

Inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by activated factor XII plays a role in the enhancement of fibrinolysis by contact factors in-vitro

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田中, 晶 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1949

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 5 7 3 号	学位授与年月日	平成 22 年 3 月 15 日
氏 名	田 中 晶		
論文題目	Inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by activated factor XII plays a role in the enhancement of fibrinolysis by contact factors in-vitro (活性化 XII 因子によるプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ 1 の不活性化は in-vitro における接触因子による線溶活性の増強に寄与する)		

博士(医学) 田 中 晶

論文題目

Inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by activated factor XII plays a role in the enhancement of fibrinolysis by contact factors in-vitro

(活性化 XII 因子によるプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ 1 の不活性化は in-vitro における接触因子による線溶活性の増強に寄与する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血液凝固活性化経路には、組織因子 (TF) と凝固 VII 因子 (FVII) の結合により開始される外因系と、血液中の接触因子が陰性荷電を有するコラーゲンや人工物に接触することにより開始される内因系がある。TF や FVII の遺伝子欠損動物は出血により胎生致死に至るため外因系は胎児発育に不可欠な血液凝固系とされる。一方内因系の接触因子の欠損では凝固時間の延長を認めるものの明らかな出血傾向は認めず、逆に血栓症を引き起こすことより、内因系は線溶活性の増強や炎症反応に深く関わるとされる。実際、血漿中線溶活性を総括的に表すとされるユーグロブリン溶解時間 (euglobulin clot lysis time, ECLT) が、接触因子の活性化物質であるカオリン添加により著明に短縮する事実が報告されている。ECLT は血漿中の線溶促進因子である tissue plasminogen activator (tPA) とその阻害因子である plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) のバランスにより決まる。これまでに、白血球エラスターゼやトロンピンは PAI-1 を不活性化することによりこれを短縮することが示され、凝固に伴う線溶活性増強機構として報告された。本研究では、カオリンによって活性化された凝固 XII 因子等の接触因子が、PAI-1 を不活性化することにより線溶活性を増強する可能性について検討した。

[材料ならびに方法]

1. ECLT は、クエン酸添加血漿の pH5.2 における等電点沈査を再溶解して得られた分画であるユーグロブリン分画に、トロンピンを添加してクロットを作成し、それが自然溶解するまでの時間として測定した。正常血漿、及び接触因子である、凝固 XII 因子 (FXII)、XI 因子 (FXI)、プレカリクレイン (PK) 欠乏血漿の ECLT に対するカオリン添加の影響を解析し、トロンピン産生を介して ECLT を短縮するカルシウムイオンとの差異を検討した。

2. 上記種々血漿を用いた ECLT 時の PAI-1 の動態を、ビオチン標識 PAI-1 を用いて解析し、精製活性化 FXII (FXIIa) とビオチン標識 PAI-1 の反応と比較した。

3. sepharose に結合した抗 PAI-1 抗体で調整した PAI-1 欠乏血漿を用いて、カオリンによる ECLT 短縮における PAI-1 の役割を検討した。

[結果]

1. 正常血漿では、カオリン及びカルシウムイオンの添加により、ECLT (100%) は、それぞれ $29.9 \pm 3.1\%$ 、及び $62.1 \pm 3.1\%$ に短縮した。活性化プロテイン C (aPC) の添加によりトロンピン産生を抑制すると、カルシウムイオンによるこの短縮は回復した ($86.3 \pm 17.4\%$) が、カオリンによる短縮は回復しなかった ($31.4 \pm 2.1\%$)。これよりカオリンによる短縮にはトロンピン産生が関与していないことが示唆され、このことは Western blotting でカオリン添加したユーグロブリン分画中にはトロン

ビンを認めないことにより確認された。

2. FXII、FXI、PK の欠乏血漿では、カルシウムイオンはいずれの ECLT も短縮したが、カオリンは PK 欠乏血漿及び FXI 欠乏血漿では短縮した(6.9±1.2%, 61.8±2.3%)ものの、FXII 欠乏血漿では著明な短縮を認めなかった(83.2±2.3%)。これより、カオリンによる ECLT の短縮には接触因子の中でも FXII が最も大きく関与していることが示唆された。

3. 正常血漿における、ユーグロブリン分画中の PAI-1 の動態をビオチン標識 PAI-1 を用いた Western blotting で確認したところ、カオリン添加でもカルシウムイオン添加と同様に低分子分解 PAI-1 が確認された。aPC によりトロンビン産生を抑制するとカルシウムイオン添加時の低分子分解 PAI-1 の産生は抑えられたが、カオリン添加による産生は抑制できなかった。一方 FXII 欠乏血漿ではカルシウムイオン添加により正常コントロール血漿と同様に低分子分解 PAI-1 を認めたが、カオリン添加では認めなかった。精製系で FXIIa と PAI-1 の反応を解析したところ、両者は高分子複合体を形成すると同時に PAI-1 の一部が限定分解されることが明らかになった。

4. ECLT 短縮機構における PAI-1 の影響を確認するため、血漿を各種濃度の抗 PAI-1 中和抗体で処理し PAI-1 を除去した後に調整したユーグロブリン分画を用いて、ECLT の変化を検討した。抗 PAI-1 抗体の濃度依存的に ECLT は短縮し、また濃度依存的にカオリン並びにカルシウムイオン添加の影響は減少した。

[考察]

カオリンによる ECLT の短縮には、接触因子である FXII が不可欠であり、カルシウムイオンによる短縮と同様に PAI-1 の不活性化が関与していることが明らかになった。カルシウムイオンによる短縮では、産生されたトロンビンが PAI-1 の限定分解及び不活性化に関わっていたが、カオリンによる短縮はトロンビン産生非依存的であり、活性化接触因子の関与が示唆された。接触因子の中でも特に FXII が重要であり、FXIIa は PAI-1 と高分子複合体を形成すること及び低分子に限定分解することにより、これを不活性化して線溶活性を増強する事実が明らかになった。

[結論]

FXIIa によるプラスミノーゲンの活性化や、カリクレインを介したプロウロキナーゼの活性化が、接触因子による線溶活性増強機構として報告されている。今回、活性化接触因子、特に FXIIa が、トロンビン産生非依存的に PAI-1 を不活性化することにより線溶活性を増強する、という新たな機構を解明した。

論文審査の結果の要旨

申請者は、カオリンによって活性化された凝固 XII 因子(FVII)等の接触因子が PAI-1 を不活性化することにより線溶活性を増強するかどうかを検討した。

クエン酸添加血漿の pH5.2 における等電点沈査を再溶解して得られた分画であるユーグロブリン分画に、トロンビンを添加してクロットを作成し、それが自然溶解するまでの時間、ユーグロブリン溶解時間 (euglobulin clot lysis time, ECLT) を測定した。

正常血漿では、カオリン添加により、ECLT は短縮し、また活性化プロテイン C (aPC) 添加によりトロンビン産生を抑制しても短縮は回復しなかった。これよりカオリンによる短縮にはトロンビン産生

が関与していないことが示唆された。凝固 XI 因子 (FXI) 及びプレカリクレイン (PK) 欠乏血漿ではカオリンは ECLT を短縮したが、FXII 欠乏血漿では短縮を認めなかった。これより、カオリンによる ECLT の短縮には接触因子の中でも FXII が最も大きく関与していることが示唆された。

ECLT 測定時の PAI-1 の動態を、ビオチン標識 PAI-1 を用いて解析したところ、カオリン添加で低分子分解 PAI-1 が確認されたが、FXII 欠乏血漿では認めなかった。また、aPC 添加では産生は抑制できなかった。精製系で FXIIa と PAI-1 の反応を解析したところ、両者は高分子複合体を形成すると同時に PAI-1 の一部が限定分解された。

このことから、申請者は FXIIa が、トロンビン産生非依存的に PAI-1 を不活性化することにより線溶活性を増強することを見出した。

審査委員会では、線溶活性増強における FXIIa の重要な役割を詳細に解明し、それが不育症の原因となりうることを示したことを高く評価した。

論文審査担当者	主査	梅村 和夫		
	副査	前川 真人	副査	上里 忠良