

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590230

研究課題名（和文）

活性化血小板膜リン脂質上の凝固系活性化開始機構のイメージング解析

研究課題名（英文）

Imaging analysis of phosphatidylserine-evoked initiation of coagulation cascade on activated platelets surface.

研究代表者

浦野 哲盟（URANO TETSUMEI）

浜松医科大学・医学科・教授

研究者番号：50193967

研究成果の概要（和文）：

（1）ex-vivo における活性化血小板上の phosphatidylserine (PS) 露出調節機構の解明と組織因子 (Tissue Factor: TF) 発現 micro-particle集積の解析検討

in-vivo における血小板血栓形成の解析において血小板血栓の中央部の血小板のみに PS 発現が認められた事実より、活性化血小板上への phosphatidylserine (PS) の露出に及ぼす fibrin network 形成の影響を共焦点顕微鏡を用いて検討した。血小板数を調節した多血小板血漿に蛍光標識 fibrinogen (fbg) を加え、TF + カルシウムイオン、あるいはトロンビンで刺激することにより、フィブリン網形成と PS 発現を時空間的に解析した。いずれの刺激でも PS の発現とフィブリン網の形成が観察できた。フィブリン網に結合した血小板の細胞内 Ca^{++} 濃度は、PS 露出に先行して増加した。血小板とフィブリン網の結合を阻害する GPIIb/IIIa 拮抗薬、フィブリン重合を阻害する Gly-Pro-Arg-Pro ペプチド、更には血小板骨格の再構築を抑制する cytochalasin B により PS 発現は減弱した。PS 発現には血小板がフィブリン骨格に結合し、結合血小板の骨格変化に伴う血餅退縮による機械的刺激が必須である事実が明らかになった。（論文投稿中）

U937 単球系培養細胞を Calcium ionophore で刺激し TF 発現 microparticle を得た。上記と同様の系に microparticle を添加後フィブリン網が形成される事実が明らかになり、凝固系活性化の起点になると考えられた。TF、FVIIa と PS 発現血小板の局在を解析中である。

（2）in-vivo における活性化血小板上への TF-FVIIa 集積の解析

in-vivo においてレーザー照射による血管内皮傷害部に形成された血栓中に、蛍光標識 FVIIa と蛍光標識可溶性 TF が集積する事実を認めた。PS 発現の局在との一致性を確認中である。

研究成果の概要（英文）：

（1）Analyses of the regulatory mechanisms on PS exposure on platelets' surface and its contribution to micro-particle bearing TF-evoked activation of coagulation cascade.

Exposure of PS on platelets' surface plays essential role in thrombus formation. Based on our recent finding in in-vivo study that platelets expose PS only when they exist in the center of the thrombus, we analyzed the factors to regulate PS exposure on platelets surface. To elucidate how PS exposure is regulated within the thrombus, we analyzed PS exposure on platelets existing in fibrin network using diluted platelet-rich plasma by Confocal Laser Scanning Microscopy. Almost all platelets bound to fibrin scaffold and exposed PS after treatment with TF, thrombin or ionomycin. An attenuation of fibrin mesh formation by several pharmacological methods suppressed PS exposure. FK633, a GPIIb/IIIa antagonist, entirely inhibited fibrin(ogen) binding

and moderately but still significantly diminished PS exposure. Gly-Pro-Arg-Pro amide not only abrogated fibrin network formation, but also reduced PS exposure without suppressing fibrin(ogen) binding. Cytochalasin B impaired both platelets' binding to fibrin(ogen) and PS exposure. These results suggest that GPIIb/IIIa-mediated outside-in signals in platelets generated by the binding to fibrin scaffold and the associated mechanical foci, appear to be essential for PS exposure. Such regulation of platelet PS exposure may play an important role in the control of hemostasis. (submitted)

U937 cells were treated by calcium ionophore, and TF bearing microparticles were obtained. Supplementation of the TF-bearing microparticle to the system mentioned above, successfully generated fibrin network. We started to analyze the space- and time-dependent interaction between TF based on microparticle and PS exposed on activated platelets both of which are essential to activate coagulation cascade.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：血液凝固・血液レオロジー

1. 研究開始当初の背景

血管壁が障害されると速やかに血小板が粘着・凝集すると共に、凝集血小板上で凝固系が活性化され強固なフィブリン血栓を形成し止血する（止血血栓）。過剰な血栓の形成（病的血栓）は末梢臓器の梗塞を来すため、様々な増幅及び抑制機構により血栓形成過程は巧妙に調節されている。凝固系活性化の増幅機構の鍵因子の一つは凝集した活性化血小板膜上に露出する phosphatidylserine (PS) である。PS は血小板の活性化に伴い細胞表面に露出し、 γ carboxyl glutamic acid (Gla) domain を有するビタミン K 依存性凝固因子の活性化に必須である。更に PS は、凝固の開始因子である組織因子 (Tissue Factor: TF) を活性顕在型に変化させるのに必須であるという新規な機構も紹介された。従って PS 発現は凝固系活性化、即ち血栓形成過程の key factor であり、その発現部位は凝固因子の集積と活性化の場と位置づける事が出来る。我々がニポウ式共焦点蛍光顕微鏡を用いて、生体内での血栓形成時の個々の血小板の動態と PS 発現をリアルタイムに解析した

結果、PS 発現は、血流によるずり応力、周囲の血小板から放出される凝集惹起物質濃度、フィブリノーゲンを含む接着因子を介して発生する周囲の血小板との張力、等により調節され、凝集血小板塊の中央でのみ充分に発現している事実が明らかになった (Hayashi T et al, Pflugers Arch 2008)。本研究は、これらの結果を踏まえ、血栓形成過程の時空間的制御機構の解析の一環として、凝固系活性化の場としての活性化血小板膜上 PS 発現に及ぼす機械的刺激の影響及び、TF 並びに FVIIa の同部位への集積による外因系凝固機転発現開始機構の詳細を解析する。

2. 研究の目的

活性化血小板膜上 PS 発現に及ぼす機械的刺激の影響の解析、及び、TF 並びに FVIIa の PS 発現部位への集積による外因系凝固機転開始機構の詳細を解析する。

3. 研究の方法

(1) 活性化血小板膜上 PS 発現に及ぼす機械的刺激の影響の解析

①クエン酸加全血を rhodamine G (R-6D) 処理し血小板を標識した後多血小板血漿 (PRP) を調整した。標識 fibrinogen 及び標識 annexin V を添加後、TF、トロンビン、ionomycin で刺激し、フィブリン網生成と PS 発現を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。また、トロンビン阻害薬 (argatroban)、Glycoprotein IIb/IIIa 拮抗薬、フィブリン重合阻害薬 (Gly-Pro-Arg-Pro)、cytochalasin B の効果を検討した。

(2) TF 並びに FVIIa の PS 発現部位への集積による外因系凝固機転開始機構の解析

① TF 発現 microparticle の調整

単球系培養細胞 (U937) あるいは洗浄血小板を ionomycin で処理後、超遠心により microparticle 分画を調整した。

② TF 発現 microparticle 及び TF と PS 発現血小板との局在の検討

In-vitro 系：上記【1】と同様の系で共焦点顕微鏡を用い、活性化血小板膜上に露出した PS と TF 発現 microparticle との共局在を確認する。

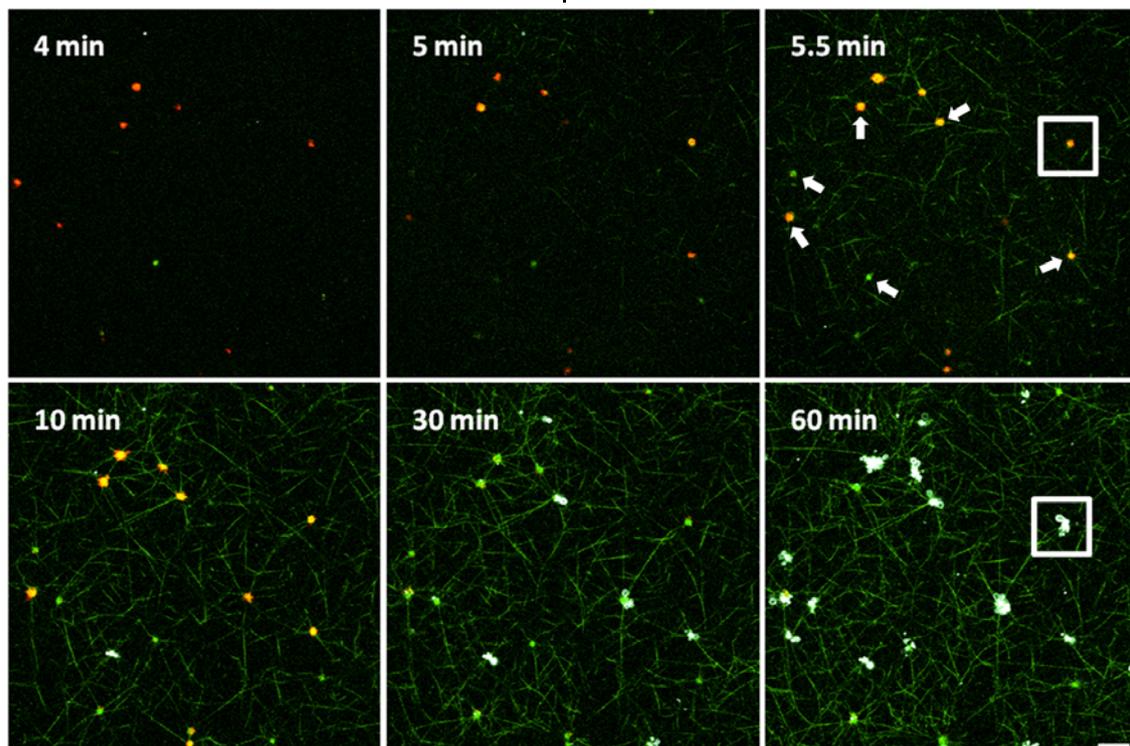
In-vivo 系：本講座で確立している Intra-vital confocal microscopy (Nipeaw 式) (Hayashi T et al, Pflugers Arch 2008)を用い、血小板血栓中央に存在する PS 露出血小板と TF 発現 microparticle 及び FVIIa の共局在を検討する。

4. 研究成果

【1】活性化血小板膜上 PS 発現に及ぼす機械的刺激の影響の解析

in-vivo における血小板血栓形成過程の可視化解析において血小板血栓の中央部の血小板のみに PS 発現が認められた事実より、活性化血小板上への PS の露出に及ぼす fibrin network 形成の影響を共焦点顕微鏡を用いて検討した。血小板数を調節した多血小板血漿に蛍光標識 fibrinogen (fbg) を加え、TF + カルシウムイオン、あるいはトロンビンで刺激することにより、フィブリン網形成と PS 発現を時空間的に解析した。いずれの刺激でも PS の発現とフィブリン網の形成が観察できた (図)。フィブリン網に結合した血小板の細胞内 Ca^{++} 濃度は、PS 露出に先行して増加した。血小板とフィブリン網の結合を阻害する GPIIb/IIIa 拮抗薬、フィブリン重合を阻害する Gly-Pro-Arg-Pro ペプチド、更には血小板骨格の再構築を抑制する cytochalasin B により PS 発現は減弱した。PS 発現には血小板がフィブリン骨格に結合し、結合血小板の骨格変化に伴う血餅退縮による機械的刺激が必須である事実が明らかになった。成果をまとめ論文投稿中である。

図 R-6D 処理多血小板血漿を TF で処理すると、R-6D 標識血小板 (赤色) に、alexa 488 標識 fibrin(ogen) (緑色) が結合した後、フィブリン網 (緑色) 形成とこれに結合した血小板膜に alexa647 結合 annexin V (白色)の結合が観察出来た。



(2) TF 並びに FVIIa の PS 発現部位への集積による外因系凝固機転開始機構の解析

① U937 単球系培養細胞を ionomycin で刺激して得た TF 発現 microparticle を、上記と同様の系に添加後フィブリン網が形成される事実が明らかになり、凝固系活性化の起点となりうると考えられた。TF、FVIIa と PS 発現血小板の局在を解析中である。

②in-vivo における活性化血小板上への

TF-FVIIa 集積の解析

in-vivo においてレーザー照射後の血栓中に蛍光標識 FVIIa と蛍光標識可溶性 TF が集積する事実を認めた。PS 発現の局在との一致性を確認中である。

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 21 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
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
3. Fujie M, Nakamura S, Asai K, Niimi T, Yamashita J, Kiyofuji K, Shibata K, Suzuki M, Aoshima R, Urano T and Yamashita M. A novel phospho sugar analogue: synthesis and evaluation of 2,3-dibromo-3-methyl-1-phenylphospholane 1-oxide as a new class of potential anti-proliferative materials for leukemia cells. Heterocyclic Communications 15(4): 273-278, 2009
4. Tanaka A, Suzuki Y, Sugihara K, Kanayama N, Urano T. Inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by activated factor XII plays a role in the enhancement of fibrinolysis by contact factors *in-vitro*. Life Sciences 85(5/6), 220-225, 2009
5. Hoki S, Suzuki Y, Umemura K, Urano T. Enhancement of fibrinolysis by gel-filtered platelets and its quenching by cytochalasin B and GPIIb/IIIa antagonists. Pharmacological Reports 61(5), 877-84, 2009
6. Adachi E, Kazoe Y, Sato Y, Suzuki Y, Urano T, Ueyama T, Saito N, Nikolaev VO, Lohse MJ, Tominaga M, Mogami H. A technique for monitoring multiple signals with a combination of prism-based total internal reflection fluorescence microscopy and epifluorescence microscopy Pflugers Arch - Eur J Physiol 459(1), 227-34, 2009
7. Suzuki, Y and Urano T. Novel mechanism of the expression and amplification of cell surface-associated fibrinolytic activity demonstrated by real-time imaging analysis. Journal Pharmacological Sciences 116(1), 19-24, 2011
8. Rybaltowski M, Suzuki Y, Mogami H, Chlebinska I, Brzoska T, Tanaka A, Banno F, Miyata T, Urano T. In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall. Pflugers Arch - Eur J Physiol 461(6), 623-633, 2011
9. Iwaki T, Tanaka A, Miyawaki Y, Suzuki A, Kobayashi T, Takamatsu J, Matsushita T, Umemura K, Urano T, Kojima T, Terao T, Kanayama N. Life-threatening haemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete PAI-1 deficiency in humans. Journal of Thrombosis and Haemostasis 9(6), 1200-1206, 2011
10. Suzuki Y, Yasui Y, Brzoska T, Mogami H, Urano T. Surface-retained tPA is essential for effective fibrinolysis on vascular endothelial cells. Blood 118(11), 3182-3185, 2011
11. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Oehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich B, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, and Nagai R. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. Blood 2012. **119**(8): p. e45-56
12. 浦野哲盟 【血栓止血の臨床一研修医のために一】線溶療法の考え方と治療薬剤 Fibrinolytic therapy: Concept & Drugs 血

栓止血学会雑誌 20(4), 398-400, 2009

13. 浦野哲盟, 鈴木優子 抗血栓療法「凝固線溶系と血栓形成」治療学 44(6), 17-20, 2010
14. 浦野哲盟, 鈴木優子, 最上秀夫, 坂野史明 GFP 強発現 ADAMTS13 遺伝子欠損マウスの生体内イメージング解析 血栓と循環 18(2): 4-7, 2010
15. 浦野哲盟, 柴山知子, 鈴木優子 「技術講座」ユーグロブリンクロット溶解時間 (Euglobulin Clot Lysis Time: ECLT) 検査と技術 39(2), 86-92, 2011
16. 鈴木優子, 浦野哲盟 コレステロールと抗血栓効果 循環器内科 69(2), 170-176, 2011
17. 浦野哲盟 喫煙による血栓傾向の機序について教えてください 喫煙が血栓傾向をおこす機序 血栓と循環 19(1), 31-34, 2011
18. 浦野哲盟, 鈴木優子 線溶系検査の意味するところ 臨床病理 59(7), 703-708, 2011
19. 浦野哲盟 血栓形成の分子機構: 凝固に伴い線溶活性が増強する機構 Thrombosis Medicine 1 (1), 89-92, 2011
20. 浦野哲盟 血栓形成の分子機構: 組織因子の構造変化と凝固活性発現調節 Thrombosis Medicine 1 (1), 89-92, 2011
21. 浦野哲盟 線溶機序 脈管学 51(3), 293-299, 2011

[学会発表] (計 10 件)

1. Urano T, "Global fibrinolysis assay" 56th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH (SSC2010), Cairo (Egypt), 2010, 05
2. Tanaka A, Suzuki Y, Urano T. Intra-vital analyses of plasminogen binding to platelet-rich micro-thrombus. 20th International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, 2010, 08. Amsterdam (The Netherlands)
3. Urano T, Suzuki Y, Mogami H. In-vivo

Imaging Analyses of Platelet Thrombus Formation. The 6th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis. 2010, 10. Bali (Indonesia)

4. 浦野哲盟, 鈴木優子 「線溶系検査の意味するところ」第57回 日本臨床検査医学会学術集会
5. 浦野哲盟, 鈴木優子 「血栓溶解療法: 安全域と治療域の分子指標」第5回 日本血栓止血学会 学術標準化委員会シンポジウム
6. Suzuki Y, Urano T, Unique secretory mechanism of tPA and expression of fibrinolytic activity on vascular endothelial cells. XXIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Kyoto, Japan), July 2011
7. Urano T, Suzuki Y ECLT shows fibrinolytic potential to be determined by the balance between tPA and PAI-1. What we learned from PAI-1 deficient patients. 57th Annual Meeting of Scientific & Standardization Committee of the ISTH, July 2011 Kyoto Japan
8. Urano T, Brzoska T, Suzuki Y Spontaneous plasma clot lysis time assay revealed the importance of "coagulation-associated enhancement of fibrinolysis". 57th Annual Meeting of Scientific & Standardization Committee of the ISTH, July 2011, Kyoto Japan
9. Urano T, Tanaka A, Suzuki Y, Brzoska T, Mogami H Real time imaging of plasminogen binding to platelet-rich micro-thrombus in vivo. 57th Annual Meeting of Scientific & Standardization Committee of the ISTH, July 2011, Kyoto Japan
10. Brzoska T, Rybaltowski M, Suzuki Y, Mogami H, Chlebinska I, Tanaka A, Banno F, Miyata T, Urano T. Imaging analysis of the interaction between unusually large von-willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals. 57th Annual Meeting of Scientific & Standardization Committee of the ISTH, July 2011, Kyoto Japan

[図書] (計 1 件)

1. Iwaki T, Urano T and Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical

problem and its aetiology. British Journal of
Haematology, in press

6. 研究組織

(1)研究代表者

浦野 哲盟 (URANO TETSUMEI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50193967

(2)研究分担者

鈴木 優子 (SUZUKI YUKO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20345812

(3)連携研究者

該当なし