

博士学位論文要旨

プラスミンの新規生理的機能の解析：
止血と血管新生の制御への関与

工学研究科 化学応用学専攻 博士後期課程

学籍番号

BD17004

氏名

富樫 兼史

指導教員

今村保忠 教授

本研究は、血液中のタンパク質分解酵素であるプラスミンが、止血や血管新生という生体反応において、新規な役割を果たしうることを示したものである。

本論文は、5章から構成され、第1章は全体の序論として、止血および血管形成についての知見をまとめ、本研究の目的を述べる。第2章では、プラスミンの止血に対する新規の機能を述べ、第3章では、3本らせん構造を持たないIV型コラーゲンペプチド鎖 NTH $\alpha 1(IV)$ が、血管新生を促進させること、第4章でプラスミンの活性化にも関与することを示す。第5章では、本研究のまとめを述べることになる。

以下に各章の要約を示す。

第1章 序論

日本人の3大死因はがん、心疾患、脳血管疾患であり、これらは止血、血管に関わる病気であり、健康、長寿などに関わる重要な社会的課題である。血液は血球成分と血小板、これらを浮遊させる血漿(液性成分)からなる。血漿は、より生体内環境を反映しており、生化学的に多くの有用な情報を得ることができる。

血管の損傷などにより出血した場合、個体の生存を維持できるよう、止血が起こる。この止血の過程は二段階に分かれている。第一段階では、傷口周囲の血管が少し縮んで、物理的に出血を抑えるように働く。同時に血管内皮細胞から分泌された止血因子フォン・ヴィレブランド因子(von Willebrand factor; VWF)が、血管の損傷によって露わになった細胞の足場である基底膜のIV型コラーゲンと結合し、血小板を集める。血小板が凝集し、血小板血栓を作り傷口を塞ぐことを一次止血という。次に、これを補強するために、第二段階の止血反応、二次止血が起こる。止血因子フィブリンは強く丈夫な網目様の凝集体を形成し、一次止血で作られた血小板血栓を覆い固める。

止血反応が終わると、血栓を除去する作用が始まる。この現象を線溶と呼ぶ。線溶系の基本反応は、血液中の酵素であるプラスミンによるフィブリン塊の分解である。プラスミンは血栓上で活性化し、効率よくフィブリンを分解する。止血や線溶のような血栓制御メカニズムは生体生存に重要であるが、その詳細が不明な点はまだ残されている。

一方、創傷治癒の過程で組織が再生されると、それに応じて既存の血管から新たに血管がつくられ、虚血状態を防ぐ。これを血管新生と呼ぶ。血管新生は、血管内皮細胞増殖因子が主要な因子と考えられているが、それ以外に、プラスミンも基底膜の分解を介してその制御に関わると考えられている。

基底膜は、血管の構造維持に重要であり、ラミニンやIV型コラーゲンなど細胞外マトリックス成分で構成されている。基底膜の骨格となるIV型コラーゲンは、2本の $\alpha 1(IV)$ 鎖と1本の $\alpha 2(IV)$ で構成される3量体として普遍的に存在している。IV型コラーゲンの生合成においては、3本らせん構造をとらないポリペプチドが細胞外に分泌される。このようなポリペプチド鎖は、non-triple helical collagen polypeptide(NTH)と呼ばれる。特に、IV型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖のNTHは、NTH $\alpha 1(IV)$ と記される。NTH $\alpha 1(IV)$ は、血管新生の初期段階で起こる発芽、伸長に関与する可能性が指摘されている。

本研究の目的は、プラスミンが止血や血管形成という生体反応において、新規な役割を果たしうることを示すことである。止血に関する新たな知見は、出血性疾患の発症機序の解明につながると考えられる。血管形成に関しては、NTH $\alpha 1$ (IV)が直接的に血管新生を誘導する一方で、プラスミンの活性化を介し、間接的にその制御に関わることを示す。このような機構は、がんなど血管新生が関与する疾患の治療法の開発へつながると期待できる。また、本研究で示すプラスミンのように、1つの因子を軸とすることは、さまざまな要因が複合して起こるがんなど疾病を、総合的に理解する上で、有効な方法論であることを示す。

第2章 ヒト血漿中でプラスミンは、構造変化した止血因子 VWF 多量体およびフィブリンを切断し、止血能力を低下させる^[1]

止血因子 VWF 多量体(VWF multimers; VWFM) は、血管内皮細胞から分泌されるタンパク質会合体である。VWFM が血管損傷により露わになったコラーゲンと結合すると、血流による高ずり応力で構造変化をおこす。構造変化した VWFM は血小板と結合し、血栓を形成する。血小板との結合能力は VWFM の分子量が大きいほど高い。分子量 20,000kDa の超高分子量 VWFM は、血漿メタロプロテアーゼ(a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13; ADAMTS13)によって切断されて約 10,000kDa 以下の VWFM になる。

プラスミンは、フィブリンの塊を溶かすセリンプロテアーゼである。プラスミノーゲンは、プラスミンの前駆体であり、血流中を循環している。プラスミノーゲンは、フィブリン塊の表面に存在するプラスミノーゲンアクチベーターによってプラスミンに変換される。循環血液中のプラスミンの活性は、プラスミンインヒビターなどで精妙に制御されている。しかし、がん、溶連菌感染症、炎症などの病態に伴って、プラスミノーゲンの過剰な活性化が誘導されることがある。

我々はプラスミンがヒトの血漿中で ADAMTS13 を切断し、VWF 切断活性を約 10%に低下させることを明らかにした^[2]。一方で、精製した VWFM をプラスミンが切断することにより、血小板凝集活性が低下することが報告されている。さらに、プラスミンはフィブリノーゲンも切断すると報告もある。血液中のプラスミンは、一次止血と二次止血の両方に影響を及ぼすと推測されるが、その詳細な影響についてはよくわかっていない。

私は、より生理的に近い条件下であるヒト血漿中で、プラスミンが VWFM を切断することを見出した。そこで本章では、生体内で内在性のプラスミンが与える止血反応への影響を調べるために、ヒト血漿中でプラスミン活性を解析した。

ヒト血漿にて、内在性プラスミンは ADAMTS13 と同レベルで構造変化した VWFM を低分子量化させた。切断された VWFM は、止血機能の一つであるコラーゲンへの結合能力を低下させた。これらのことから、生体内にてプラスミンは、ADAMTS13 と同様に VWFM を切断し、一次止血機能を低下させることが考えられた。さらに、内在性プラスミンはフィブリノーゲンを分解することにより、フィブリン膜の形成を抑制した。このことから、プラスミンは、一次止血および二次止血の機能を低下させ、止血障害を引き起こす可能性が示された。また、本研究で示した結果は、出血性疾患の一つ後天性フォン・ヴィ

レブランド病の患者の血液の分析結果と類似しており、プラスミンの新規生理的機能はこの疾患の発症機序の一部である可能性が考えられた。

第3章 NTH $\alpha 1(IV)$ は、血管内皮細胞間の結合を抑制し、遊走を促進させる^[3]

NTH $\alpha 1(IV)$ は、in vivo や in vitro の研究において、血管新生へ関与が指摘されてきた。血管新生の初期段階では、血管内皮細胞間の細胞間結合が抑制されて発芽伸長が起きることが知られている。そこで、私は、NTH $\alpha 1(IV)$ が内皮細胞間結合に影響を及ぼすと考えた。

NTH $\alpha 1(IV)$ を精製し、血管内皮細胞の培養系に添加する実験を行ったところ、NTH $\alpha 1(IV)$ は VE-cadherin のエンドサイトーシスを誘導し、それに伴って細胞間結合を抑制し、細胞間にギャップを出現させた。この現象は、3 本らせん構造を持たない NTH $\alpha 1(IV)$ に特異的な作用である可能性がある。さらに、NTH $\alpha 1(IV)$ は血管内皮細胞の遊走を促進した。以上の結果から NTH $\alpha 1(IV)$ は血管内皮細胞間の結合を抑制し、遊走を促進させることで血管新生に寄与することが考えられた。また、NTH $\alpha 1(IV)$ の構造類似体である変性 IV 型コラーゲンをういた実験から、NTH $\alpha 1(IV)$ の内在化が VE-cadherin のエンドサイトーシスを引き起こす重要な鍵である可能性が考えられた。

第4章 Endo180 の細胞膜上からの消失は血管内皮細胞間の結合を抑制し、遊走を促進させる^[3]

Endo180 はコラーゲンのエンドサイトーシス受容体と考えられている。近年、Endo180 は、I 型コラーゲンよりコラーゲンが変性したゼラチンに、また、様々なコラーゲンのうち、IV 型コラーゲンに親和性が高いことが示されている。これらのことから、私は NTH $\alpha 1(IV)$ の受容体として Endo180 に着目した。近年、Endo180 はプラスミンを活性化させるウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子とその受容体と結合し、三量体を形成しており、細胞膜上から Endo180 が消失すると、プラスミン活性化の効率が上がることが報告されている。さらに、リンパ管新生の発芽において、Endo180 は調節因子として関与するとの報告がある。私は、NTH $\alpha 1(IV)$ が Endo180 を介して血管新生にも寄与すると仮説を立てた。この章では、Endo180 が内皮細胞間結合の抑制や、遊走に関与するのか検討し、NTH $\alpha 1(IV)$ と Endo180 が及ぼす内皮細胞間への影響の関連性を調べた。

その結果は、Endo180 を細胞膜上から消失させた場合、VE-cadherin のエンドサイトーシスが亢進され、同時に、細胞遊走も促進された。第3章の結果と合わせると、NTH $\alpha 1(IV)$ は Endo180 のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、この時、細胞膜から Endo180 が欠如することになり、VE-cadherin のエンドサイトーシスが誘起されると考えられた。細胞膜上から Endo180 の消失はプラスミンの活性化を促進させることが報告されていることと合わせて考えると、NTH $\alpha 1(IV)$ が Endo180 を介してプラスミンの活性化を制御する可能性が示唆された。今後、NTH $\alpha 1(IV)$ の受容体を特定し、内皮細胞間の結合抑制のメカニズムを解明する必要がある。

第5章 総括

本論文では、プラスミンが及ぼす新たな生理的機能について検討を行った。プラスミンが止血因子 VWFM とフィブリノーゲンを切断することを明らかにし、これが止血障害を引き起こす可能性を示唆し

た。この知見はプラスミンが関わる出血性疾患の機序の解明につながることを期待される。NTH $\alpha 1(IV)$ は、直接的に血管新生を誘導する一方で、Endo180 を介してプラスミンの活性化に関与していることが示された。このような機構は、がんなど血管新生が関与する疾患の治療法の開発へつながると期待できる。また、本研究で示すプラスミンのように、1つの因子を軸として研究することは、さまざまな要因が複合して起こるがんなど疾病を、総合的に理解する上で有効な方法論ではないかと考えられた。

審査付論文

1. Togashi, K., Suzuki, S., Morita, S., Ogasawara, Y., Imamura, Y., and Shin, Y. (2020) Excessively activated plasminogen in human plasma cleaves VWF multimers and reduces collagen-binding activity. *J. Biochem.* **168**, 355–363
2. Shin, Y., Miyake, H., Togashi, K., Hiratsuka, R., Endou-Ohnishi, K., and Imamura, Y. (2018) Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by plasmin in human plasma: risk of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biochem.* **163**, 381–389
3. Togashi K., Shin, Y., Imamura, Y. Non-triple helical form of type IV collagen alpha1 chain induces disruption of VE-cadherin-mediated cell-to-cell junctions. *J. Biochem.* In press.

目次

略語	3
第1章 序論	4
第2章 ヒト血漿中における内在性プラスミノーゲン活性化が及ぼす止血への影響	8
第1節 序文	8
第2節 実験材料と方法	10
第1項 試薬	10
第2項 ヒト血漿中での内在性 ADAMTS13, プラスミンによる VWFM の切断	10
第3項 ADAMTS13 またはプラスミンによって切断された VWFM のコラーゲン結合能力	11
第4項 ボルテックスを用いたヒト血漿中での VWFM の切断	11
第5項 VWFM の精製	12
第6項 プラスミンによる精製 VWFM の切断	12
第7項 フィブリン重合	12
第3節 結果、考察	13
第1項 変性状態下でヒト血漿中でのプラスミンによる VWFM の切断	13
第2項 ボルテックスを用いたヒト血漿中でのプラスミンによる VWFM の切断	16
第3項 切断された VWFM のコラーゲンへの結合の影響	20
第4項 プラスミンによる VWF 切断部位	21
第5項 ヒト血漿中での内在性プラスミノーゲン活性化によるフィブリン重合の影響	24
第6項 考察	26
第3章 NTH α1(IV)が及ぼす血管内皮細胞間の結合への影響	28
第1節 序文	28
第2節 実験材料と方法	29
第1項 試薬	29
第2項 細胞培養	29
第3項 変性された IV 型コラーゲンの作製	30
第4項 NTH α 1(IV)の精製	30
第5項 免疫蛍光染色およびウエスタンブロット法	31
第6項 Wound healing assay	31
第3節 結果、考察	31
第1項 NTH α 1(IV)は VE-カドヘリンによる細胞間結合を抑制	31
第2項 短時間での NTH α 1(IV) による細胞間結合の抑制	36
第3項 NTH α 1(IV)による内皮細胞の遊走への影響	40
第4項 考察	42

第 4 章 Endo180 が及ぼす血管内皮細胞間の結合への影響	43
第 1 節 序文.....	43
第 2 節 実験材料と方法.....	44
第 1 項 試薬	44
第 2 項 Endo180 の siRNA を用いたノックダウン	44
第 3 項 Wound healing assay	45
第 4 項 内在化アッセイ	45
第 3 節 結果、考察	45
第 1 項 細胞膜上の Endo180 欠損は VE-カドヘリンの細胞間結合を抑制	45
第 2 項 Endo180 欠損細胞におけるコラーゲンの内在化	47
第 3 項 Endo180 欠損細胞における細胞遊走	51
第 4 項 考察	52
第 5 章 総括	53
謝辞	55
参考文献	56