

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590273

研究課題名(和文) 組織因子による凝固系開始機構における活性化血小板膜リン脂質の役割の解析

研究課題名(英文) Role of phosphatidylserine on activated platelets on tissue factor initiated blood coagulation

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：活性化血小板膜の凝固系活性化、フィブリン形成と溶解に寄与する機構を解析した。凝固系に必須のphosphatidylserine (PS)の血小板膜上への発現には血小板 GPIIb/IIIaを介したフィブリン網への結合と形態変化により生じる機械刺激が必須であり、重要な凝固系活性化増幅系として報告した。今回PS発現血小板膜上にプラスミノゲン(plg)も集積し、その周囲からフィブリン網溶解が始まる現象を証明した。凝固亢進部位で早期に線溶系が開始するという、過剰血栓の早期溶解に重要な機構である。in vivoでもPS発現部位にplgが早期から集積する事実を見だし、本機構の生理的重要性が証明できた。

研究成果の概要(英文)：Contribution of activated platelets on the initiation of coagulation cascade, fibrin formation as well as its lysis was analyzed. For the exposure of phosphatidylserine (PS) on activated platelets, integrin outside-in signals generated by platelet binding to a rigid fibrin network, and the resultant mechanical foci to stretch platelets through this binding, appeared to be essential. We also found that plasminogen binds to PS exposing platelets which then initiated fibrinolysis as starting points. This seems important to quickly dissolve generated excess amounts of thrombi in order to keep vascular patency. The accumulation of plasminogen in the center of micro-thrombuss, where platelets were exposing PS and fibrin was formed, was demonstrated from the early phase of thrombus formation. This suggests the physiological importance of coagulation-fibrinolysis cross-talk for normal hemostasis.

研究分野：血液生理学、血栓止血学

キーワード：凝固 線溶 血小板 plasminogen

1. 研究開始当初の背景

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、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を約 1×10^6 倍増幅する。従って PS の存在下でのみ凝固系は効率的に活性化されることになる。我々は、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、凝集血小板塊の中央でのみ血小板は十分に活性化され PS を膜表面に発現する事実を見いだした。同部位に限局してフィブリンが産生される事実も確認した(Hayashi T et al, Pflugers Arch 2008)。

では血栓中央部で凝固機転は如何に開始されたのか。我々は *in vivo* の系で外因系凝固開始因子である FVIIa と TF が PS 発現部位に集積する事実を、それぞれ標識 FVIIa 及び標識抗 TF を用いて明らかにした。これは PS 発現部位が凝固機転開始の起点である可能性を示している。また血栓を溶解する線維素溶解(線溶)系がどのように凝固系と cross-talk し、フィブリン線維を溶解するかも不明である。これも PS 発現血小板を中心に検討する。

2. 研究の目的

血管内血栓形成過程の時空間的制御機構の鍵因子である活性化血小板膜上 PS を凝固機転開始部位として着目し、TF の活性顕在化機構を解析するとともに、凝固に伴うフィブリン形成に引き続き、これを溶解する線溶活性がどのように発現するか解析する。

3. 研究の方法

【1】PS 発現血小板膜を起点とする凝固活性発現およびフィブリン形成を共焦点顕微鏡及び全反射顕微鏡を用いて解析する。多血小板血漿を材料とし、TF 添加により凝固を開始した。PS 発現を蛍光標識 annexin V で同定し、蛍光標識 fibrinogen を tracer としてフィブリン線維を可視化した。

【2】上記凝固活性発現およびフィブリン形成に続く、フィブリン溶解過程を共焦点顕微鏡及び全反射顕微鏡を用いて解析する。

【3】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および溶解過程を可視化し、PS 発現血小板の役割を解析する。green fluorescence protein (GFP) 発現マウスの腸間膜血管に対物レンズを通して局所的にレー

ザー照射して微小血栓を形成し、蛍光標識 plasminogen の集積とその溶解過程を可視化した。また tissue plasminogen activator (tPA) を投与し、線溶過程を解析した。

4. 研究成果

【1 & 2】

- (1) TF 添加後、血小板への annexin V の結合と、annexin V 結合血小板への fibrin(ogen) の結合、fibrin 線維の形成が認められた。
- (2) 活性化血小板周囲の fibrin 蛍光強度は、血小板間の fibrin 蛍光強度に比し強く、fibrin 密度が高いと考えられた。
- (3) fibrin 線維の溶解は、活性化血小板周囲から開始され、血小板間の線維に溶解が伝播した。血小板周囲の fibrin の方が、血小板間の線維に比し、優位に早期に溶解した。
- (4) 溶解に先んじて、活性化血小板への標識 plasminogen の集積が認められた。溶解範囲の拡大時に、溶解縁に沿って標識 plasminogen の結合が認められた。
- (5) thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) の阻害薬 (potato carboxy-peptidase inhibitor) により、溶解時間は短縮した。
- (6) 遺伝子組み換え可溶性ヒト thrombomodulin (rhTM) の添加により、活性化血小板周囲への plasminogen の集積と、fibrin 溶解が優位に抑制された。

【3】

- (1) 微小血栓内の中央部 (PS 発現血小板の存在部位およびフィブリン形成部位) に蛍光標識 plasminogen の継時的な集積が認められ、その集積はリジン様物質である epsilon aminocaproic acid (EACA) の前投与や carboxypeptidase 処理により抑制された。また plasmin の阻害薬である aprotinin の前投与でも優位に抑制された。
- (2) 観察期間 (約 2 時間) 内に血栓溶解が確認できなかったため、tPA を静注し血栓溶解が確認できた。その際、蛍光標識 plasminogen の集積が急速に増強し、その後溶解することが確認できた。

成果のまとめ

本研究において、PS 発現活性化血小板膜上で凝固系が活性化されフィブリン網が産生されるだけでなく、その周辺からフィブリン網の溶解も開始される現象を、初めて可視化して証明した。凝固と線溶系が密に関連し、凝固亢進部位で早期に線溶系が活性化される事は過剰に形成された血栓の早期溶解と血管の開存性維持という観点で重要な機構

である。凝固に伴う線溶系の活性化には、線溶系の主要因子であるプラスミノゲンが細胞膜表面やフィブリン上のC末端リジンにリジン結合部位を介して結合することにより活性化されやすい高次構造に変化することを報告してきた。今回示した凝固亢進部分から線溶系が開始される現象が EACA や carboxypeptidase である TAFI により阻害される事実は本機構の生理的重要性を支持するものと考えられる。TAFI はトロンピンによる線溶系阻害因子であり、凝固線溶系の cross talk を制御する因子として興味深く、現在論文にまとめている。また in vivo の系でも、PS 発現部位に一致してプラスミノゲンが早期から集積する事実を見だし (論文番号7)、今回の in vitro の結果の生理的重要性を支持する結果と評価している。

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 7 件)

1. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara 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 119(8): p. e45-56, 2012
2. Kramkowski K, Leszczynska A, Mogielnicki A, Chlopicki S, Fedorowicz A, Grochal E, Mann B, Brzoska T, Urano T, Motterlini R, Buczko W. Anti-thrombotic properties of water-soluble carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMS). Arterioscler Thromb Vasc Biol 32, 2149-2157, 2012
3. Iwaki T, Urano T and Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. Br J Haematol, 157, 291-298, 2012
4. Urano T and Suzuki Y. Accelerated fibrinolysis and its propagation on vascular endothelial cells by secreted and retained tPA. J Biomed Biotechnol, Article ID 208108, 2012.
5. Brzoska T, Suzuki Y, Mogami H, Sano H, Urano T. Binding of thrombin-activated platelets to a fibrin scaffold through $\alpha_{11b}\beta_3$ evokes phosphatidylserine exposure on their cell surface. Plos One, 8: E55466, 2013
6. 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 Jul;132(1):100-5. doi: 10.1016/j.thromres.2013.04.003. Epub 2013 Apr 20.

7. Brzoska T, Tanaka-Murakami A, Suzuki Y, Sano H, Kanayama N, Urano T. Endogenously Generated Plasmin at the Vascular Wall Injury Site Amplifies Lysine Binding Site-Dependent Plasminogen Accumulation in Microthrombi. Plos One, in press.

[学会発表](計 13 件)

1. Suzuki Y, Urano T Accelerated fibrinolysis on vascular endothelial cells triggered by membrane-retained secreted tPA. 21st International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, June 2012, Brighton, United Kingdom
2. 浦野哲盟, 鈴木優子 血管内皮細胞上の線溶活性発現ポテンシャル維持機構とその破綻 2012.8.10-11 第 17 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
3. 鈴木優子 日本血管生物医学会ジョイントシンポジウム「血管と血液のインターフェース」：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、平成 24 年 6 月
4. Urano T, Regulatory mechanism of the expression of plasmin activity on vascular endothelial cells revealed by imaging technique, Gordon Research Conferences Ventura(USA), February 2014
5. Yasui H, Suzuki Y, Brzoska T, Sano H, Suda T, Dan T Miyata T, Urano T, Real time imaging analysis of secreted-tPA dependent fibrinolytic activity on vascular endothelial cell surface and its enhancement by newly synthesized PAI-1 inhibitor, XIV International Workshop Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation, University of Notre Dame (USA) , June 2013
6. Tanaka A, Suzuki Y, Brzoska T, Sano H, Urano T, Real time imaging of plasminogen accumulation in platelet-rich micro-thrombus and its effective lysis by tPA infusion in vivo, XIV International Workshop Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation, University of Notre Dame (USA), June 2013
7. Sano H, Otsu M, Iwaki T, Nagahashi K, Suzuki Y, Kanayama N, Urano T, Generation of inducible pluripotent stem(iPS)cells from plasminogen activator inhibitor-1 deficient patient, XIV International Workshop Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation,

- Univcity of Notre Dame (USA), June 2013
8. Brzoska T, Suzuki Y, Mogami H, Sano H, Urano T, Phosphatidylserine exposure on platelets'surface upon binding to rigid fibrin scaffold, XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam (The Netherlands), June 2013
 9. Urano T, Tanaka A, Brzoska T, Suzuki Y, Real time imaging of plasminogen binding to platelet-rich micro-thrombus and its effective lysis by tPA infusion in vivo, XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam (The Netherlands), June 2013
 10. Urano T, Suzuki Y, Sano H, Iwaki T, Regulatory mechanism of fibrinolytic activity in plasma and on vascular endothelial cells(VECS):messages from congenital deficiency cases of plasminogen activator inhibitor Type1(PAI-1) in human, The 8th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis, Hanoi(Vietnam), October 2014
 11. Brzoska T, Suzuki Y, Sano H, Urano T, Phosphatidylserine exposure on platelets'surface requires the binding to a rigid fibrin scaffold, The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto (Japan) April 2014
 12. Sano H, Otsu M, Iwaki T, Nagahashi K, Suzuki Y, Kanayama N, Urano T, Generation of inducible pluripotent stem(iPS)cells from plasminogen activator inhibitor-1 deficient patient and differetiation into endothelial cells, The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto (Japan) , April 2014
 13. Sano H, Otsu M, Iwaki T, Nagahashi K, Suzuki Y, Kanayama N, Urano T, Generation of inducible pluripotent stem(iPS)cells from plasminogen activator inhibitor-1 deficient patient, 22th International Congress On Fibrinolysis & Proteolysis, Marseille (France), July 2014

〔図書〕(計 3 件)

1. 浦野哲盟、後藤信哉 血栓形成と凝固・線溶：治療に生かせる基礎医学 メディカルサイエンスインターナショナル
2. 浦野哲盟：線溶療法 朝倉英英編「臨床に直結する血栓止血学」中外医学社 2013
3. 浦野哲盟、鈴木優子：プラスミノゲンレセプター Annual Review 血液 2014 中外医学社 209-215, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：plasminogen activator inhibitor type 1 の Gly397 近傍を標的とした活性阻害分子の発明

発明者：浦野哲盟他

権利者：浜松医科大学

種類：特許・特願

番号：2014-021457

出願年月日：2014 年 02 月 06 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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)研究分担者

佐野秀人 (Sano Hideto)

浜松医科大学医学部助教

研究者番号：80623842