

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 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590219

研究課題名（和文） t-PA/t-PAR 系による血管修復・再生機能の解析とその応用

研究課題名（英文） Analysis of vascular remodeling by t-PA/t-PAR system

研究代表者

松尾 理 (MATSUO OSAMU)

近畿大学・医学部・顧問

研究者番号：40030879

研究成果の概要（和文）：作成した t-PAR 過剰発現血管内皮細胞は、t-PA 結合能、Plg 活性化能、細胞増殖能、細胞浸潤・遊走能および管腔形成能が増強した。また、血管平滑筋細胞は、t-PA 結合能と t-PA による Plg 活性化促進性を示した。それらの細胞における t-PA/t-PAR 系は、組織障害後の修復・再生過程に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：t-PAR-transfected endothelial cells enhanced the t-PA binding ability, t-PA-mediated plasminogen activation, migration and invasion of cells, and tube formation as compared with control endothelial cells. Vascular smooth muscle cells bound to t-PA and enhanced t-PA-mediated plasminogen activation. Therefore, it is thought that t-PA/t-PAR system on the membrane surface of these cells plays an important role on the tissue regeneration process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・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

t-PA レセプター (t-PA receptor; t-PAR) は、組織性プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator; t-PA) に対する受容体で、我々がその存在を血管内皮細胞の細胞膜上で単離した物質である。t-PA は血管内での線溶活性に大きくかかわっているが、t-PA の受容体である

t-PAR も血管内での線溶活性の制御に極めて重要であると考えられる。我々が単離・精製に成功した t-PAR の分子量は、約 2 万であるが、世界的にも未だにこれと同一の物質に関する報告はなされていない新規なものである (Biochem Biophys Res Commun 187:956-962, 1992)。したがって、本研究は、きわめて独創性が高い。心筋梗塞や脳梗塞な

ど血管内に血栓が形成されることによって発症する疾患には線溶活性化反応の増強手段として PA の投与が実施されている。また、血管内皮細胞上では、t-PA/t-PAR 系を介したプラスミノゲン (plasminogen; Plg) 活性化の促進が起きていると考えられ、t-PAR の生理的および病態生理的な役割を解明することは、血栓性疾患の発症やその進展を防ぐ方策および血栓性疾患の予防法を見出すうえで非常に大きな意義がある。t-PAR に関する研究は、日本国内では申請者のグループだけで行われている。一方、国外的には、数グループがこのテーマに関連した研究を実施しており、米国の研究グループは、主にヒト胎盤から精製した t-PAR が既存のリン脂質結合蛋白質であるアネキシン II と同一の物質であったと報告している。また、米国およびカナダの研究グループは、脳に存在するエノラーゼ様物質もしくはアクチン分子が Plg とともに t-PA と結合すると報告している。また、英国の研究グループは、血管平滑筋細胞で p63 分子が t-PAR としての機能を持つことを報告している。しかし、これらの物質は、我々が単離・精製した t-PAR の分子量や生物学的特徴が明らかに異なることから、全く別の物質と考えられる。我々の見出した t-PAR は、Plg と結合せず、t-PA とのみ結合するという生化学的特徴から、この分子こそが血管内皮細胞を中心に発現する真の t-PA 受容体であろうと期待される。

一方、我々は、組織の障害後の再生過程に線溶系因子の関与を考え、遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた系で検討してきた。肝臓では、部分肝切除モデル (Fibrinolysis Proteolysis 15;2-8, 2001)、apoptosis 誘導モデル (Hepatology 33;569-676, 2001) および肝線維化モデル (J Hepatology 40;110-116, 2004, Blood Coagl Fibro 19;503-511, 2008) において、線溶系因子の肝再生過程への重要な関与を見出した。また、分離肝細胞を用いた解析では、肝細胞表面での線溶系因子の効率的活性化が、肝再生時の肝細胞の増殖能に重要であることを見出した。さらに、心・血管系における傷害・修復過程や皮膚の創傷治癒過程においては、Plg/ α_2 -AP 系が血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β) の発現を制御することにより重要な役割を果たすことを明らかにした。

また、組織障害後の修復・再生過程における血管新生は、その再生部位への血液供給に重要な役割を果たす。この血管新生過程に線溶系因子の関与が考えられる。したがって、血管を構成する血管内皮細胞や血管平滑筋細胞での細胞周囲での線溶系酵素による蛋白分解活性の発現が組織再生に重要であると思われる。

2. 研究の目的

t-PA の受容体である t-PAR は、我々がその存在を血管内皮細胞から単離し明らかにした蛋白質である。本研究は、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞と血管平滑筋細胞を用いて、それらの細胞における t-PA/t-PAR 系の機能を解析し、組織における役割の解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1). 血管内皮細胞系

①. t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の作成

t-PAR 遺伝子は、細胞膜上で蛋白を発現できる pDisplay vector (Invitrogen) に挿入した。この vector の細胞への導入を Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて行った。血管内皮細胞をヒト臍帯静脈より当研究室で樹立化した TKM-33 細胞を用いた。

②. t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の解析

血管内皮細胞の t-PAR 発現を培養細胞の抽出液を用いて PCR と Western blot で検討した。また、血管内皮細胞の細胞膜における t-PAR 発現を t-PAR 抗体と CD31 抗体を用いた免疫染色法で検討した。

③. t-PA 結合能

血管内皮細胞の t-PA 結合能を分子相互作用解析装置 IAsys (Affinity Sensors) で検討した。また、t-PA 結合能の反応速度論的解析を蛍光標識 (Molecular Innovations) した t-PA と細胞との反応性で検討した。

④. Plg 活性化能

t-PA による Plg 活性化を血管内皮細胞の存在、非存在下で合成気質法 (plasmin 基質: S-2251) を用いて検討した。血管内皮細胞は、予め t-PA を結合させた後使用した。

⑤. 増殖能

血管内皮細胞の増殖能を WST-1 Kit (タカラ) を用いて検討した。

⑥. 血管内皮細胞の遊走・浸潤能

細胞の遊走・浸潤能および管腔形成能について 24-well plate 内のコラーゲンゲルとの二層培養系を用いた新しい方法を開発した。細胞の遊走・浸潤能用の plate は、下層に 1-a 型コラーゲン (新田ゼラチン) をゲル化させ、その上面と接するようにポアサイズ 5 \cdot m の上層チャンバーを設置した。その中に細胞を播種し培養後、下層ゲルをコラーゲナーゼ (新田ゼラチン) で分解後、ゲル内に遊走・浸潤した細胞数を顕微鏡下で評価した。

また、細胞の管腔形成用 plate では、下層に 1-c 型コラーゲン（新田ゼラチン）を用いた。上記同様の方法で細胞を培養し、下層のゲル内に遊走・侵潤した細胞による管腔形成を顕微鏡下で評価した。

(2). 血管平滑筋細胞系

①. 血管平滑筋細胞の分離

血管平滑筋細胞を t-PA 遺伝子欠損マウス (t-PAKO) とその野生型マウス (WT) の大動脈より分離した。

②. t-PA 結合能

血管平滑筋細胞の t-PA 結合能は、分子相互作用解析装置 IAsys (Affinity Sensors) で検討した。

③. Plg 活性化能

t-PA による Plg 活性化を血管平滑筋細胞の存在、非存在下で合成基質法 (plasmin 基質: S-2251) により測定した。

4. 研究成果

(1). 血管内皮細胞系における解析

①. t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の解析

作成した t-PAR 過剰発現血管内皮細胞に t-PAR 遺伝子および蛋白質の発現が検出された。また、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞は、t-PAR と血管内皮細胞のマーカーである CD31 を共発現していた (図 1)。

以上より、作成した t-PAR 過剰発現血管内皮細胞が、t-PAR を発現していることを確認できた。

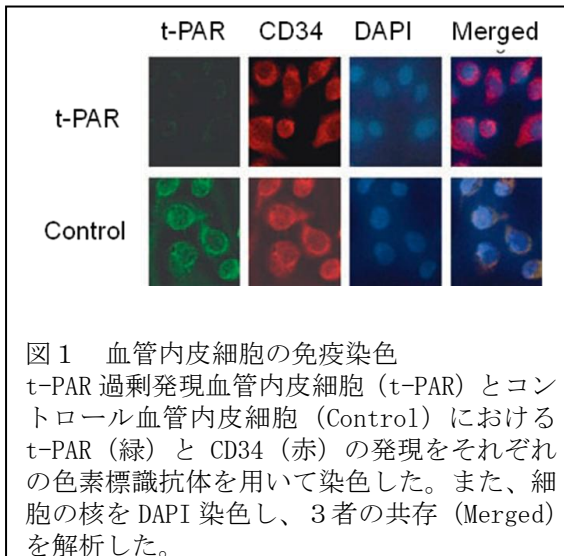


図 1 血管内皮細胞の免疫染色

t-PAR 過剰発現血管内皮細胞 (t-PAR) とコントロール血管内皮細胞 (Control) における t-PAR (緑) と CD34 (赤) の発現をそれぞれの色素標識抗体を用いて染色した。また、細胞の核を DAPI 染色し、3 者の共存 (Merged) を解析した。

②. t-PA 結合能

t-PA の結合能は、t-PAR 過剰発現血管内

皮細胞の方がコントロール血管内皮細胞に比べ高かった (図 2A)。また、DFP 処理で t-PA 活性を失活化させた DFP・t-PA は、血管内皮細胞に対して未処理 t-PA と同程度結合した (図 2B)。t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の Lys 誘導体の EACA 処理は、t-PA 結合能を抑制した (図 2C)。

以上より、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞は、t-PA 結合能が強く、その結合に Lys 親和性部位の関与が示唆された。

また、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の t-PA 結合能は、低親和性と高親和性の性質を示した (表 1)。これに対し、コントロール血管内皮細胞では、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の低親和性の Kd と Bmax と類似の値を示した (表 1)。

よって、血管内皮細胞には t-PA 結合部位が存在していた。また、t-PAR はその結合部位より高親和性であった。

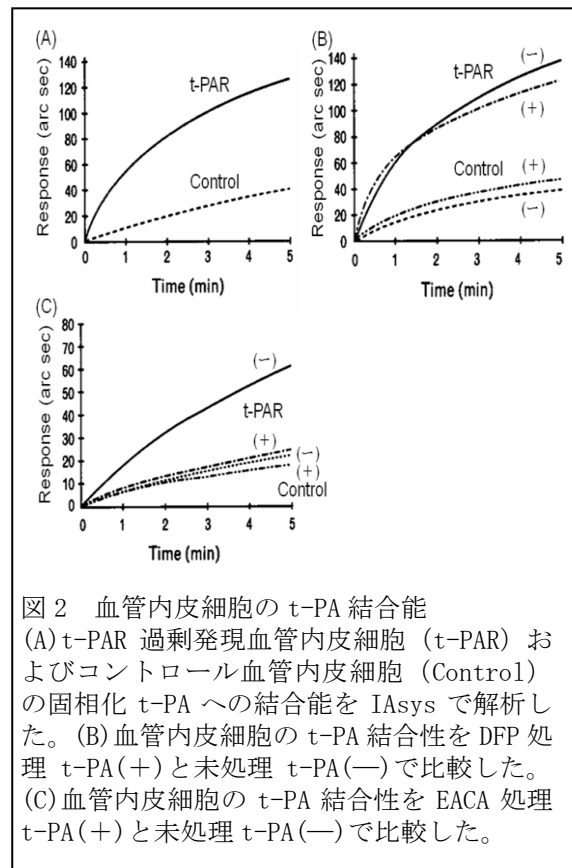


図 2 血管内皮細胞の t-PA 結合能

(A) t-PAR 過剰発現血管内皮細胞 (t-PAR) およびコントロール血管内皮細胞 (Control) の固相化 t-PA への結合能を IAsys で解析した。(B) 血管内皮細胞の t-PA 結合性を DFP 処理 t-PA (+) と未処理 t-PA (-) で比較した。(C) 血管内皮細胞の t-PA 結合性を EACA 処理 t-PA (+) と未処理 t-PA (-) で比較した。

表 1. 血管内皮細胞に対する t-PA 結合能

血管内皮細胞	Kd (nmol/L)	Bmax x10 ⁶ (sites/cell)
Control	2.31 ± 0.37	0.23 ± 0.10
t-PAR	0.39 ± 0.38	0.43 ± 0.07
過剰発現	3.92 ± 0.35	0.39 ± 0.17

③. Plg 活性化能

t-PA による Plg 活性化は、血管内皮細胞の存在で増強した (図 3)。さらに、その増強は、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の方がコントロール血管内皮細胞に比べ高かった (図 3)。

これらの結果から、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞は、細胞周囲での蛋白分解活性を亢進させることが示唆された。

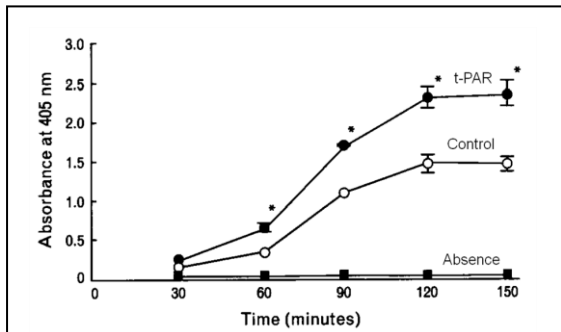


図3 t-PAによるPlg活性化に対する血管内皮細胞の影響

t-PAによるPlg活性化をt-PAを結合させたt-PAR過剰発現血管内皮細胞(t-PAR)またはコントロール血管内皮細胞(Control)の存在下、非存在(Absence)で合成基質法により検討した。*:P<0.001。

④. 増殖能

血管内皮細胞の増殖能は、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の方がコントロール血管内皮細胞に比べ高かった (図 4)。

よって、血管内皮細胞の t-PAR 発現は、細胞の増殖能に関与することが示唆された。

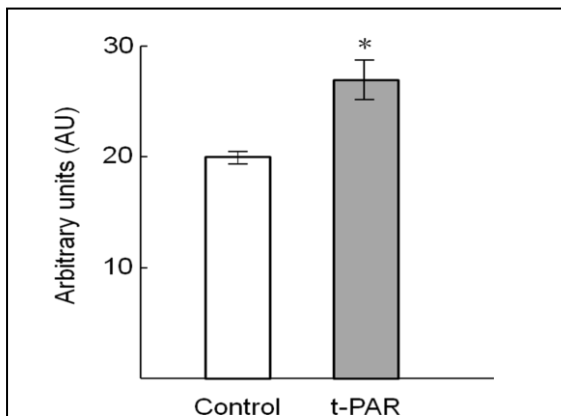


図4 血管内皮細胞の増殖能
t-PAR 過剰発現血管内皮細胞 (t-PAR) およびコントロール血管内皮細胞 (Control) の増殖能はWTP-1により検討した。*:P<0.005。

⑤. 遊走・侵潤能と管腔形成能

血管内皮細胞の遊走・侵潤能は、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の方がコントロール血管内皮細胞に比べ高かった (図 5)。

よって、血管内皮細胞の t-PAR 発現は、細胞の遊走・侵潤能に関与することが示唆された。

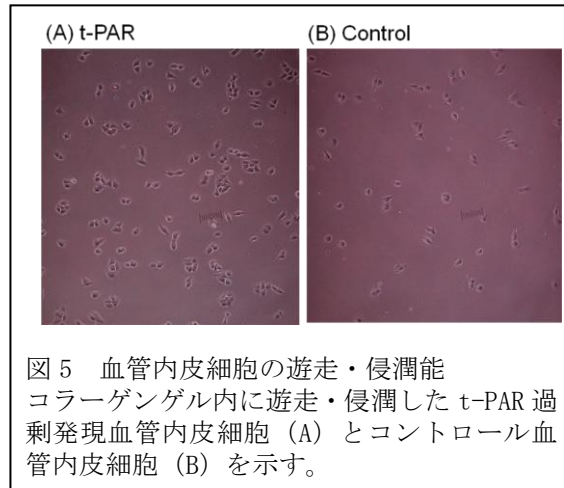


図5 血管内皮細胞の遊走・侵潤能
コラーゲンゲル内に遊走・侵潤したt-PAR過剰発現血管内皮細胞(A)とコントロール血管内皮細胞(B)を示す。

また、血管内皮細胞の二層培養における1-c型コラーゲンゲルへの遊走・侵潤では、ゲル内に管腔を形成した。この管腔形成能は、t-PAR 過剰発現血管内皮細胞の方がコントロール血管内皮細胞に比べ高かった (図 6)。

よって、血管内皮細胞の t-PAR 発現は、細胞の管腔形成に関与することが示唆された。

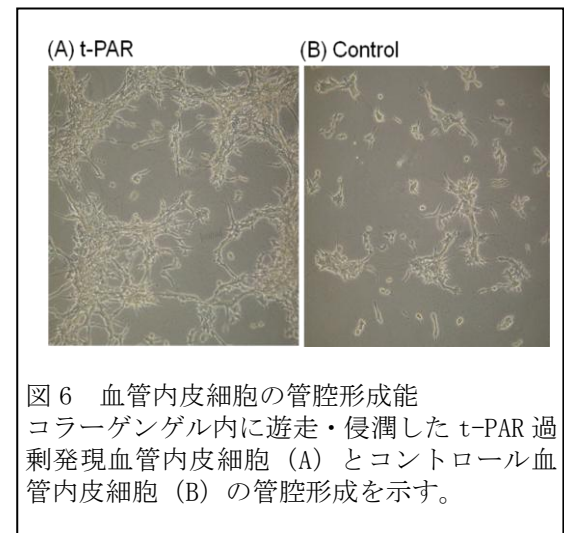


図6 血管内皮細胞の管腔形成能
コラーゲンゲル内に遊走・侵潤したt-PAR過剰発現血管内皮細胞(A)とコントロール血管内皮細胞(B)の管腔形成を示す。

(2). 血管平滑筋細胞系における解析

①. 血管平滑筋細胞の分離

血管平滑筋細胞を t-PAKO と t-PAWT マウスの大動脈より分離した。

②. t-PA 結合能

マウス血管平滑筋細胞は、t-PA と結合した。その結合能は、t-PAKO と t-PAWT から得られた血管平滑筋細胞間に差はなかった (図 7)。また、肝臓の肝細胞や皮膚の線維芽細胞に対しても線溶系因子の結合性を確認している。

よって、血管平滑筋細胞は、t-PA 結合部位有することが示唆された。

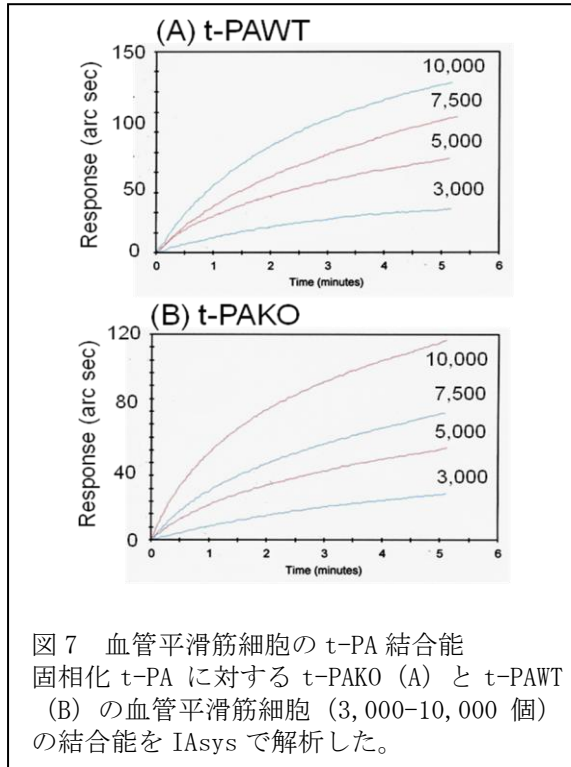


図 7 血管平滑筋細胞の t-PA 結合能
固相化 t-PA に対する t-PAKO (A) と t-PAWT (B) の血管平滑筋細胞 (3,000-10,000 個) の結合能を IAsys で解析した。

③. Plg 活性化能

t-PA による Plg 活性化は、血管平滑筋細胞の存在で増強した (図 8)。また、肝臓

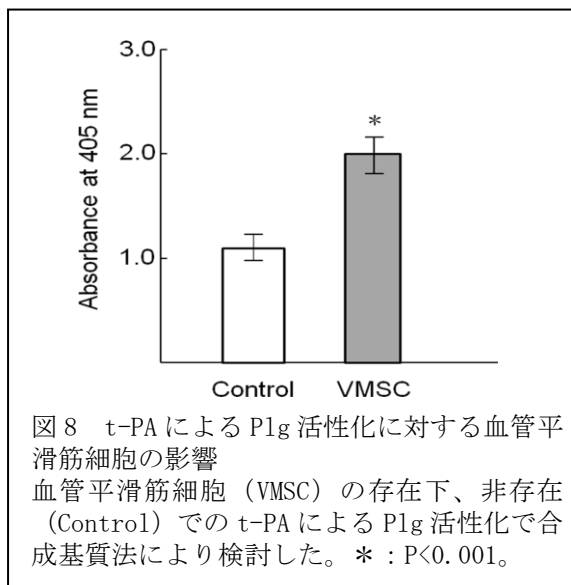


図 8 t-PA による Plg 活性化に対する血管平滑筋細胞の影響
血管平滑筋細胞 (VMSC) の存在下、非存在 (Control) での t-PA による Plg 活性化で合成基質法により検討した。* : P<0.001。

の肝細胞においても同様の細胞存在下で Plg 活性化促進反応が確認している。

よって、血管平滑筋細胞は、t-PA の結合により細胞周囲での蛋白分解活性を亢進させることが示唆された。

以上の結果より、血管内皮細胞の t-PA/t-PAR 系は、細胞の遊走・侵潤能および環状形成能に重要な役割を果たすことが示唆された。血管内皮細胞と血管平滑筋細胞での t-PA/t-PAR 系による蛋白分解活性亢進と細胞増殖能促進の作用とを考え併せると、各細胞膜上での t-PA/t-PAR 系による蛋白分解活性の亢進が、組織修復・再生過程における血管新生・再構築を誘導すると考えられる。

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 5 件)

- (1) Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Horiuchi Y, Okumoto K, Okada K, Suzuki Y, Umemura K, Yano M, Ueshima S, Kaji H, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen mediate activation of macrophage phagocytosis during liver repair in vivo. *Thromb Haemost* 査読有 107, 2012, 749-59
DOI:10.1160/TH11-08-0567
- (2) Okada K, Ueshima S, Matsuno H, Nagai N, Kawao N, Tanaka M, Matsuo O. A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances plasminogen activator by tissue-type plasminogen activator. *J Thromb Haemost* 査読有 9, 2011, 997-1006
DOI:10.1111/j.1538-7836.2011.04257.x
- (3) Kanno Y, Ishisaki A, Kawashita E, Chosa N, Nakajima K, Nishihara T, Toyoshima K, Okada K, Ueshima S, Matsushita K, Matsuo O, Matsuno H. Plasminogen/plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. *J Biol Chem* 査読有, 286, 2011, 8952-8960
DOI:10.1074/jbc.M110.152181
- (4) Tomogane K, Kanno Y, Kawashita E, Okada K, Takeuchi K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H. The absence of urokinase type plasminogen activator receptor plays a role in the insulin-independent glucose metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 査読有, 57, 2011,

- (5) Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Umemura K, Ueshima S, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator contributes to heterogeneity of macrophages at the border of damaged site during liver repair in mice. *Thromb Haemost* 査読有, 105, 2010, 892-900
DOI:10.1160/TH10-08-0516

[学会発表] (計 9 件)

- ① Okada K, Ueshima S, Kawao O, Tamura Y, Yano M, Matsuo O, Kaji H. The mechanism of enhancement on plasminogen activation and thrombolysis by synthetic nonadecapeptide. The 90th Annual Meeting of the Physiology Society of Japan. 2013/03/27-29, Tokyo
- ② 河尾直之、田村行識、奥本勝美、矢野昌人、岡田清孝、松尾 理、梶 博史. 骨修復におけるプラスミノゲンの重要性について. 第 12 回日本再生医療学会総会 2013/03/21-23, 横浜
- ③ 岡田清孝、上嶋 繁、河尾直之、田村行識、矢野昌人、梶 博史、松尾 理. 肝細胞周囲での線溶系酵素/受容体系による肝再生制御機構. 第 11 回日本再生医療学会総会 2012/06/12-14, 横浜
- ④ 岡田清孝、上嶋 繁、河尾直之、田村行識、矢野昌人、梶 博史、松尾 理. 新規合成ペプチドとプラスミノゲンの相互作用. 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012/06/07-09, 東京
- ⑤ 河尾直之、永井信夫、田村行識、堀内喜高、奥本勝美、岡田清孝、矢野昌人、鈴木康裕、梅村和夫、梶 博史、松尾 理. 肝修復過程における u-PA によるマクロファージの機能制御. 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012/06/07-09, 東京
- ⑥ Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okumoto K, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Umemura K, Kaji H, Matsuo O. Roles of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen in both accumulation of macrophages and induction of their phenotype heterogeneity during liver repair. The 89th Annual Meeting of the Physiology Society of Japan.

- ⑦ Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okumoto K, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Umemura K, Ueshima S, Matsuo O. Impaired accumulation of macrophages and absence of their phenotype heterogeneity during liver repair in urokinase-deficient mice. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2011/07/23-28, Kyoto
- ⑧ Okada K, Ueshima S, Matsuno H, Kawao N, Nagai N, Matsuo O. Synthetic nonadecapeptide (SAK22-40) enhances plasminogen activation and thrombolysis. 20th International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis 2010/07/02-05, Amsterdam/Nederland
- ⑨ 岡田清孝、上嶋 繁、河尾直之、永井信夫、松尾 理. 肝細胞上での蛋白分解カスケード増幅系による肝再生調節機構の解析. 第 31 回日本炎症・再生学会 2010/08/04-06, 東京

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 理 (MATSUO OSAMU)
近畿大学・医学部・顧問
研究者番号: 40030879

(2) 研究分担者

上嶋 繁 (UESHIMA SHIGERU)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号: 30193791
岡田清孝 (OKADA KIYOTAKA)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号: 20185432
河尾直之 (KAWAO NAOYUKI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号: 40030879

(3) 連携研究者

永井信行 (NAGAI NOBUYUKI)
長浜バイオ大学・アニマルバイオサイエンス学科・教授
研究者番号: 90260281