

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09449

研究課題名(和文) プラスミノゲン欠損症の診断・治療を目指した代替的フィブリン分解経路の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism elucidation of alternative fibrin degradation pathway aiming for diagnosis and treatment of plasminogen deficiency

研究代表者

尾崎 司 (Osaki, Tsukasa)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60380565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プラスミノゲン欠乏症血漿からフィブリン分解産物を濃縮し、切断部位の同定、プロテアーゼの推定を行った。プラスミン(PLM)、カテプシンG、顆粒球エラスターゼ、マトリクスメタロプロテアーゼ-3が候補と考えられたので、これらのプロテアーゼによるフィブリン分解を検討した。その結果、患者では残存するPLM活性による分解(健常者の約15%)が大半で他のプロテアーゼによる影響はほとんどみられなかった。一方、血漿プロテオーム解析の結果、患者で特定の補体系タンパク質が高値だったので、補体活性を調べたところ、フィブリン上で補体系が活性化していたので、オプソニン化を介した大食細胞による貪食除去の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We concentrated fibrin degradation products (FDP) by its specific antibodies and identified cleavage sites of FDP, followed by a estimation of candidate proteases which cleave the cleavage sites. As a result, plasmin (PLM), cathepsin G, granulocyte elastase and matrix metalloproteinase-3 were considered candidates. We investigated the fibrin degradation by these proteases. The fibrin degradations in patients were mainly due to residual PLM activity, corresponding to about 15% of the degradations in healthy controls, while the degradations were little affected by other proteases. On the other hand, we found that the specific complement system proteins were high levels in the patient by plasma proteome analysis. Therefore, we investigated the complement activity on a fibrin clot. We found that the complement system was activated on the fibrin clot. We postulated that the complement-opsonized fibrin clot might be removed by phagocytosis.

研究分野：生化学

キーワード：プラスミノゲン欠乏症 FDP 質量分析 モノクローナル抗体 プロテアーゼ ELISA

### 1. 研究開始当初の背景

(1) プラスミノゲン(plasminogen; PLG)は、血液凝固反応で生成した不溶性のフィブリノクロットを可溶性のフィブリン分解産物(fibrinogen/fibrin degradation products; FDP)に分解するプラスミン(plasmin; PLM)の前駆体タンパク質で、血栓の溶解のみならず、創傷治癒、組織の再構築にも重要である。実際、PLG ノックアウトマウスでは、重篤な血栓傾向を示すとともに、創傷治癒への関与も実証されている。また、世界で最初の PLG 分子異常症が我が国で発見され、血栓症を発症していたことから、長年にわたり血中 PLM 活性の低下が血栓症発症の原因とされてきた。ところが、50 例の欧米人における PLG 欠乏症や我が国の吹田コホートスタディにおける PLG 分子異常症の疫学調査の結果、PLM 活性の低値が必ずしも血栓症発症と関連しないことが明らかになった。

(2) 一方、申請者の所属する研究室では、慢性全身性偽膜性粘膜炎の症例から本邦初の重度 PLG 欠乏症の姉妹例を発見し(PLG Uwajima)、さらに別の家系でも重度 PLG 欠乏症例を同定した(PLG Hakodate)。これらの症例はいずれも高齢であるにもかかわらず、静脈血栓症の既往がないことから、代替的線溶機構の存在及び発動が想定された。

### 2. 研究の目的

(1) まだ解明されていない PLG 欠乏症における代替的フィブリン分解経路の分子機構を明らかにし、新しい診断・治療への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行った。そのためにまず、患者および健常者血漿中の FDP を同定し、切断部位からプロテアーゼの推定を行った。

(2) 血漿検体を通常のプロテオーム解析で処理すると、大半は血中のエキソペプチダーゼによって非特異的切断を受けたものや、切断を受けていないフィブリノゲンしか同定されず、PLM などのエンドペプチダーゼによって特異的に切断された FDP は数種類しか同定されない。そこで、多くの FDP を同定するために、血漿から 2 種類のモノクロナル抗体(JIF-23、IF-123)を用いて FDP を濃縮し、質量分析装置を用いて同定を行った。

(3) PLG ノックアウトマウスは発生、止血などにおける生理的役割を検証する目的で 1995 年に作出され、重篤な血栓症を引き起こすことが確認されている。しかし、上述のように PLG 欠乏症例(ヒト)は必ずしも血栓症を発症しない。ヒトとマウスとの症候の乖離は、代替的線溶機構がマウスには存在しない、あるいは補完できないほど軽微であることに起因していると考えられ、代替的線溶機構の解明にはヒト PLG 欠乏症例

の検体を用いて解析することが必須である。

(4) 国内の他の PLG 欠乏症報告例は正常の 50%以上の PLM 活性を保持しており、PLM 活性が 10%以下の重度 PLG 欠乏症例は、申請者の所属する研究室で発見された 2 家系 3 例のみで、国内の他施設では研究されていなかった。

(5) 代替的線溶機構の分子機構を解明すれば、波及効果として、診療や治療への臨床応用のみならず、経路に必須なプロテアーゼを補完した動物モデルの作成などの応用が期待された。

### 3. 研究の方法

(1) 各種プロテアーゼによって生成する FDP の網羅的解析

精製フィブリノゲンを PLM、顆粒球エラスターゼ、カテプシン G、プロテアーゼ 3 などのプロテアーゼで消化した断片をさらにトリプシン、あるいはキモトリプシンで消化後、消化ペプチドを液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)により同定した。トリプシン消化断片で COOH 末端(C 末端)が K/R 以外のペプチドを基に切断部位を推定した。一方、キモトリプシン消化断片では C 末端が F/Y/L/W 以外のペプチドを基に切断部位を推定した。切断部位を推定するための基になったペプチドのピーク面積を積算して、全体の切断を 100% とした時の各切断部位における切断の割合を算出した。P5 から P5' のアミノ酸の割合を基にシーケンスロゴで図示した(図 1)。

(2) 血漿中 FDP の網羅的解析

2 種類のモノクロナル抗体(JIF-23; PLM によって鎖 63-85 が遊離した FDP を認識、IF-123; 顆粒球エラスターゼによって切断された鎖<sup>204</sup>L を認識)を用いて FDP を濃縮後、トリプシン、あるいはキモトリプシンで消化後、上述の方法で消化ペプチドの同定、切断部位の推定、各切断部位における切断の割合の算出を行い、結果をシーケンスロゴで図示した(図 2)。

(3) PLG 抗原量、および PLM 活性の測定

PLG 抗原量は抗 PLG マウスモノクロナル抗体(R&D Systems 社)をコートしたプレートを用いて、ELISA 法により測定した。検出抗体は抗 PLG ウサギポリクロナル抗体(ダコ・ジャパン株式会社)、二次抗体は HRP 標識抗ウサギ抗体(GEヘルスケア・ジャパン株式会社)、発色基質は TMB を用いた。活性はプロトコールに従い、PLG テストチーム(積水メ

ディカル株式会社) を用いて測定した。

- (4) 顆粒球エラスターゼ量の測定  
 血漿中の顆粒球エラスターゼ量は、プロトコールに従い、PMN Elastase 測定 ELISA キット (BioVendor) を用いて測定した。

- (5) 候補プロテアーゼによるフィブリン凝固塊溶解反応の測定  
 顆粒球エラスターゼ(150 ng/mL)、カテプシン G (15 ng/mL)、MMP-3(50 ng/mL) 存在下、非存在下で血漿に APTT 試薬とカルシウムを加え、37 10 分反応させてフィブリン凝固塊を生成した。凝固塊に組織プラスミノゲン活性化因子(tissue plasminogen activator; tPA, 15 ng/mL)、顆粒球エラスターゼ(500 ng/mL)、カテプシン G (50 ng/mL)、MMP-3(100 ng/mL) を加え、37 で分解反応を実施し、経時的に一部抜き取り、生成した D-Dimer 量を ELISA にて測定した。健常者血漿に tPA を加え、72 時間後の反応液中の D-Dimer 量を 100%とした。また、4.5 mL/分で循環させながら、同様の実験を実施した。この場合は、健常者血漿に tPA を加え、2 時間後の反応液中の D-Dimer 量を 100%とした。

- (6) 血漿プロテオーム解析  
 PLG 欠乏症血漿 3 検体、および健常者血漿 6 検体を試料として、熱処理、還元アルキル化後、トリプシン消化を行って、LC-MS/MS により同定した。同定ペプチドのピーク面積を基に定量比較を行った。

- (7) 補体活性の測定  
 フィブリノゲンをプレートに固相化した後、トロンピンを加え、37 で 30 分反応させてフィブリンを生成した。PLG 欠乏症血漿に様々な濃度の PLG を加え、37 12 時間反応後、フィブリンに結合した C5b-C9 複合体(膜侵襲複合体)の量を ELISA で測定した。

#### 4. 研究成果

- (1) 各種プロテアーゼによって生成する FDP の網羅的解析

健常者あるいは PLG 欠乏症例で FDP の生成に関わっていると考えられる PLM、顆粒球エラスターゼ、カテプシン G、プロテアーゼ 3 などのプロテアーゼによる切断部位を決定するために、上述のように精製フィブリノゲンをこれらのプロテアーゼで消化し、さらにトリプシン、キモトリプシンで切断したペプチドを同定し、切断部位の推定を行った。その結果、それぞれ 41、196、154、246 箇所切断部位が推定され、それぞれの切断の割合を算出したところ、PLM の P1 部位

は K/R、顆粒球エラスターゼ、カテプシン G、プロテアーゼ 3 の P1 部位はそれぞれ I、N、T となっている割合が高かった(図 1)。

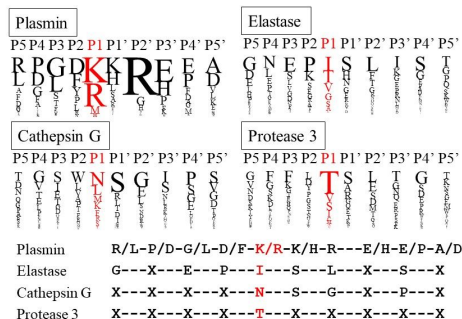


図 1 各プロテアーゼの切断部位

- (2) 血漿中 FDP の網羅的解析

PLG 欠乏症血漿 3 検体、および健常者血漿 6 検体を試料として、JIF-23 で免疫沈降を行った場合、PLG 欠乏症血漿で回収される FDP 量は健常者血漿を 1.00 とした場合、0.81±0.28 だった。一方、回収した FDP から推定された切断部位は PLG 欠乏症で 53±14、健常者で 48±16 箇所だった。切断部位は患者の P1 部位は M、健常者は E がおもだったが、前後の P2 部位、P1' 部位が不均一で候補プロテアーゼの推定は出来なかった(図 2)。各種プロテアーゼの切断部位と比較したところ、患者 FDP の切断部位の一部がカテプシン G の切断部位と一致しており、健常者 FDP の切断部位の一部がカテプシン G、あるいは PLM の切断部位と一致していたことからこれらのプロテアーゼが候補プロテアーゼと考えられた。一方、P3 部位の R や P2' 部位の L は比較的均一であった。R の C 末端側を切断する PLM や L の NH<sub>2</sub> 末端(N 末端)側を切断する MMP-3 などのプロテアーゼで各々切断された後、アミノペプチダーゼ、あるいはカルボキシペプチダーゼでさらに切断を受けた可能性が考えられ、MMP-3 も候補プロテアーゼと考えられた。

IF-123 で免疫沈降を行った場合、PLG 欠乏症血漿で回収される FDP 量は健常者血漿を 1.00 とした場合、8.93±3.56 で、回収した FDP から推定された切断部位は PLG 欠乏症で 117±4、健常者で 77±25 箇所だった。切断部位は患者の P1 部位は Q/R、健常者は M がおもで、患者では PLM などで切断を受けた可能性があると考えられたが、健常者では前後の P2 部位、P1' 部位が不均一で候補プロテアーゼの推定は出来なかった(図 2)。各種プロテアーゼの切断部位と比較したところ、健常者 FDP の切断部位の一部はカテプシン G、あるいは PLM の切断部位と一致していた。一方、健常者の P3 部位の R や患者の P2 部位の R、P2' 部位の L、あ

るいは健常者 P2' 部位の I は比較的均一であった。PLM や MMP-3、I の C 末端側を切断する顆粒球エラストラーゼなどのプロテアーゼで各々切断された後、アミノペプチダーゼ、あるいはカルボキシペプチダーゼでさらに切断を受けた可能性が考えられ、顆粒球エラストラーゼも候補プロテアーゼと考えられた。

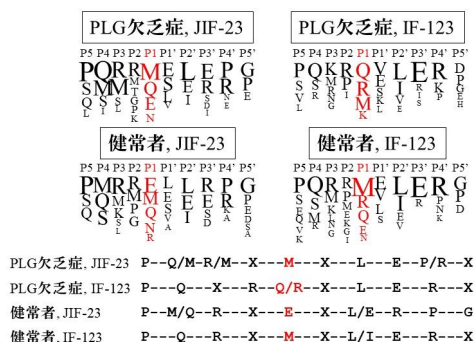


図2 患者と健常人のFDPの切断部位の比較

(3) PLG 活性、PLM 活性、顆粒球エラストラーゼ量

候補プロテアーゼである PLM の抗原量 (PLG 抗原量) と活性、および顆粒球エラストラーゼ量を PLG 欠乏症と健常者で測定した。PLG 抗原量は PLG 欠乏症では 0.6 mg/dL と非常に低値を示した (基準値 10.0-17.0 mg/dL)。また、健常者の PLM 活性を 100% とした時の PLG 欠乏症の PLM 活性は  $7 \pm 2\%$  と非常に低値を示した (基準値 71-128%)。一方、顆粒球エラストラーゼの血漿濃度は PLG 欠乏症で  $25.5 \pm 9.5$  ng/mL (3 例)、健常者で  $25.5 \pm 12.2$  ng/mL (6 例) と有意差はなかった (基準値 20.0-40.0 ng/mL)。

(4) 候補プロテアーゼによるフィブリン凝固塊溶解反応

健常者血漿を用いた場合は、tPA を加えると 8 時間でフィブリン凝固塊は完全に溶解したが、tPA を加えないと 72 時間経ってもフィブリン凝固塊は完全には溶解しなかった。実際、72 時間後の反応液中の D-Dimer 量は tPA を加えなかった場合は  $5.0 \pm 4.4\%$  と非常に低い値を示した。一方、PLG 欠乏血漿を用いた場合は tPA の有無に関わらず 72 時間経ってもフィブリン凝固塊は完全には溶解しなかった。72 時間後の反応液中の D-Dimer 量は tPA を加えた場合は  $15.4 \pm 0.8\%$  とやや分解が認められたが、tPA を加えなかった場合は  $3.5 \pm 3.1\%$  と非常に低い値を示した。

PLG 欠乏血漿に顆粒球エラストラーゼ、MMP-3 を加えた場合も tPA の有無に関わらず 72 時間経ってもフィブリン凝固塊は完全には溶解しなかった。72 時間後の反応液中の D-Dimer 量は tPA を加えた場

合は  $16.7 \pm 0.3\%$ 、tPA を加えなかった場合は  $3.1 \pm 0.1\%$  と顆粒球エラストラーゼ、MMP-3 が無い時とほとんど差がなかった。

PLG 欠乏血漿に顆粒球エラストラーゼ、カテプシン G を加えた場合も tPA の有無に関わらず 72 時間経ってもフィブリン凝固塊は完全には溶解しなかった。72 時間後の反応液中の D-Dimer 量は tPA を加えた場合は  $9.1 \pm 2.2\%$ 、tPA を加えなかった場合は  $0.9 \pm 0.3\%$  と顆粒球エラストラーゼ、カテプシン G が無い時より寧ろ低い値を示した。健常者血漿に顆粒球エラストラーゼ、カテプシン G を加えて同様の実験を行ったところ、tPA を加えると 8 時間でフィブリン凝固塊は完全に溶解したが、tPA を加えないと 72 時間経ってもフィブリン凝固塊は完全には溶解しなかった。72 時間後の反応液中の D-Dimer 量は tPA を加えた場合は  $53.6 \pm 16.3\%$ 、tPA を加えなかった場合は  $7.1 \pm 7.9\%$  と健常者血漿でも顆粒球エラストラーゼ、カテプシン G が無い時より寧ろ低い値を示した。

生体内で線溶反応は静止系でなく、循環系で起こっていると考えられるので 4.5 mL/分 で循環させながら、同様の実験を実施した。循環系では健常血漿ではフィブリン凝固塊は 2 時間で完全溶解したが、PLG 欠乏症血漿ではフィブリン凝固塊は 48 時間でも完全には溶解しなかった。D-Dimer 量は 6 時間でほぼプラトーに達した (約 13%)。

以上の結果から、PLG 欠乏症血漿でも残存しているごく微量の PLM が機能して 15% 程度分解していることは明らかとなった。しかし、顆粒球エラストラーゼやカテプシン G、MMP-3 ではフィブリン凝固塊が完全には溶解しなかったことから、代替的線溶経路に参与している可能性は極めて低いと考えられる。

(5) 血漿プロテオーム解析

PLG 欠乏症血漿 3 検体、および健常者血漿 6 検体の血漿プロテオーム解析を実施した。同定した 264 種類の血漿タンパク質のうち、3 種類以上のペプチドで定量比較ができた 68 種類のタンパク質について比較を行った。PLG 欠乏症で有意に増加していたタンパク質はフィブリノゲン 鎖や補体タンパク質 C4A、C4B、C5 など 12 種類あった。一方、減少していたタンパク質は PLG やトランスサイレチン、APOE など 9 種類あった。PLG 欠乏症では健常者に比べて C4A、C4B、C5 などの補体系タンパク質を含むある特定の急性期タンパク質が増加していることが明らかになった。

(6) 補体活性

PLG 欠乏症血漿で C4A、C4B、C5 などの補体系タンパク質が増加していたので、フィブリン凝固塊のクリアランスに補体系が関与していないか確認した。フィブリンに PLG 欠乏症血漿を加え、37 で 12 時間反応するとフィブリン上で C5b-C9 複合体(膜侵襲複合体)が形成された。この膜侵襲複合体の形成は PLG の量依存的に阻害されることも明らかとなった。この結果から、フィブリン上で補体系が活性化され、オプソニン化されたフィブリンが大食細胞の貪食によって除去される可能性が考えられた。

## 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 1 件)

Osaki T., Souri M., SongYS, Izumi N, Law R, Ichinose A. Molecular pathogenesis of plasminogen Hakodate: the second Japanese family case of severe type I plasminogen deficiency manifested late-onset multi-organic chronic pseudomembranous mucositis. *J. Thromb. Thrombolysis*. 査読有、Vol. 42、2016、pp. 218-224  
DOI: 10.1007/s11239-016-1375-y

〔学会発表〕(計 2 件)

尾崎 司、惣宇利 正善、一瀬 白帝、先天性プラスミノゲン欠乏症におけるフィブリン分解に関わるプロテアーゼの探索、第 38 回日本血栓止血学会学術集会、2016 年 6 月 17 日、18 日、奈良春日野国際フォーラム  
尾崎 司、惣宇利 正善、一瀬 白帝、先天性プラスミノゲン欠損症における代替的線溶経路に関与するプロテアーゼの探索、第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 22 日、甲府市総合市民会館

〔図書〕(計 1 件)

尾崎 司、株式会社金芳堂、新・血栓止血血管学 抗凝固と線溶 8 プラスミノゲン、2015、pp67-74

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 司 (OSAKI, Tsukasa)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号：60380565

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

一瀬 白帝 (ICHINOSE, Akitada)  
山形大学・名誉教授  
研究者番号：10241689

惣宇利 正善 (SOURI, Masayoshi)  
山形大学・医学部・准教授  
研究者番号：20292419

(4)研究協力者

鈴木 崇 (SUZUKI, Takashi)

池脇 淳子 (IKEWAKI, Junko)

宋 勇錫 (SONG, Young-Seok)