



The role of activated protein C (APC) in fibrinolysis of human placenta

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 茂庭, 将彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1603

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 3 2 6 号	学位授与年月日	平成 1 2 年 1 2 月 2 2 日
氏 名	茂 庭 将 彦		
論文題目	The role of activated protein C(APC) in fibrinolysis of human placenta (ヒト胎盤での活性型プロテイン C の線溶系における役割)		

博士(医学) 茂庭 将彦

論文題目

The role of activated protein C (APC) in fibrinolysis of human placenta

(ヒト胎盤での活性型プロテインCの線溶系における役割)

論文の内容の要旨

[はじめに]

妊娠中の血液は凝固亢進、線溶抑制状態にあり、殊に胎盤においては絨毛間腔の血液の流れが緩徐なことから血栓が生じやすい環境にある。絨毛間腔の絨毛細胞の表面で血栓が形成されると胎盤機能の悪化、ひいては胎児発育不全や妊娠中毒症の発症にもつながる。しかし正常妊娠では絨毛間腔の血流は保たれており血栓が形成されることは少ない。これは絨毛間腔において血栓形成防止機構が存在するためと思われる。その機序として胎盤で産生される血液凝固阻止因子であるthrombomodulin、血小板凝集阻止因子、外因系阻止因子、ヘパラン硫酸が関与していると考えられている。活性化プロテインC(APC)は強力な血液凝固阻止因子であり、胎盤においても血栓形成を抑制していると考えられる。最近APCは血液凝固阻止因子のみならず線溶系にも作用することが報告されているが、APCの線溶系に対する役割については知られていない。そこで本研究では胎盤を中心に線溶系とAPCの関連について検討した。

[材料ならびに方法]

- 1) 胎盤のAPC、線溶関連物質の局在：インフォームドコンセントの得られた人工妊娠中絶症例および正常分娩時(妊娠初期12例、後期9例)の胎盤を採取した。採取後ただちに10%中性ホルマリンで固定後、パラフィン包埋した。脱パラフィン後、過酸化水素メタノール処理、ブロッキング反応後、一次抗体として抗ヒトurokinase type plasminogen activator(uPA)単クローン抗体、抗ヒトplasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1)単クローン抗体および抗ヒト活性型プロテインC(APC)単クローン抗体を用いてABC法によりそれらの局在を検討した。
- 2) APCの線溶系への影響に関する生化学的検討：96穴のマイクロプレートに0.1M炭酸ナトリウムで溶解したuPA溶液をコーティングした。ブロッキング後PAI-1(25 μ g/100 μ l)を加え、1時間反応後、各種濃度のAPC(0-10 μ g/100 μ l)を加え、その後以下の測定を行なった。
 1. uPA活性の測定-96穴のマイクロプレートに合成基質S-2444を加え、反応後405nmの波長で吸光度を測定した。
 2. PAI-1抗原量の測定-抗PAI-1抗体50 μ lを添加し、その後、ビオチン標識2次抗体、洗浄後アビジン・ペルオキシダーゼ反応後、酵素基質(3,3'-5,5'-tetramethyl benzidine)を加えた後450nmの吸光度を測定した。
- 3) APCの線溶系への影響に関する細胞生物学的検討：uPAの受容体を持つヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)ではuPA-PAI-1複合体が形成されていることが知られている。そこでHUVECをJaffetの方法により5%CO₂培養器内においてPRMI 1640培養液中で培養した。confluentになったところで、APCを100 μ l/ml添加し、さらに培養した(30分)。その後、上清を回収しWestern-Blot法を用いてPAI-1、APCの存在を検討した。

〔結果〕

- 1) 妊娠前期では、uPAは栄養膜合体層および栄養膜細胞層にび漫性に存在した。PAI-1およびAPCは栄養膜合体層に強く染色された。後期胎盤ではuPAは栄養膜合体層および栄養膜細胞層に局在が認められた。
- 2) 作成したマイクロプレート上のuPA/PAI-1複合体はAPCを添加後、APCの濃度依存性にuPA活性が回復することが示された。またマイクロプレート上のPAI-1はAPCの濃度依存性にPAI-1抗原量が失われることが確認された。
- 3) 培養したHUVECにおいてAPCを添加することにより、上清中にPAI-1/APC複合体(100kDa)の存在を確認した。

〔考察〕

本研究において、妊娠前期胎盤においてAPCが栄養膜合体層に存在することを免疫組織化学的に明らかにした。生化学的解析よりマイクロタイタープレート上に形成されたuPA/PAI-1 complexに対し、APCを添加することによりAPC濃度依存性に固相上のuPA活性が回復することを見出した。このことはPAI-1/APC複合体の形成によりPAI-1が遊離することを意味している。さらに血清無添加培地上で培養したHUVECにおいてAPCを添加することにより、上清中にPAI-1/APC複合体(100kDa)の存在を確認した。これらの結果からAPCは細胞膜上に結合している線溶抑制因子のPAI-1を解離させ、細胞膜上での線溶能亢進作用を保持していることが予想された。殊に易血栓状態における胎盤においては胎盤機能を維持するために絨毛細胞上でこの機構が作動していることが考えられる。妊娠初期の胎盤に強くAPCが染色されたことは血中のAPCが絨毛細胞上に結合しPAI-1を解離していることが考えられる。血栓が形成される妊娠中毒症や子宮内胎児発育遅延の胎盤では凝固機構のみならず線溶機構も障害されていることが推測される。最近重症妊娠中毒症に対し、APC製剤を投与することによりその症状が改善されたことが報告されている。今回の検討からこれは絨毛間腔に面している栄養膜合体層において形成されているuPA/PAI-1 complexが、APCによりPAI-1が解離しPAI-1/APC complexが形成され、細胞表面のuPA活性が回復する機構も関与していると考えられる。我々はAPCが絨毛細胞上で抗血栓作用のみならず、線溶亢進作用を持つことを初めて示した。

論文審査の結果の要旨

妊娠中の血液は凝固亢進、線溶抑制状態にあり、ことに胎盤においては絨毛間腔の血液の流れが緩徐なことから血栓が生じやすい環境にある。しかし、正常妊娠では絨毛間腔の血流は保たれており血栓は形成されることは少ない。その機構として胎盤で産生される血栓形成抑制因子が存在するためと考えられている。活性化プロテインC(APC)は強力な凝固阻止因子であり、血栓形成抑制機構に関与していると考えられている。しかし、最近ではAPCは線溶系にも作用することが報告されているが、胎盤におけるAPCの線溶系に対する役割は未だ解明されていない。そこで、申請者は胎盤におけるAPCと線溶系の関連について検討した。

〔材料及び方法〕

- 1) 胎盤のAPC、線溶関連物質の局在：インフォームドコンセントの得られた人工妊娠中絶症例および

正常分娩時(妊娠初期12例、後期9例)の胎盤を採取した。採取後ただちに10%中性ホルマリンで固定後、パラフィン包埋した。切片を作成し、一次抗体として抗ヒトurokinase type plasminogen activator (uPA)単クローン抗体、抗ヒトplasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1)単クローン抗体および抗ヒト活性型プロテインC(APC)単クローン抗体を用いてABC法によりそれらの局在を検討した。

- 2) APCの線溶系への影響に関する生化学的検討：96穴のマイクロプレートにuPA溶液をコーティングし、ブロッキング後PAI-1(25 μ g/100 μ l)を加え、1時間反応後、各種濃度のAPC(0-10 μ g/100 μ l)を加え、残存uPA活性と結合PAI-1抗原量の測定を行なった。
- 3) APCの線溶系への影響に関する細胞生物学的検討：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、confluentになったところで、APCを100 μ g/ml添加し、さらに培養した後、上清を回収しWestern-Blot法を用いてPAI-1、APCの存在を検討した。

[結果]

- 1) 妊娠前期では、uPAは栄養膜合体層および栄養膜細胞層にびまん性に存在した。PAI-1およびAPCは栄養膜合体層に強く染色された。後期胎盤ではuPAは栄養膜合体層および栄養膜細胞層に局在が認められた。
- 2) 作成したマイクロプレート上のuPA/PAI-1複合体はAPCを添加後、APCの濃度依存性にuPA活性が回復することが示された。またAPCの濃度依存性にPAI-1抗原量が失われた。
- 3) 培養したHUVECにおいてAPCを添加することにより、上清中にPAI-1/APC複合体の存在を確認した。

審査委員は今回の研究により

- 1) 妊娠前期胎盤においてAPCが栄養膜合体層に存在することを免疫組織化学的に明らかにしたこと。
- 2) APCがuPA/PAI-1複合体からPAI-1を遊離させ、APC/PAI-1複合体を形成することでuPA活性を回復させたことを証明できたことを高く評価した。

[本論文の評価]

本論文内容の説明の後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

- 1) PAI-1/uPA複合体の結合様式は
- 2) APCがPAI-1を遊離させAPC/PAI-1複合体を形成するメカニズムは
- 3) 胎盤における線溶系因子の発現調節について
- 4) U937 cell lineを実験で用いた理由は
- 5) APCの胎盤局所での濃度はどれほどか
- 6) APCが妊娠後期で発現が低下する理由は
- 7) 胎盤におけるトロンビン・トロンボモジュリン・APCの関係は
- 8) Pro-uPAからuPAへの変換とそれらのバランスは
- 9) PAI-1とplasminogen activator inhibitor type-2 (PAI-2)におけるuPAの結合の違いは
- 10) 妊娠後期におけるPAI-1の産生増加の生理的意義は
- 11) 今回の研究が妊娠中毒症や抗リン脂質抗体症候群の治療に貢献できる可能性は
- 12) 妊娠中毒症の発症メカニズムと発症時の血栓形成のメカニズムについて

以上の質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 梅 村 和 夫

副査 筒 井 祥 博 副査 浦 野 哲 盟