

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PLACENTAL PLASMINOGEN ACTIVATOR (PPA)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 隆夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1284

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 7号	学位授与年月日	昭和60年10月21日
氏名	小林隆夫		
論文題目	PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PLACENTAL PLASMINOGEN ACTIVATOR (PPA) (胎盤性プラスミノゲン・アクチベーター(PPA)の精製とその性質)		

医学博士 小林 隆夫
論文題目

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PLACENTAL
PLASMINOGEN ACTIVATOR (PPA)

(胎盤性プラスミノゲン・アクチベーター (PPA) の精製とその性質)

論文の内容の要旨

研究目的：われわれは従来ヒト胎盤内には存在しないといわれていたプラスミノゲン・アクチベーター (placental plasminogen activator: 以下PPAという) が存在し、胎盤内でそのインヒビターであるウロキナーゼ・インヒビター (urokinase inhibitor: 以下UKIという) と可逆的な complex すなわち PPA-UKI complex を形成していることをはじめて明らかにしてきた。本論文では PPA-UKI complex から PPA を分離させ、胎盤から初めて PPA を精製したのでその性質を検討するとともに、胎盤における PPA の存在意義を明らかにすることを目的とした。

方法：PPA の精製は胎盤ホモジネート、酸処理、硫酸分画、CM-セファデックス 50、リジンセファロース 4B アフィニティークロマトグラフィー、UK-アフィゲル 10 アフィニティークロマトグラフィー、セファデックス G-150 ゲルろ過、DEAE-セファセルカラムにて行った。活性測定はフィブリン分解活性 (フィブリン平板法)、PA 活性 (プラスミノゲン存在下のプラスミン基質水解活性法)、UK 活性 (UK 基質水解活性法) にて行った。フィブリンノーゲン分解に及ぼす影響はフィブリンノーゲンと検体とを反応させた後、トロンビンを加え、そのトロンビン時間の変化をみることにより検討した。分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、免疫学的方法はオクタロニー法によった。

結果：PPA-UKI complex に UK を接触させることにより、PPA の分離が可能であり、最終的には精製 PPA は胎盤 1 個あたり 25 μ g 得られ、その specific activity は PA 活性として 21,071 IU/mg-protein、フィブリン分解活性として 11,786 IU/mg-protein であった。分子量は 3~7 万と推定され、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では約 65,000 であった。免疫学的に PPA は抗 UK 血清とは反応せず、また UK も抗 PPA 血清とは反応しなかった。フィブリンノーゲン分解に及ぼす PPA と UK の影響をみた実験では、UK は実験系への添加の量が増える程影響が大きくなるが、PPA は UK に比し影響が少ないことがわかった。すなわち、生食のトロンビン時間が 7.3 ± 0.4 秒であったのに対し、測定系中への添加 PPA が 0.3 IU、0.7 IU ではそれぞれ 11.6 ± 5.8 秒、 15.0 ± 12.9 秒とやや延長、同じく添加 UK が 0.4 IU、0.6 IU ではそれぞれ 13.0 ± 2.2 秒、 38.1 ± 25.4 秒と延長し、0.8 IU では 100 秒以上に延長した。

考察：われわれは胎盤から初めて UK とは生物学的にも免疫学的にも異なる新しい PA を抽出することに成功し、PPA と名付けた。この PPA の性質の検討及び臨床的検索から以下のことを推論し得た。すなわち正常妊娠胎盤内では PPA と UKI が可逆的な complex を形成して存在しているが、一般には UKI が優位で線溶抑制の方向にあり、生理的に出血の防止に働いている。PPA-UKI complex は、局所の状況の変化により、直ちに凝固・線溶のいずれの方向にも対処できるようになっているため、もし胎盤内に血栓が形成されても、PPA によりすぐに血栓は溶解され、胎盤内の血流は確保されるのであろう。実際胎盤血栓ができにくいのは正にこの PPA の働きによるものと考えられる。一方妊娠中毒症では UKI による母体腎及び胎盤における線溶抑制が重大であり、PPA の産生低下や消費亢進などのために過剰の UKI による線溶抑制が主体となると、腎及び胎盤内に血栓形成が起こり、妊娠中毒症が悪化するであろう。このような胎盤内での PPA と UKI のバランスのくずれが妊娠中毒症病態と密接に関連しているようだ。この意味からも PPA の血栓溶解作用が妊娠中毒症の予防ないしは治療の上に大切となってくる。

PPAの血栓溶解効果はUKに劣ることなく、かつ、メラノーマtPAと同様フィブリノーゲン分解に及ぼす影響も小さいため、将来の血栓溶解薬となる可能性を秘めている。さらにPPAは胎盤機能、特に妊娠中毒症病態の指標や悪性腫瘍のマーカー・プロテインになり得る可能性も示唆されている。

論文審査の結果の要旨

申請者は現在迄ヒト胎盤中には存在しないといわれていたプラスミノゲン・アクチベーター(PPA)が本来は存在していることを見出した。これはウロキナーゼ・インヒビター(UKI)と可逆的なcomplexを作っているために一見存在しないかに思われてきたが、これらを分離することによりPPAの活性を見出したのである。方法としては胎盤のホモジネートを得て、これを酸処理、硫酸分画、さらにCM-セファデックス カラムクロマトグラフィー、リジンセファロース4Bアフィニティクロマトグラフィー、UKアフィゲル10アフィニティクロマトグラフィー、セファデックスG-150ゲル濾過、DEAEセファセルカラムクロマトグラフィー等により純化した。

この内で最も独創的で、PPAの分離に役立った方法はUKアフィゲル10アフィニティクロマトグラフィーで、これによりUKI-PPA complexがUKと結合し、UK-UKI-PPA complexを作る。しかしUKは固相に結合しているため、KSCNで溶出するとUK-UKIとPPAが分離し、PPAが溶出されてくるという方法である。このような方法により得られた純化PPAはSDS-PAGEで一本のバンドを示し、分子量は約65,000と推定された。免疫学的にはオクタロニー法によりPPAは抗UK血清、抗t-PA血清とも反応しなかった。また、PPAにはプラスミノゲンを活性化作用はあったが、フィブリンを直接溶解しないので、プラスミンの作用はないことを示した。

さらに一般に凝固・線溶の生理学的または病態生理学的な意義として、アクチベーターは非妊時には線溶亢進、月経血の排出促進に役立ち、インヒビターは妊娠時の線溶抑制、妊娠の維持、分娩時出血の抑制に関与していると考えられる。今回報告したPPAとUKIの病態生理学的な意義として、妊娠中毒症では線溶抑制がみられるが、これはUKIの増加とPPAの低下が原因の一つとして考えられ、この際PPAの治療的投与の可能性も示唆される。

これに対して審査委員と申請者の中で種々の討議がなされた。結論として申請者の見出したPPAは新しい型のアクチベーターとするに充分純化され特徴づけられている。また病態生理学的観点から見ても興味深く、将来の診断、治療に用いられる可能性も充分あると考えられる。

以上から本審査委員会は本研究が医学博士の学位授与にふさわしいものであると全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	高田	明和			
	副査	教授	川島	吉良	副査	教授	菅野剛史
	副査	教授	阪口	周吉	副査	教授	西村顯治