

令和元年6月10日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08492

研究課題名(和文) 活性化血小板膜を基盤とした血栓溶解活性発現の多様な調節機構の解析

研究課題名(英文) Various regulatory mechanisms of activated-platelet' membrane-based activation of fibrinolysis.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血小板含有血漿を組織因子と CaCl₂ で処理し、活性化血小板膜を起点とするフィブリン形成と同部位への組織型プラスミノゲンアクチベータとプラスミノゲンの集積、また同部位から始まる溶解縁へのプラスミノゲンの集積を伴うフィブリン溶解を認めた。プラスミノゲンの集積はリジン結合部位依存性で、トロンビン活性化線溶阻害因子(TAFI)の活性化に関わる可溶性トロンボモジュリン(TM)により阻害され、溶解時間も著明に延長した。TMの効果はカルボキシペプチダーゼ阻害薬、及びトロンビン結合の拮抗抗体により消去された。活性化血小板膜は凝固系だけでなく線溶系活性化を多様に調節することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血栓形成は場所と時間で巧妙に調節されており、内皮障害部等の必要部位では迅速に形成されるが、正常内皮細胞の存在する不要部位では形成が抑制されたり形成されても速やかに溶解される機構がある。凝固系が活性化血小板上でだけ活性化されるのは前者に関わる。線溶系に対する血小板の影響は不明であったが、フィブリン形成の促進に伴い線溶が促進するという基本機構が存在すること、内因性あるいは外来性のトロンボモジュリンにより活性化される TAFI によりその基本機構が修飾され線溶阻害にも関わることが明らかになった。これらを修飾する薬剤により、より安全な抗凝固療法や血栓溶解療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：When platelet-rich plasma was treated by tissue factor and CaCl₂, activated platelets initiated not only fibrin formation but also fibrinolysis after triggering the accumulation of both tissue plasminogen activator and plasminogen on their surfaces. The latter was attenuated by recombinant thrombomodulin, an essential cofactor for thrombin to activate thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, which was reversed by either carboxypeptidase inhibitor or neutralizing antibody to block the interaction of thrombin and thrombomodulin. Activated platelets appeared not only to facilitate the activation of coagulation cascade but also to diversely regulate fibrinolysis.

研究分野：生理学、血栓止血学

キーワード：線溶 血小板 凝固 プラスミノゲン トロンビン活性化線溶阻害因子 プラスミノゲン アクチベータ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

線溶系は組織修復後の不要血栓の溶解だけでなく、過剰血栓形成の迅速な溶解により血栓症発症予防に大きく寄与する。これには巧妙な時空間的調節機構による、(1)病的過剰血栓部における迅速な溶解と、(2)止血血栓の早期溶解の防御、という相反する現象が関わる。これまで血小板はビタミンK依存性凝固因子の活性化に必須の phosphatidylserine (PS) の膜表面への発現を介した凝固促進作用を有することと、血小板血栓は溶解抵抗性である事実が目撃されてきた。

今回我々は、活性化血小板膜が凝固開始起点となりフィブリン網が形成されると同時に、tPAとプラスミノゲンもC末端リジン依存性に結合し効率的にフィブリン溶解の起点(線溶開始起点)となることを見出した。同様の線溶増強効果はフィブリン上で証明されているが、活性化血小板膜の存在によりさらに増強するものである。フィブリンによる線溶増強はフィブリン上への組織型プラスミノゲン・アクチベータ(tPA)とプラスミノゲンの結合による3者複合体形成が主要な機構とされる。酵素と基質を最終基質であるフィブリン上に集約する鑄型効果と、結合に伴うプラスミノゲンの易活性型への構造変化という二つの機構が関わる。結合にはプラスミノゲンのクリングル構造上のリジン結合部位(LBS)とフィブリンのC末端リジンが関わる。キモトリプシン様セリン酵素であるプラスミンはリジンあるいはアルギニンのC末端側を切断するため、一部分解されたフィブリン上に新たにC末端リジンが露出し、更にプラスミノゲンが結合する増幅機構である。今回活性化血小板膜にはフィブリン非依存性のプラスミノゲンの結合も確認できた。

溶解抵抗性に関して我々は、上記線溶増強機構をトロンボモジュリンが解消してしまうこと、さらに、ずり応力存在下ではプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1型(PAI-1)を放出し効率的に血栓溶解を阻害することにより血栓形成を増強することを見出した。前者には血管内皮細胞上に発現するトロンボモジュリンが必須であり、また後者にはずり応力が必須である。本研究ではこのような環境因子がどのように血小板の「多様な役割」の時空間的調節機構に関わるか解析するものである。

環境因子の一つはトロンボモジュリンで、正常血管内皮細胞上に発現するトロンピン結合蛋白質として強力な抗血栓因子として機能する。トロンピンの向血栓活性を抗凝固因子であるプロテインCの活性化能を有する抗血栓活性に修飾する。トロンボモジュリン結合トロンピンはまたトロンピン活性化線溶阻害因子(TAFI)を活性化する(TAFIa)。TAFIaはカルボキシペプチダーゼで、上記線溶活性促進の鍵因子であるC末端リジンを特異的に切断し線溶活性発現を阻害する。今回我々は膜貫通ドメインを欠損する可溶性トロンボモジュリンを添加すると活性化血小板膜による線溶促進効果がTAFIa活性依存性に消失することを見出した。生理的条件下では正常血管内皮細胞近傍でトロンピンが産生された状況が想定され、障害部位を覆った止血血栓辺縁に相当する。これを止血血栓の溶解抵抗性の一機構と仮定しこれを証明する。

2. 研究の目的

血栓(線維素)溶解(線溶)過程における血小板の役割を解析する。活性化血小板膜は凝固系活性化に不可欠で凝固開始点となる。我々はイメージング手法を用い血管内皮細胞上と同様に活性化血小板膜表面に組織型プラスミノゲンアクチベータ(tPA)と共にプラスミノゲンがリジン結合部位(LBS)依存性に集積し、血小板膜が線溶系活性化を促進し溶解開始起点として機能することを見出した。本効果は本来血管内皮細胞上に発現しトロンピン活性化線溶阻害因子(TAFI)の活性化に関わるトロンボモジュリンにより消失することも証明した。一方shear stress下では血小板は顆粒からPAI-1を分泌し線溶を阻害し血栓を増大させる機構も証明した。本研究では、これらの線溶系に対する血小板の「多様な役割」の時空間的調節機構を明らかにし、止血血栓の安定性と不要過剰血栓の易溶解性の機構の相違を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

活性化血小板膜上の線溶活性発現促進機構と、TAFIによるその促進機構の積極的な線溶阻害および、ずり応力下で活性化血小板から放出されるPAI-1による線溶阻害という、多様な血小板の役割を解析する。

およびでは、培養血管内皮細胞上で希釈多血小板血漿をtissue factorで処理し、血小板含有フィブリン網の形成および溶解過程を共焦点顕微鏡で観察する。鍵因子となるTAFIおよび血管内皮細胞上のトロンボモジュリンの局在、血小板膜上のC末端リジンのプラスミンによる露出およびTAFIaによる切断を可視化する。これによりこれらの時空間的調節機構を解析する。

に関してはPAI-1欠損ならびにコントロールiPSから調整した血小板を用い、ずり応力下での血小板含有フィブリン網産生および溶解過程の相違を観察する。またPAI-1-GFP発現巨核球から調整した血小板を用い、PAI-1-GFPの分泌過程ならびにAlexa標識tPAとの複合体形成過程を、ずり応力下ならびに静止系でイメージング解析する。

4. 研究成果

血小板膜上の線溶活性発現促進機構

イメージング手法を用い血管内皮細胞上と同様に活性化血小板膜表面に組織型プラスミノゲンアクチベータ (tPA) と共にプラスミノゲンがリジン結合部位 (LBS) 依存性に集積し、血小板膜が線溶系活性化を促進し溶解開始起点として機能することを見出した。本効果は本来血管内皮細胞上に発現しトロンピン活性化線溶阻害因子 (TAFI) の活性化に関わるトロンボモジュリンにより消失することも証明した。

線溶活性発現は、標識プラスミノゲンの集積とフィブリン網の溶解で解析した。血管内皮細胞の存在下及び非存在下で、蛍光標識プラスミノゲン、組織型 PA、フィブリノゲンの存在下で多血小板血漿を組織因子と CaCl₂ で処理し、フィブリン網の形成とその溶解過程を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

活性化血小板膜表面からのフィブリン形成とともに、同部位への tPA とプラスミノゲンの集積、さらには同部位から開始する溶解縁へのプラスミノゲンの集積を伴うフィブリン溶解を認めた。

TAFI によるその促進機構の積極的な線溶阻害

可溶性トロンボモジュリン存在下では、上記のフィブリン形成と初期のプラスミノゲンの集積は同様であったが、以降の集積の増幅は認めず、溶解時間は著明に延長した。トロンボモジュリンの効果は、活性化 TAFI (TAFIa) 阻害活性を有するカルボキシペプチダーゼ阻害薬、及びトロンボモジュリン・トロンピン結合の拮抗抗体により消去された。今回血管内皮細胞存在下では、トロンボモジュリン添加の影響は小さかったが、カルボキシペプチダーゼ阻害薬及びトロンボモジュリン・トロンピン結合の拮抗抗体により、プラスミノゲンの集積の改善、溶解時間の短縮ともに強く認められた。これにより血管内皮上のトロンボモジュリンが TAFI の活性化を促進し線溶活性を抑制している事実が確認できた。

5. 主な発表論文等

1. Iwaki T, Nagahashi K, Takano K, Suzuki-Inoue K, Kanayama N, Umemura K, Urano T. Mutation in a highly conserved glycine residue in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 causes polymerization. Thromb Haemost 2017 117(5):860-869, DOI: 10.1160/TH16-07-0572
2. Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y. Regulation of Plasminogen Activation on Cell Surfaces and Fibrin. J Thromb Haemost 16 (8), 1487-1497, 2018. DOI: 10.1111/jth.14157

〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. Brzoska T, Suzuki Y, Sano H, Suzuki A, Tanaka H, Urano T. Imaging analyses of coagulation-dependent initiation of fibrinolysis on activated platelets and its modification by thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. Thromb Haemost 2017 7. 682-690. doi.org/10.1160/TH16-09-0722
2. Kugo H, Zaima N, Tanaka H, Urano T, Unno N, Moriyama T. The effects of nicotine administration on pathophysiology of rat vascular wall. Biotechnic & Histochemistry 2017 92(2):141-148, DOI: 10.1080/10520295.2017.1287428
3. Iwaki T, Nagahashi K, Takano K, Suzuki-Inoue K, Kanayama N, Umemura K, Urano T. Mutation in a highly conserved glycine residue in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 causes polymerization. Thromb Haemost 2017 117(5):860-869, DOI: 10.1160/TH16-07-0572
4. Urano T, Suzuki Y. (editorial) Thrombolytic therapy targeting alpha 2-antiplasmin. Circulation 2017. 135:1021-1023 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.026884
5. Kugo H, Zaima N, Tanaka H, Hashimoto K, Miyamoto C, Sawaragi A, Urano T, Unno N, Moriyama T. Pathological Analysis of the Ruptured Vascular Wall of Hypoperfusion-

- induced Abdominal Aortic Aneurysm Animal Model. *J Oleo Sci* 2017 66(5), 499-506. DOI: 10.5650/jos.ess16219
6. Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Yamamoto N, Inuzuka K, Yata T, Iwaki T, Umemura K, Sano H, Suzuki Y, Urano T, Setou M, Unno N. Lysophosphatidylcholine Acyltransferase-3 Expression Is Associated with Atherosclerosis Progression. *J Vasc Res* 2017 54(4), 200-208, 2017, DOI: 10.1159/000473879
 7. Hashimoto K, Kugo H, Tanaka H, Miyamoto C, Urano T, Unno N, Zaima N, Moriyama T. The effect of high fat diet on development of abdominal aortic aneurysm in vascular hypoperfusion-induced animal model. *J Vasc Res* in press
 8. Iida Y, Tanaka H, Urano T, Unno N, Shimizu H. PC194 Ectopic Expression of Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 by Smooth Muscular Cells Contributes to Aortic Dissection. *J Vasc Surg* 2017 65(6), 192S-193S, DOI: 10.1016/j.avsg.2017.10.005
 9. Takechi D, Kuroda N, Dote H, Kim E, Yonekawa O, Watanabe T, Urano T, Homma Y. Better documentation in electronic medical records would lead to an increased use of lower extremity venous ultrasound in the inpatient setting: a retrospective study. *Acute Med Surg* 2017 4(4), 385-393, DOI: 10.1002/ams2.289
 10. Tanaka H, Unno N, Yata T, Kugo H, Zaima N, Urano T. Creation of a Rodent Model of Abdominal Aortic Aneurysm by Blocking Adventitial Vasa Vasorum Perfusion. *J. Vis. Exp.* (129), e55763, doi:10.3791/55763, 2017. DOI: 10.3791/55763
 11. Tanaka H, Iida Y, Iwaki T, Suzuki Y, Sano H, Miyajima C, Zaima N, Sasaki T, Sumioka A, Hakamata S, Shimizu H, Umemura K, Urano T. Elevated Plasma Levels of LDL Cholesterol Promote Dissecting Thoracic Aortic Aneurysms in Angiotensin II-Induced Mice. *Ann Vasc Surg* 48:204-213 2018 DOI: 10.1016/j.avsg.2017.10.006
 12. Wendelboe, Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Buñler H, Ddungu, H, Dvorak JD, Hunt BJ, Hylek EM, Kakkar A, Konstantinides SV, McCumber M, McLintock C, Urano T, Weitz J. Global Public Awareness about Atrial Fibrillation. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018, 2(1), 49-57.
 13. Sugiura K, Ojima T, Urano T, Kobayashi T. The incidence and prognosis of thromboembolism associated with oral contraceptives: age-dependent difference in Japanese population. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2018, 44(9), 1766-1772
 14. Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y. Regulation of Plasminogen Activation on Cell Surfaces and Fibrin. *J Thromb Haemost* 16 (8), 1487-1497, 2018. DOI: 10.1111/jth.14157
 15. Tanaka H, Unno N, Suzuki Y, Sano H, Yata T, Urano T. Hypoperfusion of the Aortic Wall Secondary to Degeneration of Adventitial Vasa Vasorum Causes Abdominal Aortic Aneurysms. *Curr Drug Targets* 2018 19(11), 1327-1332
 16. Tanaka H, Inuzuka K, Ida Y, Shimizu H, Unno N, Urano T. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Is Associated with Degenerating Adipocytes in Abdominal Aortic Aneurysm. *J Oleo Sci* 2018, 67(10), 1355-1360.

〔学会発表〕(計 12 件)

(特別講演)

1. 浦野哲盟、血栓溶解に関わる血液と血管機能～生活習慣と食事の影響～第22回日本フードファクター学会学術集会、日本大学、2017.12.2-3

(シンポジウム等)

2. Urano T, Fibrinolytic assays. ISTH Workshop on Thrombosis and Hemostasis. Bangkok (Thailand), 2017.11.4-7

3. Urano T, Fibrinolysis related hemostatic- and thrombotic- disorders. ISTH Workshop on Thrombosis and Hemostasis. Bangkok (Thailand), 2017.11.4-7
4. 浦野哲盟, Regulatory mechanism of the initiation and amplification of fibrinolysis on cell surface by TAFI and PAI-1: Potential drug target to prevent thrombosis. 第 39 回本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017.06.08-10
5. Urano T. Regulatory Mechanisms of the Initiation and Amplification of Fibrinolysis on Cell Surface by TAFI and PAI-1: Demonstration by Real-Time Imaging Analysis. Gordon Research Conference. Ventura (USA), 2018. 02. 11-16
6. Urano T, Suzuki Y, Brzoska T, Sano H, Regulatory mechanism of the fibrinolytic activity and its related disorders , 2018 Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis together with the 9th Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology. St Petersburg (Russia), 2018.10.05
7. Urano T, Suzuki Y, Overview of the cross-talk between the coagulation-fibrinolysis System and cellular functions. The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019). Kobe (Japan), 2019.03.28
8. Suzuki Y, Sano H, Urano T: Spatiotemporal analysis of membrane surface-based fibrinolysis on vascular endothelial cells and activated platelets. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (APSTH). Sapporo, 2018 年 6 月
9. Suzuki Y, Sano H, Honkura N, Urano T: Cell surface-modified fibrinolysis; contribution of vascular endothelial cells and paltelets. The Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies; 9th FAOPS Congress. Kobe, 2019 年 3 月

(一般演題)

10. Sano H. Vascular Endothelial Cells Derived from Human PAI-1 Deficient iPS Cells Reveal Physiological Functions of PAI-1 in Angiogenesis. 26th ISTH Congress with 63rd Annual SSC Meeting, 2017 July, Berlin (Germany)
11. Urano T, Sano H, Tanaka H, Suzuki Y. Carbonylation makes fibrin resistant to fibrinolysis: its underlying mechanism and pathological implication. The 2nd Joint Meeting of ISFP and PA Workshop. Edingburg (UK), 2018.09.05
12. Suzuki Y, Vidal M, Maess M, Sano H, Urano T. TAFI-dependent inhibition of fibrinolysis by platelets and vascular endothelial cells. The 2nd Joint Meeting of ISFP and PA Workshop. 2018 年 9 月, Edinburgh (Scotland)

〔図書〕(計 3 件)

1. 浦野哲盟: 日本語訳分担「血液」、Guyton Hall Textbook of Medical Physiology 13th Ed. 日本語版
2. 浦野哲盟: 線溶療法 朝倉英策編 臨床に直結する血栓止血学
3. 浦野哲盟: PAI-1 および TAFI による線溶活性制御機構と抗血栓療法 朝倉英策編 臨床に直結する血栓止血学

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木優子
ローマ字氏名：Suzuki Yuko
所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：20345812

研究分担者氏名：岩城孝行
ローマ字氏名：Iwaki Takayuki
所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：70509463

研究分担者氏名：佐野秀人
ローマ字氏名：Sano Hideto
所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：80623842

研究分担者氏名：田中宏樹
ローマ字氏名：Tanaka Hiroki
所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部
職名：特任研究員
研究者番号(8桁)：50456563

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。