

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461123

研究課題名(和文) 血管内皮細胞による内因性線溶活性発現増強機構の解明とその応用による血栓症予防

研究課題名(英文) Elucidation of intrinsic fibrinolytic activities potentiated vascular endothelial cells and its possibility in prophylaxis of thrombotic disease

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞(VECs)は様々な因子の発現と分泌により抗血栓作用を発揮し、血液の流動性の維持に貢献する。VECsより分泌され、血栓溶解反応を開始する組織型プラスミノゲンアクチベータ(tPA)は、分泌後に細胞表面に滞留することがこれまでの研究で明らかになっていた。本研究ではこの滞留tPAによる二つの異なるプラスミノゲン活性化作用をプラスミン生成とフィブリン溶解として定量法を確立した。この方法により変異型tPAであるtenecteplase(海外にて血栓溶解薬として使用)の野生型tPA(alteplase)と比較したPA活性の特異性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial cells (VECs) play essential role in keeping the fluidity of circulating blood by expressing dynamic antithrombotic effects. Tissue-type plasminogen activator (tPA) secreted from VECs is a key molecule for initiating fibrinolytic, and retained on the cell surface after secretion. Cell surface-retained tPA effectively evokes both plasminogen activation and fibrin clot dissolution (fibrinolysis) on VECs. Our quantitative assessment of these two different plasminogen activator activities contributes to identify the unique characteristics of TNK-tPA (tenecteplase) having lower affinity to VEC surface compared to wild-type (alteplase).

研究分野：細胞生理学

キーワード：血管内皮細胞 線溶活性 組織型プラスミノゲンアクチベータ リアルタイムイメージング解析 蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

線維素溶解(線溶)反応は血栓形成時に適時適所で巧みに作動し、止血血栓の過剰な増大を抑制するとともに血管内皮修復後に残余血栓を完全に除去すると考えられている。血管内線溶活性は、血管内皮細胞より活性型酵素として分泌される組織型プラスミノゲンアクチベータ(tPA)が血漿中プラスミノゲンをプラスミンに活性化することで発現され、tPAと特異的インヒビター(PAI-1)との量的バランスにより規定される。生活習慣病や感染症など、種々の病態で内皮傷害に伴う反応性のtPA分泌量やPAI-1発現量の異常が報告され血栓性疾患の発症に関わるとされるが、tPA分泌機構の詳細は未だ解明されていない。

我々は、これまでに培養血管内皮細胞からのtPA分泌とPA活性発現を全反射/共焦点蛍光顕微鏡によりリアルタイムに可視解析し、分泌後のtPAが細胞表面に滞留すること、ならびに滞留tPAによる細胞表面線溶活性発現特性を報告してきた。これらの知見をもとに、内皮上で活性化される他の線溶関連因子や凝固系とのクロストークを含め内因性線溶活性発現増強機構を解明し、より安全で効果的な血栓症予防・治療への考察をすることを念頭に本研究を進めた。

2. 研究の目的

- (1) tPAの活性発現に重要な分泌後tPAの膜表面滞留に関わる要因を明らかにする。
- (2) 血漿・流速存在下における血栓形成モデルを構築し血栓形成促進/抑制系、線溶反応促進/抑制系存在下における線溶活性増強機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 分泌後tPAの滞留要因

以下のGFP融合変異tPA(tPAs-GFP)遺伝子を血管内皮細胞モデル細胞{ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)由来細胞株(EA.hy926)}に導入し、細胞内分泌顆粒中に発現したtPAs-GFPの開口放出動態を全反射蛍光(TIRF)顕微鏡にて解析し細胞表面滞留を評価し、変異tPAのPA活性を検討した。

糖鎖結合部位変異tPA-GFP:tPA分子の有する4箇所(糖鎖結合部位(T61, N117, N184, N448))をそれぞれN, Q, Q, Qに置換した糖鎖非結合tPA(TATNQ-tPA)-GFP

海外で臨床応用されている血栓溶解薬tenecteplase(TNK-tPA:T103N/N117Q/K296A/H297A/R298A/R299A)-GFP

(2) 血漿・流速存在下における検討

共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡(CLSM)を用いてEA.hy926細胞上へ血漿を添加しフィブリン塊形成の経時解析をした。

フローチャンバーにEA.hy926細胞を培養し、tPA-GFP遺伝子を導入しずり応力負荷に対するtPA-GFP分泌の変化をTIRF顕微鏡に

て解析した。

4. 研究成果

(1) 分泌後tPAの滞留要因

TATNQ-tPA-GFPの解析

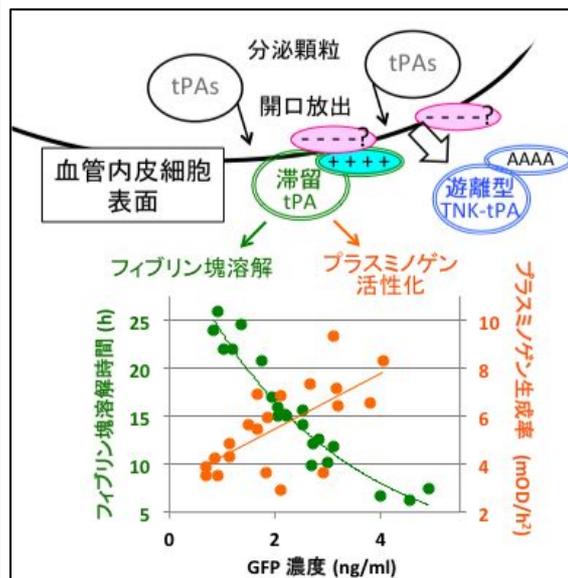
糖鎖結合タンパク質のレクチンファミリーに属しガラクトースに対して結合特異性を有するガレクチン1がtPA-GFP分泌顆粒に共同在することを予備実験にて明らかにしていた。よってTATNQ-TPA-GFPでは分泌後糖鎖を介した膜結合性が減弱していることから速やかに細胞表面から解離することを予想していた。が、これに反してTATNG-tPA-GFPでは野生型に比し分泌後の細胞表面からの解離は遅延し、細胞表面滞留量が増大していた。

また細胞上に作成したフィブリン塊の溶解は野生型に比し遅延傾向を示したが、tPA活性の変化あるいは発現量の差違によるものは明らかでなかった。これらの結果から、tPAの糖鎖を介した細胞表面への結合の可能性は低く、効率的なフィブリン溶解にはtPAが細胞表面から解離することも重要であると考えられた。

TNK-tPA-GFPの解析

分泌後のTNK-tPA-GFP細胞表面滞留度は野生型に比し減弱していた。また培養上清中を検討すると、野生型ではPAI-1との複合体のみ検出されるのに対して、TNK-tPA-GFPは遊離型とPAI-1との複合体型の両方が検出された。以上よりtPA-GFP分子中の陽性荷電アミノ酸配列と細胞表面の陰性荷電分子との相互作用による細胞表面滞留要因が明らかとなった。

さらに野生型に比し、細胞上に作成したフィブリン塊溶解時間は短縮する一方で、細胞表面への標識プラスミノゲンの集積ならびに発色基質による内皮細胞由来プラスミン生成率が減弱することが明らかとなった。これらの新規PA活性定量法{図参照;tPA-GFP



の発現量を上清中の GFP 濃度として GFP ELISA Kit にて測定、各々のサンプルにおける分泌後の tPA-GFP により惹起される PA 活性として、フィブリン塊溶解時間(緑でプロット)は強い負の相関を、プラスミン発色基質によるプラスミン生成率(オレンジでプロット)は強い正の相関をしめした}を TNK-tPA の特性とともに報告した(業績 1: Suzuki Y, et al. *FEBS Open Bio* 6:469-476, 2016)。

本研究結果は脳梗塞患者の治療における alteplase に対する tenecteplase の優位性を示す臨床研究(Parsons M et al.; *N Engl J Med* 2012)を支持する基礎データであり、報告した意義は大きいと考える。

(2) 血漿・流速存在下における検討

ともに血管内皮細胞の有する抗血栓性ならびに線溶促進・線溶抑制の両側面に焦点をあてて、現在サンプル数を増やして検討を進めているところである。

近年、血小板-凝固反応活性化を流速存在下に検討した報告が相次いでいる。このようなデータを下に、線溶系活性化の調節機構を流速存在下にて解明していくことは、ヒト生体内における調節機構の理解に必須であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- 1) Suzuki Y, Sano H, Tomczyk M, Brzoska T, Urano T. Activities of wild-type and variant tissue-type plasminogen activators retained on vascular endothelial cells. *FEBS Open Bio* 6:469-476, 2016. 査読有 doi:10.1002/2211-5463.12057
- 2) Tomczyk M, Suzuki Y, Sano H, Brzoska T, Tanaka H, Urano T. Bidirectional functions of thrombin on fibrinolysis: Evidence of thrombin-dependent enhancement of fibrinolysis provided by spontaneous plasma clot lysis. *Thromb Res* 143:28-33, 2016. 査読有
- 3) Urano T, Suzuki Y. Recent progress and perspectives in the field of fibrinolysis. *Rinsyo Ketsueki* 57:333-339, 2016. 査読無
- 4) Asaji J, 他 11 名, Urano T(9 番目). Platelets regulate the migration of keratinocytes 1 via podoplanin/CLEC-2 signaling during cutaneous wound healing in mice. *Am J Pathol* 186:101-108, 2016. 査読有
- 5) 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* 10:e0122196, 2015. 査読有
- 6) Kapitsinou PP, Sano H, (他 11 名). Endothelial HIF-2 mediates protection and

recovery from ischemic kidney injury. *J Clin Invest* 124:2396-2409, 2014. 査読有

7) 鈴木優子, 浦野哲盟: 凝固線溶系分子による血管内皮細胞機能の維持. *血液内科* 69:336-342, 2014. 査読無

8) 浦野哲盟, 鈴木優子: 「血栓・塞栓症・治療・予防の最新動向」凝固・線溶系のしくみと血栓形成機序. *日本臨床* 72:1198-1205, 2014. 査読無

9) 鈴木優子, 浦野哲盟: 血液凝固における血管内皮細胞と RAS の役割. *Angiotensin Research* 11:1-6, 2014. 査読無

10) 浦野哲盟, 鈴木優子: 凝固線溶系 プラスミノゲンレセプター. *Annual Review 血液* 2014:209-215, 2014. 査読無

11) 鈴木優子, 浦野哲盟: 動脈硬化、血栓性疾患発症予防におけるスタチンの特殊な位置付け. *動脈硬化予防* 12:56-63, 2013. 査読無

[学会発表](計 9 件)

招待講演・シンポジウム発表

1) 鈴木優子, 血管内皮の抗血栓機能のリアルタイムイメージング解析 (Real-time imaging analysis of vascular endothelial antithrombotic function) 第 20 回静岡健康・長寿学術フォーラム、2015 年 10 月、静岡

2) Suzuki Y. Visualization of secretory dynamics of tissue-type plasminogen activator and cell surface-associated fibrinolytic activity on vascular endothelial cells. 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月、鹿児島

口演発表

1) 鈴木優子, 血管内皮細胞表面におけるプラスミノゲンアクチベーター活性の評価、第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月、金沢

2) 鈴木優子, 血管内皮細胞発現 tPA によるプラスミン産生ならびに線溶の定量評価と変異型 tPA の機能解析、第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月、甲府

3) 鈴木優子, リアルタイムイメージングによる修飾 tPA の分泌動態解析、第 36 回日本血栓止血学会学術集会、2014 年 5 月、大阪

ポスター発表

1) Suzuki Y, Evaluation of activities of tissue-type plasminogen activators expressed and retained on vascular endothelial cells、第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月、札幌

2) 鈴木優子, 血管内皮細胞によるプラスミノゲンアクチベーター活性発現調節のリアルタイムイメージング解析、第 23 回日本生物医学学会学術集会、2015 年 12 月、神戸

3) Suzuki Y, Assessment of plasminogen activator activity on vascular

endothelial cells. 9th AIM; Aso International Meeting, 2015年5月、南阿蘇

4) Suzuki Y, Post exocytotic- and cell surface retained- tissue plasminogen activator efficiently initiates fibrin clot lysis on vascular endothelial cells. 8th AIM; Aso International Meeting, 2013年5月、南阿蘇

〔図書〕(計 2件)

1) 鈴木優子、血管内皮細胞と線溶活性調節、一瀬白帝・丸山征郎・和田英夫編著、新・血栓止血血管学「抗凝固と線溶」、金芳堂、pp.83-88(全130)、2015

2) 鈴木優子、15. 運動と血液 血栓と線溶、宮村美晴編、ニュー運動生理学II、真興交易(株)医書出版部、pp.322-333(全414)、2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：PAI-1阻害剤

発明者：浦野哲盟、岩城孝行、鈴木優子、梅村和夫

権利者：国立大学法人浜松医科大学

種類：特願

番号：2014-021457

出願年月日：平成26年02月06日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

https://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seiri2_kenkyu.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

佐野 秀人 (SANO HIDETO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80623842