



The Cleavage and Inactivation of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 by Neutrophil Elastase: The Evaluation of Its Physiological Relevance in Fibrinolysis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 呉, 凱 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1033

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	医博第 180号	学位授与年月日	平成 7年 3月27日
氏 名	呉 凱		
論文題目	The Cleavage and Inactivation of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 by Neutrophil Elastase: The Evaluation of Its Physiological Relevance in Fibrinolysis (好中球エラスターゼによる 1 型プラスミノゲンアクチベーターインヒビターの分解と不活化：線溶反応におけるその生理学的重要性の評価)		

博士(医学) 吳 凱

論文題目

The Cleavage and Inactivation of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 by Neutrophil Elastase: The Evaluation of Its Physiological Relevance in Fibrinolysis

(好中球エラスターゼによる1型プラスミノゲンアクチベーターインヒビターの分解と不活化：線溶反応におけるその生理学的重要性の評価)

論文の内容の要旨

【目的】ヒト好中球エラスターゼ (HNE) は、線溶活性を増強する事が知られている。その機序は主にプラスミノゲンをより活性化され易い分子に分解すること及び直接フィブリンを分解することによるとされている。しかしこれらの反応には比較的高濃度の HNE が必要であり、その生理的意義に関して疑問がもたれている。プラスミノゲンアクチベーター (PA) インヒビター 1 (PAI-1) は、生理的な PA のインヒビターで線溶活性の制御に重要であるが、近年 HNE により限定分解されることが報告された。本研究において HNE による PAI-1 限定分解部位を同定すると共にフィブリン溶解に対する影響を解析し、その生理的意義について検討する。

【方法】PAI-1 はヒト PAI-1 発現ベクターにてトランスフェクトして大腸菌にて発現させ Sephacry-200、Hydroxy apatite column 及びヘパリンセファロースを用いて精製した。HNE による遺伝子組み換え prokaryotic PAI-1 (rpPAI-1) の限定分解は $2.9 \mu\text{M}$ の活性型あるいは活性潜在型 rpPAI-1 と $0.3 \mu\text{M}$ の HNE を 37 度で経時的に反応後、rpPAI-1 の限定分解を SDS-PAGE で確認した。限定分解前後の rpPAI 活性は u-PA の阻害活性により測定した。フィブリン溶解に対する HNE の影響はフィブリンノゲン、t-PA、rpPAI-1、プラスミノゲンと種々濃度の HNE 存在下でトロンビン添加により clot を作成し、その溶解時間より検討した。アミノ酸配列は約 $3.8 \mu\text{M}$ の rpPAI-1 と 17nM のエラスターゼを 37 度で 1 時間反応させた後、 57pmol の反応液を試料として分析した。

【結果】 44kD の活性型 rpPAI-1 は HNE により経時的に限定分解されて、約 40kD の小分子 PAI-1 が SDS-PAGE で認められた。PAI-1 の活性は HNE と反応させた後経時的に不活化され、HNE の増加に伴って rpPAI-1 の不活化は促進された。一方活性潜在型 rpPAI-1 は限定分解を受けなかった。フィブリン溶解時間は rpPAI-1 の非存在下では 20 分で、 68nM の rpPAI-1 の添加により 87 分に延長した。HNE 添加により溶解時間は短縮し、 80nM の HNE の添加では、rpPAI-1 の非存在下の溶解時間とほぼ同じであった。一方 rpPAI-1 の非存在下で作成したフィブリンは HNE を添加しても溶解時間は短縮しなかった。切断部位のアミノ酸配列分析については、二つの異なる配列が得られた。一つは PAI-1 の N 末端配列であり、他方は HNE より切断された PAI-1 ペプチド断片であった。ペプチド断片の N 末端配列は 356 番目の Ser から始まる Ser-Ala-Arg-Met-Ala であった。

【考察】HNE は活性型 PAI-1 の 355 番目の Val と 356 番目の Ser 残基の間を切断し、不活化することがわかった。更にこの機構によりフィブリン溶解時間が短縮したことから、PAI-1 の限定分解による不活化は HNE による線溶促進機構の新たな経路として重要であることが示された。また PAI-1 の非存在下ではフィブリン溶解時間が短縮しなかったことから、HNE によるプラスミノゲンあるいはフィブリンの分解による線溶活性の増強作用は否定的であった。

【結論】 活性型 PAI-1 は HNE により反応部位近傍 P 4 と P 3 の間を限定分解され不活化された。PAI-1 の限定分解による不活化は HNE による線溶促進機構の新たな経路として重要であることが示された。

論文審査の結果の要旨

血液凝固は止血過程であると同時に炎症の修復過程でもある。その反応の場には多数の好中球が存在し、この好中球から放出されるヒト好中球エラスターゼ (HNE) が線溶活性を増強することが知られている。そのメカニズムに関して HNE が $\alpha 2$ -PI、フィブリン、プラスミノゲンなどを分解することによるとの報告もあるが、この反応には比較的高濃度の HNE が必要であり、これらの分解による線溶活性増強作用については疑問視されている。申請者はプラスミノゲン、アクチベーター (PA) インヒビター 1 (PAI-1) が HNE により限定分解されるとの最近の報告に着目し、この限定分解部位を同定すると共に HNE の線溶増強作用のメカニズムについて検討した。

その結果、44kD の活性型 rpPAI-1 は HNE により限定分解されて約 40kD の PAI-1 となり、その活性も HNE の添加により経時的に、濃度依存性に抑制された。一方、活性潜在型 rpPAI-1 は限定分解を受けなかった。フィブリン溶解時間は HNE の添加により短縮したが、rpPAI-1 の非存在下では短縮しなかった。切断部位のアミノ酸配列分析については、二つの異なる配列、即ち PAI-1 の N 末端配列と HNE により切断された PAI-1 ペプチド断片が得られ、ペプチド断片は 356 番目の Ser から始まる Ser-Ala-Arg-Met-Ala であった。このことより HNE は活性型 rpPAI-1 の 355 番目の Val と 356 番目の Ser 残基の間を切断し、不活性化することがわかった。この不活性化をフィブリン溶解時間でみたところ rpPAI-1 の非存在下では短縮しなかったことより、HNE による線溶活性の増強作用はフィブリンやプラスミノゲンが分解されるために起こるのではないことがわかった。

本研究により血液凝固における好中球の役割、殊にエラスターゼ (HNE) による線溶活性の増強作用が明らかとなった。血液凝固過程は血漿中の血液凝固因子と血小板、血管内皮細胞、組織因子が相互に作用して進行すると考えられているが、この過程に好中球も関与することを明らかにしたことが高く評価された。

申請者の発表に対し、次のような質疑が行われた。

- 1) 血漿により作製した clot に HNE を加えて同様に行ったか
- 2) 生体内では好中球より HNE が放出されたとしても $\alpha 1$ -トリプシン インヒビターにより阻害されるのではないのか
- 3) フィブリン溶解時間測定の実験条件について
- 4) フィブリン溶解時間測定の再現性について
- 5) 本研究において発色合成基質を用いなかった理由について
- 6) 活性潜在型 rpPAI-1 が HNE により分解されない理由について
- 7) 活性型 rpPAI-1 と活性潜在型 rpPAI-1 の構造上の違いについて
- 8) 血液 1 ml 中の HNE 活性と今回の実験に用いた HNE の濃度との関係について
- 9) PAI-1 の HNE による分解部位とプラスミノゲン アクチベーターによる分解部位との違いについて

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題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が全員一致して評価した。

論文審査担当者	主査	教授	寺 尾 俊 彦							
	副査	教授	菅 野 剛 史	副査	教授	中 島 光 好				
	副査	教授	村 上 彰	副査	助教授	上 里 忠 良				