

〈原著〉

抗フィブロネクチンモノクローナル抗体MOの反応性の検討

岡田 真理子¹⁾、福岡 史奈^{1,3)}、佐川 輝高¹⁾、櫃本 泰雄²⁾

Examination of the properties of a monoclonal anti-fibronectin antibody MO

Mariko Okada¹⁾, Mina Fukuoka^{1,3)}, Terutaka Sagawa¹⁾ and Yasuo Hitsumoto²⁾

Summary The properties of an anti-fibronectin monoclonal antibody MO which recognizes an epitope on a subpopulation of human neutrophils were examined. The result of an ELISA examination showed that MO specifically bound to immobilized fibronectin only at low temperature but not at 37°C. MO was found to dissociate from the antigen by an incubation at 37°C. Flow cytometric analysis revealed that the ratio of the MO-binding subpopulation of neutrophils increased by the stimulation of whole blood with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. This result suggested that MO recognized an epitope expressed on primed (or activated) neutrophils. In the presence of heparin or citrate but not of EDTA, MO bound to platelets in addition to neutrophils. The present study indicates that MO can be a useful tool for investigating the structure and function of fibronectin on the surface of neutrophils and platelets in whole blood.

Key words: Anti-fibronectin-antibody, Monoclonal, Neutrophils, Platelets, f-MLP

I. 緒言

フィブロネクチンは線維芽細胞、上皮細胞、肝細胞などの様々な細胞により産生される多機能糖タンパク質のひとつで、細胞外マトリックスを形成して細胞遊走、細胞接着、細胞シクナリング、細胞分裂のコントロールなどに関わるとともに、体液中では可溶性タンパク質として非特異的オプソニン活性を担っていると考えら

れている^{1,2,3)}。最近、ヒト好中球がまれなアイソタイプのフィブロネクチンを産生し、好中球細胞膜上にもフィブロネクチンが結合しているという報告がなされた⁴⁾が、細胞膜上でのフィブロネクチンの構造や結合の仕方、その機能などについては不明である。

抗フィブロネクチンモノクローナル抗体MOはヒト血漿由来フィブロネクチンを抗原として作製されたIgMタイプのモノクローナル抗体で、

¹⁾愛媛県立医療技術大学 保健科学部 臨床検査学科
〒791-2101 愛媛県伊予郡砥部町高尾田543

²⁾岡山理科大学 理学部

³⁾現所属: 愛媛大学医学部付属病院 検査部

¹⁾Department of Medical Technology, Ehime Prefectural University of Health Sciences, 543 Tako-oda, Tobe-cho, Iyo-gun, Ehime 791-2101, Japan

²⁾Department of Life Science, Okayama University of Science

³⁾Department of Clinical Laboratory, Ehime University Hospital

受領日 平成25年9月27日

受理日 平成25年10月3日

液相中のフィブロネクチン分子との結合性は弱く、もっぱら固相化したフィブロネクチン分子と結合する⁵⁾。そのような性質を反映して、MOは健康人のEDTA加全血中で、血漿中にはフィブロネクチンが $\sim 300 \mu\text{g/mL}$ の濃度で存在するにもかかわらず、一部の好中球の細胞膜と結合し、好中球集団をMO陽性好中球とMO陰性好中球の2つのサブポレーションに分別する⁵⁾。現在のところMOが認識するフィブロネクチン分子中のエピトープ部位や、好中球膜上でMOと結合するエピトープ (MOエピトープ) を有する物質の本体、MO陽性好中球とMO陰性好中球の機能の違いなどについては不明であるが、健康人における好中球集団中のMO陽性好中球の割合 (MO陽性率) には0%~60%と個人差が大きく、男性より女性の方が若干高い傾向にあることが分かっている^{5,6)}。

通常、MOを用いた抗原抗体反応は4℃、一部は室温で行っていたが、我々はMOを低温で好中球に結合させた後、37℃に温度を上げるとMO陽性好中球がMO陰性好中球に変化することを観察した。このことは、加温によりMOと好中球細胞膜物質との抗原抗体複合物が細胞から放出あるいは細胞内に取り込まれたか、もしくはMO単独が抗原抗体複合物から解離したことを示唆した。そこで、今回あらためて、MOと本来の抗原であるフィブロネクチンとの抗原抗体反応に反応温度がどのように影響を与えるか、ELISAにより検討した。

一方で、我々はMO陽性好中球がMO陰性好中球に比べて生体内で機能的になんらかの活性化を受けた状態の好中球ではないかと仮定した。もしそうであると、*in vitro*で好中球集団を活性化するとMO陽性好中球の割合が増加するはずである。formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-MLP) は好中球遊走因子の一つで、好中球のさまざまな活性を亢進させる⁷⁻¹⁰⁾。今回、全血液をf-MLPにより刺激すると好中球集団中のMO陽性率にどのような変動があるかについてフローサイトメトリーにより検討を加え、好中球活性化とMO陽性化の関連を探った。同時に、抗凝固剤としてEDTAだけでなくヘパリンあるいはクエン酸を用いて採血した全血液を用いてf-MLPの影響を調べるとともに、好中球集団以外の血液細胞集団とMOの結合性について検討した。

II. 方法と材料

抗体：抗フィブロネクチンモノクローナル抗体MO (IgMアイソタイプ) とHB91 (IgG1アイソタイプ) は既報の通りに精製した⁵⁾。抗血小板モノクローナル抗体TP80 (血小板GP II b/GP III a 特異的、IgG1アイソタイプ) は市販品 (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いた。

ELISA：平底マイクロプレート (Nalge Nunc International) の各ウェルをフィブロネクチン (Exocell) ($5 \mu\text{g/mL}$) $50 \mu\text{L}$ で通常の条件でコートしたのち、0.5% Tween加リン酸緩衝生理食塩水で抗原未反応表面をブロックして抗原プレートを作成した。モノクローナル抗体と4℃もしくは37℃で60分間、2段階インキュベーションする際は4℃もしくは37℃で60分間、さらに、4℃もしくは37℃で60分間反応させた。0.5% Tween加リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、2次抗体としてHRPO標識抗マウスIgG+IgM(H+L)goat F(ab)₂ (Biosource) を4℃で反応させた。洗浄後、ABTS基質溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) を加えて室温で発色させ、1% SDSで反応を停止させて414 nMの吸光度をマイクロプレートリーダー (Immuno Mini NJ-2300, Nalge Nunc) で測定した。測定はすべてduplicationで行い、結果はそれらの吸光度の平均値で示した。

血液検体：口頭および文書で研究内容の説明を行い、実験参加の同意を得た複数の健康人から血液の提供を受けた。血液検体は実験当日、実験終了後に廃棄した。

f-MLPと血液の反応：f-MLPはSigma製品を用いた。DMSO (Sigma) に1 mMに溶解したものを-30℃において凍結した保存溶液を、使用直前に溶解し、Dulbecco'sリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) で必要な濃度に希釈して用いた。コントロールとしては溶媒のみをPBS(-)で希釈したものを用いた。血液は採血後、実験操作に伴う不必要な活性化を避けるため実験直前まで4℃に保存し、種々の濃度のf-MLPと37℃で15~60分間反応後は、直ちに4℃に冷却した。

フローサイトメトリー：MOおよびTP80と血液細胞との結合はフローサイトメトリーで解析した。EDTA (最終濃度3.5 mM)、ヘパリン (最

終濃度 1 U/mL)、クエン酸 3 ナトリウム (最終濃度 4 mg/mL) いずれかを加え抗凝固した末梢血全血 100 μ L に 1 次抗体として MO 2.5 μ g、あるいは MO 2.5 μ g と TP80 1 μ g の混合物を加え 4 $^{\circ}$ C で 45 分間反応させた。アイソタイプコントロールとして MO に対しては TEPC-183 (Sigma) 2.5 μ g、TP80 に対しては MOPC-21 (Sigma) 1 μ g を同様に反応させた。反応終了後、冷却した PBS(-)0.5%NaN₃ (PBS-NaN₃) 1 mL で 1 回洗浄し、次に 2 次抗体として最適濃度に PBS-NaN₃ で希釈した FITC 標識 rat anti-mouse IgM (ROCKLAND) あるいは FITC 標識 rat anti-mouse IgM と PE 標識 goat anti-mouse IgG-F(ab')₂ (Beckman Coulter) の混合物を 100 μ L 加えて 4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。2 次抗体の添加以降は暗所で操作した。溶血試薬として OptiLyseC (Beckman Coulter) 500 μ L を検体に加え室温で 10 分間静置し、同量の PBS-NaN₃ を加えてさらに 15 分間静置した。その後ただちに EPICS XL system2 (Beckman Coulter) により、好中球集団あるいは血小板集団にゲートをかけ MO 陽性率および TP80 陽性率を測定した。

倫理委員会の承認：本研究は愛媛県立医療技術大学倫理委員会の承認を経て行われた。

Ⅲ. 結果

1. 固相化フィブロネクチンへの MO 結合におよぼす反応温度の影響

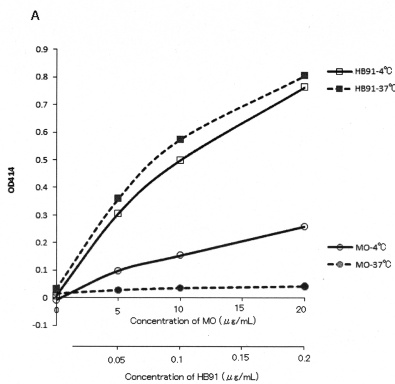


Fig. 1A に示すように、MO は 4 $^{\circ}$ C では濃度依存的に固相化フィブロネクチンと結合したが、37 $^{\circ}$ C では結合が認められなかった。比較として用いた IgG1 タイプの抗フィブロネクチンモノクローナル抗体 HB91 は 4 $^{\circ}$ C においても 37 $^{\circ}$ C においても同等の結合が認められた。MO をまず 4 $^{\circ}$ C において固相フィブロネクチンとあらかじめ結合させておいても、引き続きインキュベーション温度を 37 $^{\circ}$ C に上げると結合が認められなくなった (Fig. 1B)。HB91 は 2 ステップの反応温度のどの組み合わせでも同等の結合がみられ、温度による抗原抗体反応への影響は認められなかった (Fig. 1C)。この結果から、MO は 4 $^{\circ}$ C では固相フィブロネクチンと結合するが 37 $^{\circ}$ C では結合せず、いったん 4 $^{\circ}$ C で結合したフィブロネクチンからも 37 $^{\circ}$ C では解離することがわかった。以下の MO と血液細胞との反応は水浴中で行った。

2. f-MLP 刺激が好中球集団の MO 陽性率におよぼす影響

EDTA 加全血液に f-MLP (最終濃度 10 nM) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートすると好中球集団中 (Fig. 2A) の MO 陽性好中球の割合 (MO 陽性率) が、無添加 (Fig. 2B M1 部分) に比べ増大した (Fig. 2C M1 部分)。好中球集団中の MO 陽性率は f-MLP とのインキュベーション時間とともに増加し (Fig. 3A)、MO 陽性好中球の平均蛍光強度にも増強が認められた (Fig. 3B)。f-MLP 無添加の場合は EDTA 加全血液を

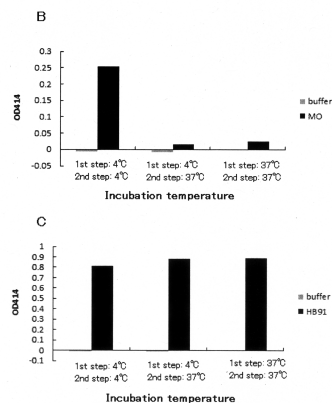


Fig. 1 Effect of the incubation temperature on the binding of MO and HB91 to immobilized fibronectin. A) MO (0~20 μ g/mL) or HB91 (0~0.2 μ g/mL) was incubated with immobilized fibronectin at 4 $^{\circ}$ C (solid lines) or 37 $^{\circ}$ C (dotted lines). B) MO or C) HB91 was first incubated with immobilized fibronectin at 4 $^{\circ}$ C or 37 $^{\circ}$ C for 60 minutes (1st step) and then further incubated at 4 $^{\circ}$ C or 37 $^{\circ}$ C for 60 minutes (2nd step).

37°Cで60分間インキュベートしてもMO陽性率にもMO陽性好中球の平均蛍光強度にもインキュベーション前と変化がなかった (Fig. 3A, B)。抗凝固剤としてEDTA以外にヘパリンやクエン酸を用いて採血した全血液に対し、f-MLPの濃度を変化させて好中球集団への影響を調べた。どの抗凝固剤を用いてもf-MLPによるMO陽性率の増加が認められ、その効果はf-MLPの濃度に依存的であった (Fig. 4)。

3. MOと血液細胞との反応性の検討

我々はすでに、EDTA加全血液中ではMOは血液細胞の中で一部の好中球以外には結合しない

ことを報告している^{5,6)}。ところが今回、ヘパリンあるいはクエン酸を抗凝固剤として加えた全血液を用いて、MOと血液細胞との結合性を検討した結果、EDTA加全血液では確かにMOは好中球の一部にのみ結合し、それ以外の細胞集団には結合しないが、ヘパリンあるいはクエン酸加全血液中ではMOは好中球以外に血小板集団にも結合することが分かった (Fig. 5B, C, D)。リンパ球集団には今回用いた3種類のどの抗凝固剤を用いてもMOは結合しなかったが、単球集団にはヘパリンあるいはクエン酸で抗凝固した血液では一部結合が認められた (data not shown)。

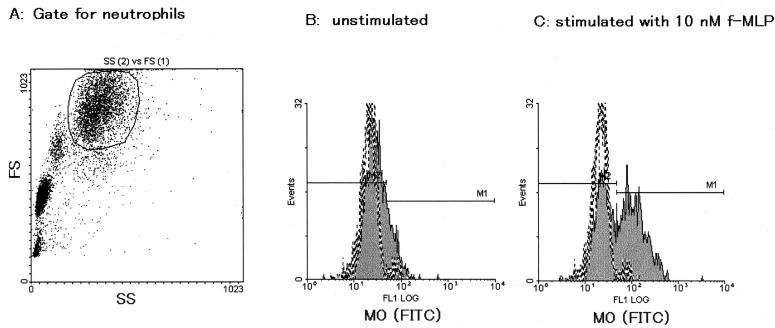


Fig. 2 Flow cytometric analysis of the expression of MO-epitope on the surface of neutrophils stimulated with f-MLP. Whole blood samples anticoagulated by EDTA were incubated with 10 nM f-MLP or with vehicle alone at 37°C for 15 minutes, and immediately after the incubation, samples were cooled at 4°C and then analyzed the MO-binding to neutrophils by flow cytometry. A) gate for neutrophils. B) neutrophils incubated with vehicle alone (solid line). C) f-MLP-stimulated neutrophils (solid line). Isotype controls (dotted lines). M1: MO-positive fraction, M2: MO-negative fraction. Results of one of typical experiments are shown.

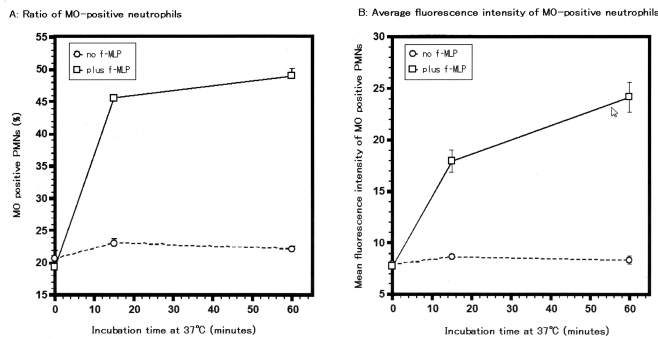


Fig. 3 Time kinetics of MO-expression on the surface of neutrophils stimulated with f-MLP. Whole blood samples anticoagulated by EDTA were incubated with 10 nM f-MLP (□solid lines) or with vehicle alone (○dotted lines) at 37°C for indicated time (0~60 minutes). Immediately after the incubation, samples were cooled at 4°C and then analyzed the MO-binding to neutrophils by flow cytometry. A) ratio of MO-positive neutrophils. B) average fluorescence intensity of MO-positive neutrophils. Data are expressed as the mean ± SD of triplicate assay.

4. TP80とMOによる2重染色

Fig. 5Aのゲートをかいた集団が確かに血小板であることを確認するために、EDTA加血液とヘパリン加血液を用いて血小板膜タンパクGP II b/III aに特異的な抗体TP80とMOによる2重染色を行った (Fig. 6)。EDTA存在下ではゲート内集団のほぼすべて (97.2%) がTP80陽性MO陰性であった。ヘパリン加全血液ではTP80陽性の一部がMO陽性 (この検体では37.5%) で一部はMO陰性 (15.8%) であった。ヘパリン加血液ではEDTA加血液と異なり、ゲート内集団中にかなりの割合 (46.1%) でTP80陰性MO陰性が含まれていた。ヘパリン加血液中では単球集団にもTP80の結合が見られた (data not shown)。

Ⅳ. 考察

我々は好中球細胞膜上のMOが認識する物質の探索を行う過程で、いったん好中球にMOを低温で結合させた後、37℃において酵素切断によりMOとフィブロネクチンのエピトープを保有する細胞膜上物質との抗原抗体複合物を単離しようと試みた。その際、酵素を作用させなくても37℃に反応温度を上げるだけでMO陽性好中球がMO陰性好中球に変化することを観察した。このことは、加温によりMOと好中球細胞膜物質との抗原抗体複合物が細胞から放出あるいは細胞内に取り込まれたか、もしくはMO単

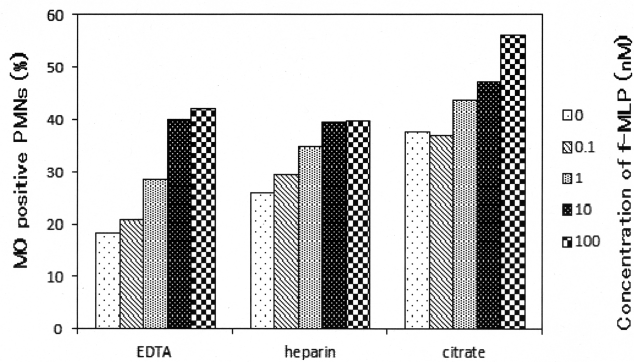


Fig. 4 Effect of f-MLP-concentration on the ratio of MO-positive neutrophils. Blood from a donor was divided into three tubes and anticoagulated by either EDTA, heparin or citrate. These blood samples were incubated with various concentrations of f-MLP (0~100 nM) at 37℃ for 15 minutes and then analysed the MO-binding to neutrophils by flow cytometry. Results of one of typical experiments are shown.

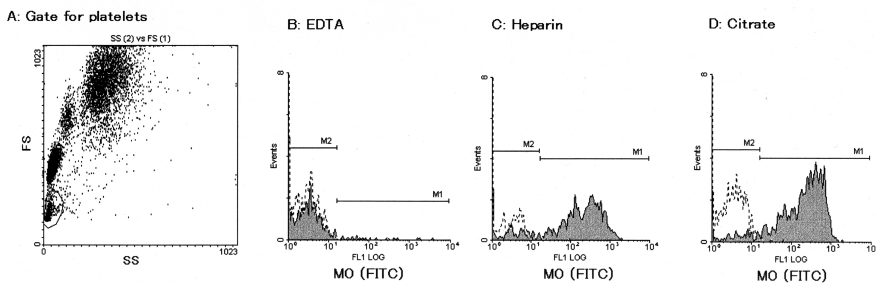


Fig. 5 Effect of anticoagulant on the MO-binding to platelets in whole blood. A) gate for platelets. Blood from a donor was divided into three tubes and anticoagulated by either B) EDTA, C) heparin, or D) citrate, and MO-binding to platelets in these blood samples was analyzed by flow cytometry (solid lines). Isotype control (dotted lines). M1:MO-positive platelets. M2: MO-negative platelets. These results were obtained from the same assays in Fig.4 (at the concentration of f-MLP: 0 nM) by gating for platelets.

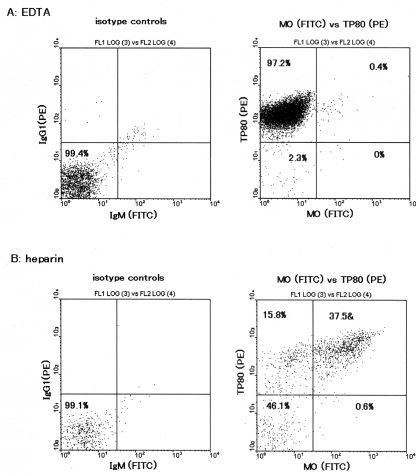


Fig. 6 Double staining of platelets by MO and TP80. Blood from a donor was divided into two tubes and anticoagulated by A) EDTA or B) heparin. Immediately after the bleeding, these blood samples were analyzed TP80- and MO-bindings to platelets by flow cytometry. Left panels: isotype controls.

独が抗原抗体複合物から解離したことを示唆した。そこで、好中球細胞膜ではなく、本来の抗原であるフィブロネクチンをコートした固相プレートを用い、ELISAによりMOと抗原との結合反応に及ぼす温度の影響を検討した。その結果、MOは低温では固相フィブロネクチンに結合するが、37℃ではほとんど結合せず、さらに、いったん4℃で固相フィブロネクチンに結合させておいても、37℃に温度を上げるとMOは固相フィブロネクチンから解離することが明らかとなった。したがって、上述の37℃に反応温度を上げるだけでMO陽性好中球がMO陰性好中球に変化する現象は、好中球に結合したMOが細胞膜表面上の抗原物質から解離したことによるものと考えられた。もともとMOは液相中のフィブロネクチン分子との結合性が弱く、もっぱら固相化したフィブロネクチン分子と結合する抗体であることが分かっていた⁹⁾が、今回の結果より、MOは固相抗原と低温でのみ結合できる抗体であることが明らかとなった。従前の2報の研究では、MOとEDTA加全血液との反応は室温⁹⁾、もしくは4℃で行っており⁶⁾、いずれの報告でも、それぞれすべての血液検体とMOは

同一条件で反応させて値を比較している。したがって、MOが好中球集団をMO陽性好中球とMO陰性好中球の2つのサブポピュレーションに分別し、全血中のMO陽性好中球の割合に個体差が大きいという結論に変わりはない。

現在のところ好中球細胞膜上でMOと結合する物質の本体や、MOが認識するフィブロネクチン分子中のエピトープ部位は明らかではないが、我々はMO陽性好中球がMO陰性好中球に比べて生体内で機能的になんらかの活性化を受けた状態の好中球ではないかと仮定した。もしそうであると、in vitroで好中球集団を活性化するとMO陽性好中球の割合が増加するはずである。生体が炎症反応にさらされると血管内の好中球は休止状態から何段階かの活性化を受け、血管内皮に接着後、それをすり抜けて組織内に移動し、さらに炎症局所に遊走していく^{12,13)}。formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-MLP)は炎症反応に関わる好中球遊走因子の一つで、in vitroにおいて好中球のさまざまな活性をCa²⁺イオン依存性とCa²⁺イオン非依存性の経路によって亢進させる物質である⁷⁻¹¹⁾。今回の結果から、f-MLPは用量および時間依存的に、さらに細胞外2価イオン非依存的に全血液中のMO陽性好中球の割合を増加させることが明らかとなり、f-MLPによる刺激がMO陰性好中球をMO陽性好中球に変化させることが示された。もともと結合組織内フィブロネクチンは炎症時における好中球と結合組織との接着や細胞遊走に密接にかかわる分子であるが、好中球が炎症刺激を受けるとフィブロネクチンが持つエピトープのひとつであるMOエピトープが好中球自身の細胞膜表面に表出することは、炎症過程における好中球の変化を考えるうえで興味深い現象である。

一方、EDTA加全血中では既報通りMOは一部の好中球にしか結合しなかったが⁹⁾、ヘパリンやクエン酸で抗凝固した血液液中では好中球集団の一部以外に血小板集団の一部にも結合することが今回新たに明らかになった。血小板膜タンパクGP II b/III a複合体分子に特異的な抗体であるTP80とMOの2重染色の結果は、血小板集団はTP80陽性MO陽性血小板とTP80陽性MO陰性血小板に分別されることを示している。フローサイトメトリーで識別される血小板集団中にはTP80陰性で血小板以外と思われる粒子も含まれ

ていたが、これはおそらく何らかの細胞断片であろうと考えられる。血小板にはGP II b/III a複合体分子をはじめ複数の種類のフィブロネクチン受容体が発現し、血小板が活性化されるとこれらの受容体分子はCa²⁺イオン依存性にフィブロネクチンと結合して血小板と結合組織との接着や血小板凝集反応にかかわるとされている¹⁴⁾。未刺激血小板上でMOエピトープが2価イオン依存性に観察されたことは、血小板のフィブロネクチン受容体と血漿由来フィブロネクチンとが活性化とは無関係に何らかの相互作用をしていることを意味するのか、あるいは実験操作中に血小板の一部が機械的に活性化されてフィブロネクチンが結合し、それを検出したのか、今回の結果からだけでは明確なことはわからない。血小板上のMOエピトープの本体についても好中球膜上のMOエピトープの本体と同様、さらに、詳細に検証する必要がある。今回、ヘパリン血では単球集団にもMOの結合が見られたが、同時にTP80も結合したことから、おそらく単球に血小板が結合し¹⁵⁾、その結合物が単球集団ゲート内に含まれていたのであろう。

好中球も血小板も分離操作などの機械的な刺激によっても容易に活性化しうる細胞である。したがって、採血という最小限の操作しか加えずに生理的条件下に近い環境下でこれらの細胞膜表面のフィブロネクチンエピトープを追跡できるMOは、低温でしか抗原抗体反応を起こさないという制限はあるものの、フィブロネクチンの細胞膜上での構造や機能を研究する上で有用な抗体であることが示唆された。

文献

- 1) Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Peterson K, and Baralle FE: Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J*, 4: 1755-1759, 1985.
- 2) Pankov R, and Yamada KM: Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*, 115: 3861-3863, 2002.
- 3) Drossou V, Kanakoudi F, Diamanti E, Tzimouli V, Konstantinidis T, Germenis A, Kremenopoulos G, and Katsougiannopoulos V: Concentrations of main serum opsonins in early infancy. *Arch Dis Child*, 72: F172-F175, 1995.
- 4) Wagner C, Pioch M, Meyer C, Iking-Konert C, Andrassy K, and Hänsch GM: Differentiation of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic infections and chronic inflammatory diseases: evidence of prolonged life span and *de novo* synthesis of fibronectin. *J Mol Med*, 78: 337-345, 2000.
- 5) Okada M and Hitsumoto Y: A unique monoclonal antibody against human plasma fibronectin, which recognizes an epitope on the surface of a subpopulation of polymorphonuclear neutrophils. *Hybridoma*, 25: 202-208, 2006.
- 6) 岡田真理子, 川崎麻美, 中城 敏, 櫃本泰雄: 成人好中球細胞膜におけるフィブロネクチンエピトープ発現の多様性. *愛媛県立医療技術大学紀要*, 5: 39-43, 2008.
- 7) Bender JG, McPhail LC and Van Epps DE: Exposure of human neutrophils to chemotactic factors potentiates activation of the respiratory burst enzyme. *J Immunol*, 130: 2316-2323, 1983.
- 8) Berger M, O'Shea J, Cross AS, Folks TM, Chused TM, Brown EJ, and Frank MM: Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J Clin Invest*, 74: 1566-1571, 1984.
- 9) Sayeed MM: Exuberant Ca²⁺ signaling in neutrophils: A cause for concern. *News Physiol Sci*, 15: 130-136, 2000.
- 10) Kelher MR, Ambruso DR, Elzi DJ, Anderson SM, Paterson AJ, Thurman GW, and Silliman CC: Formyl-Met-Leu-Phe induces calcium-dependent tyrosine phosphorylation of Rel-1 in neutrophils. *Cell Calcium*, 34: 445-455, 2003.
- 11) Condliffe AM, Webb LMC, Ferguson GJ, Davidson K, Turner M, Vigorito E, Manifava M, Chilvers ER, Stephens LR, and Hawkins PT: RhoG regulates the neutrophil NADPH oxidase. *J Immunol*, 176: 5314-5320, 2006.
- 12) Bokoch GM: Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, 86: 1649-1660, 1995.
- 13) Herrmann JM, Bernardo J, Long HJ, Seetoo K, McMenamin ME, Batista EL, Van Dyke TE, and Simons ER: Sequential chemotactic and phagocytic activation of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*, 75: 3989-3998, 2007.
- 14) Bennett JS, Berger BW, and Billings PC: The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemost*, 7: 200-205, 2009.
- 15) Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, and Barandun S: Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood*, 67: 629-636, 1986.