

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860146

研究課題名(和文) Imaging analyses for activated platelets' surface to initiate blood coagulation both in in-vivo and in-vitro systems.

研究課題名(英文) Imaging analyses for activated platelets' surface to initiate blood coagulation both in in-vivo and in-vitro systems.

研究代表者

BRZOSKA TOMASZ (Brzoska, Tomasz)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：80707000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000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。凝固系活性化の増幅に必須の血小板膜上の phosphatidylserine (PS)は、凝固系活性化開始機転及びフィブリン網形成起点としても重要である事を見出した。さらに今回、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、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として提唱した。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 and amplification of coagulation cascade, fibrin formation as well as its lysis was analyzed. PS exposing platelets appeared the initiation sites of both the activation of coagulation cascade and fibrin formation. We also found that plasminogen binds to PS exposing platelets which then initiated fibrinolysis as starting points. These seem important to quickly dissolve generated excess amounts of thrombi in order to keep vascular patency.

研究分野：血液凝固・線溶

キーワード：Fibrinolysis Coagulation Plasminogen Platelet

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、ニボ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こと、ま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)。さらに Ex-vivo の系で PS 発現には血小板膜上の GPIIb/IIIa を介したフィブリンとの結合と血小板の構造変化に伴う機会的刺激が必須であることを報告した (Brzoska T, et al, PLoSONE, 2013)。

このように血小板は PS 発現を介して凝固系活性化を増幅する事実は明らかであるが、どのように凝固機転が開始されるのかは不明である。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を用いて解析する。

【3】ニボ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 の結合を認め、ほぼ同時に annexin V 結合血小板への fibrin(ogen) の結合を認めた。
- (2) 同部位を起点に、fibrin 線維の形成が認められた。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。これより活性化血小板が凝固機転開始の起点となっている事実が明らかとなった。
- (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: PCI) 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。

- (7) rhTM による線溶抑制は PCI により消失した。

【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、その後に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事が確認できた。同時に、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 はトロンビ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い。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いだし (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 4 件)

1. Brzoska T, Suzuki Y, Mogami H, Sano H, Urano T. Binding of thrombin-activated platelets to a fibrin scaffold through $\alpha_{IIb}\beta_3$ evokes phosphatidylserine exposure on their cell surface. Plos One, 8: E55466, 2013
2. 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.
3. Suzuki Y, Sano H, Tomczyk M, Brzoska T, Urano T. Activities of wild- and variant-type tissue-type plasminogen activators retained on vascular endothelial cells. FEBS open Bio in press
4. Tomczyk M, Suzuki Y, Sano H, Brzoska T, Urano T. Bidirectional functions of thrombin on fibrinolysis: evidence of thrombin-dependent enhancement of fibrinolysis provided by spontaneous plasma clot lysis. Thromb. Res. 2016 in press DOI: 10.1016/j.thromres.2016.04.018

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 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
2. 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
3. Brzoska T, Suzuki Y, H, 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
4. Brzoska T, Suzuki Y, Sano H, Tomczyk M, Urano T, Imaging analysis of coagulation-dependent initiation of fibrinolysis on activated platelets and its

modification by TAFI, XXV ISTH Congress with 61st Annual SSC Meeting, Tronto(USA), June 2015

5. Brzoska T, Suzuki Y, Sano H, Tomczyc M, Tanaka T, Urano T, Coagulation-dependent initiation of fibrinolysis on activated platelets and its modification by TAFI demonstrated by microscopy imaging analyses, XV International Workshop Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation, Roma (Italy), September 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) (1)研究代表者

BRZOSKA TOMASZ (Brzoska Tomasz)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：80707000

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：