

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 中川久子

学位論文題名

Nicked β 2-glycoprotein I と Angiostatin kringle1-4.5 の血管新生に与える影響

【背景と目的】 β 2 Glycoprotein I (β 2GPI)は prothrombin と並ぶ、抗リン脂質抗体の主要抗原である。トロンビンや第 XII 因子 (Haegeman Factor) などの血液凝固因子の活性化阻止、血小板凝集抑制機能を有する。またフィブリン溶解が進むと β 2GPI 分解が増す傾向にあることが報告されている。血清中に存在している β 2GPI はリポプロテインリパーゼ活性や抗凝固作用と向凝固作用をあわせ持ち、アポトーシス細胞処理に関与する。 β 2GPI は plasmin あるいは活性化第 X 因子により第 V ドメインの Lys317-Thr318 で切断され、nicked β 2GPI となる。Nicked β 2GPI は β 2GPI の主な機能であるリン脂質結合能を失い、それに依存した機能が消失するものと考えられている。nicked β 2GPI 濃度が脳梗塞患者の血中で上昇していることや plasminogen kringle 5 に結合して plasmin 生成を抑制することから nicked β 2GPI は線溶系の活性化マーカーであると同時に外因系線溶の negative feedback 機構を担うものと考えられる。ここで我々は plasminogen が plasmin により自己分解されて産生される angiostatin に注目した。angiostatin は血管内皮細胞の増殖や遊走などを阻害する血管新生抑制物質であり、一般的に angiostatin と呼ばれるものは Kringle1-3 あるいは K1-4 を示すが、AS4.5 (plasminogen kringle1-4 の 100%と kringle5 の 85%)は plasminogen の N 端および kringle5 をタンパク分解することによって作られ、血漿中に検出される唯一の isoform である。angiostatin の血管新生抑制効果は、主として血管内皮細胞上の F1F0 合成酵素と結合して内皮細胞の遊走や増殖を抑制することが要因とされている。nicked β 2GPI は plasminogen kringle 5 に結合することから、kringle 5 を有する AS4.5 と nicked β 2GPI の結合が予想され、さらに、血栓近傍での血管新生に何らかの影響をもたらすものと予想される。よって、本研究は、nicked β 2GPI が AS4.5 との相互作用を通して血管新生に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】AS4.5 と nicked β 2GPI の結合性の有無を検討する目的で Biacore X を用いて結合試験を行った。intact β 2GPI は AS4.5 と結合性を示さなかったのに対し、nicked β 2GPI は AS4.5 と解離定数 K_D 3.05×10^{-7} で結合し、plasminogen との結合とほぼ同程度の結合性を有する事を明らかにした。また、nicked β 2GPI は plasminogen と結合する事から、Glu-plasminogen を固相化して液相の nicked β 2GPI に対して AS4.5 を用いた inhibition Assay を行った結果、AS4.5 は濃度依存的に nicked β 2GPI と Glu-plasminogen の結合を阻害した。nicked β 2GPI と AS4.5 の結合が血管新生の場において何らか役割を果たしている可能性が示唆されたため、血管内皮細胞に与える影響を検討した。最初に内皮細胞増殖への影響を検討するためヒト大動脈血管内皮細胞(Human Aortic endothelial cell, HAEC)、ヒト臍帯血管内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)を用いて Cell proliferation assay を行った。その結果、AS4.5 単独添加では既報の通り HAEC の増殖抑制に働くことを確認した。この系に nicked β 2GPI を添加することによって、AS4.5 による細胞増殖抑制作用を阻害し、結果的に AS4.5 非存在下と同等の HAEC 増殖が確認された。続いて血管内皮細胞の遊走への影響を評価する目的で、マトリゲルイ

ンページョンチャンバーを用いた。HUVEC を 1×10^5 cell/ml に調整し、細胞混濁液に AS4.5、intact β 2GPI および nicked β 2GPI をそれぞれ添加後、8 μ m 孔を有するメンブレン上にマトリゲルがコートしてあるインサートチャンバー内に 37°C 下 8 時間静置した。浸潤した細胞を染色し、光学顕微鏡下でセルカウントを行い評価した。その結果、AS4.5 単独では内皮細胞遊走を阻害したが、nicked β 2GPI の添加によって、その内皮細胞遊走阻害効果がキャンセルされた。AS4.5 が血管新生時に管腔形成を阻害することは既知の事実であるが、nicked β 2GPI との相互作用を検討するため、HUVEC と線維芽細胞を共培養した plate を用いて in vitro tube formation Assay を行った。11 日間培養し、Mouse anti-human CD31 および Goat anti-mouse IgG ALP conjugate を用いて染色後、管腔面積を画像解析にて評価した。AS4.5 による管腔形成阻害効果を確認した。その系に intact β 2GPI を添加したものでは、その管腔形成抑制効果に変化は認められなかったが、nicked β 2GPI を添加したものでは、AS4.5 の tube 形成阻害効果を阻害することを確認した。さらに、in vivo における管腔形成への影響を検討するため、内皮細胞増殖因子、AS4.5、nicked β 2GPI の混合物をつめたシリコンチューブをヌードマウスの皮下に移植し、10 日後摘出し、FITC lectin を用いて蛍光測定を行った。in vivo においても in vitro と同様の結果が得られた。

【考察】本研究では、AS4.5 を介した nicked β 2GPI の機能解析を行った。nicked β 2GPI は AS4.5 と結合して血管内皮細胞の増殖と遊走、管腔形成における抑制作用を解除した。このことより、nicked β 2GPI は plasminogen との結合による plasmin 生成抑制すると同時に、AS4.5 の生成抑制と機能制御を行っているものと考えられた。また nicked β 2GPI は AS4.5 の存在下では血管新生促進に働き、互いに強い血管新生抑制効果を有する AS4.5 と nicked β 2GPI のバランスが重要であることが明らかとなった。生体内における意義としては、血栓形成時、線溶系の活性化により plasminogen により plasmin 生成が亢進し、AS4.5 のみならず nicked β 2GPI の生成が促進される。血流の滞っている状態では、局所での AS4.5 および nicked β 2GPI の濃度が高値になるものと考えられる。結合することによって互いの血管新生抑制作用を打ち消し、最終的に側副血行路の形成を促す可能性があると考えられる。

【結論】nicked β 2GPI は AS4.5 と強固に結合した。また、nicked β 2GPI は AS4.5 と結合して血管内皮細胞の増殖と遊走、管腔形成における抑制作用を解除した。