

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25年 5月29日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590826

研究課題名（和文）新規細胞表面線溶活性発現機構の血管内皮バリア機能制御における役割の可視化解析

研究課題名（英文）Imaging analysis of the role of newly proposed cell surface-associated fibrinolysis mechanism in the regulation of endothelial barrier function.

研究代表者

鈴木 優子（SUZUKI YUKO）

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20345812

研究成果の概要（和文）：血栓溶解開始因子である tPA は血管内皮細胞から活性型酵素として分泌される。tPA の分泌動態の可視化解析から得られた知見をもとに、申請者は細胞上の血栓溶解活性発現-増幅機構を明らかにし、さらにその活性に伴う細胞機能修飾の可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Thrombolysis initiation factor, tPA, is secreted from the vascular endothelial cells as an active enzyme. Based on our previous study, in which we visualized the exocytotic dynamics of tPA, we clarified the expression and augmentation mechanisms of thrombolytic activity and the possibility to modulate the cellular function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細胞生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学・分子血管病態学

キーワード：血管内皮細胞、線溶活性、可視化解析、組織プラスミノゲンアクチベータ

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は血管腔と血管壁とのバリアとして機能するのみならず、様々な因子の産生・分泌を通して血管壁の恒常性の維持に寄与する。種々要因にて正常血管内皮機能が破綻すると、接着因子の発現や血栓形成促進により心血管病の発症・進展につながる。また重症感染症や炎症性サイトカインの作用などにより内皮バリア機能が障害され血管透過性が亢進すると、臓器障害が惹起され生命予後の悪化要因となる。

線溶システムは、線溶活性化因子である

plasminogen activator (PA) がセリン酵素前駆体であるプラスミノゲンをプラスミンに活性化することで、血栓溶解をはじめとする蛋白分解作用を発揮する。血管内皮細胞は組織型 PA (tPA) の分泌により血漿中のプラスミノゲンを活性化し血管内血栓を除去する。申請者は、血管内皮細胞からの tPA 分泌動態の可視化解析を通して、分泌された tPA が重鎖を介して細胞表面に滞留する現象を発見した (Suzuki Y, et al. *Blood*. 113 : 470-478, 2009)。tPA は活性型の酵素として分泌されること、またフィブリンや細胞膜表

面など線溶活性が発現される“場”への結合によりその酵素活性が増強することが知られている。

また、プラスミノゲンはフィブリンに加え、血球系細胞、血管内皮細胞などや腫瘍細胞をも含めた多くの細胞表面に結合し、PA作用により効率よくプラスミンに変換され、いわゆる組織線溶（細胞線溶）としての機能を発揮する。細胞線溶は、細胞外マトリックスの分解、細胞移動、増殖因子の活性化や組織リモデリングなどにおいて重要であり、血管新生、炎症反応、創傷治癒といった病態生理的現象に大きく関与する。またプラスミンは、G蛋白質共役型受容体ファミリーに属するユニークな受容体 **protease-activated receptor** (PAR; 受容体の細胞外特定領域が切断され、新たな N 末端領域がリガンドとして作用することで信号を伝達する) のサブタイプである PAR1 および PAR4 を活性化することにより、細胞内シグナル活性化を介した細胞機能の修飾にも関与すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮細胞で産生・分泌され細胞表面に滞留する tPA の酵素活性発現機構ならびに細胞機能修飾の可能性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

血管内皮モデル細胞：ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 由来細胞株 (EA. hy926) を用い、GFP 融合 tPA (tPA-GFP) 遺伝子を導入して以下を検討する。

(1) 滞留 tPA によるプラスミノゲン活性化の解析

① 滞留 tPA-GFP と Alexa568 標識プラスミノゲン (plg568) との共局在性を全反射蛍光顕微鏡にて検討する。

② 滞留 tPA-GFP によるプラスミノゲン活性化を検討する。

③ 単層培養血管内皮上に Alexa647 標識フィブリン (fbg-647)、トロンビン、plg-568 を添加して作成したフィブリン網の溶解過程を共焦点レーザー走査顕微鏡にて可視化解析する。

(2) 細胞表面 PA/プラスミン活性による細胞機能への影響に関する検討

① 細胞にプラスミンを添加し、カルシウム指示薬による細胞内カルシウムイオン濃度の変化を検討し、PAR の活性化の有無を検討する。

② tPA-GFP 発現細胞にプラスミノゲンを添加し得られたプラスミン活性により①と同様、PAR の活性化を検討する。

③ PA/プラスミン活性による細胞形態変化を small GTPase バイオセンサーにより、細胞内シグナル活性化の有無とあわせ可視化解析

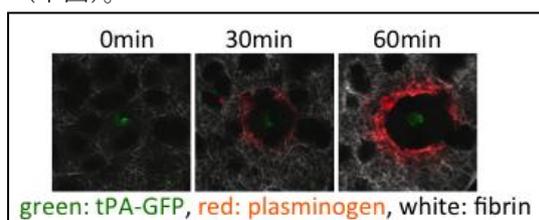
する。

4. 研究成果

(1) ① tPA-GFP 発現血管内皮細胞に plg568 を添加し全反射蛍光顕微鏡にて解析したところ、分泌顆粒開口後の tPA-GFP 滞留部位に plg568 は集積しその輝度値は経時的に増強した。また細胞表面/周囲基質蛋白に plg-568 の集積増強を認めた。

② plg-568 の集積増強は、活性を有さない変異 tPA-GFP の解析ならびに各々の阻害因子存在下での解析結果から、tPA 活性ならびにプラスミン活性依存的であること、またリジン結合部位を介した特異的結合であることが判明した。細胞表面で生成されたプラスミンが、細胞表面/周囲基質蛋白を分解し新たな C 末端リジンが露出すると、更なるプラスミノゲン結合の場が供給されるという細胞表面でのプラスミノゲン活性化増幅機構が明らかとなった。

③ tPA-GFP 発現細胞を起点にフィブリン溶解は拡大し、先行する溶解縁に局限して plg-568 が集積することが明らかとなった (下図)。



以上の研究成果を血管内皮細胞表面における線溶活性発現-増幅機構として報告した (Suzuki Y. et al. Blood 118:3182-3185, 2011)。

(2) ① PAR1 活性化ペプチドにて細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することはすでに確認している。プラスミン添加により、カルシウムオシレーションが惹起された。

② tPA-GFP 発現細胞にて細胞由来で生成されるプラスミンによるカルシウムシグナルは残念ながら検出できなかった。

③ PA/プラスミン活性による細胞形態変化の可視化解析ツールとして入手した蛍光共鳴エネルギー移動:FRET に基づく sam11 GTPase バイオセンサーを用いて可視化を試みた。しかしながら、その変化量が微量であることから解析が難航し落射蛍光顕微鏡では不可能であると判断した。細胞膜近傍の微小輝度変化検出感度に優れる全反射蛍光顕微鏡での解析が望まれるが、新たな励起レーザーを含む顕微鏡システム一式の導入が必要であり、残念ながら本研究では遂行しきれなかった。

(3) 当初の目的ではなかったが、tPA-GFP の細

胞膜表面滞留要因の検索を進めることができた。tPA-GFP 分泌顆粒中に共存する蛋白が明らかとなり、該当蛋白と tPA との直接的結合に関して Biacore による解析、また変異 tPA-GFP における結合性の変化などの検討を進め、現在結果をまとめている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Yasui H, Suzuki Y, Sano H, Suda T, Chida K, Dan T, Miyata T, Urano T. TM5275 prolongs secreted tissue plasminogen activator retention and enhances fibrinolysis on vascular endothelial cells. *Thromb Res*. 2013 Apr 20. 査読有 doi:10.1016/j.thromres.2013.04.003.
- ② Brzoska T, Suzuki Y, Mogami H, Sano H, Urano T. Binding of thrombin-activated platelets to a fibrin scaffold through $\alpha_{IIb}\beta_3$ evokes phosphatidylserine exposure on their cell surface. *PLoS One*. 2013;8(2):e55466. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0055466.
- ③ 鈴木優子、浦野哲盟. 血管内皮の抗血栓作用と線溶関連治療の考え方. *Current Therapy*. 2013;31:318-23. 査読無
- ④ Urano T, Suzuki Y. Accelerated fibrinolysis and its propagation on vascular endothelial cells by secreted and retained tPA. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:208108. 査読有 doi:10.1155/2012/208108.
- ⑤ Iwaki T, Urano T, Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *Br J Haematol*. 2012;157(3):291-8. 査読有 doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09074.x.
- ⑥ Suzuki Y, Yasui H, Brzoska T, Mogami H, Urano T. Surface-retained tPA is essential for effective fibrinolysis on vascular endothelial cells. *Blood*. 2011;118(11):3182-5. 査読有 doi:10.1182/blood-2011-05-353912.
- ⑦ Urano T, Suzuki Y. Parameters related to fibrinolysis and their meanings. *Rinsho Byori*. 2011;59(7):703-8. 査読無
- ⑧ Suzuki Y, Urano T. Novel situations of endothelial injury in stroke--mechanisms of stroke and strategy of drug development: novel mechanism of the expression and amplification of cell surface-associated fibrinolytic activity demonstrated by real-time imaging analysis. *J Pharmacol Sci*. 2011;116(1):19-24. 査読有
- ⑨ 鈴木優子. 血管内皮表面における滞留 tPA 惹起線溶活性増幅機構のイメージング解析.

日本血栓止血学会誌. 2012;22:374-6. 査読無

⑩ 鈴木優子、浦野哲盟. 血管内皮細胞上の線溶活性調節機構. *血液フロンティア*. 2012;21:1571-9. 査読無

⑪ 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*. 2011;461(6):623-33. 査読有 doi:10.1007/s00424-011-0958-x.

⑫ 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 hemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete plasminogen activator inhibitor-1 deficiency in humans. *J Thromb Haemost*. 2011;9(6):1200-6. 査読有 doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04288.x.

⑬ 鈴木優子、浦野哲盟. コレステロールと血栓性. *循環器内科*. 2011;69:170-6. 査読無

[学会発表] (計 11 件)

- ① Yasui H: Real time imaging analysis of secreted t-PA dependent fibrinolytic activity on vascular endothelial cell surface and its enhancement by newly synthesized PAI-1 inhibitor. XIVth International Workshop Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation. NotreDame, IN, USA. 2013. 6. 4-8.
- ② 安井秀樹: イメージング手技を用いた血管内皮細胞上での線溶活性に対する PAI-1 阻害薬 TM5275 の効果の検討、第 35 回日本血栓止血学会、山形 2013. 5. 30.-6. 1.
- ③ 鈴木優子: 日本血管生物医学科ジョイントシンポジウム「血管と血液のインターフェイス」: 血管内皮細胞による線溶反応の時空間的制御、第 34 回日本血栓止血学会学術集会、東京、2012. 6. 7-9.
- ④ Brzoska T: Phosphatidylserine exposure on platelets surface upon binding to rigid fibrin scaffold. 第 17 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、浜松、2012. 8. 11-12.
- ⑤ 浦野哲盟: 血管内皮細胞上の線溶活性発現ポテンシャル維持機構、浜松、2012. 8. 11-12.
- ⑥ Suzuki Y: Accelerated fibrinolysis on vascular endothelial cells triggered by membrane-retained secreted tPA. 21th International Congress on Fibrinolysis

and Proteolysis, Brighton. England.
2012. 7. 1-5

⑦浦野哲盟：活性化血小板表面へのプラスミン
ノグンの特異結合と微小局壁在血栓への解
析 第 34 回 日本血栓止血学会学術集会
2012. 6. 4-8

⑧Suzuki Y : Unique secretory mechanism of
t-PA and the expression of fibrinolytic
activity on vascular endothelial cells.
XXIIIth Congress of International Society
of thrombosis hemostasis. 京都、2012. 7.

⑨鈴木優子：血管内皮細胞における細胞表面
滞留 tpA による新たな細胞表面線溶活性発
現調節機構、第 73 回日本血液学会学術集会、
名古屋、2011. 10.

⑩鈴木優子：血管内皮細胞表面における線溶
活性発現-増幅機構のイメージング解析、第
53 回日本糖尿病学会年次学術集会、岡山、
2010. 5.

⑪鈴木優子：血管内皮細胞における細胞表面
線溶活性発現機構のイメージング解析、第 1
回浜松医科学シンポジウム、浜松、2010. 10.

[図書] (計 2 件)

①浦野哲盟、後藤信哉：メディカルサイエン
スインターナショナル、血栓形成と凝固・線
溶-治療に生かせる基礎医学、232、2013.

②鈴木優子(分担執筆)：中外医学社、Annual
Review 血液 2012、230-5、2012.

[その他]

ホームページ：

http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seiri2.html

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・准教授
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
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