



Less pronounced enhancement of
thrombin-dependent inactivation of plasminogen
activator inhibitor type 1 by low molecular weight
heparin compared with unfractionated heparin

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 龍太 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/359

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 4 3 5 号	学位授与年月日	平成 1 9 年 2 月 1 4 日
氏 名	中 村 龍 太		
論文題目	<p>Less pronounced enhancement of thrombin-dependent inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by low molecular weight heparin compared with unfractionated heparin (低分子ヘパリンによるトロンビン依存性プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 不活性化の増強は未分画ヘパリンに比し顕著でない)</p>		

博士(医学) 中 村 龍 太

論文題目

Less pronounced enhancement of thrombin-dependent inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by low molecular weight heparin compared with unfractionated heparin

(低分子ヘパリンによるトロンビン依存性プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 不活性化の増強は未分画ヘパリンに比し顕著でない)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

血管内における線溶活性は、プラスミノゲンをプラスミンに活性化する組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) と プラスミノゲンアクチベーター (PA) の特異的インヒビターであるPAインヒビタータイプ1 (PAI-1) のバランスにより決定され、その不均衡は線溶活性の過剰又は不足状態を引き起こす。PAI-1は、tPAの他にトロンビン、 Ca^{2+} 結合活性型凝固第X因子 (Ca^{2+} -Xa) 等の血液凝固関連の活性型セリンプロテアーゼと複合体を形成して活性を失い、相対的に線溶活性が増強することが報告されている。抗凝固薬であるヘパリンはこの作用を増強するため、この活性化凝固因子によるPAI-1活性中和を介した線溶活性増強がヘパリン投与時の出血性副作用の発現に関与している可能性がある。今回我々は、臨床的に未分画ヘパリンより出血性副作用が発現しにくいとされている低分子ヘパリンがPAI-1活性中和を介した線溶活性増強にどのように影響するか未分画ヘパリンと比較して検討した。

〔材料ならびに方法〕

(1) トロンビン及びXaの合成基質 (S2238及びS2222) 分解活性に対する遺伝子組換え型ヒトPAI-1の阻害活性を検討した。(2) トロンビン及びXaとPAI-1の複合体形成に対する低分子ヘパリン及び未分画ヘパリンの影響をSDSポリアクリルアミド電気泳動法とウエスタンブロット法により確認した。(3) PAI-1存在下、フィブリノーゲン、プラスミノゲンとtPA溶液にトロンビンを加えて作成したフィブリンクロット溶解時間に対する低分子ヘパリン及びヘパリンの影響を比較した。

〔結果〕

(1) 未分画ヘパリン (0.1~100 u/ml) はPAI-1によるXa及びトロンビン活性阻害をベルシェイプ型に促進し(阻害率：最大27及び80 %)、その程度は低分子ヘパリン(同用量、阻害率：最大0及び21 %)の阻害促進より有意に大きかった。PAI-1活性中和を介した線溶活性の増強作用を有するビトロネクチン共存下でも、低分子ヘパリンはPAI-1によるXa活性阻害をわずかに促進したが、その程度は未分画ヘパリンに比し弱かった。(2) Xa及びトロンビンとビオチン標識PAI-1との複合体形成もヘパリンにより促進されたが、その程度は未分画ヘパリンの方が低分子ヘパリンより強かった。(3) ヘパリン及び低分子ヘパリン (0.01~100 u/ml) はPAI-1存在下でフィブリンクロット溶解時間をベルシェイプ型に短縮した。低分子ヘパリンの短縮効果(%Control：最大68.3 %)は未分画ヘパリンの効果(%Control：最大32.3 %)より有意に小さかった。これらのヘパリンの作用は、ビトロネクチンによりさらに増強された。

〔考察〕

凝固活性亢進時の線溶過剰発現状態は播種性血管内凝固症候群(DIC)発症時等にみられる極めて重篤な出血症状をひき起こす。その発生機序として、様々な血液凝固関連因子による線溶活性増強機構が提唱されている。その一つとして活性化凝固因子による tPA 及び PAI-1 のバランス制御の修飾が関わる事が提唱されており、これまでに、トロンビン及び Ca^{2+} -Xa が PAI-1 活性中和を介して線溶活性を増強すること、更にこの作用はヘパリン、ビトロネクチン等により増強されることが報告されている。今回の研究において、トロンビン及び Xa との複合体形成に起因する PAI-1 の不活性化では、低分子ヘパリンは未分画ヘパリンに比して増強効果が小さいこと、またこれに伴う線溶活性増強効果も小さい事実が明らかとなった。現在、低分子ヘパリンによる出血性の副作用が未分画ヘパリンより少ない理由として、低分子ヘパリンの抗トロンビン活性が未分画ヘパリンより弱いことが挙げられている。今回新たに得られた、低分子ヘパリンは未分画ヘパリンより活性化凝固因子による PAI-1 活性中和を介した線溶活性増強機構の促進効果が小さい、という事実も低分子ヘパリンの低い出血性の副作用を説明する重要な機構であると考えられる。

〔結論〕

トロンビン及び Ca^{2+} -Xa による PAI-1 活性中和を介した線溶活性増強を低分子ヘパリンよりも未分画ヘパリンの方が強く促進することを示した。これは凝固活性亢進時の線溶過剰発現状態において、低分子ヘパリンよりも未分画ヘパリンの方が出血傾向を強く増悪させる可能性を示唆していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

血管内では凝固と線溶のバランスが保たれ、また線溶活性は組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)とその阻害因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) のバランスによって保たれている。凝固活性が亢進し、かつ線溶活性も亢進している臨床的な病態として播種性血管内凝固症候群(DIC)があるが、その発生機序の一つとして活性化凝固因子による tPA と PAI-1 のバランスが崩れることがあげられる。そして治療薬としてヘパリンが用いられる。ヘパリンは抗凝固剤の一つで、血栓塞栓症や DIC の治療、人工透析や体外循環での凝固防止などに広く用いられている。アンチトロンビンと結合し、その抗トロンビン・第 Xa 因子阻害作用を増強することによって抗凝固作用を示す。従って、出血性副作用が問題になるが、一般的な未分画ヘパリンよりも低分子ヘパリンではその副作用が少ないと言われている。そこで、この低分子ヘパリンがなぜ出血性副作用を起こしにくいのかを解明するために、活性化凝固因子による PAI-1 活性中和を介した線溶活性の増強にどのような影響を及ぼしているのかを検討した。

リコンビナント PAI-1 (rPAI-1) (40 nM) を未分画および低分子ヘパリンの存在下で、第 Xa 因子 (0.1 nM) またはトロンビン (0.2 nM) と 37℃、15 分反応させた後の両凝固因子の残存活性を合成基質 (S-2222, S-2238) の分解活性として測定した。さらにビトロネクチン (0~80 nM) を加えた場合についても同様に検討した。トロンビン (400 nM) および第 Xa 因子 (400 nM) とビオチン標識した rPAI-1 (40 nM) を、未分画または低分子ヘパリンの存在下で反応させ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロット法で解析した。rPAI-1 存在下で、フィブリノーゲン (2 μM)、プラスミノゲン (0.5 μM)、tPA (0.1 nM) 溶液にトロンビン (50 nM) を加えて作成したフィブリンクロットの溶解時間に及ぼす未分画ヘパリンと

低分子ヘパリンの影響を比較検討した。

未分画ヘパリンは低分子ヘパリンよりも顕著にrPAI-1による第Xa因子およびトロンビン活性をベルシェイプ型に阻害した。PAI-1活性の中和を介した線溶活性を増強させるビトロネクチンを共存させた時も同様に、未分画ヘパリンの第Xa因子およびトロンビン活性の阻害は低分子ヘパリンよりも大きかった。第Xa因子およびトロンビン活性とビオチン標識rPAI-1との複合体形成はヘパリンによって促進され、低分子ヘパリンよりも未分画ヘパリンで強かった。tPAによって誘導されるフィブリンクロット溶解時間は、rPAI-1存在下でヘパリンによってベルシェイプ型に短縮され、その短縮効果は未分画ヘパリンでより強く認められた。さらに、ビトロネクチンの存在によってその効果は増強された。

今回の研究により、PAI-1活性の中和を介した活性化凝固因子(トロンビン、第Xa因子)による線溶活性増強の促進効果は低分子ヘパリンの方が小さいことが明らかとなり、低分子ヘパリンが未分画ヘパリンに比較して出血性副作用を起こしにくい理由の一つと考えられた。審査委員会では、DICの治療薬として広く用いられているヘパリンを比較検討し、低分子ヘパリンの方が従来の未分画ヘパリンよりも出血性副作用が乏しく使用が好ましい理由をPAI-1中和系を用いた *in vitro* の実験系で明らかにしたことを高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 実験系の各因子の濃度設定について
- 2) 凝固因子活性の表記法について
- 3) ベルシェイプ型の阻害パターンの意味について
- 4) ウェスタンブロット法の結果について
- 5) フィブリンクロット溶解時間の測定について
- 6) ビトロネクチンについて
- 7) 線溶過剰と出血について
- 8) 線溶亢進と凝固亢進について
- 9) 低分子ヘパリンの治療薬について

これらの質問に対し申請者の解答は概ね適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	前 川 真 人			
	副査	渡 邊 裕 司	副査	杉 村 基	

博士(医学) 中 村 龍 太

論文題目

Less pronounced enhancement of thrombin-dependent inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by low molecular weight heparin compared with unfractionated heparin

(低分子ヘパリンによるトロンビン依存性プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 不活性化の増強は未分画ヘパリンに比し顕著でない)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

血管内における線溶活性は、プラスミノゲンをプラスミンに活性化する組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) と プラスミノゲンアクチベーター (PA) の特異的インヒビターであるPAインヒビタータイプ1 (PAI-1) のバランスにより決定され、その不均衡は線溶活性の過剰又は不足状態を引き起こす。PAI-1は、tPAの他にトロンビン、 Ca^{2+} 結合活性型凝固第X因子 (Ca^{2+} -Xa) 等の血液凝固関連の活性型セリンプロテアーゼと複合体を形成して活性を失い、相対的に線溶活性が増強することが報告されている。抗凝固薬であるヘパリンはこの作用を増強するため、この活性化凝固因子によるPAI-1活性中和を介した線溶活性増強がヘパリン投与時の出血性副作用の発現に関与している可能性がある。今回我々は、臨床的に未分画ヘパリンより出血性副作用が発現しにくいとされている低分子ヘパリンがPAI-1活性中和を介した線溶活性増強にどのように影響するか未分画ヘパリンと比較して検討した。

〔材料ならびに方法〕

(1) トロンビン及びXaの合成基質 (S2238及びS2222) 分解活性に対する遺伝子組換え型ヒトPAI-1の阻害活性を検討した。(2) トロンビン及びXaとPAI-1の複合体形成に対する低分子ヘパリン及び未分画ヘパリンの影響をSDSポリアクリルアミド電気泳動法とウエスタンブロット法により確認した。(3) PAI-1存在下、フィブリノーゲン、プラスミノゲンとtPA溶液にトロンビンを加えて作成したフィブリンクロット溶解時間に対する低分子ヘパリン及びヘパリンの影響を比較した。

〔結果〕

(1) 未分画ヘパリン (0.1~100 u/ml) はPAI-1によるXa及びトロンビン活性阻害をベルシェイプ型に促進し(阻害率：最大27及び80 %)、その程度は低分子ヘパリン(同用量、阻害率：最大0及び21 %)の阻害促進より有意に大きかった。PAI-1活性中和を介した線溶活性の増強作用を有するビトロネクチン共存下でも、低分子ヘパリンはPAI-1によるXa活性阻害をわずかに促進したが、その程度は未分画ヘパリンに比し弱かった。(2) Xa及びトロンビンとビオチン標識PAI-1との複合体形成もヘパリンにより促進されたが、その程度は未分画ヘパリンの方が低分子ヘパリンより強かった。(3) ヘパリン及び低分子ヘパリン (0.01~100 u/ml) はPAI-1存在下でフィブリンクロット溶解時間をベルシェイプ型に短縮した。低分子ヘパリンの短縮効果(%Control：最大68.3 %)は未分画ヘパリンの効果(%Control：最大32.3 %)より有意に小さかった。これらのヘパリンの作用は、ビトロネクチンによりさらに増強された。

〔考察〕

凝固活性亢進時の線溶過剰発現状態は播種性血管内凝固症候群(DIC)発症時等にみられる極めて重篤な出血症状をひき起こす。その発生機序として、様々な血液凝固関連因子による線溶活性増強機構が提唱されている。その一つとして活性化凝固因子による tPA 及び PAI-1 のバランス制御の修飾が関わる事が提唱されており、これまでに、トロンビン及び Ca^{2+} -Xa が PAI-1 活性中和を介して線溶活性を増強すること、更にこの作用はヘパリン、ビトロネクチン等により増強されることが報告されている。今回の研究において、トロンビン及び Xa との複合体形成に起因する PAI-1 の不活性化では、低分子ヘパリンは未分画ヘパリンに比して増強効果が小さいこと、またこれに伴う線溶活性増強効果も小さい事実が明らかとなった。現在、低分子ヘパリンによる出血性の副作用が未分画ヘパリンより少ない理由として、低分子ヘパリンの抗トロンビン活性が未分画ヘパリンより弱いことが挙げられている。今回新たに得られた、低分子ヘパリンは未分画ヘパリンより活性化凝固因子による PAI-1 活性中和を介した線溶活性増強機構の促進効果が小さい、という事実も低分子ヘパリンの低い出血性の副作用を説明する重要な機構であると考えられる。

〔結論〕

トロンビン及び Ca^{2+} -Xa による PAI-1 活性中和を介した線溶活性増強を低分子ヘパリンよりも未分画ヘパリンの方が強く促進することを示した。これは凝固活性亢進時の線溶過剰発現状態において、低分子ヘパリンよりも未分画ヘパリンの方が出血傾向を強く増悪させる可能性を示唆していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

血管内では凝固と線溶のバランスが保たれ、また線溶活性は組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)とその阻害因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) のバランスによって保たれている。凝固活性が亢進し、かつ線溶活性も亢進している臨床的な病態として播種性血管内凝固症候群(DIC)があるが、その発生機序の一つとして活性化凝固因子による tPA と PAI-1 のバランスが崩れることがあげられる。そして治療薬としてヘパリンが用いられる。ヘパリンは抗凝固剤の一つで、血栓塞栓症や DIC の治療、人工透析や体外循環での凝固防止などに広く用いられている。アンチトロンビンと結合し、その抗トロンビン・第 Xa 因子阻害作用を増強することによって抗凝固作用を示す。従って、出血性副作用が問題になるが、一般的な未分画ヘパリンよりも低分子ヘパリンではその副作用が少ないと言われている。そこで、この低分子ヘパリンがなぜ出血性副作用を起こしにくいのかを解明するために、活性化凝固因子による PAI-1 活性中和を介した線溶活性の増強にどのような影響を及ぼしているのかを検討した。

リコンビナント PAI-1 (rPAI-1) (40 nM) を未分画および低分子ヘパリンの存在下で、第 Xa 因子 (0.1 nM) またはトロンビン (0.2 nM) と 37℃、15 分反応させた後の両凝固因子の残存活性を合成基質 (S-2222, S-2238) の分解活性として測定した。さらにビトロネクチン (0~80 nM) を加えた場合についても同様に検討した。トロンビン (400 nM) および第 Xa 因子 (400 nM) とビオチン標識した rPAI-1 (40 nM) を、未分画または低分子ヘパリンの存在下で反応させ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロット法で解析した。rPAI-1 存在下で、フィブリノーゲン (2 μM)、プラスミノゲン (0.5 μM)、tPA (0.1 nM) 溶液にトロンビン (50 nM) を加えて作成したフィブリンクロットの溶解時間に及ぼす未分画ヘパリンと

低分子ヘパリンの影響を比較検討した。

未分画ヘパリンは低分子ヘパリンよりも顕著にrPAI-1による第Xa因子およびトロンビン活性をベルシェイプ型に阻害した。PAI-1活性の中和を介した線溶活性を増強させるビトロネクチンを共存させた時も同様に、未分画ヘパリンの第Xa因子およびトロンビン活性の阻害は低分子ヘパリンよりも大きかった。第Xa因子およびトロンビン活性とビオチン標識rPAI-1との複合体形成はヘパリンによって促進され、低分子ヘパリンよりも未分画ヘパリンで強かった。tPAによって誘導されるフィブリンクロット溶解時間は、rPAI-1存在下でヘパリンによってベルシェイプ型に短縮され、その短縮効果は未分画ヘパリンでより強く認められた。さらに、ビトロネクチンの存在によってその効果は増強された。

今回の研究により、PAI-1活性の中和を介した活性化凝固因子(トロンビン、第Xa因子)による線溶活性増強の促進効果は低分子ヘパリンの方が小さいことが明らかとなり、低分子ヘパリンが未分画ヘパリンに比較して出血性副作用を起こしにくい理由の一つと考えられた。審査委員会では、DICの治療薬として広く用いられているヘパリンを比較検討し、低分子ヘパリンの方が従来の未分画ヘパリンよりも出血性副作用が乏しく使用が好ましい理由をPAI-1中和系を用いた *in vitro* の実験系で明らかにしたことを高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 実験系の各因子の濃度設定について
- 2) 凝固因子活性の表記法について
- 3) ベルシェイプ型の阻害パターンの意味について
- 4) ウェスタンブロット法の結果について
- 5) フィブリンクロット溶解時間の測定について
- 6) ビトロネクチンについて
- 7) 線溶過剰と出血について
- 8) 線溶亢進と凝固亢進について
- 9) 低分子ヘパリンの治療薬について

これらの質問に対し申請者の解答は概ね適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	前 川 真 人	
	副査	渡 邊 裕 司	副査 杉 村 基