



Visualization of domain- and concentration-dependent impact of thrombomodulin on differential regulation of coagulation and fibrinolysis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-03-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 望月, 里依奈 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004330

博士（医学）望月 里依奈

論文題目

Visualization of domain- and concentration-dependent impact of thrombomodulin on differential regulation of coagulation and fibrinolysis

凝固と線溶の異なる調節系におけるトロンボモジュリンのドメインならびに濃度依存性作用の可視化

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

トロンボモジュリン (TM) は血管内皮細胞上に発現する一本鎖糖タンパク質である。血液凝固因子であるトロンビンが TM に結合するとその凝固活性は阻害され、また抗凝固因子であるプロテイン C の活性化により凝固カスケードも阻害される。さらに TM 結合トロンビンはトロンビン活性化線維素溶解 (線溶) 抑制因子 (TAFI) を強力に活性化する。活性化 TAFI (TAFIa) はその carboxypeptidase 作用によりフィブリン上の C 末端リジンを切断し、プラスミノゲンと組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) のフィブリンへの結合を阻害し線溶を抑制する。よって TM は凝固と線溶の両反応系を修飾し、そのバランスを担う重要分子である。

TM は N 末端から、レクチン様 (D1)、6 個の連続する上皮成長因子様 (EGF 1-6; D2)、セリン/スレオニンリッチ (D3)、膜貫通、細胞内の各ドメインで構成される。EGF 4-6 はプロテイン C の活性化に、EGF 3-6 は TAFI の活性化に必須とされる。細胞外ドメインである D1-3 に相当する遺伝子組換えヒト TM 製剤 (rTM) は、播種性血管内凝固症候群における抗凝固薬としてすでに臨床応用されている。しかしながら、TM 結合トロンビンがどのようなバランスで凝固・線溶の両反応系を阻害しているかは明らかでなく、本研究ではヒト血小板血漿を用い、異なるドメイン、濃度によって、TM が凝固・線溶活性に対しどのような影響をもたらすかを検討すべく実験を行った。

〔材料ならびに方法〕

本研究は浜松医科大学の医の倫理委員会の承認 (No. 16-286) を得て実施した。

健常者の血液を採取し最終血小板数 $4.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$ で調整した。TM の細胞外ドメインである D1-3 (D123; rTM に相当)、プロテイン C と TAFI の活性化能を有する EGF 3-6 (E3456)、プロテイン C の活性化能のみを有する EGF 4-6 (E456) を種々濃度 (0.25~125 nM) で用いた。凝固・線溶反応は組織因子・tPA でそれぞれ惹起し以下の実験を行った。

フィブリン網形成と溶解に伴う濁度変化を毎分測定し、初期値と最大値の半値の時間を凝固時間、最大値から完全溶解による最小値の半値の時間を溶解時間とした。また凝固カスケード反応の足場となる活性化血小板を起点としたフィ

ブリン網の形成と溶解反応を共焦点レーザー走査顕微鏡にて可視化した。可視化には、緑色蛍光標識フィブリノゲン、赤色蛍光標識プラスミノゲンをを用いて、血小板血漿の凝固開始から完全溶解までを連続で撮像した。解析は、Image Jにてフィブリン網集積部位を関心領域として行った。フィブリン網出現（緑色蛍光輝度値増強開始）から溶解直前のプラスミノゲン集積（赤色蛍光）最大値までの時間をプラスミノゲン集積時間とした。これらを TAFIa 阻害薬（TAFIaI）の有無で比較検討した。

多重比較検定には Shirley-Williams 検定あるいは Steel-Dwass 検定を、二群間の比較にはスチューデント t 検定またはマンホイットニー U 検定を用いた。

〔結果〕

凝固時間は D123、E3456、E456 のいずれも低濃度では変化を認めず、最大濃度の 125 nM のみで延長した ($p<0.01$)。溶解時間は D123、E3456 ではそれぞれ 0.25 nM ($p<0.05$)、5 nM ($p<0.01$) 以上の TM 濃度で延長した。E456 の溶解時間は延長せず、125 nM でむしろ短縮する傾向があった。TAFIaI の添加にて、TM 変異体の有無に関わらず溶解時間は同程度まで短縮した ($p<0.01$)。

可視化解析では、活性化血小板を中心に高密度フィブリン網の形成を認め、撮像開始 5 分でいずれも緑色蛍光輝度値は最大となった。TM 無添加および E456 添加時は撮像開始約 10 分で高密度フィブリン網にプラスミノゲンの集積増強を認めた。いずれも溶解直前にはプラスミノゲンの集積増強が先行し、溶解域は拡大した。プラスミノゲン集積時間は、D123、E3456 で著明に延長し、5 nM E3456 では、5 nM D123 あるいは 125 nM E3456 に比し延長した ($p<0.01$)。いずれの延長効果も TAFIaI にて消失した。

〔考察〕

本研究では、TM 結合トロンビンによるプロテイン C・TAFI の活性化による抗凝固・抗線溶活性を、異なる TM ドメインと濃度に関して濁度法と可視化解析を用いて検討した。抗凝固作用には高濃度の TM (EGF4-6 ドメイン) が必要であったが、抗線溶作用は低濃度の TM (EGF3-6 ドメイン) で確認された。既報では、正常血漿中の微量の可溶性 TM が、活性化血小板によるトロンビン生成増強に伴い TAFI の活性化を促進することが示されており、血小板血漿では添加した TM においても TAFI の活性化による抗線溶作用がより優位であると考えられた。

また高濃度の TM では、抗凝固作用によるトロンビンの生成抑制により TAFI の活性化が減弱した可能性が示唆された。トロンビン生成が障害されている血液凝固因子欠損症や抗凝固薬によるトロンビン活性減弱時には、TAFI の活性化が障害され止血時の抗線溶（止血血栓の安定化）作用が減弱することが報告されている。高濃度 TM 存在下においてもトロンビン活性が TAFI の活性化を修飾する可能性が考えられた。

今回は血小板血漿を用いた解析のみであったが、血管内皮細胞表面に発現する TM が、同じく内皮表面に発現する血管内皮プロテイン C 受容体とともに強力にプロテイン C を活性化するとされていることから、血管内皮細胞を含む実験系における更なる検討が必要であると考えられた。

〔結論〕

活性化血小板により増強する凝固反応によって増幅生成されるトロンビン、高濃度の TM 存在下では凝固反応を抑制する一方で、より低濃度において TAFI の活性化による抗線溶作用を示した。rTM 投与の際の凝固・線溶反応の修飾作用への理解に繋がる可能性が示唆される。