrinogen concentration was one twentieth of normal plasma, concentrations of these two kinds of adhesive protein are not physiological. However, the inhibitory effect of plasma fibronectin was more pronounced when the platelets were stimulated by a lower dose of ADP, and it is supposed that platelets in the circulation are stimulated by a far lower concentration of ADP than the experimental concentration. Therefore, the results obtained here suggest that plasma fibronectin regulates the aggregability of platelets in vivo.