

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590858
 研究課題名（和文） 組織プラスミノゲンアクチベーター特有の分泌動態に関連した新規血管機能制御機構
 研究課題名（英文） Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and vascular function
 研究代表者
 鈴木 優子（SUZUKI YUKO）
 浜松医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20345812

研究成果の概要：近年、生活習慣病などに起因する心血管病の増加とともに、その病態基盤として血管内皮傷害が注目されている。正常血管内皮細胞は血栓形成を抑制し生じた血栓を溶解する機能を有するが、傷害内皮ではこれらの機能に異常をきたす。本研究では血栓溶解を担う線溶活性化因子に着目し、その内皮細胞からの分泌動態を蛍光顕微鏡によりリアルタイムに解析し、新たな線溶活性調節機構を見いだした。これにより内皮傷害の病態解明、傷害の予防などへ繋がるのが期待できる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学・血管病態学

キーワード：組織型プラスミノゲンアクチベーター、血管内皮細胞、開口放出、全反射蛍光顕微鏡、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1、線溶活性

1. 研究開始当初の背景

組織型プラスミノゲンアクチベーター（tissue plasminogen activator;tPA）は、血管内線溶を担う主要なセリン酵素であり、血管内皮細胞において産生・分泌される。tPAは一本鎖の活性型酵素として分泌されるため、その多寡は線溶活性に直結すると考えられるが、その詳細な分泌機構は不明である。

予備実験にてtPAの開口放出過程を可視化し生細胞リアルタイムイメージング解析したところ、分泌されたtPAは細胞表面に数分

以上は滞留することが判明した。tPAが活性型酵素として分泌されること、またフィブリンや細胞表面などの固相に結合したtPAは酵素活性が増強することを考慮すると、血管内皮表面における線溶活性、さらには線溶以外の血管壁への作用の発現にも有利な現象であることが予想される。

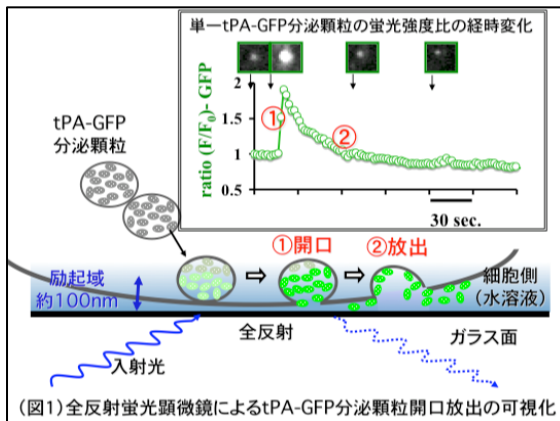
2. 研究の目的

本研究は分泌後のtPAによる(1)内皮細胞

上の線溶調節機構と (2) 血管トーンズに関連した内皮機能調節を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞由来細胞株 (EA.hy926) をモデル細胞とし tPA の開口放出現象を次のように可視化した (図1)。細胞に緑色蛍光タンパク (GFP) 融合 tPA 遺伝子を導入し、分泌顆粒内に発現した tPA-GFP の蛍光強度変化を細胞膜近傍の蛍光検出に有利な全反射蛍光顕微鏡にて経時的に解析した。GFP 蛍光の pH 依存性 (pH7.0-11.5 で安定、酸性度に比例し蛍光が減弱する) により、分泌顆粒 (約 pH5.5) からの開口 (図①)・放出 (図②) 現象はグラフのような典型的な蛍光強度変化を示す。



(1) tPA の細胞表面滞留要因として tPA 分子中の責任領域の同定: tPA フィブリンとの親和性を有するとして明らかになっている各ドメインに対し、デリベーションミュータント tPA-GFP を作成し、開口放出パターンのカイネティクスの相違について蛍光強度半減時間 ($T_{F1/2}$) を指標に検討し、細胞膜への結合領域を明らかにする。

(2) 細胞膜表面に存在する tPA 結合因子の同定: 線溶活性発現との関連から annexinA2 (anxA2) が最有力候補因子である。anxA2 の挙動を同時に追跡するため、anxA2-mRFP を作成し tPA-GFP との共発現下に、顆粒開口後の tPA-GFP との局在の一致性を検討する。anxA2 の関連が示唆されなければ、他の既知の tPA 結合蛋白について検討を行う。

(3) 細胞表面滞留 tPA に対する PAI-1 の修飾作用: 以下の 3 条件で検討した。

- ① 遺伝子組み換え PAI-1 (rPAI-1) の添加による tPA-GFP の開口放出動態の変化
- ② PAI-1 と複合体形成をしない (tPA の活性中心の Ser 478 を Ala に置換すると tPA は酵

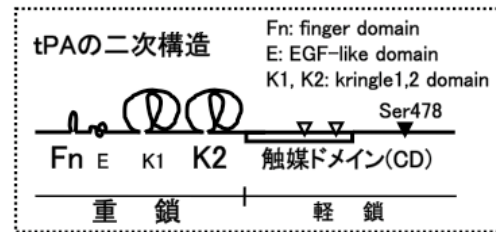
素活性とともに PAI-1 との結合性を失う) 変異 tPA-GFP (tPA-S478A-GFP) の開口放出動態

③ PAI-1 siRNA による PAI-1 発現抑制下における tPA-GFP の開口放出動態

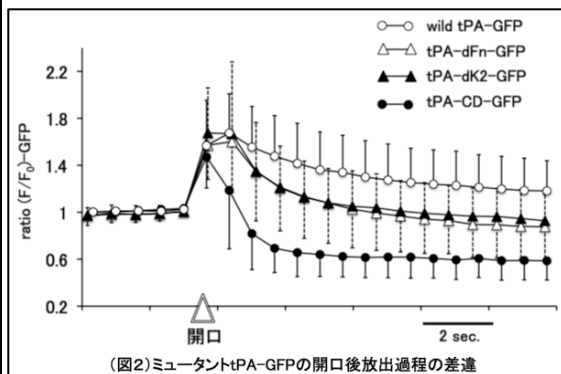
(4) 開口放出後の tPA による細胞膜表面線溶活性発現の検討: 本細胞では PAI-1 の発現が多いため内因性 tPA によるプラスミン生成は検出できない。PAI-1 siRNA (Thromb Haemost.2006;95:857-64,5'aagcacaactccctt aaggtc3') による発現抑制などの工夫をして、内因性 tPA によるプラスミン生成が chromogenic assay にて検出できる条件を検討する。

4. 研究成果

(1) tPA の細胞表面滞留要因として tPA 分子中の責任領域の同定:



tPA 分子中のフィブリンへの結合に関与するフィンガー (Fn) とクリングル 2 (K2) の両ドメインについて細胞表面滞留への影響を検討した。野生型 tPA-GFP、Fn ドメイン欠失 tPA-GFP (tPA-dFn-GFP)、K2 ドメイン欠失 tPA-GFP (tPA-dK2-GFP) および重鎖欠失 tPA-GFP (tPA-CD-GFP) の開口後の放出動態の差異を図 2 に示す。



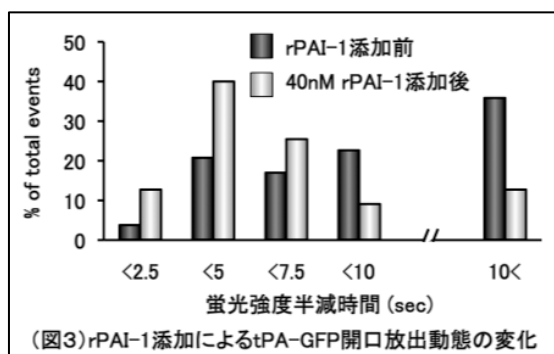
tPA-CD-GFP では開口後速やかに蛍光スポットは消失した。時間分解能のより高い高感度 CCD カメラを用いた解析から、そのほとんどは開口後 250 ms で液相中へ拡散することが判明した。これはクロム親和性細胞における NPY-GFP の開口放出時間とほぼ一致するものであった。よって tPA の重鎖は細胞表面滞留

に不可欠であり、かつ Fn と K2 ドメインは同程度に滞留に関与すると推察された。

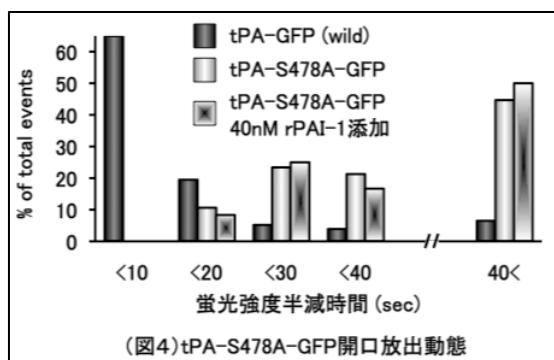
(2) 細胞膜表面に存在する tPA 結合因子の同定：抗 anxA2 抗体と抗 tPA 抗体による二重免疫染色あるいは作成した anxA2-mRFP と tPA-GFP との共発現のいずれにおいても anxA2 と tPA との共局在を示す結果は得られなかった。他の tPA 結合蛋白との検討は現在検討中である。

(3) 細胞表面滞留 tPA に対する PAI-1 の修飾作用：

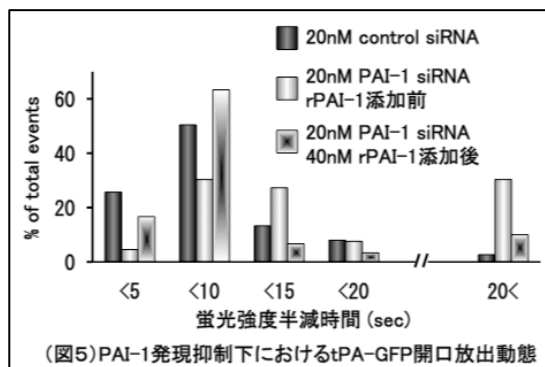
① rPAI-1 添加前後で単位時間あたりの開口放出頻度は変わらず、tPA-GFP 滞留時間の分布は左方移動し短縮を示した (図 3)。また rPAI-1 添加 60 分後の上清には添加した PAI-1 濃度依存性に tPA-PAI-1 複合体量の増加を認めた。しかし遊離 tPA は同定できなかった。



② tPA-S478A-GFP は、上清中に遊離型、複合体型ともに同定できず、全反射蛍光顕微鏡観察により細胞表面に多量の集積を認めた。また野生型 tPA-GFP に比し tPA-S478A-GFP 滞留時間は著明に延長し、rPAI-1 添加による影響も認めなかった (図 4)。



③ PAI-1 発現抑制により tPA-GFP 滞留時間の分布は右方に移動した。さらに、rPAI-1 添加により滞留時間の分布は PAI-1 発現非抑制程度まで再短縮を示した (図 5)。



(4) 開口放出後の tPA による細胞膜表面線溶活性発現の検討：PAI-1 siRNA により PAI-1 発現を抑制することで内因性 PA による細胞表面線溶活性の検出が可能となった。これは rPAI-1 の添加により抑制された。

以上 tPA は開口放出後、その重鎖を介して細胞表面に滞留するという血管内皮細胞特有の現象を見いだした。この tPA 細胞表面滞留は PAI-1 により修飾されることから、PAI-1 は液相中のみならず細胞表面 tPA 活性をも制御するという新たな線溶活性調節機構を提唱し、論文 (Suzuki Y, et al. Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Blood*. 113:470-478, 2009) としてまとめた。

なお、tPA による血管トーンズに関連した内皮機能調節については現在検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Suzuki Y, Mogami H, Ihara Y, Urano T. Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Blood*. 113, 470-478, 2009 査読有
- ② Yashiro K, Matsumoto Y, Ihara H, Suzuki Y, Kondo K, Urano T, Umemura K. Involvement of platelet activation by P2Y12 receptor in the development of transplant arteriosclerosis in mice. *Transplantation*. 87(3), 660-667, 2009 査読有
- ③ Hayashi T, Mogami H, Murakami Y, Nakamura T, Kanayama N, Konno H, Urano T. Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo.

Pflugers Arch. 456(6), 1239-51, 2008 査読有

- ④ Inui N, Enomoto N, Suda T, Kageyama Y, Watanabe H, Chida K. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in lung diseases associated with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 41(13), 1074-7, 2008 査読有
- ⑤ Suwa D, Konno H, Tanaka T, Urano T. Intraperitoneal infusion of recombinant plasminogen activator inhibitor type 2 induced apoptosis in implanted human colon cancer and inhibited its growth and liver metastasis. *Anticancer Res.* 28(2A), 693-8, 2008 査読有
- ⑥ Hirao A, Kondo K, Takeuchi K, Inui N, Umemura K, Ohashi K, Watanabe H. Cyclooxygenase-dependent vasoconstricting factor(s) in remodeled rat femoral arteries. *Cardiovasc Res.* 79(1), 161-8, 2008 査読有
- ⑦ Asai M, (他 7 名), Watanabe H. Misinterpretation of the effect of amlodipine on systolic calcium concentration with fura-2 fluorospectrometry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 377(4-6), 423-7, 2008 査読有
- ⑧ Kaida Y, Inui N, Suda T, Nakamura H, Watanabe H, Chida K. The CYP2A6*4 allele is determinant of S-1 pharmacokinetics in Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 83(4), 589-94, 2008 査読有
- ⑨ 鈴木優子、浦野哲盟 血漿 tPA 及び PAI-1 抗原量測定の意義-新たな知見からの再考察-, *日本血栓止血学会雑誌* 18(3), 247-254, 2007 査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ① Urano T, Rybaltowski M, Hayashi T, Suzuki Y, Mogami H. Dynamics of Platelet-vessel Wall Interactions. 5th General Assembly Asian Hematology Association. 2009 Kobe
- ② Suzuki Y, Urano T. Unique exocytotic dynamics of tissue plasminogen activator (tPA) from vascular endothelial cells (VECs) and its modification by PAI-1. The 5th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis. 2008.9 Singapore
- ③ Suzuki Y, Urano T. Secretary dynamics of tPA from vascular endothelial cells and its modification by PAI-1. 第 70 回日本血液学会総会 2008.10 京都
- ④ Suzuki Y, Urano T. Fibrinolytic

activity on vascular endothelial cells: secretory dynamics of tPA and its modification by PAI-1. 第 6 回血液・血管オルビス 2008.11 東京

- ⑤ 鈴木優子, 浦野哲盟 血管内皮細胞における tPA 開口放出とその活性発現 第 31 回日本血栓止血学会 2008.11.22 大阪
- ⑥ T. Urano, Y. Suzuki, H. Ihara, H. Mogami, Modification by PAI-1 of slow exocytotic dynamics of tissue plasminogen activator (tPA) and its activity on vascular endothelial cells (VECS). XXIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2007.07.09. Geneva
- ⑦ Suzuki Y, Ihara H, Mogami H, Urano T. Unique secretory Dynamics of Tissue Plasminogen Activator (tPA) Is Beneficial to Maintain Fibrinolytic Activity on Cell Surface. XIth International Workshop on Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation. 2007.06.17. Stockholm
- ⑧ 浦野哲盟、鈴木優子、井原勇人、最上秀夫。血液及び血管内皮から見た血栓症リスク。第 85 回日本生理学会、シンポジウム『深部静脈血栓症の病態生理とその予防』2007. 東京

[図書] (計 1 件)

- ① Nagai, N. and Urano, T. Role of tPA in the neural system. In Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis. Edited by K. Tanaka and E. W. Davie. Springer, Tokyo pp. 314-327, 2008

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 優子 (SUZUKI YUKO)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20345812

(2) 研究分担者

浦野 哲盟 (URANO TETSUMEI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50193967
最上 秀夫 (MOGAMI HIDEO)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90311604
渡邊 裕司 (WATANABE HIROSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50262803

(3) 連携研究者

なし