

# 博士學位論文

氏名(本籍)	富樫 兼史 (東京都)
学位の種類	博 士(工学)
学位記番号	甲 第174号
学位授与年月日	令和 4年 6月 27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位論文題目	プラスミンの新規生理的機能の解析:  止血と血管新生の制御への関与
論文審査委員	主査今村 保忠 教授 副査小山 文隆 教授 〃 南雲 紳史 教授 〃 林 利彦 (東京大名誉教授、瀋陽薬科大客員教授) 〃 大和 雅之(東京女子医大教授) 〃 〃

工学院大学大学院

## 目次

略語	3
<b>第1章 序論</b>	4
<b>第2章 ヒト血漿中における内在性プラスミノーゲン活性化が及ぼす止血への影響</b>	9
第1節 序文	9
第2節 実験材料と方法	11
第1項 試薬	11
第2項 ヒト血漿中での内在性ADAMTS13,プラスミンによるVWFMの切断	12
第3項 ADAMTS13またはプラスミンによって切断されたVWFMのコラーゲン結合能力	12
第4項 ボルテックスを用いたヒト血漿中でのVWFMの切断	13
第5項 VWFMの精製	13
第6項 プラスミンによる精製VWFMの切断	13
第7項 フィブリン重合	14
第3節 結果	15
第1項 変性状態下でヒト血漿中でのプラスミンによるVWFMの切断	15
第2項 ボルテックスを用いたヒト血漿中でのプラスミンによるVWFMの切断	19
第3項 切断されたVWFMのコラーゲンへの結合の影響	22
第4項 プラスミンによるVWF切断部位	24
第5項 ヒト血漿中での内在性プラスミノーゲン活性化によるフィブリン重合の影響	26
第6項 考察	28
<b>第3章 NTH <math>\alpha 1</math>(IV)が及ぼす血管内皮細胞間の結合への影響</b>	31
第1節 序文	31
第2節 実験材料と方法	31
第1項 試薬	31
第2項 細胞培養	31
第3項 変性されたIV型コラーゲンの作製	32
第4項 NTH $\alpha 1$ (IV)の精製	32
第5項 免疫蛍光染色およびウエスタンブロット法	32
第6項 Wound healing assay	33
第3節 結果、考察	34
第1項 NTH $\alpha 1$ (IV)はVE-カドヘリンによる細胞間結合を抑制	34
第2項 短時間でのNTH $\alpha 1$ (IV) による細胞間結合の抑制	38

第3項 NTH $\alpha 1$ (IV)による内皮細胞の遊走への影響	42
第4項 考察	44
<b>第4章Endo180が及ぼす血管内皮細胞間の結合への影響</b>	46
第1節 序文	46
第2節 実験材料と方法	46
第1項 試薬	46
第2項 Endo180のsiRNAを用いたノックダウン	47
第3項 Wound healing assay	47
第4項 内在化アッセイ	47
第3節 結果	48
第1項 細胞膜上のEndo180欠損はVE-カドヘリンの細胞間結合を抑制	48
第2項 Endo180欠損細胞におけるコラーゲンの内在化	50
第3項 Endo180欠損細胞における細胞遊走	53
第4項 考察	54
<b>第5章 総括</b>	56
謝辞	58
参考文献	59

## 略語

ADAMTS13; a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13

BSA; bovine serum albumin

Endo180; urokinase type plasminogen activator receptor associated protein/Endo180

FITC; fluorescein isothiocyanate

HUVEC; human venous umbilical endothelial cell

NEM; N-ethylmaleimide

NTH; non-triple helical collagen polypeptide

VWF; von Willebrand factor

Pg; plasminogen

PI; plasmin

cOmplete EDTA-free PIC; cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail

PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF; polyvinylidene difluoride

SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA; short interfering RNA

TIG-1; fetal lung normal diploid fibroblast

tPA; tissue type plasminogen activator

TTP; thrombotic thrombocytopenic purpura

UL-VWFM; unusually large VWF multimer

uPA; urokinase type plasminogen activator

VEGF; vascular endothelial growth factor

VEGFR2; VEGF receptor 2

## 第1章 序論

血管は、体のすみずみの組織まで酸素や栄養分を送るライフラインである。血管の損傷などにより出血した場合、個体の生存に関わるため、止血が行われる。日本人の3大死因であるがん、心疾患、脳血管疾患は、止血、血管が関与するものである。また、ケガによる組織の損傷によって、組織が虚血状態に陥ると、それを解消するために既存の血管から新しい血管が形成される。新しく血管ができる過程を血管新生と呼び、成長、骨格筋肥大、月経、妊娠および創傷治癒を可能にする極めて重要なプロセスだが、網膜症、腫瘍形成などの病態にも関係する。すなわち、止血や血管新生などによる、血管の恒常性維持やその破綻のメカニズムを解明することは、健康、長寿などに関わる重要な社会的課題である。

血管内には血液が流れている。血液は動物の体内を巡る主要な体液であり、生体内で細胞が生きていく上で必要不可欠な媒質である。血液の組成は血球成分と血小板、これらを浮遊させる血漿(液性成分)であり、血漿に含まれる血漿タンパク質は、体液の浸透圧や緩衝作用の調整や、抗体として免疫作用にしたり、血液凝固に作用したりと多様な機能をもつ。血液内で起こる様々な反応の研究は、疾患に対する予防、治療の研究目的として利用できる。血漿を用いた研究は、複雑かつ極めて困難ではあるが、より生体内環境を反映しており、生化学的に多くの有用な情報を得ることができる。

血管が傷ついて傷口から出血すると、血が止まるまでの過程は二段階に分かれている。第一段階では、まず傷口部分の血管が少し縮んで、傷口からなるべく血が出ていかないように作用する。同時に血管の内皮細胞から止血因子フォン・ヴィレブランド因子(von Willebrand factor; VWF)が血管の損傷によって露わになった基底膜のIV型コラーゲンと結合し、血小板を集める。集まった血小板が、塊(血小板血栓)を作り傷口を塞ぐことを一次止血という(図1)。VWFは、この一次止血において血小板が傷口に付着するときに重要な役割を果たしている因子である。しかし、このようにしてできた血小板血栓による一次止血は、あまり丈夫なものではなく、出血を完全に止めるには十分ではない。これを補強するために、第二段階の止血作業が行われる。止血因子フィブリンは強くて丈夫な網を形成し、この網が一次止血で作られた血小板血栓を覆い固める。これを二次止血と呼ぶ(図1)。

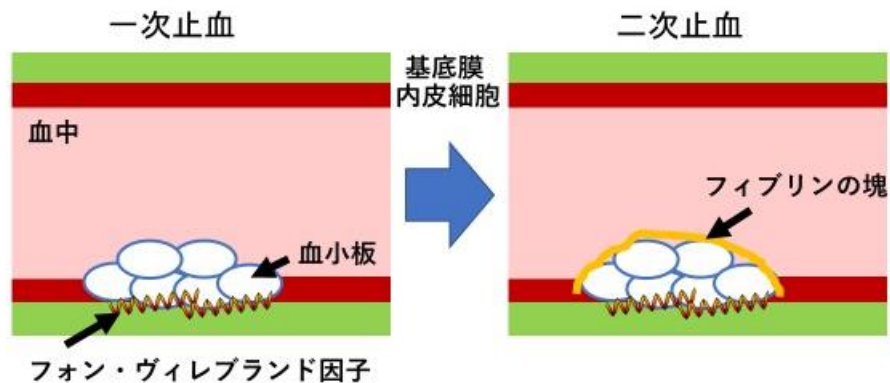
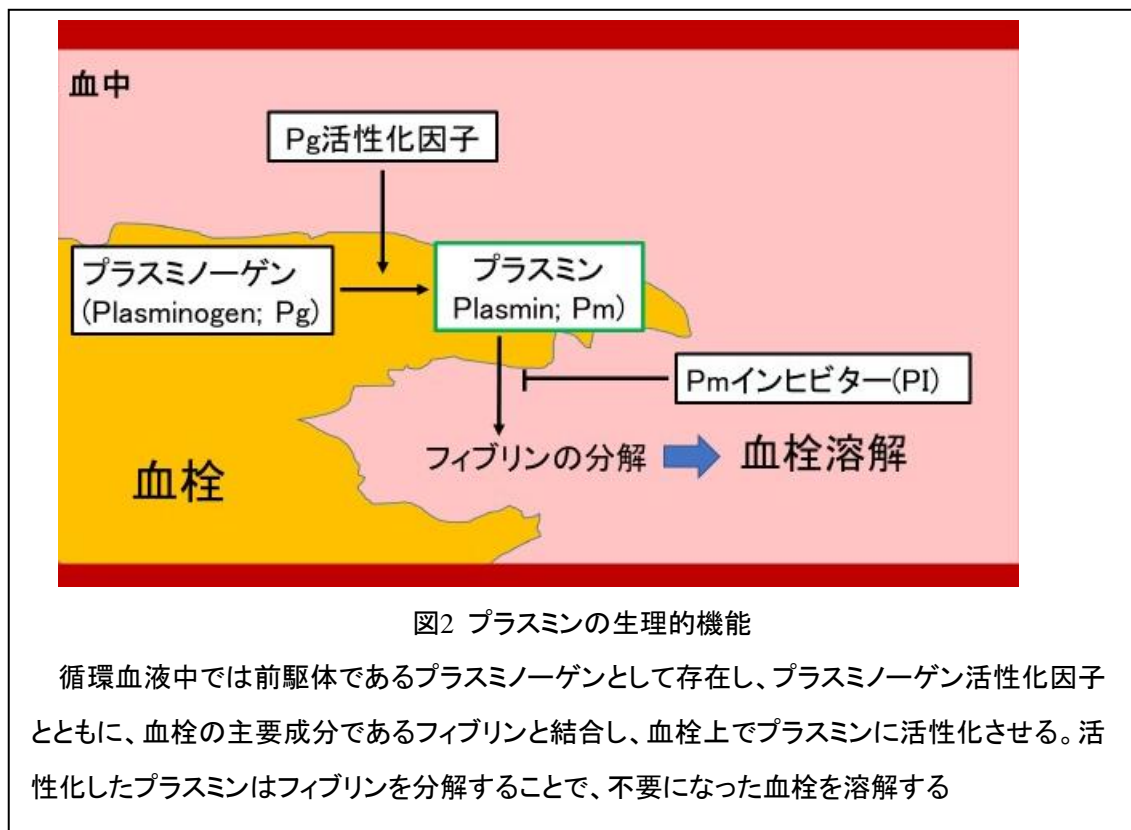


図1 止血のしくみ

止血は2段階の反応を経て、出血を止める。まず初めに、血管が損傷した場合、止血因子フォン・ヴィレブランド因子が露になった基底膜コラーゲンと結合し、血小板を集める。これを一次止血と呼ぶ。次に止血因子フィブリンが丈夫な網を形成し、血小板を覆い固める。これを二次止血と呼ぶ。この止血血栓の大きさは、フォン・ヴィレブランド因子がもつ血小板を凝集する活性とコラーゲンに結合する能力の大きさで決定される。また、止血血栓の強度はフィブリンの塊の形成されるほど強くなる。

止血作業が終わり、出血がおさまると血栓は血流の障害になるので、血栓を除去する作用が始まる。この現象を線溶とよぶ。線溶系の基本反応は、血液中の酵素であるプラスミンによるフィブリン網の分解である(図2)。プラスミンは血栓上で活性化し、効率よくフィブリンを分解する。止血や線溶のような血栓制御メカニズムは生体生存に重要に関わる反面、これらのバランスが崩れた際には致命的な障害を与える。このため血栓の制御メカニズムの解明は重要だが、まだまだ詳細が不明な点が多い。



一方、創傷治癒の過程で組織が再生されると、それに応じて既存の血管から新たに血管がつけられ、虚血状態を防ぐ。これを血管新生とよぶ。これまでに、血管新生は血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)によって制御され、血管細胞による管腔形成や細胞遊走の促進が起こることが知られている(1)。VEGFは、VEGFファミリーに属するヒト遺伝子として VEGF-A, -B, -C, -Dがある。生理的あるいは病的状況で認められる血管新生やリンパ管新生に対し重要な役割を果たす。VEGFファミリーはジスフィルフト結合により架橋されたホモ二量体として分泌され、受容体型チロシンキナーゼであるVEGF receptor (VEGFR)の自己リン酸化を誘導する(1,2)。このVEGF/VEGFRシステムを介した細胞内シグナル伝達により血管内皮細胞の増殖、遊走を促進し、さらに、血管透過性を亢進する。

血管内皮細胞増殖因子以外にプラスミンも血管新生の制御に関わることが考えられている。プラスミンの活性化因子の一つであるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(urokinase type plasminogen activator; uPA)は細胞膜上にあるuPA受容体に結合すると、細胞上でプラスミンの活性化が起こることが知られている(3)。プラスミンが細胞上で活性化すると、基底膜の分解

に関わるマトリックスメタロプロテアーゼの活性化を促し、血管の細胞を遊走させることが考えられている(図3)。しかし、このuPA/uPARを介したプラスミンの活性化を制御するメカニズムは不明である。

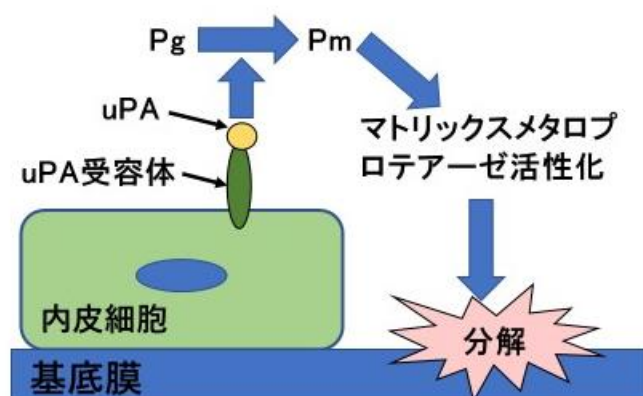


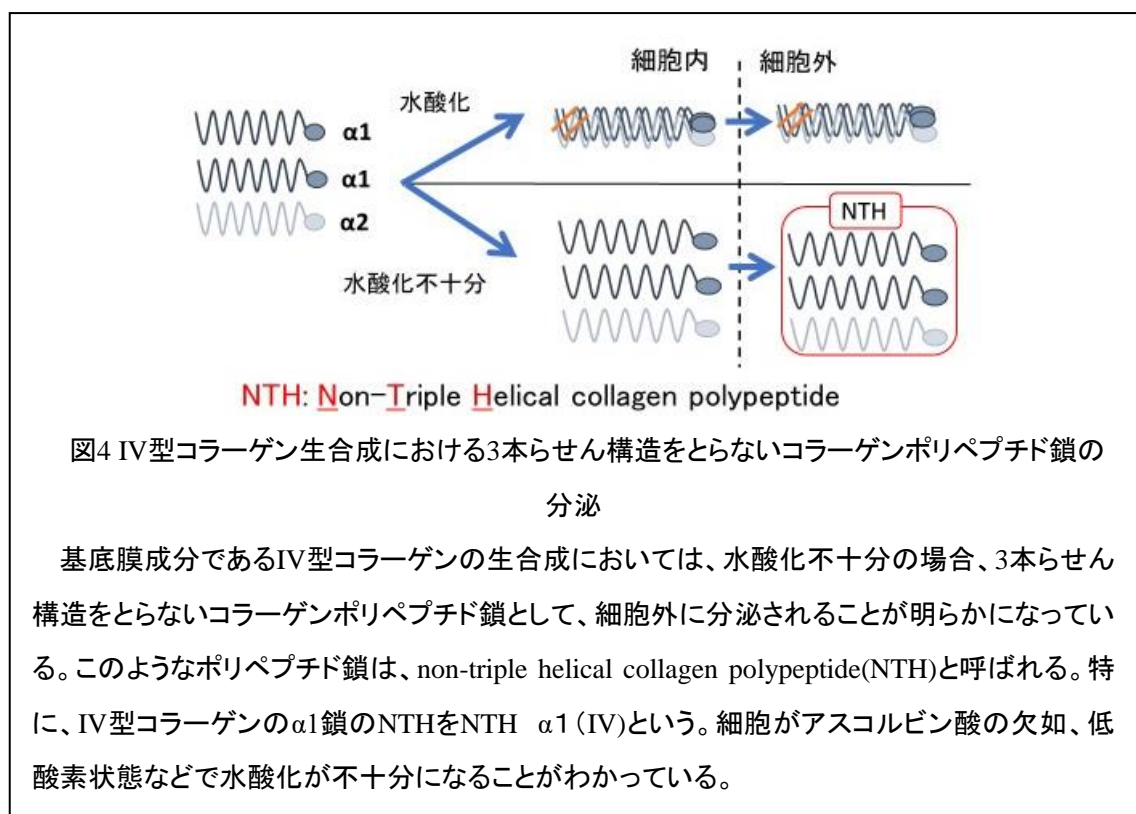
図3 細胞上でのプラスミン活性化による血管新生への関与の仮説

内皮細胞は、プラスミンのアクチベーターの一つであるウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター(urokinase type plasminogen activator; uPA)が細胞膜上にあるuPA受容体に結合すると、細胞上でプラスミノーゲン(Pg)がプラスミン(Pm)に活性化することが知られている。活性化したPmはマトリックスメタロプロテアーゼを活性化させ、基底膜の分解を行う。この反応により、細胞遊走が促進され、血管新生に関与すると考えられている。

基底膜は、血管の構造を維持する上で重要であり、主にラミニン、IV型コラーゲン、ニドゲンなどのヘパラン硫酸プロテオグリカンで構成されている。IV型コラーゲンは基底膜の適切な形成に直接関わる(4,5)。IV型コラーゲンは2本の $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と1本の $\alpha 2(\text{IV})$ で構成される3量体として普遍的に存在している(6)。一般的に、3本らせん構造をとらないコラーゲンポリペプチド鎖は、細胞内で分解されるため、細胞外に分泌される事はないと考えられてきた。しかし、IV型コラーゲンの生合成においては、3本らせん構造をとらないポリペプチドとして、細胞外に分泌されることが明らかになっている(7-11)。このようなポリペプチド鎖は、non-triple helical collagen polypeptide(NTH)と呼ばれる。特に、IV型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖のNTHは、NTH  $\alpha 1(\text{IV})$ と記される(図4)。近年、NTH  $\alpha 1(\text{IV})$ が血管新生において先端部分を含む全体に局在や基底膜構造に存在することから(12,13)、NTH  $\alpha 1(\text{IV})$ が血管新生における発芽や伸長に関与する可能性が指摘



されている。血管新生は、損傷治癒など生体組織の恒常性維持に必須のプロセスの一方で、線維症や動脈硬化症、腫瘍の悪性化など様々な疾患に関与することから、詳細な制御メカニズムについて多大な関心が寄せられている。



本論文では、血液中に存在する線溶酵素プラスミンが止血の調節に関する新しい知見を指摘することになる。また、血管形成にプラスミンの活性化が関与する新しい可能性を提示する。

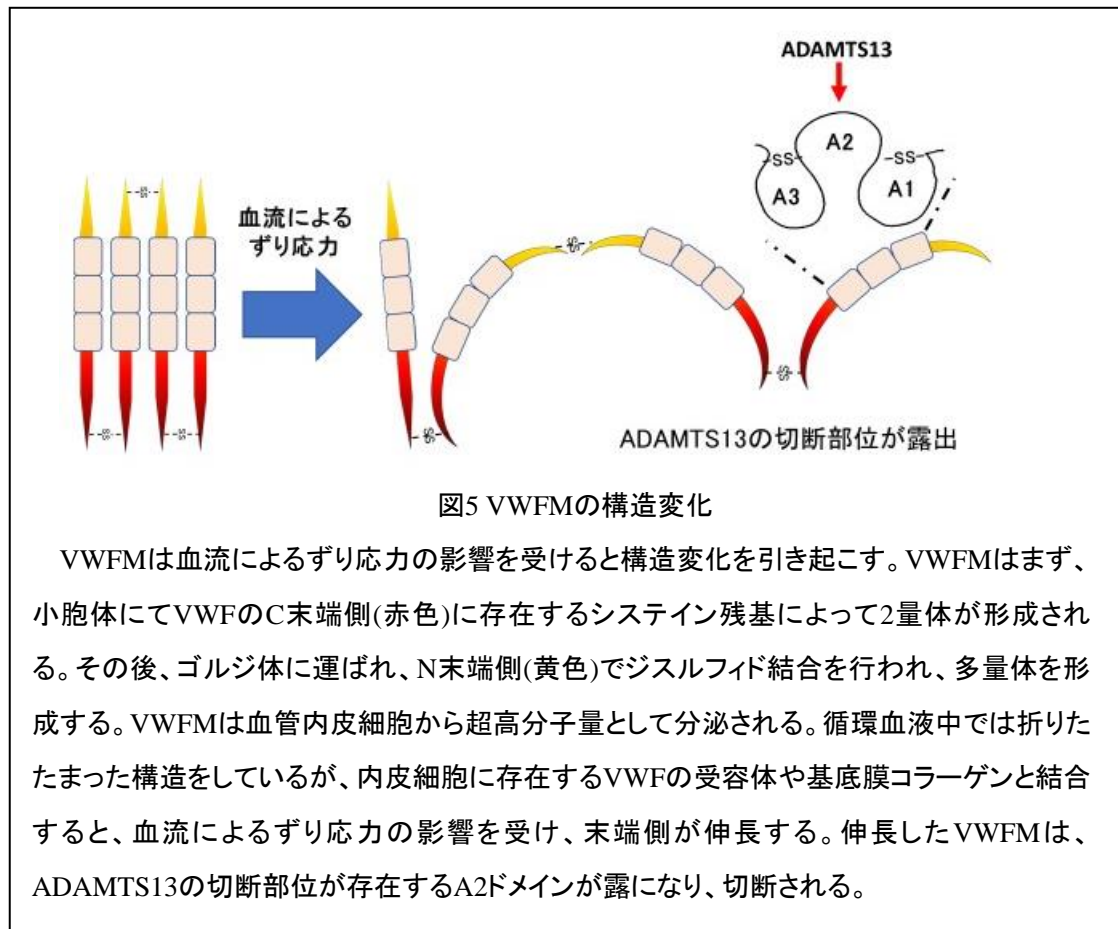
止血に関しては、プラスミンが線溶時ではなく、一次止血および二次止血時に作用する可能性を指摘する(14)。本研究の新たな血栓形成の抑制に関する知見は、出血性疾患の発症機序の解明につながると考えられた。さらに、血管新生におけるプラスミン活性化の制御に関わる新しい因子として、NTH α1(IV)の可能性を指摘する(15)。NTH α1(IV)が直接的に血管新生を誘導する一方で、プラスミンの活性化を介し、間接的にその制御に関わることを示した。このような機構は、がんなど血管新生が関与する疾患の治療法の開発へつながると期待できる。また、本研究で示すプラスミンのように、1つの因子を軸として研究することは、さまざまな要因

が複合して起こるがんなど疾病を、総合的に理解する上で有効な方法論ではないかと考えられた。

## 第2章 ヒト血漿中における内在性プラスミノゲン活性化が及ぼす止血への影響

### 第1節 序文

フォン・ウィレブランド因子多量体(von Willebrand factor multimers; VWFMs)は、血小板の活性化や凝集時の血小板の橋渡しに重要な役割を果たす大型の多量体タンパク質である。VWFは、内皮細胞や巨核球において、最初は一連の繰り返しドメイン(D1-D2-D<sup>1</sup>-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK)からなる単量体(プロVWF)として合成される(16)。プロVWFのモノマーは、小胞体でC末端のジスルフィド結合が形成されて二量体になる。その後、ゴルジ装置でプロVWFのプロ配列が切断され、D3からCKまでのドメイン構造が形成され成熟したVWFになる。さらにVWFの二量体間ではN末端側のジスルフィド結合が形成され、より長い多量体構造に変換される(17,18)。これらは、様々なサイズ(500~20,000kDa)の多量体として内皮細胞で生成・分泌される。血管損傷部位に結合した VWFM は、血流中のずり応力に反応して伸長した構造となる(図5)。伸長したVWFMは、血小板表面の糖タンパク質(GP)Ib $\alpha$ に高い親和性を示し(19)、血小板の凝集が開始される契機となる。また、VWFMはサイズが大きくなるほど血小板への結合力が増すため、血栓を形成しやすい状態になる。正常な血漿中では、VWF切断酵素であるADAMTS13(a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13)が、異常に大きなVWFM(UL-VWFM)を切断し、高分子量の多量体は著しく失われ、適正なサイズとして存在している(20-22)。ADAMTS13が欠損すると、血漿中にUL-VWFMが蓄積される。その結果、病的な血小板凝集体の形成を引き起こし、微小血管を閉塞させ、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の原因となる(23-26)。



プラスミンは、フィブリン塊を溶解するセリンプロテアーゼである。プラスミンはフィブリン塊を溶解するセリンプロテアーゼであり、循環血液中ではプラスミンの前駆体であるプラスミノーゲンとして存在している。プラスミノーゲンは、フィブリン塊の表面に存在するプラスミノーゲンアクチベーターによってプラスミンに変換される(27)。循環血液中のプラスミンの活性は、 $\alpha_2$  プラスミンインヒビター( $\alpha_2$ PI)によって瞬時に抑制される(28,29)。しかし、がん、溶連菌感染症、炎症などの病態に伴って、プラスミノーゲンの過剰な活性化が誘導されることがある(30-32)。

プラスミンの血液中での機能については、線溶以外の可能性もいくつか報告されている。以前、我々はプラスミンがヒトの血漿中でADAMTS13を断片化し、VWF切断活性を約10%に低下させることを明らかにした(33)。Tersteegら(34)は、内皮細胞から分泌されたVWFMをプラスミンが切断すると、血小板凝集活性が低下することを示した。さらに、プラスミンはフィブリンだけでなく、フィブリノーゲンも切断する(35)。これらの報告から、血中のプラスミンは一次止血(VWFMによる

一次血小板プラグの形成)と二次止血(凝固蛋白によるフィブリンの形成)の両方に影響を与えると推測されるが、その詳細についてはまだよくわかっていない。

クエン酸で抗凝固処理されたヒト血漿中のVWFMは、バリウムイオンと尿素の存在下で分解されることが報告されている(36)。バリウムイオン添加で、クエン酸にキレートされたカルシウムイオンや亜鉛イオンが、複合体から遊離し、クエン酸血漿中のADAMTS13活性を刺激する(37)。尿素は、VWFの構造変化を引き起こし、プロテアーゼ感受性の構造へと変化する。本研究では、ヒト血漿中のADAMTS13活性を測定するために、後述のようにヒト血漿を尿素含有緩衝液に対して透析する条件を用いた(33)。しかし、EDTA処理したADAMTS13不活化ヒト血漿中においても、尿素含有緩衝液で透析すると、高分子量 VWFMが切断されることがわかった。尿素含有緩衝液での透析により プラスミノゲンが活性化された(プラスミン-プラスミンインヒビター(PI)複合体形成で示される)。セリンプロテアーゼインヒビターが VWFM の切断を阻止することから、プラスミン が生体内のヒト血漿中で VWFM を切断しているのではないかと推測した。そこで、血中のプラスミノゲン 活性化と止血反応の関係を調べるために、プラスミノゲン活性化によるヒト血漿中の VWFM の切断と、ヒト血漿中の消化された VWFM のコラーゲンへの結合を調べ、一次止血への影響を検討した。また、この時のフィブリノーゲンの切断とフィブリン膜の形成に及ぼす影響を調べ、二次止血への影響も検討した。

## 第2節 実験材料と方法

### 第1項 試薬

citrate-treated human plasma (containing 2.6 (w/v%) sodium citrate hydrate and 0.3 (w/v%) citric acid monohydrate; kindly provided by the Japan Red Cross, Tokyo, Japan), streptokinase (SK; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), human derived plasmin (Calbiochem, Madison, WI, USA), Pefabloc SC (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free PIC; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Merck Millipore, Billerica, MA, USA), polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Merck Millipore), anti-Rabbit IgG, horseradish peroxidase-conjugated (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), Peroxidase Labeling Kit-NH2 (Dojindo Molecular Technologies Inc., Tokyo, Japan), anti-human VWF polyclonal antibody (Dako, Carpinteria, CA, USA), anti-human VWF polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK), anti-plasminogen monoclonal antibody MAB2659 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore), tissue plasminogen activator (tPA; Calbiochem, Madison, WI, USA), urokinase plasminogen activator (uPA; Calbiochem), Vortex-Genie 2 Mixer (M&S Instruments Inc., Osaka, Japan), ultrafiltration membrane (10-kDa nominal

molecular weight limit (NMWL), Ultracel regenerated cellulose, 44.5 mm diameter, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Sephacryl S-500 high resolution column (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England), ELISA flat-bottom 96-well plates (AGC Techno Glass Co. Ltd., Shizuoka, Japan), type III collagen (Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan), TMB microwell peroxidase substrate (1-component; SeraCare Life Sciences Inc., Gaithersburg, MD, USA), purified fibrinogen from bovine plasma (Sigma-Aldrich), and epsilon-aminocaproic acid (EACA; Wako, Osaka, Japan).

## 第2項 ヒト血漿中での内在性ADAMTS13,プラスミンによるVWFの切断

VWFに対するADAMTS13、内在性プラスミンの影響をヒト血漿中で調べた。ヒト血漿をプラスミノゲン活性化因子であるストレプトキナーゼ(32)(2U/ $\mu$ l)(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)またはBaCl<sub>2</sub>(10mM)を含む50mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH8.0で2倍に希釈した。BaCl<sub>2</sub>を含むサンプルは、セリンプロテアーゼ阻害剤のPefabloc SC(1mM)および1× Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktailを添加した。内在性プラスミンを活性化させた試料はEDTA(10mM)を添加した。試料を尿素緩衝液(5mM Tris-HCl, 1.5M尿素, pH8.0)に対して37°Cで24時間透析処理した。1mMのPMSFおよび10mMのEDTAを用いて反応を停止させた。

VWFのサイズは、非還元条件下での1.4%SDS-アガロースゲル電気泳動で評価した(38)。その後、キャピラリーブロットイングによりPVDF膜に転写し(38)、抗ヒトVWFポリクローナル抗体と西洋わさびペルオキシダーゼを結合した抗ウサギIgGによりVWFを免疫染色した。Ledford-Kraemer (39)によれば、多量体分布は低分子量 (<5量体)、中間分子量 (5-10量体)、高分子量 (>10量体)と定義される。プラスミノゲンおよびプラスミンは、非還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミド(7.5%)ゲル電気泳動(SDS-PAGE)後、抗プラスミノゲン mAb MAB2659 (R & D systems, Minneapolis, MN, USA)を用いたウエスタンブロット法によって検出した。

## 第3項 ADAMTS13またはプラスミンによって切断されたVWFのコラーゲン結合能力

マイクロプレート(96穴)を1mMHClに溶解した。Ⅲ型コラーゲン(30 $\mu$ g/ml)を用いて、4°Cで一晩コートし、続いて3%ウシ血清アルブミン(BSA)でブロックした。ヒト血漿を上記のように BaCl<sub>2</sub>またはストレプトキナーゼで処理した後、尿素含有緩衝液に対して透析されました。得られたサンプルを緩衝液(5 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8.0)で5倍に希釈し、コラーゲンコートしたプレートに加え、37°C、1時間静置した。コラーゲンに結合したVWFは、HRPが結合した抗VWFポリクローナル抗体を使用して検出した。その後、TMBペルオキシダーゼ基質と20分間反応させた後、1 N HClを添加して反応を停止した。コラーゲンに結合したVWFの量は、マイクロプレートリーダーSpectraMax 340PC384 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)を使用して450nmでの吸光度を測定することによって決定した。

#### 第4項 ボルテックスミキサーを用いたヒト血漿中でのVWFMの切断

BaCl<sub>2</sub>またはプラスミノゲン活性化因子(ストレプトキナーゼ、組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)またはuPA)によるヒト血漿中のVWFM切断は、ボルテックスミキサー(Vortex-Genie2)を用いた高速旋回攪拌に基づくせん断応力下で評価した(40,41)。上記のようにBaCl<sub>2</sub>またはストレプトキナーゼで処理した試料は、0.2 ml PCRチューブに3%BSAを含むTris緩衝液(5 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 8.0)で20倍に希釈した。総量200 $\mu$ lの試料を、ボルテックスミキサーで37°C、1時間回転レベル1で旋回攪拌した。VWFタンパク質分解反応は、1 mM PMSFおよび10mM EDTAを添加することにより停止した。VWFMは、1.4%SDS-アガロースゲル電気泳動、続いてキャピラリーブロットティング、およびHRPが結合した抗VWFポリクローナル抗体および抗ウサギIgGによって検出し、分子量変化を評価した。

精製されたプラスミン(3-3000 nM)によるヒト血漿中のVWFM切断は、高速旋回攪拌のせん断応力下で評価した。ヒト血漿に精製されたプラスミン添加後、0.2 ml PCRチューブに3%BSAを含むTris緩衝液(5 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 8.0)で2倍に希釈しました。希釈した試料はボルテックスミキサーで旋回攪拌し、上記のように評価した。

#### 第5項 VWFMの精製

VWFMは、文献の方法にしたがって(42,43)、ヒト血漿から精製した。ヒト血漿(250 ml)を4°Cで一晩解凍後、エタノール水溶液(50% v/v)を、ヒト血漿に対して8%(v/v)の最終濃度になるように滴下した。得られた沈殿物は遠心分離(15,000 $\times$ g、4°Cで30分間)によって回収し、250 mlの再溶解緩衝液(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 20 mM EDTA, 5 mMベンズアミン、0.01%Tween-80, pH 7.4)に懸濁した。27°Cで6時間緩やかに攪拌し、再溶解した。溶液はN<sub>2</sub>ガス圧下(0.05 MPa)で限外濾過膜(10 kDa NMWL)を使用して2.5 mlに濃縮した。濃縮液は、Sephacryl S-500高分解能カラム( $\Phi$ 1.7 $\times$ 100 cm、容量226 ml)でゲル濾過に供し、高分子量画分をVWFMとした。溶出緩衝液(50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.01%Tween-80, pH 7.4)で事前に平衡化します。最後に、溶出液を溶出緩衝液で1mlのフラクションに1ml /分の流速で回収しました。

#### 第6項 プラスミンによる精製VWFMの切断

ヒト血漿から精製されたVWFM(1.3 $\mu$ g/ ml; 5.2 nM VWFに対応)を10 nM プラスミンとともに37°Cで指定された時間インキュベートしました。プラスミンによるVWFタンパク質分解は、1 mM プラスミンSFを添加することで終了しました。VWFMおよび切断産物を上記のように分析した。

VWFのプラスミン切断部位を特定するために、精製VWFM (30 $\mu$ g、1.3 $\mu$ g/ ml)をプラスミン (90 $\mu$ g、50 nM)と37°Cで4時間インキュベートし、消化断片を還元条件下でSDS-PAGEを使用して分析しました。続いてPVDFメンブレンに転写し、PVDFメンブレンをCBB染色後、タンパク質バンドを、Procise 492 (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA)を使用して配列決定するためのエドマン分解法にかけた。

#### 第7項 フィブリン重合

フィブリン重合の測定は以下のように行った:ヒト血漿サンプルを10 mM BaCl<sub>2</sub>、2 U/ $\mu$ l スレプトキナーゼ(ヒトプラスミノーゲンを効率的に活性化)を含むTris緩衝液で2倍希釈した。各ヒト血漿サンプルを37°Cで24時間インキュベートした後、10 mM EDTA、1mM PMSFによりADAMTS13、Pmの活性を停止させた。その後、10mM CaCl<sub>2</sub>と0.1U/ml トロンビンによりフィブリン重合反応を開始させた。フィブリン形成プロセスは、マイクロプレート(96穴)中で、波長350nmにおける濁度変化を、1分ごとに30分間測定することで、観察した。

### 第3節 結果

#### 第1項 変性状態下でヒト血漿中でのプラスミンによるVWFMの切断

高分子量VWFMは、尿素含有緩衝液に対する透析後、EDTAで処理されたADAMTS13不活化ヒト血漿中でも切断されることがわかった(図6A レーン2)。一方、セリンプロテアーゼ阻害剤は、EDTA処理血漿での高分子量 VWFM切断を防止した(図6A レーン3)。これらの結果は、ヒト血漿中のセリンプロテアーゼが透析条件下でVWFM切断活性を発揮することを示唆している。尿素はVWFの構造変化を促進し、VWFMのプロテアーゼ感受性が上がったと考えられる(40,44)。

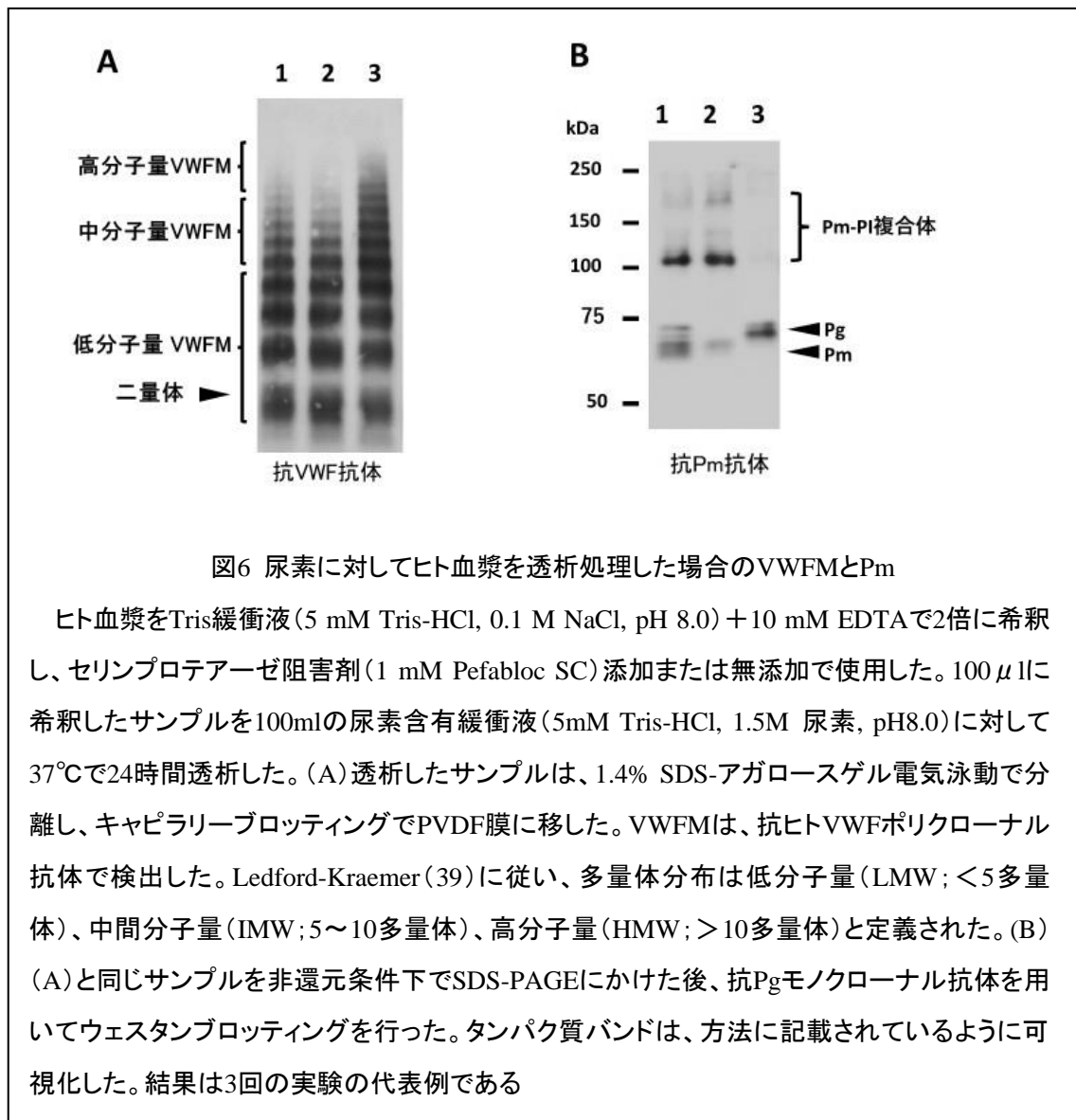
また、尿素含有緩衝液に対する透析後、ヒト血漿試料の分析を行ったところ、抗プラスミノゲン抗体によって約130 kDaのバンドが検出された(図6B レーン1,2)。これらのバンドは、プラスミンと $\alpha_2$ PIの複合体の既知の分子量と一致した。約250 kDaのバンドは、プラスミンと $\alpha_2$ マクログロブリン( $\alpha_2$ M)の複合体に対応すると考えられている(45)。プラスミン-PI複合体の形成は、セリンプロテアーゼ阻害剤の添加によって防止された(図6B レーン3)。したがって、図6に示した結果は、尿素処理がヒト血漿中のプラスミノゲンを活性化し、プラスミンを生成したことを示している。

プラスミノゲンは通常、生理学的プラスミノゲン活性化因子、tPAまたはuPAによるArg561-Val562結合の切断によって活性化される。また、連鎖球菌のいくつかの種からの得られるストレプトキナーゼは、プラスミノゲンと1:1の複合体を形成し、この複合体中のプラスミノゲンが構造変化を起こし、遊離のプラスミノゲンに対して特異的なセリンプロテアーゼ活性を発現し、プラスミンを生成する(46)。尿素処理によっても、セリンプロテアーゼ活性の発現に繋がるプラスミノゲンの構造変化が引き起こされ、プラスミンの生成が起こると推測される。

血漿中に低レベルのtPA活性が存在する可能性は排除できない。すなわち、ヒト血漿が少量のプラスミン活性を有する可能性がある。トロンビンは、血漿中でVWFをわずかに切断することが知られている(47)。しかし、使用した血漿試料中では、フィブリンの凝固は観察されなかったため、トロンビンの血漿前駆体であるプロトロンビンは実験では活性化されないと考えた。

これらの結果は、プラスミンが尿素処理によってヒト血漿中の折りたたみの解れたVWFMを切断する可能性があることを示唆している。したがって、本研究では、血漿中のVWFM切断を起こすセリンプロテアーゼはプラスミンであると仮定することにした。





この仮説を検証するために、プラスミンおよびADAMTS13によるヒト血漿中のVWFM切断を調べた(図7A)。ADAMTS13活性は、ヒト血漿に10 mM BaCl<sub>2</sub>で添加することで評価される。クエン酸血漿中で、クエン酸にキレートされていたカルシウムイオンや亜鉛イオンは、バリウムイオンの添加によって、キレート複合体から遊離し、ADAMTS13に結合することで活性化すると考えられている。プラスミン活性については、ヒト血漿にストレプトキナーゼ(1U/ $\mu$ l)を添加すると、血漿に内在する全てのプラスミノゲンが活性化されプラスミンが誘導される。

図7に示すように、尿素依存的に内在性ADAMTS13、および内在性プラスミノゲンの活性化によって生成したプラスミンは、高分子量VWFMを切断し、分子量を低下させた。VWF多量体パターンを分析し、高分子量VWF多量体の割合を定量化した(図7B)。EDTAおよびセリンプロテアーゼ阻害剤で処理されたヒト血漿中の高分子量VWFMの割合は24%でした。ADAMTS13

活性化(0.4%)または内在性プラスミノーゲン活性化(0.1%)したヒト血漿では、EDTAおよびセリンプロテアーゼ阻害剤で処理したヒト血漿よりも低い割合の高分子量 VWFマルチマーが観察された(図7Aおよび図7B)。ADMTS13およびプラスミンによるタンパク質分解後の高分子量多量体の割合に有意差はなかった。これらの結果は、ヒト血漿中の内在性プラスミノーゲン活性化によって、ADAMTS13と同程度に多量体は減少することを示唆している。さらに、内在性プラスミノーゲンとADAMTS13の両方を活性化したヒト血漿中の高分子量および中分子量VWFMの割合は1.7%であり、プラスミノーゲンを単独で活性化した場合の値である9.2%よりもかなり低かったが、統計的に有意な差はなかった(図7B、レーン4および3)。既報において、内在性プラスミノーゲンの活性化によってADAMTS13はいくつかのフラグメントに切断され、その活性は約10%に低下させることを示した。今回の結果は、残りのADAMTS13活性が活性化された内在性プラスミノーゲンと一緒にVWFMを切断する可能性があることを示唆している。

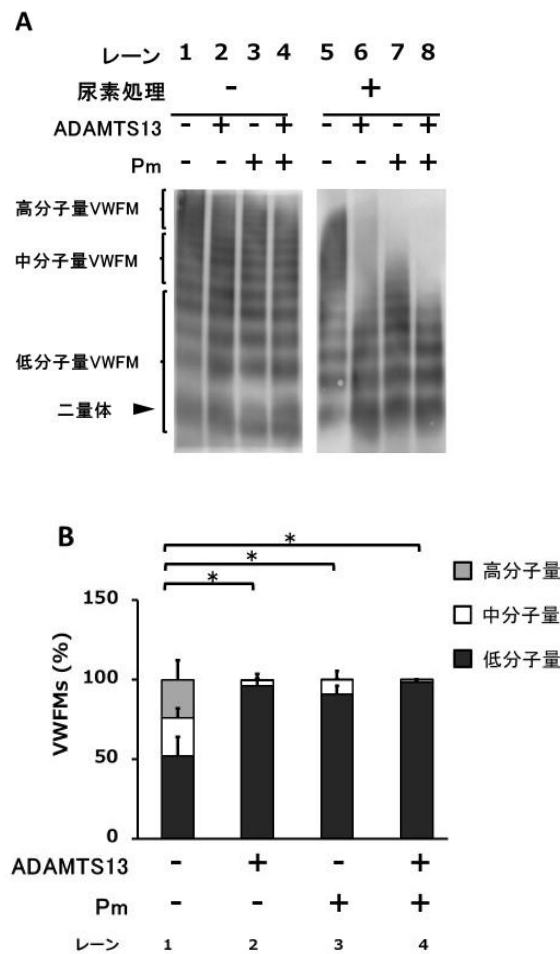


図7 ヒト血漿に内在するプラスミンおよびADAMTS13によるVWFM切断

ヒト血漿サンプルを10 mM BaCl<sub>2</sub>、2 U/μl SK (ヒトプラスミノゲンを効率的に活性化)を含むTris緩衝液で2倍希釈した。BaCl<sub>2</sub>を含むヒト血漿サンプルにおけるADAMTS13の活性化は、内因性セリンプロテアーゼを阻害するためにセリンプロテアーゼ阻害剤(1mM Pefabloc SCおよび1×Complete EDTA-free PIC)の存在下で実施した。(A)レーン1～4:37°Cで24時間インキュベートしたヒト血漿サンプル、レーン5～8:37°Cで24時間尿素含有バッファーに対して透析したヒト血漿サンプル、EDTAおよびセリンプロテアーゼ処理したヒト血漿サンプルをコントロールとして使用した。サンプルを非還元条件下で1.4%SDS-アガロースゲル電気泳動に供した。その後、キャピラリーブロットティング(38)を用いてタンパク質をPVDF膜に移し、抗ヒトVWFポリクローナル抗体とHRPを結合した抗ウサギIgGでVWFMを免疫染色した。(B)尿素含有緩衝液に対して透析した試料のデンストメトリー分析を行い、全多量体に対するVWF多量体の割合を算出した(n=3, p<0.01)。

## 第2項 ボルテックスミキサーを用いたヒト血漿中でのプラスミンによるVWFMの切断

In vivoでは、血流中の剪断応力は、VWFMを折りたたみが開かれた構造になるように誘導する。Brophyらは(40)、精製されたVWFMが、ボルテックスミキサーを用いたタンパク質分解アッセイを使用して、せん断流下でプラスミンによって容易に切断されることを報告した。さらに、プラスミンは、A1-A2ドメイン間のK1491-R1492結合で組換えA1A2A3-VWFを切断した(40)。したがって、ボルテックスミキサーを使用したせん断力は、ヒト血漿においてもVWFMのプラスミンに対するタンパク質分解感受性に影響を与える可能性があるかと仮定した。この仮説を検証するために、ボルテックスミキサーでせん断流下、プラスミノーゲン活性化因子を添加したヒト血漿を37°Cで1時間処理した(図8A)。ヒト血漿中のVWFMは、せん断応力にさらされない限り、内在性プラスミンに耐性があることがわかった。これらの結果は、ヒト血漿中のVWFMが、内在性プラスミノーゲン活性化によって構造変化依存的に切断される可能性があることを示唆するものだ。ヒト血漿中のプラスミンによるVWFM切断のせん断応力依存性を検証するために、VWFM切断に対する精製プラスミンの用量依存的影響を調べた(図8B)。ヒト血漿を3%BSA含むTris緩衝液(50 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 8.0)で20倍に希釈し、ボルテックスミキサーで37°C、1時間巡回攪拌した。精製プラスミンを3 nM添加した条件では、せん断応力下でもVWFMバンドパターン(レーン2および6)は変化しなかった。精製プラスミン30~300 nMの濃度では、ヒト血漿中の高分子量VWFMが切断され、分子量が低下した(レーン7~9)。ただし、これらの濃度のプラスミンは、せん断応力なしでは高分子量VWFMを切断されなかった。また、3000 nM プラスミン添加ではせん断応力の有無によらず高分子量VWFMが切断された。せん断応力は、VWFMの圧縮されたコンパクトな形態から広がった形態へ、コンフォメーション変化を引き起こす(48)(49)。これらのことを踏まえると、上記の結果は、ボルテックスミキサーを用いたせん断応力によるVWFMの構造変化が起きると、プラスミンが、VWFM中のK1491-R1492を含む切断部位の接近できるようになることを示唆している。さらに、ヘパリン、あるいは合成リジン類似体であるイプシロン-アミノカプロン酸(EACA)は、せん断応力下でヒト血漿の内在性プラスミノーゲン活性化によるVWFM切断を阻害した(図8C)。VWF A1ドメインのリジンに富む1405KKKK1408領域は、最近、プラスミンとの相互作用を仲介する役割を果たすと指摘されている(34)。さらに、この領域は、VWFへのヘパリンの結合を調節するのに重要であることが報告されている(50)。これらの結果は、ボルテックスミキサーを用いたせん断応力下で、プラスミンはVWF A1ドメインに結合し、A1-A2ドメイン間でVWFを切断し、VWFMの低分子量化をもたらすことを示唆している。

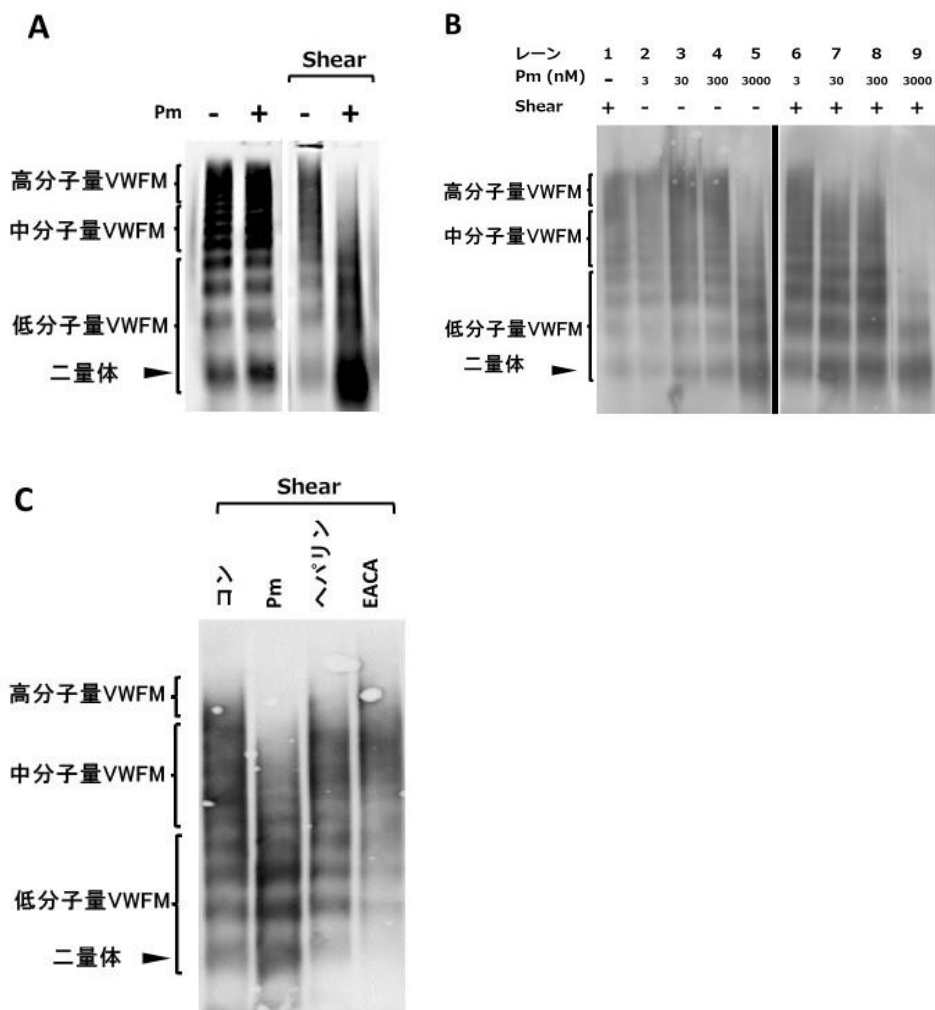


図8ボルテックスミキサーを用いたずり応力下でのVWFM切断

ヒト血漿を、3% BSAを含むTris緩衝液(50 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 8.0)で20倍に希釈し、ボルテックスミキサーで37°C、1時間巡回攪拌した。10 mM EDTAと1 mM PMSFによって反応を停止後、1.4% SDS-アガロースゲル電気泳動で分離し、キャピラリーブロッティングでPVDF膜に移した。VWFMは抗ヒトVWFポリクローナル抗体を用いて検出された。(A)ストレプトキナーゼ添加によって内在性Pm活性化させた。(B)精製Pm(3~3000nM)を含むヒト血漿試料を、3% BSAを含むTris緩衝液(5mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH8.0)で2倍希釈した。希釈したサンプルをボルテックスし、上記と同様に分析した。(C) ヒト血漿試料を3% BSAと2U/ $\mu$ l SKを含むTris緩衝液(5 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 8.0)で20倍希釈した。希釈したサンプルを30mg/mlヘパリンまたは50mM EACAで処理し、ボルテックスミキサーで37°C、4時間巡回攪拌処理した。内在性PmによるVWFタンパク質分解反応は、1mM PMSFで停止した。結果は3つの実験の代表である。

次に、ヒト血漿中の生理的プラスミノゲン活性化因子またはADAMTS13が、ボルテックスミキサーを用いたせん断流下で、VWFMを切断するかどうかを検証した(図9)。生理学的プラスミノゲン活性化因子、(tissue-type plasminogen activator; tPA)または(urokinase-type plasminogen activator; uPA)の通常の血漿濃度は、それぞれ4~10 ng / mlまたは3~5 ng / mlである(51)。図9に示されたように、10 ng / mlのtPAと5ng / mlのuPAは、せん断応力下でもVWFMの多量体パターンを変化させなかった(図9)。一方で、10 ng / mlのtPAと5ng / mlのuPAは、24時間の長時間のインキュベーション後でも、プラスミノゲンを活性化しないことは示されている(33)。これらの結果は、プラスミンは生理学的条件下でVWFMの多量体パターンに影響しないことを示唆する。

また、ADAMTS13はせん断応力下でヒト血漿中のVWFMを切断しなかった(図9)。この結果は、ヒト血漿において、VWFM上のADAMTS13による切断部位が、ボルテックスミキサーでは構造変化を誘起するのに十分なせん断応力にさらされていない可能性を示唆する。一方、ボルテックスミキサーを用いたせん断応力下で、精製VWFMはADAMTS13によって切断されるとの報告がある。Müllerらは(52)、VWF二量体のVWD4ドメイン間に二価カチオン依存性のモノマー間相互作用が存在することを示している。VWFの精製過程ではEDTAが使用されたため(40,41,53,54)、二価カチオンがキレートされモノマー間相互作用が破壊される可能性がある。その結果、精製されたVWFMのコンフォメーションが部分的に展開されることになり、VWFの切断部位へのADAMTS13の接近を促進すると考えられる。

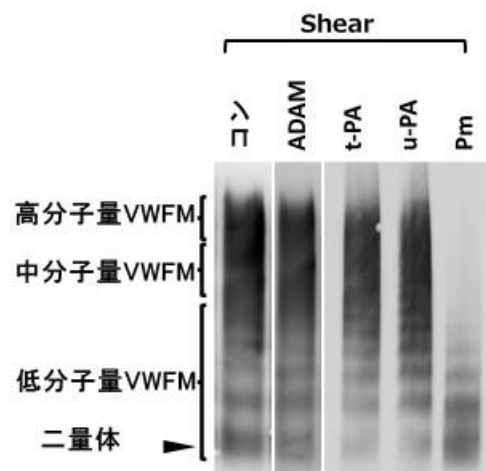


図9 ボルテックスミキサーを用いたずり応力下でのADAMTS13およびプラスミンによるVWFMの切断

ヒト血漿を10 mM BaCl<sub>2</sub>を含むTris緩衝液(5 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 8.0)で20倍に希釈し、10 ng/ml tPA, 5 ng/ml uPA または3 μM 精製Pmを加えた。これらのサンプルを3%BSA処理し、Vortex-Genie 2 Mixerで37°C、1時間ボルテックスした。プロテイナーゼによるVWFのタンパク質分解は、1mM PMSFと10mM EDTAの添加により停止させた。1.4% SDS-アガロースゲル電気泳動を用いてサンプルを分離し、キャピラリーブロッティングを用いてPVDF膜に移した。VWFMは方法に記載されているように検出された。結果は、3回の実験の代表的なものである。

### 第3項 VWFMのコラーゲン結合能に及ぼすのタンパク質切断の影響

次に、コラーゲンへのVWFMの結合能力に対するタンパク質切断の影響を検証した。VWFMは、血管損傷部位でコラーゲンに結合する(55)。ADAMTS13は高分子量VWFMを切断し、コラーゲンへの結合能力を抑制することから、ADAMTS13活性はVWFMのコラーゲン結合能を指標として計測され、実際にTTP患者に使用されている。しかし、プラスミンで消化されたVWFMのコラーゲン結合能力についてはほとんど報告されていない。この研究では、尿素含有緩衝液に対するヒト血漿の透析によるVWFの展開下でプラスミンによって切断されたVWFMのコラーゲン結合能を調べた(図10)。EDTAおよびセリンプロテアーゼ阻害剤で処理されたヒト血漿中のVWFMが、コラーゲンに結合した量を100%と定義した。コラーゲンに結合したVWFMの量は、ADAMTS13による切断後に26%に減少した。一方、プラスミンでは35%に減少した。プラ

スミンは、ADAMTS13と同様にVWFMのコラーゲン結合能力を低下させることが示された。ADAMTS13のみで切断されたVWFMと、ADAMTS13および内在性プラスミンによって切断されたVWFMのコラーゲン結合能(21%)に有意差はなかった。図7ではこのような切断により高分子量多量体の割合が顕著に減少していたので、VWFMのコラーゲン結合能は多量体のサイズを反映すると考えられる。したがって、内在性プラスミノーゲンの活性化によって生成されたプラスミンは、ヒト血漿中の高分子量 VWFMの量を減少させ、コラーゲンに結合するVWFMの能力を低下させ、一次止血に影響を与えると推測された。

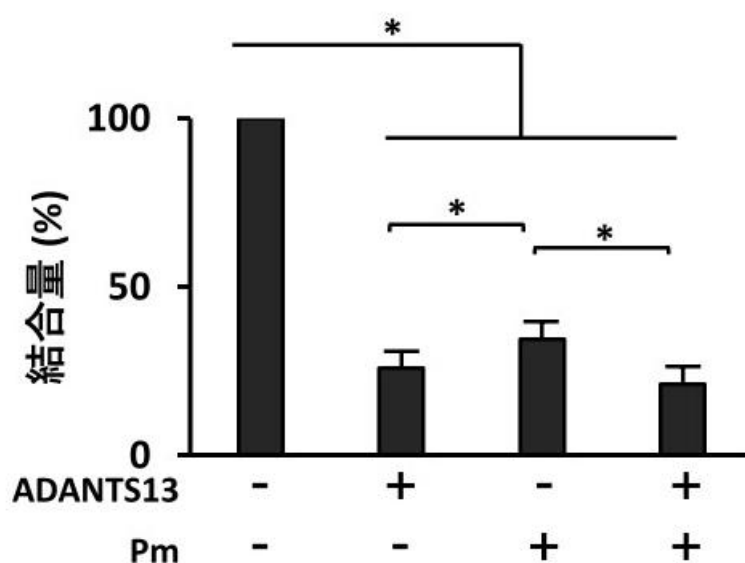


図10 ヒト血漿中の切断型VWFMのコラーゲンへの結合

マイクロプレートを、1 mM HClに溶解したIII型コラーゲン30  $\mu$ g/mlを用いて、4°Cで一晩コートし、3% BSAでブロックした。BaCl<sub>2</sub>またはSKのいずれか、あるいは両方を含むヒト血漿試料を、図6に記載したように、尿素含有緩衝液に対して透析した。透析試料をTris緩衝液(5 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8.0)で5倍に希釈し、コラーゲンコートしたプレートに添加した。コラーゲンに結合したVWFは、材料と方法に書かれているように検出された。EDTAおよびセリンプロテアーゼ阻害剤(Pefabloc SCおよびComplete EDTA-free PIC)を添加したヒト血漿VWFMのコラーゲン結合能を100%とした(n = 9実験)。データは9つの独立した実験の平均±標準偏差を表す(\*p<0.01)。



#### 第4項 プラスミンによるVWF切断部位

尿素含有緩衝液に対する透析によって誘発されたVWFMの構造変化は、VWFMのサイズの減少によって示されるように、VWFのいくつかの切断部位のプラスミンに対する感受性を増加させた。図11には、還元条件下でのSDS-PAGEにより、プラスミンによるVWFMの切断を分析した結果を示した。尿素含有緩衝液に対して透析されたヒト血漿では、内在性プラスミノゲン活性化に生成したプラスミンはVWFを3つの断片に分解した(図11、レーン7、矢印a~c)。ADAMTS13による切断では、約170kDaおよび140kDaの断片が生成された(図11、レーン6、P1およびP2)。これらの分子量は、断片bおよびcとほぼ一致した。尿素処理なしで内在性プラスミノゲンを活性化すると、VWFが切断され、断片bが生成した(レーン3)。ヒト血漿中のプラスミンによるVWFモノマーの切断パターンは、尿素処理の有無によって異なることがわかった。VWFMは、ヒト血漿中でせん断応力を受けないと、球状コンフォメーションをしていると考えられる(48,49)。しかし、尿素の存在下では、VWFMは部分的に折りたたみが広がった構造となると見なされている。本研究の結果から、尿素処理によってVWFMに構造変化が生じ、VWF上の切断部位へプラスミンがアクセスできるようになったと考えられる。

次に、ヒト血漿から精製したVWFMをプラスミンとともに37°Cで各時間インキュベートし、切断産物を還元条件下でSDS-PAGEを使用して分析した(図12A)。精製VWFM濃度は1.3μg/ml(5.2

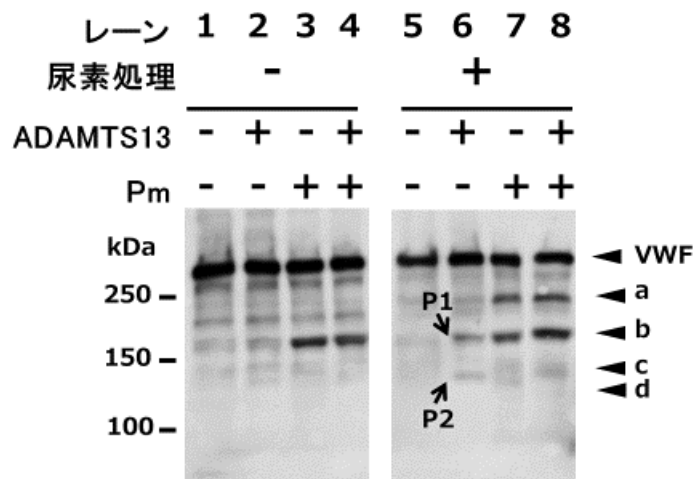
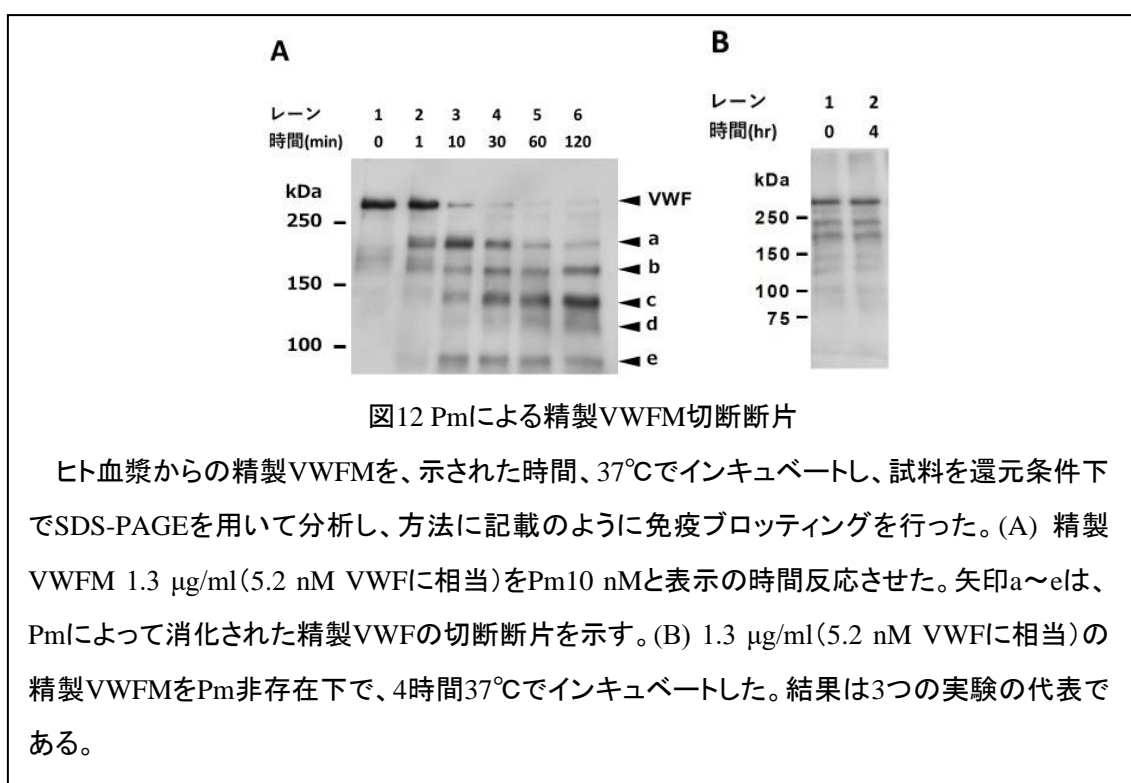


図11 ADAMTS13、内在性Pmによるヒト血漿中のVWFMの断片

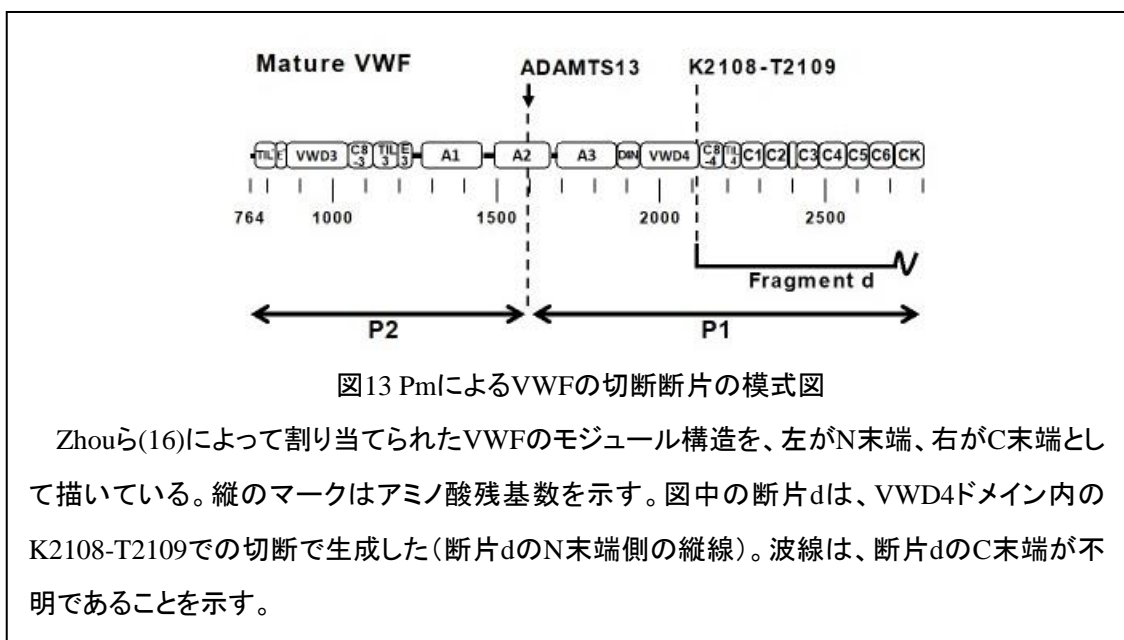
BaCl<sub>2</sub>、ストレプトキナーゼ処理したヒト血漿試料を尿素含有バッファーに対して透析した。このサンプルを還元条件下で5%SDS-PAGEに供し、その後、材料と方法に書かれているようにイムノブロット処理を行った。矢印a~dは、PmによるVWFの切断断片を示す。ADAMTS13によるVWFの切断断片は、分子量約170kDaおよび140kDa(それぞれP1およびP2)であった。結果は3回の実験の代表的なものである。

nM VWFに相当)、プラスミン濃度は10 nMとした。生理学的状態の血漿ではVWFM濃度は10 $\mu$ g / mlでなので、本研究の条件は約1/8と低かった。しかし、プラスミンによる精製VWFの切断パターンは、ヒト血漿中のプラスミンによるVWFの切断パターンと類似していた(図11および図12A)。時間経過を調べると、1分間のインキュベーション後に2つの切断断片aとbが見られた(レーン2)。10分間のインキュベーション後に4つの切断断片a、b、c、およびeが観察された(レーン3)。さらに、断片dは30分のインキュベーション後に出現し(レーン4)、切断を受けていないVWFは60分のインキュベーション後に消失した(レーン5)。断片bとeの強度は、10~120分のインキュベーション中にほとんど変化しなかったが、断片cとdは、断片aの減少に伴って徐々に増加した。これらの結果は、断片cおよびdが断片aの分解生成物である可能性があることを示唆している。また、少なくとも断片a、b、およびeはVWFから直接派生し、断片cおよびdは断片aから派生していると考えられる。対照実験として、精製VWFをプラスミンなしで4時間インキュベートしたが、VWF切断は観察されず、血漿由来VWF精製試料にはVWF切断プロテアーゼ活性はほとんど含まれていないことが確認された(図12B)。したがって、図12Aの切断断片は、プラスミン活性によると考えられる。



断片dのN末端アミノ酸配列は、エドマン分解法を使用してTLVQEXTVQであると決定された(図13)。この配列は、W残基を除いてVWD4ドメイン配列2109TLVQEWTVQ2117と一致していたため、プラスミンはVWD4内のK2108~T2109でVWFを切断すると考えられた。図12に示す結果と合わせて、断片dを生成したVWD4内の切断サイトは、断片a、b、c、およびeを生成した他の

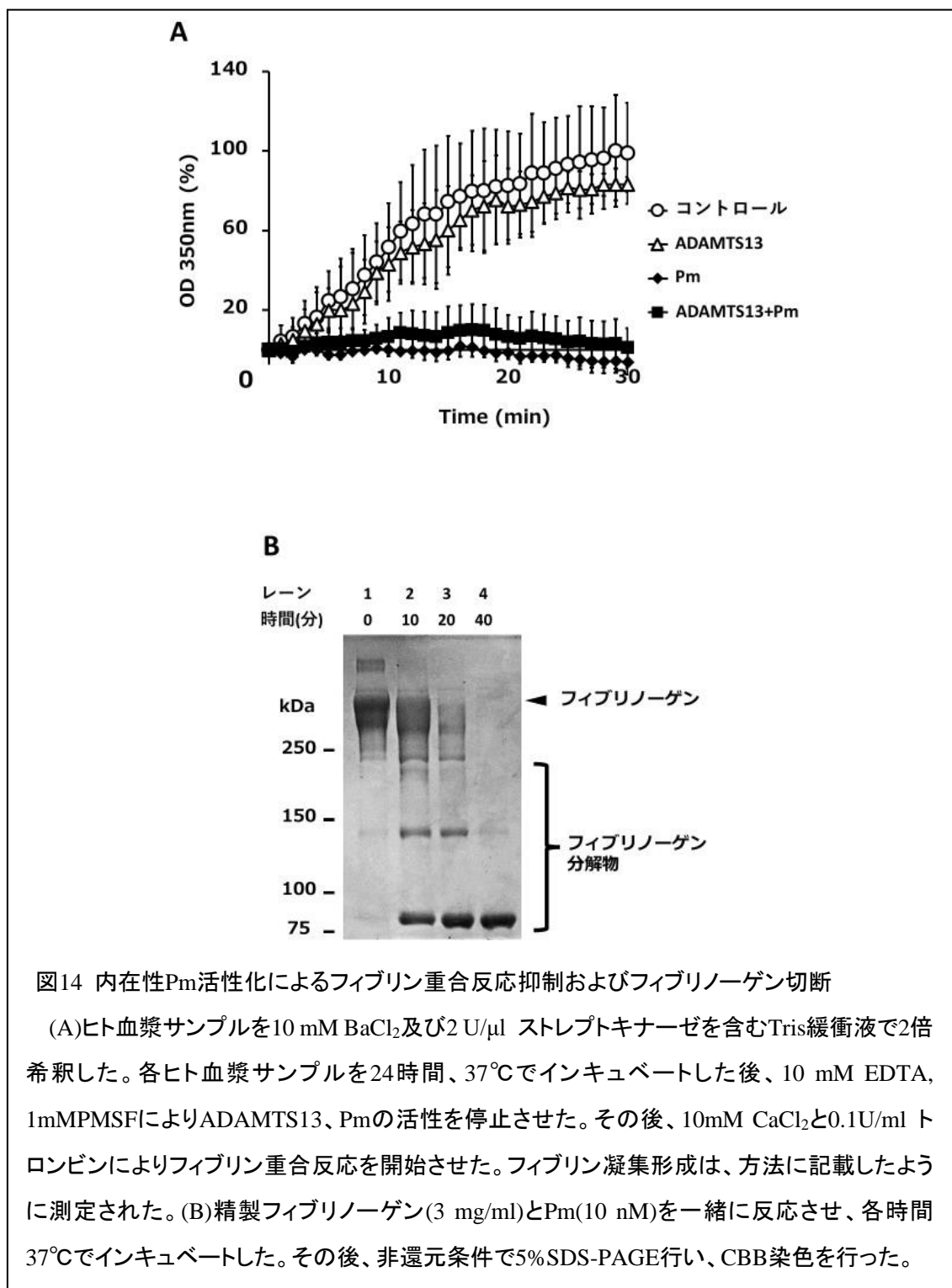
切断サイトよりもプラスミン切断に対する感受性が低いと推測された。他の断片(a、b、c、およびe)のシーケンス分析は、不明な理由で失敗した。



#### 第5項 ヒト血漿中での内在性プラスミノーゲン活性化によるフィブリン重合の影響

プラスミンの生理的役割はフィブリンを分解する線溶であるため、内在性プラスミン活性化がフィブリン網を形成する二次止血に影響を与えるか検討した。ヒト血漿にBaCl<sub>2</sub>またはプラスミノーゲン活性化因子をそれぞれ添加し、1.5Mの尿素で37°C 24時間透析処理を行った。その後、10mM CaCl<sub>2</sub>と0.1U/mlのトロンビンを添加し、350nmの波長で濁度を30分間計測し、フィブリン重合を測定した(図14A)。ヒト血漿にセリンプロテアーゼ阻害剤とEDTA添加したものをコントロールとした(○)。ADAMTS13を活性化させたヒト血漿中では、フィブリン重合はコントロールと同様に行った(△)。一方、内在性プラスミノーゲンを活性化させると、フィブリン重合は起きなかった(●, ▲, ■)。フィブリン凝集塊が形成された条件で、プラスミン活性を、合成基質s-2251を用いて確認したところ、活性は認められなかった。また、精製フィブリンノーゲンのプラスミンによる分解を調べたところ、図14B 条件では40分ですべて分解されることが分かった。これらの結果から、血漿中では内在性プラスミンによってフィブリンノーゲンが切断されたため、フィブリン重合が行えな

ったと考えられた。



## 第6項 考察

この研究の目的は、血液中の内在性プラスミノゲン活性化と止血反応との関係を明らかにすることであった。内在性プラスミノゲン活性化によってヒト血漿中のVWFMが構造変化依存的に切断され、高分子量VWFMの量が減少し、VWFMのコラーゲンへの結合能力が低下することを示した。プラスミンはいくつかの部位でVWFを切断した。さらに、プラスミンはフィブリノーゲン切断し、フィブリン重合を抑制した。プラスミンは、in vitro(47)およびin vivo(34)でVWF依存性血小板凝集体を分解できることが示されている。Federiciらは、プラスミノゲン活性化因子であるストレプトキナーゼによる急性心筋梗塞の患者の治療中に、VWFとフィブリノーゲンのタンパク質分解が起こるかどうかを評価した(35)。このグループは、ストレプトキナーゼ処理によって24時間にわたって高分子量多量体が有意に消失し、フィブリノーゲンが非常に低レベルであることを発見した。ストレプトキナーゼ治療開始後48時間で、高分子量多量体レベルは回復したが、フィブリノーゲンレベルは部分的にしか回復しなかった。本研究の結果と合わせて考察すると、過度に活性化されたプラスミノゲンは一次および二次止血に影響を与える可能性がある。

我々は以前に、プラスミノゲン活性化がADAMTS13を断片に切断するが、VWFMの構造変化なしではヒト血漿中のVWFMを切断しないことを報告した(33)。その報告では、事前にヒト血漿中の構造変化なし条件下でプラスミンによって切断されたADAMTS13を用いて、尿素透析処理による構造変化後のVWFMに対する切断活性を測定したところ、多くの高分子量VWFMが得られたことから、ADAMTS13の切断によってVWFM切断活性は低下することを示した。本研究では、VWFMは、尿素含有緩衝液に対する透析またはボルテックスミキサーによるせん断応力によって構造変化を起こす条件では、活性されたプラスミンによって切断されることを示した。これらの結果は、VWFM切断に関して、内在性プラスミノゲン活性化によってヒト血漿中のADAMTS13の活性は喪失するが、プラスミンの活性によって補われ得ることを示唆している。

さらに、本研究では、ADAMTS13ではなくプラスミンが、ボルテックスミキサーを用いたせん断応力下でヒト血漿中のVWFMを切断することを見出した。この結果は、せん断応力下でのVWFMの構造変化が、プラスミンにアクセス可能な切断部位を露出させたことを示唆している。したがって、プラスミンは折りたたみが部分的に開かれた構造のVWFMを切断する可能性があり、その結果、高分子量VWFMが大幅に消失することになる。Dickeらは、出血を伴う後天性フォンヴィレブランド症候群を発症している患者は、より大きなサイズのVWFMの喪失と、プラスミノゲン活性化を示すD-ダイマーおよびプラスミン- $\alpha_2$ PI複合体レベルの増加を示したと報告している。すなわち、本研究の結果は、血中のプラスミンが、高分子量VWFMの有意な喪失を引き起こすことにより、出血性疾患のリスクを高める可能性があることを示唆する。

TTPでは、ADAMTS13は、ADAMTS13遺伝子の変異またはADAMTS13活性を阻害する自

己抗体によって不活化される(26,57)。本研究では、ADAMTS13が不活性なヒト血漿中で、プラスミノゲンの活性化により高分子量VWFMの量が減少した。さらに、プラスミノゲンのみの活性化は、ADAMTS13と同程度にVWFMのコラーゲン結合活性を低下させた。プラスミンによるVWFM切断は、血小板凝集活性を低下させることが報告されている(34)。最近、Tersteegらは(58)、急性TTPマウスモデルにおいて低用量のストレプトキナーゼを投与すると、血小板数は回復することを報告している。ヒトではマウスに比べ、より低用量のストレプトキナーゼによってプラスミノゲンが活性化される(59)。これらのことから、過度に活性化されたプラスミノゲンは、TTPのリスクを低下させる一方、フィブリノーゲン切断を介して二次止血を損ない、出血性疾患を引き起こす可能性がある。

プラスミンは複数の部位でVWFを切断し、5つの切断断片(a-e)を生成することが示された。断片dのアミノ末端配列を特定し、プラスミンがVWD4ドメインのK2108-T2109でペプチド結合を切断することを明らかにした(図13)。VWD4ドメインの3Dモデルを、VWD3ドメインのホモロジーモデリング(60)を使用して構築したところ、この切断部位はC1972-C2123のジスルフィド架橋間の $\alpha$ ヘリックス上に位置した(図15)。したがって、プラスミンによってK2108-T2109で切断が起きても、C1972-C2123でのジスルフィド架橋があるため多量体構造には影響は及ばないと推測された。Brophyらは(40)、組換えA1A2A3-VWFを使用して、プラスミンがA1-A2リンカードメインのK1491-R1492で切断することを示した。彼らは、この切断部位が変性剤の存在下で露出していることを示唆した。さらに、VWFの推定ジスルフィド結合によると(16)、この部位での切断により、VWFMの分子量が低下する可能性がある。まとめると、我々の結果は、プラスミン切断部位は静的状態でVWFMの表面に複数の部位でわずかに露出しており、旋回攪拌によるせん断応力または尿素含有緩衝液への透析によって折りたたみが開かれたVWFMでは、より露出するようになることを示唆している。

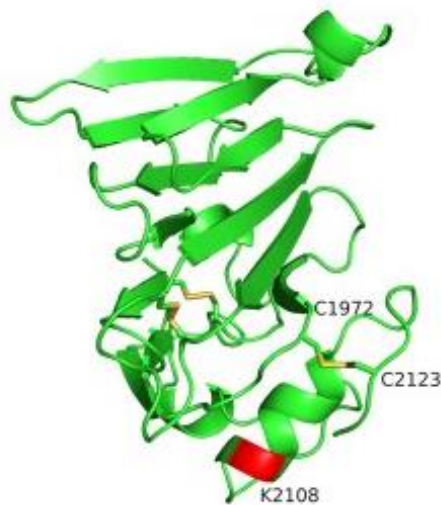


図15 VWD3ドメインとのホモロジーモデリングにより作成したVWD4ドメインの立体構造  
VWD4ドメインの立体構造は、VWD3ドメイン(60)とのホモロジーモデリングにより作成した(緑)。システイン残基は黄色の棒で示されている。

本研究から得られた知見には、一定の制約があることを指摘する。まず、動物モデルを使用していない。したがって、プラスミノーゲンの活性化がヒト生体中でVWFMを切断できるかどうかは明らかにしたわけではない。ただし、ヒト血漿サンプルを使用したこの研究は、血漿がより生体に近い状態であること、また、種の違いを考慮する必要がないことから潜在的に重要と考えられる。第二に、プラスミンのVWF切断部位のすべてを決定できませんでした。これらの切断部位の特定は、この研究で導き出された結論には必要ないが、そのような知識は、VWFに対するプラスミンの影響について多くの示唆を提供する可能性がある。少量の試料でも分析可能な質量分析などを用いた手法による切断部位の決定が必要と考えている。

要約すると、我々の発見は、血漿中の活性化プラスミノーゲンが折りたたみが開かれたVWFMを切断し、コラーゲンへのVWFMの結合能力を低下させる可能性があることを示した。過剰なプラスミノーゲンの活性化はフィブリノーゲン/フィブリンを分解する可能性がある。血液中の過剰なプラスミノーゲンの活性化は、一次および二次止血の障害を引き起こす可能性があることを提案したい。

### 第3章 NTH $\alpha$ 1(IV)が及ぼす血管内皮細胞間の結合への影響

#### 第1節 序文

NTH  $\alpha$ 1(IV)は、IV型コラーゲンのCOL4A1の遺伝子産物であり、生理的条件下で3本らせん構造を持たないポリペプチド鎖として分泌される(7-11,13)。我々は、ヒト胎児肺由来線維芽細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の共培養スフェロイドを用いたin vitroの血管新生モデルを開発し、NTH 1(IV)が血管様ネットワークの内皮細胞とその細胞周囲に基底膜構造に沿って局在することを明らかにした(12)。また、ウサギ角膜の新生血管では、NTH1(IV)が新生血管の先端を含む全体に局在していることが示されている(13)。これらの結果は、NTH  $\alpha$ 1(IV)が血管新生における発芽伸長に作用する可能性が指摘されている。血管新生の初期には、血管内皮細胞間の細胞間結合が抑制され、萌芽と伸長が同時に起こることが知られている。そこで、NTH  $\alpha$ 1(IV)は血管内皮細胞間の血管内皮カドヘリン(VE-カドヘリン)を介した結合の形成に関与していると仮定した。本章ではNTH  $\alpha$ 1(IV)の内皮細胞間接合への影響を検討した。

#### 第2節 実験材料と方法

##### 第1項 試薬

Human placental type IV コラーゲン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dithiothreitol (DTT; Wako, Osaka, Japan) and iodoacetamide (IAA; Wako), 0.22 $\mu$ m membrane filter (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). N-ethylmaleimide (NEM; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) CNBr-activated Sepharose 4B (Sigma-Aldrich), cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free PIC; Roche applied Science, Indianapolis, IN, USA), Sepharose-CL-4B (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England), phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore), anti-human VE-カドヘリン monoclonal antibody (F-8) (Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (A-11032) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A-11017) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), anti-Rabbit IgG, horseradish peroxidase-conjugated and anti-Mouse IgG, horseradish peroxidase-conjugated (Thermo Fisher), Hoechst 33258 (Dojindo Molecular Technologies Inc., Kumamoto, Japan). Monoclonal antibody against human  $\alpha$ 1(IV) chain (JK132)(7,61)

##### 第2項 細胞培養

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC; Lonza, Walkersville, MD)を6~8継代で使用した。4well plateに $3.5 \times 10^4$  cell/well播種し、2日間 EGM-2 Bullet Kit (Lonza) で提供されている成長因子とウシ胎児血清(FBS)が添加されたEBM-2で前培養した。ヒト二倍体胎児肺由来線維芽細胞



(TIG-1; Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan)は、10%FBSを含むDMEM培地 (Sigma-Aldrich) で培養した。培養は37°C、5% CO<sub>2</sub>で行われた。

### 第3項 変性されたIV型コラーゲンの作製

Human placental type IV コラーゲンを50mM 酢酸, 2M ureaで溶解(300µg/ml)し、10mM DTTを添加して80°C、30 分 インキュベートした。その後、20mM ヨードアセトアミドを添加して室温30分処理によりシステイン残基をアルキル化した。試料は、50mM 酢酸に対して透析を行い、0.22µm membrane filter (Merck Millipore)でフィルトレーションした。

### 第4項 NTH α1(IV)の精製

NTH α1(IV)は前述のようにTIG-1の培養上清から精製された(62)。詳細として、TIG-1をコンフルエントまで培養後、0.1%FBSを含むDMEM培地で3日間した。培養上清50 mlを回収し、遠心分離により不溶物質を除去した。試料はSephacrose-CL-4Bカラム(φ 1.0×5 cm, 4-ml volume)に通した後、結合buffer(20mM リン酸ナトリウム, 10mM EDTA, 1×Complete EDTA free PIC, pH 7.0)で事前に平衡化したJK132カラムにアプライした。JK132カラムは、CNBr樹脂(CNBr-activated Sepharose 4B; 0.5 g)にJK132抗体(2.9 mg)を結合させ、作製した。洗浄buffer(20mM リン酸ナトリウム, 10mM EDTA, 1×Complete EDTA free PIC, 0.1% Tween 20 pH 7.0)でカラムの体積の2倍量で洗浄し、さらに20mM リン酸ナトリウム, 10mM EDTA, 1×Complete EDTA free PIC, pH 7.0)で洗浄した。溶出buffer(0.1M Gly-HCl(pH 2.5), 10mM EDTA, 1×Complete EDTA free PIC)で1mlの画分でNTH α1(IV)を溶出した。溶出画分は直ちに中和buffer (0.1M Tris-HCl pH 9.0)で中和した。

NTH α1(IV)濃度は、ヒトα1(IV)鎖に特異的なモノクローナル抗体を用いたELISA法によって測定した(14)。マイクロプレート(96穴)にNTHα1(IV)を37°Cで1時間コートし、その後Block-ace (KAC Co.Ltd, Kyoto, Japan) でブロックした。NTHα1(IV)はJK132抗体を用いて検出した。TMBペルオキシダーゼ基質を用いて20分間インキュベートした後、1N塩酸を加えて反応を停止した。マイクロプレートリーダーSpectraMax 340PC384(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)を用いて450nmの吸光度を測定し、NTH α1(IV)の濃度を求めた。検量線の作成には、前述の変性IV型コラーゲンを既知の濃度で用いた。

### 第5項 免疫蛍光染色およびウエスタンブロット法

HUVECをIV型コラーゲン、変性IV型コラーゲン(50mM 酢酸で希釈)をそれぞれ5µg/ml含む0.2% FBS EBM-2培地、または精製したNTH α1(IV)を0.8µg/ml含むEBM-2培地で0-24時間培養

した。4%PFAによって10分室温で固定化し、0.2% Triton X-100 PBSで2分処理した。0.1% Tween 20を含むPBS (T-PBS)で洗浄後、抗VE-カドヘリンモノクローナル抗体(1:200)を1h室温でインキュベートした。細胞を3回T-PBSで洗浄し、二次抗体としてAlexa 488またはAlexa 594が付加されたgoat anti-mouse IgGを1h室温でインキュベートした。抗体はそれぞれ2%ロバ血清入りのPBSでそれぞれ希釈した。細胞骨格はローダミンファロイジン(Thermo Fisher) (1:200)で標識した。核は0.1 $\mu$ g/ml ヘキスト33258で染色した。最後に、3回T-PBSで洗浄した。蛍光画像は蛍光顕微鏡(FSX100; Olympus, Tokyo, Japan)で取得した。

上記と同条件に培養した細胞は、可溶化液(1% SDS, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM NEM)で溶解した。非還元条件で5%ゲルを用いたSDS-PAGEにより分離し、PVDF膜に転写した。その後、VE-カドヘリンとEndo180を、抗VE-カドヘリン モノクローナル抗体(1:1000)、抗Endo180モノクローナル抗体(1:1000)およびHRP標識された抗マウスIgGを用いてウエスタンブロット法により、評価した。タンパク質バンドは、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate で視覚化され、イメージアナライザーAmersham ImageQuant 800 (Cytiva, Tokyo, Japan) を使用したデンスitrometry分析によって定量化された。

#### 第6項 Wound healing assay

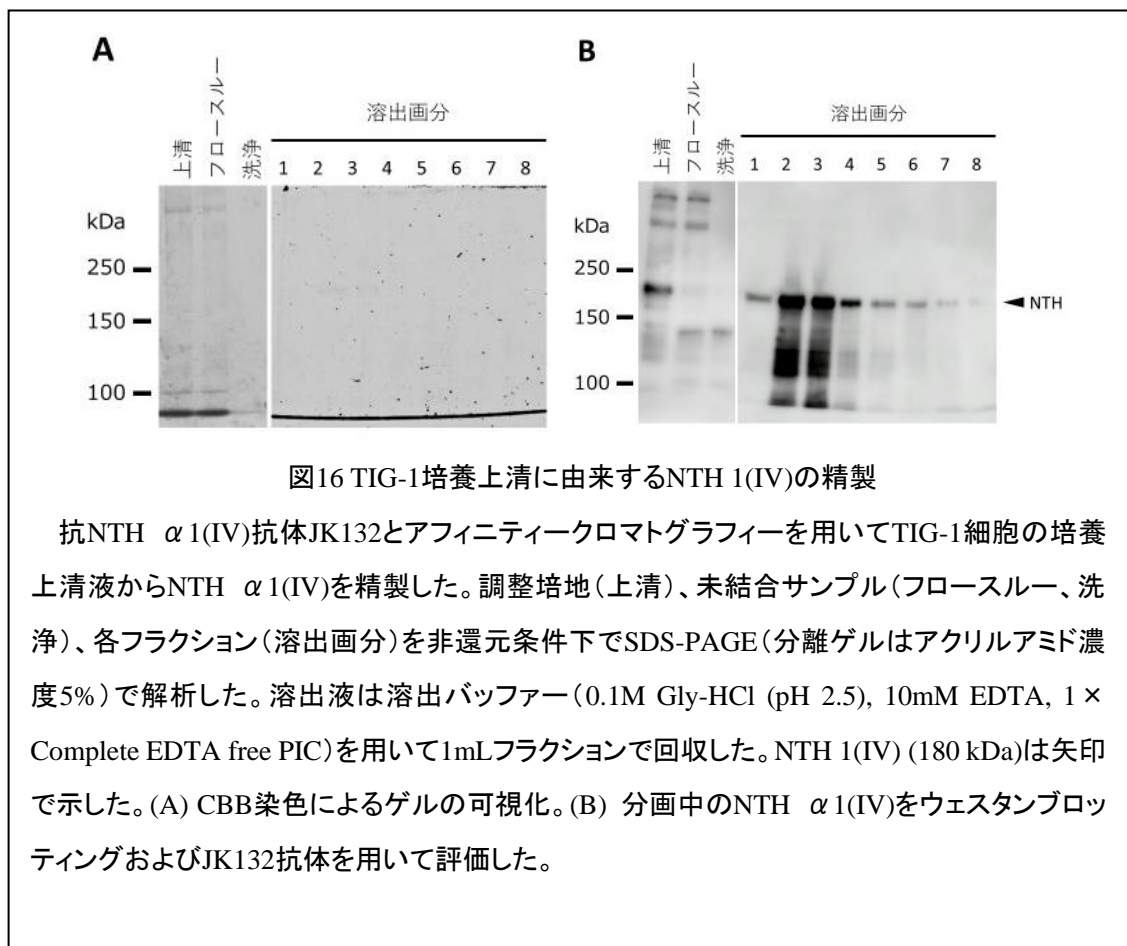
コンフルエントになるまで培養したHUVECをセルスクレーパーで削った後、PBSで洗浄した。その後、IV型コラーゲン、変性IV型コラーゲン(50mM 酢酸で希釈)をそれぞれ5 $\mu$ g/ml含む0.2% FBS EBM-2培地、または精製したNTH  $\alpha$ 1(IV)を0.8 $\mu$ g/ml含む0.2% FBS EBM-2培地を添加し、0h、2h、4h後に撮影した。Image Jを用いて創傷領域の画像から創傷領域の面積の変化量を測定した。

### 第3節 結果

#### 第1項 NTH $\alpha 1$ (IV)によるVE-カドヘリンを介した細胞間結合の抑制

ウサギの血管新生において、NTH  $\alpha 1$ (IV)は血管が発芽、伸長する過程に影響を与える可能性が指摘されている(13)。この発芽・伸長は血管内皮細胞間の細胞間結合が抑制されて起きると考えられている。そこで、まずNTH  $\alpha 1$ (IV)が細胞間結合にどのような影響を及ぼすか調べた。

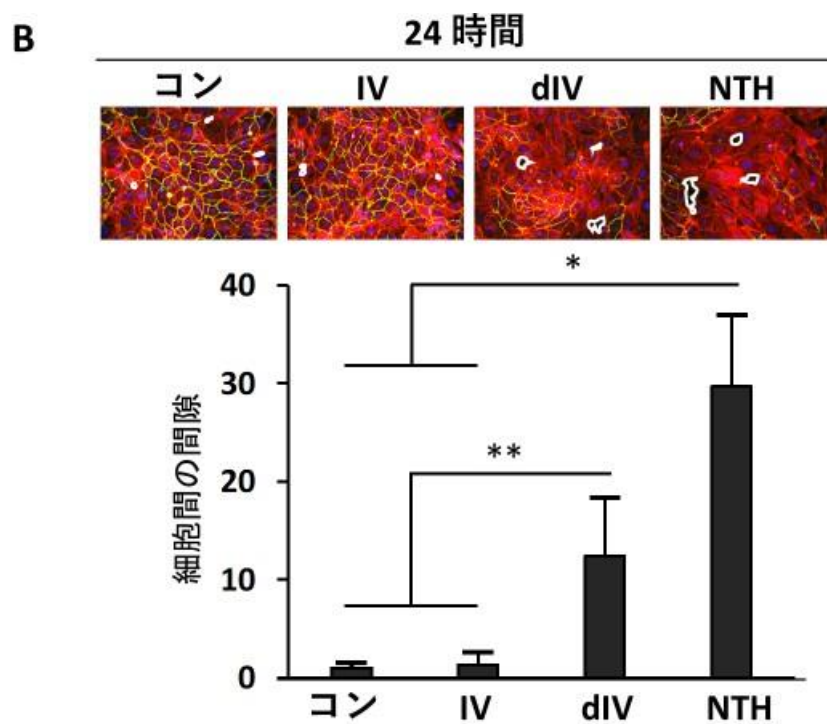
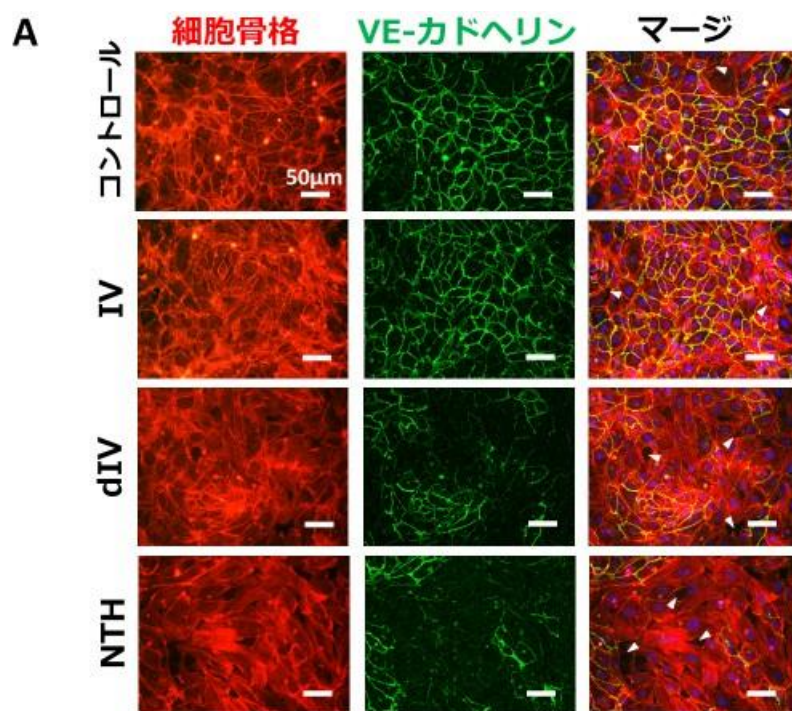
NTH  $\alpha 1$ (IV)は、TIG-1の培養上清から特異抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製されたものを使用した(図16)。非還元条件下のSDS-PAGEでIV型コラーゲンの3本らせん分子は、約500 kDaとして現れることに対し、NTH  $\alpha 1$ (IV)は約180 kDaで現れる。Flow through画分にて約500 kDaに見られる3本らせん分子が確認され、溶出画分には約180 kDaに見られるNTH  $\alpha 1$ (IV)が確認された。溶出画分にNTH $\alpha 1$ (IV)以外のタンパク質の混入は、CBB染色の結果から確認されなかった。



HUVECは前培養した後、NTH  $\alpha 1$ (IV)(0.8  $\mu\text{g/ml}$ )を含む培地に交換し、さらに24時間培養した。コントロールのNTH  $\alpha 1$ (IV)無添加条件では、隣接する細胞間の細胞周縁にVE-カドヘリンが局在していることを確認した。アクチン骨格がVE-カドヘリンに沿うように形成されており、VE-カドヘリンによる細胞間結合が形成されていることが示された(Fig 17 A)。VE-カドヘリンの染色は、視野のほぼ全域を網目様に覆っていた。NTH  $\alpha 1$ (IV)添加培養では、細胞周縁のVE-カドヘリンの染色が消失した部分があり、そこでは細胞同士が結合していないギャップ領域が認められた。これらのことから、NTH  $\alpha 1$ (IV)は、VE-カドヘリンによる細胞間結合を抑制することがわかった。一方で、IV型コラーゲン (human placental type IV コラーゲン)添加培養では、コントロールと同様に細胞周縁に存在するVE-カドヘリンによる細胞間結合が示され、NTH  $\alpha 1$ (IV)添加の結果と異なった。さらに、変性IV型コラーゲン (denatured type IV コラーゲン, dIV)添加培養では、NTH  $\alpha 1$ (IV)と同様にVE-カドヘリンによる細胞間結合が抑制され、細胞間にギャップが出現した。

これらのギャップ領域面積を測定し、NTH  $\alpha 1$ (IV)が及ぼす細胞間結合への影響を定量化した(Fig. 17B)。ギャップパーセンテージは、24時間後のNTH  $\alpha 1$ (IV)無添加のコントロールの内皮細胞間のギャップ面積を基準とした。IV型コラーゲンを添加した場合のギャップ面積はコントロールと変わらなかった。NTH  $\alpha 1$ (IV)および変性IV型コラーゲンを添加した場合では、ギャップ面積は、それぞれコントロールの30倍および13倍の大きさであり、有意な差を示した。本研究で用いたIV型コラーゲン標品はpepsin処理により調製されたものである。コラーゲンの3本らせん領域はペプシンに対し耐性があるが、非コラーゲンらせん領域は分解を受ける。IV型コラーゲンの場合には、非コラーゲンらせん領域であるNC1 domainは消失し、さらに、このコラーゲンには固有の3つ目毎にGlyが出現する繰り返し配列が中断した箇所があり、その部位で切断がおき、部分的に切断された3本らせん断片が生成する。実際に、使用した標品についてNC1 domainの消失は、NC1 domainに対する特異的抗体で確認した(図18)。NC1 domainを欠失した変性IV型コラーゲンでも、NTH  $\alpha 1$ (IV)と同様にVE-カドヘリンの細胞間結合を抑制させたことから、変性したTH domain部分がこの現象には重要である可能性が考えられた。

NTH  $\alpha 1$ (IV)と変性IV型コラーゲンのいずれを添加した場合でも、HUVECのVE-カドヘリンは細胞内に多く留まっている状態が観察された(Fig 17C)。細胞内のVE-カドヘリンは、主に核の周辺に確認されたことから、リソソームやゴルジ体に存在していることが考えられた。また、上記と同様の条件で培養したHUVECを可溶化し、VE-カドヘリンのタンパク量を調べた(Fig 17D)。NTH  $\alpha 1$ (IV)、および変性IV型コラーゲンのいずれを添加してもVE-カドヘリンのタンパク量は、コントロールと同レベルであった。これらの結果は、VE-カドヘリンの細胞周縁部からの消失は、VE-カドヘリンが分解されて消失したことによるのではなく、エンドサイトーシスにより内在化したことを示している。



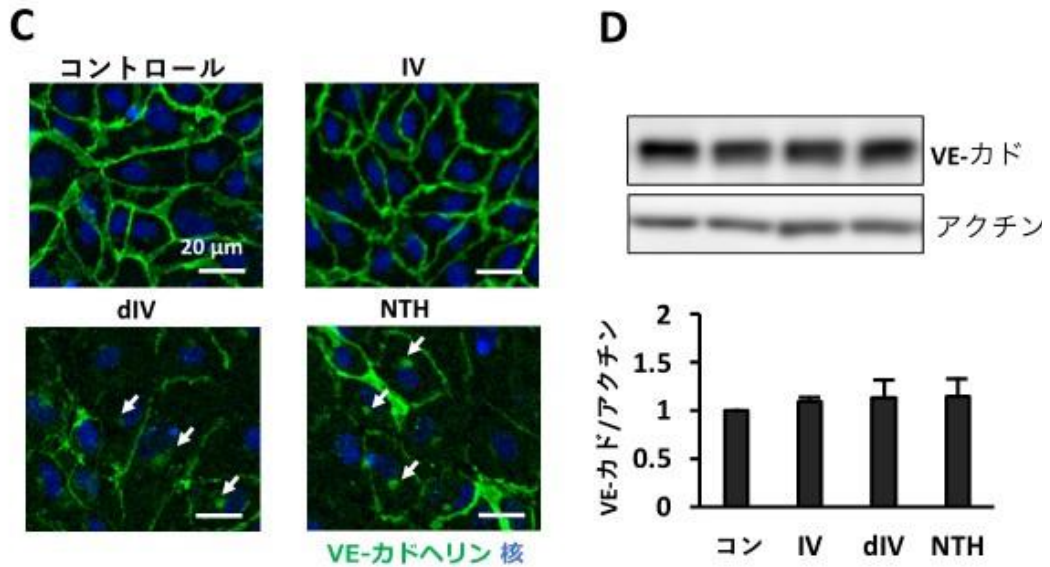


図17 NTH  $\alpha 1$ (IV)または変性IV型コラーゲンは、VE-カドヘリンを介した細胞間結合の破壊を誘発する。

(A) 前培養 HUVEC 単層を 5 $\mu$ g/mL IV 型コラーゲン (IV), 5 $\mu$ g/mL 変性 IV 型コラーゲン (dIV), または 0.8 $\mu$ g/mL NTH  $\alpha 1$ (IV) (NTH) を含む新鮮培地で 24時間維持し、内皮細胞を蛍光タグ:ファロイジン(赤)、抗VE カドヘリン(緑)およびヘキスト(青)により染色した。スケールバー:50 $\mu$ m。結果は3つの実験の代表である。矢印は主な細胞間ギャップを示す。(B)細胞間隙を白線で示す。グラフの各バーは、コラーゲンなし(コン)、IV型コラーゲンあり(IV)、変性IV型コラーゲンあり(dIV)、NTH 1(IV)あり(NTH)の培養のコントロールに対する形成面積全体を表している。データは3つの独立した実験の平均 $\pm$ 標準偏差である(\* $p < 0.01$ および\*\* $p < 0.05$ 。)(C) (A)の各パネルの一部の拡大図。NTH 1(IV)と変性IV型コラーゲンとの培養で観察されたHUVECにおけるVE-カドヘリンシグナルの蓄積(矢印)。スケールバー:20 $\mu$ m。(D)上図は、(A)と同様に培養したHUVECにおけるVE-カドヘリンと $\beta$ アクチンのウエスタンブロット解析を示した。下のグラフは、 $\beta$ アクチンのバンド強度に対するVE-カドヘリンのバンド強度の比を、コントロールに対する相対値で示した( $n=3$ )。

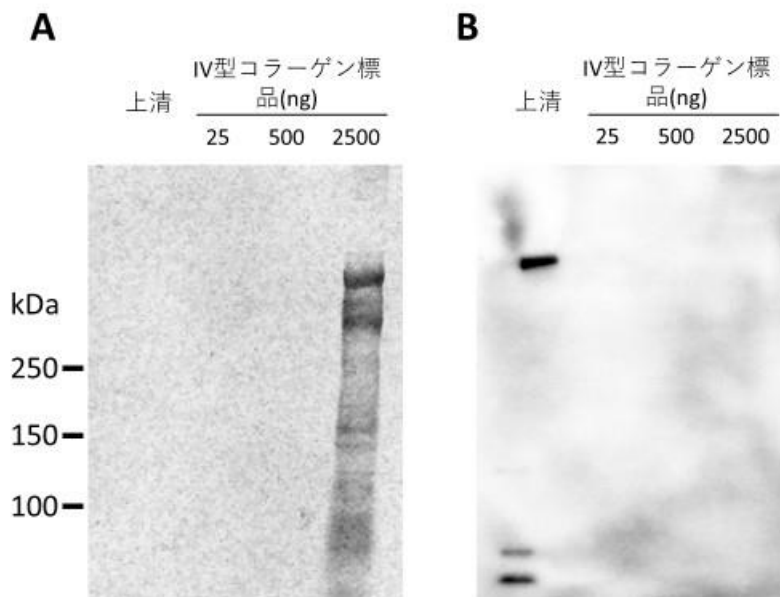


図18 IV型コラーゲン標品のNC1ドメインの解析

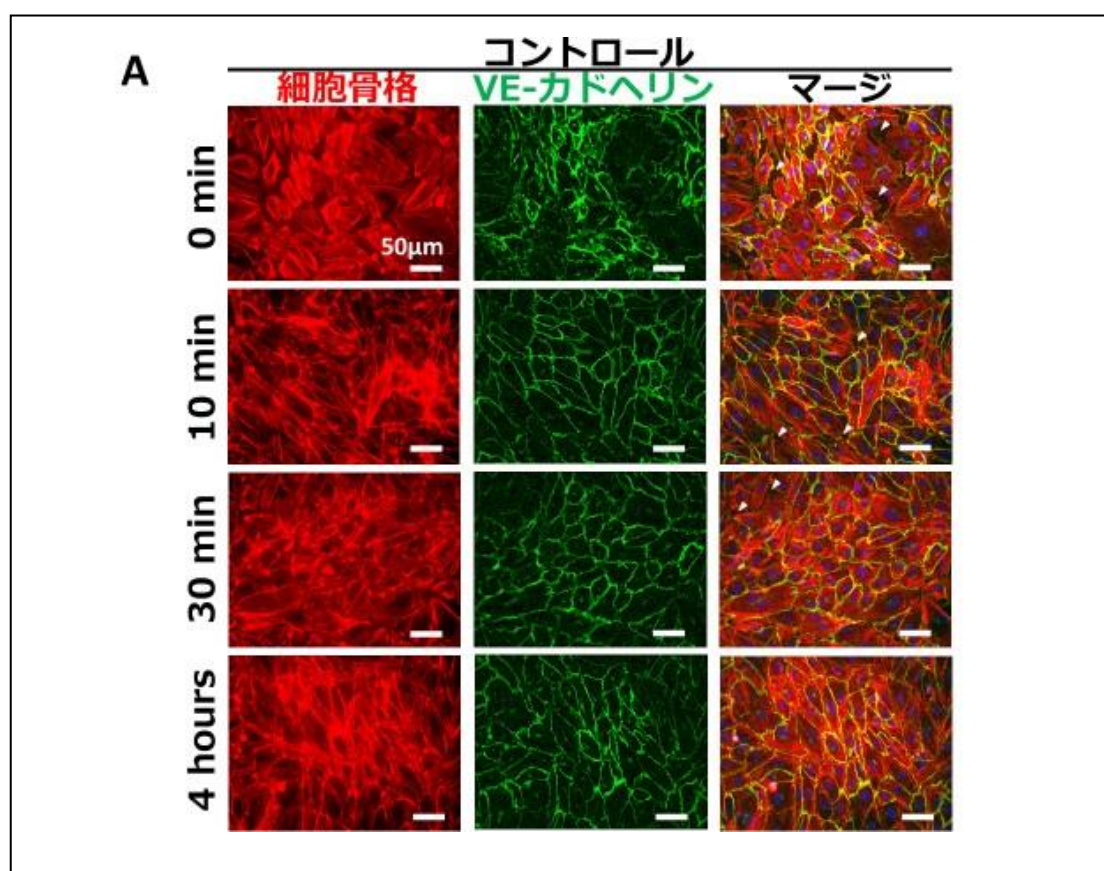
本論文で使用したヒト胎盤 IV 型コラーゲン標品は、SDS-PAGE(アクリルアミド濃度 5%)を用い、非還元条件下で解析した。サンプル質量は 25 ng から 25,000 ng であった。(A)ゲルは CBB 染色で可視化した。(B)  $\alpha 1(\text{IV})$  鎖の NC1 ドメインは、ウェスタンブロッティングによりNC1 ドメインに特異的な抗体を用いて評価した。TIG-1培養上清(上清)をNC1ドメインの存在のコントロールとして使用した。

## 第2項 短時間でのNTH $\alpha 1(\text{IV})$ による細胞間結合の抑制

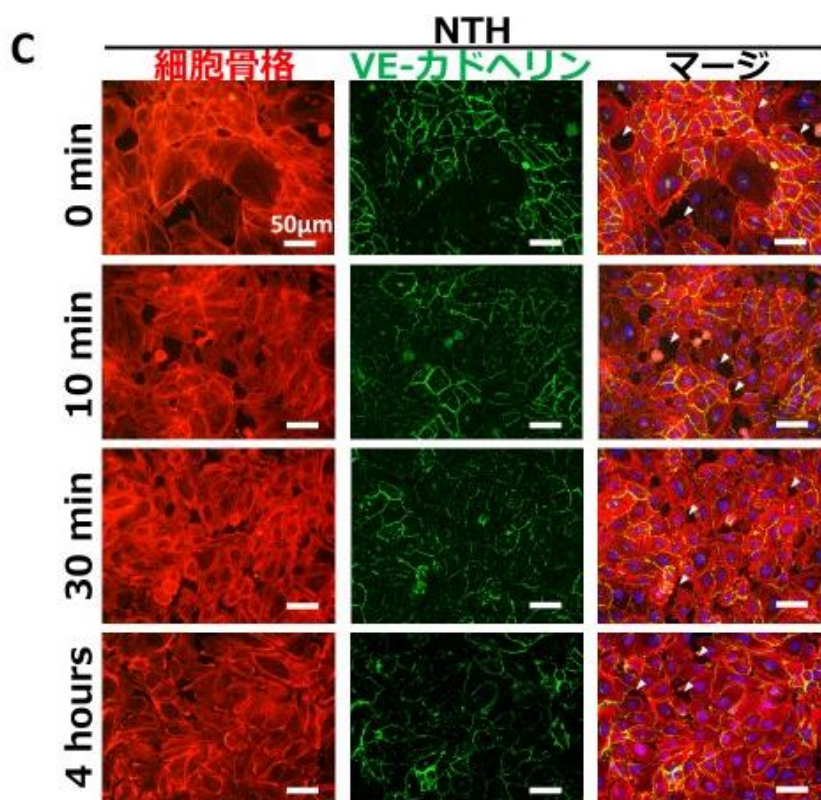
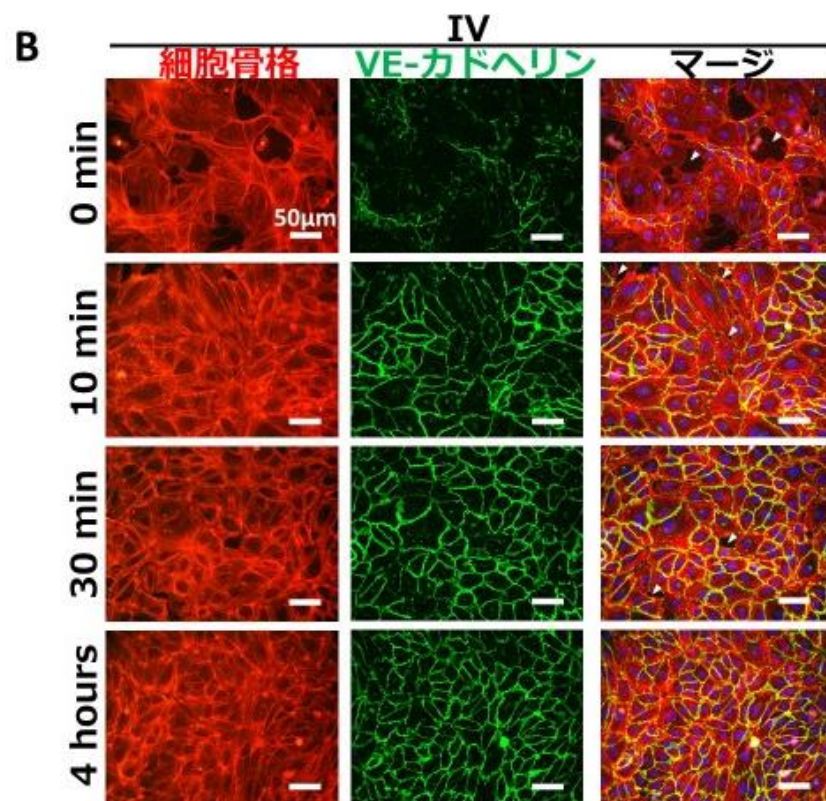
短時間でのNTH  $\alpha 1(\text{IV})$ によるVE-カドヘリンへの効果をさらに調べた。細胞間結合とギャップ領域をFig. 1と同様に視覚化した(Fig. 19A-C)。ギャップ領域の面積は添加直後のギャップ面積を100%として示した(Fig. 19D)。添加直後では、細胞周縁に存在するVE-カドヘリンの染色が一部の領域で弱くなっており、その領域では細胞間にギャップが存在した。この状態をstarting levelとし、NTH  $\alpha 1(\text{IV})$ によるVE-カドヘリンへの効果を調べた。10分後、コントロールおよびIV型コラーゲン添加培養では、細胞周縁のVE-カドヘリンの染色が明瞭になり、VE-カドヘリンを介した細胞間結合した細胞が増加したと考えられる。ギャップ面積は、コントロールでは21%、IV型コラーゲン添加培養では4.4%と小さくなった。培地交換から10分間の短時間で細胞間結合の形成が進んだことになる。一方で、NTH  $\alpha 1(\text{IV})$ 添加培養では、細胞間結合の形成は進まなかった。ギャッ

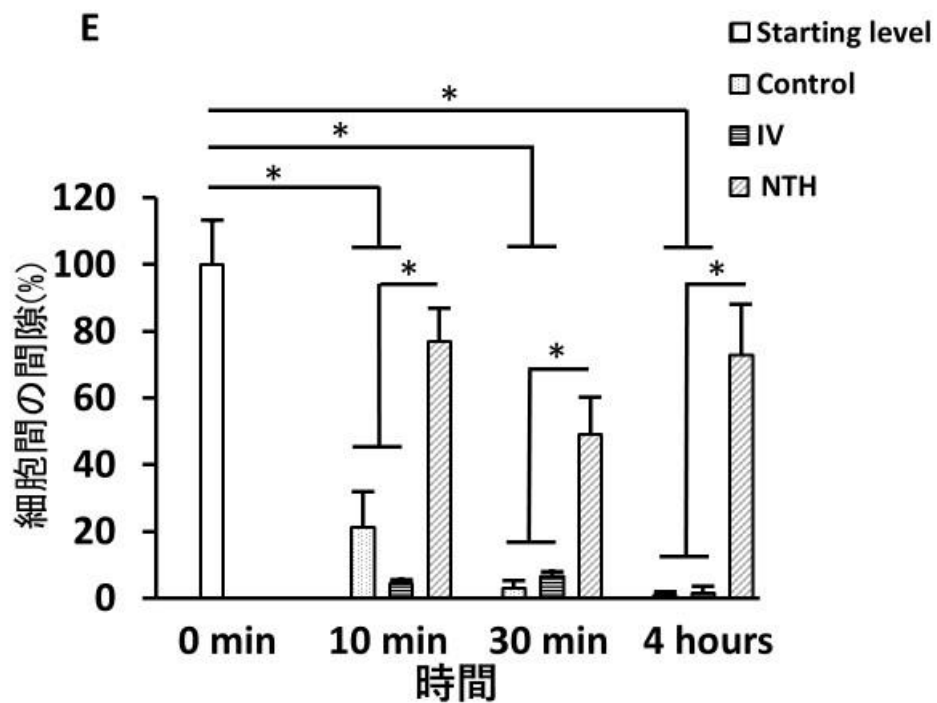
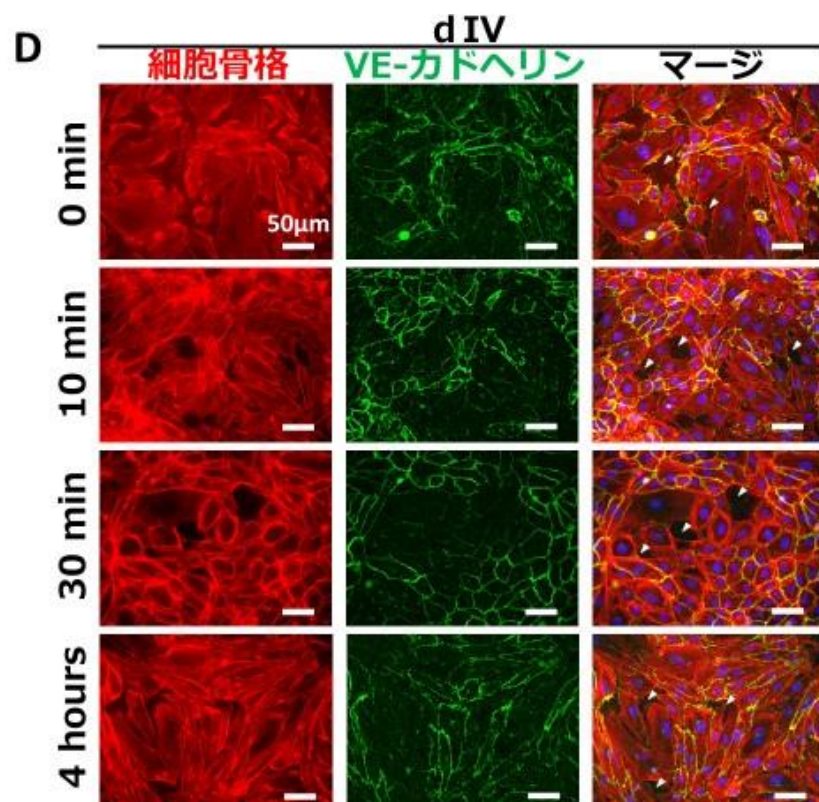


面積は77%であり、コントロールやIV型コラーゲン添加培養の条件と比べて有意に大きかった ( $p<0.01$ )。30分後ではそれぞれの細胞間ギャップ面積は、コントロールは3.1%、IV型コラーゲン添加培養は6.6%であり、それに対してNTH  $\alpha 1$ (IV)添加培養では、49%と細胞間のギャップ面積は有意に大きかった ( $p<0.01$ )。NTH  $\alpha 1$ (IV)添加培養において10分から30分の間で細胞間のギャップ面積は小さくなる傾向を示した。4h後ではコントロールやIV型コラーゲン添加培養は、ほとんどの細胞が細胞周縁に存在するVE-カドヘリンによって細胞間結合しており、細胞間のギャップ面積は2%以下だった。NTH  $\alpha 1$ (IV)添加培養での細胞間のギャップ面積は73%であり、30分後のギャップ面積から増加する傾向を示した。これらのことから、NTH  $\alpha 1$ (IV)による細胞間結合の抑制には、VE-カドヘリンの結合形成を抑制と細胞間結合を引き離す反応がある可能性が考えられた。さらに、変性IV型コラーゲン添加培養では、ギャップ面積の変化はNTH  $\alpha 1$ (IV)を処理した場合と同じ振る舞いをした。細胞間ギャップ面積は、NTH  $\alpha 1$ (IV)(0.8mg/ml)添加の方が、変性IV型コラーゲン(5 $\mu$ g/ml)添加の場合より大きかった。両者の差異は受容体に対する親和性の違いを反映している可能性が考えられる。









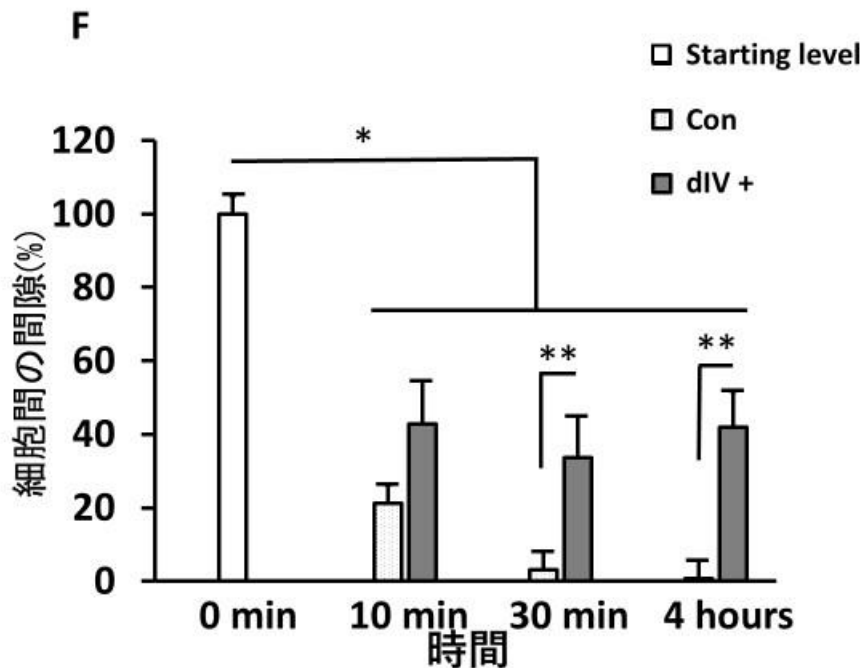


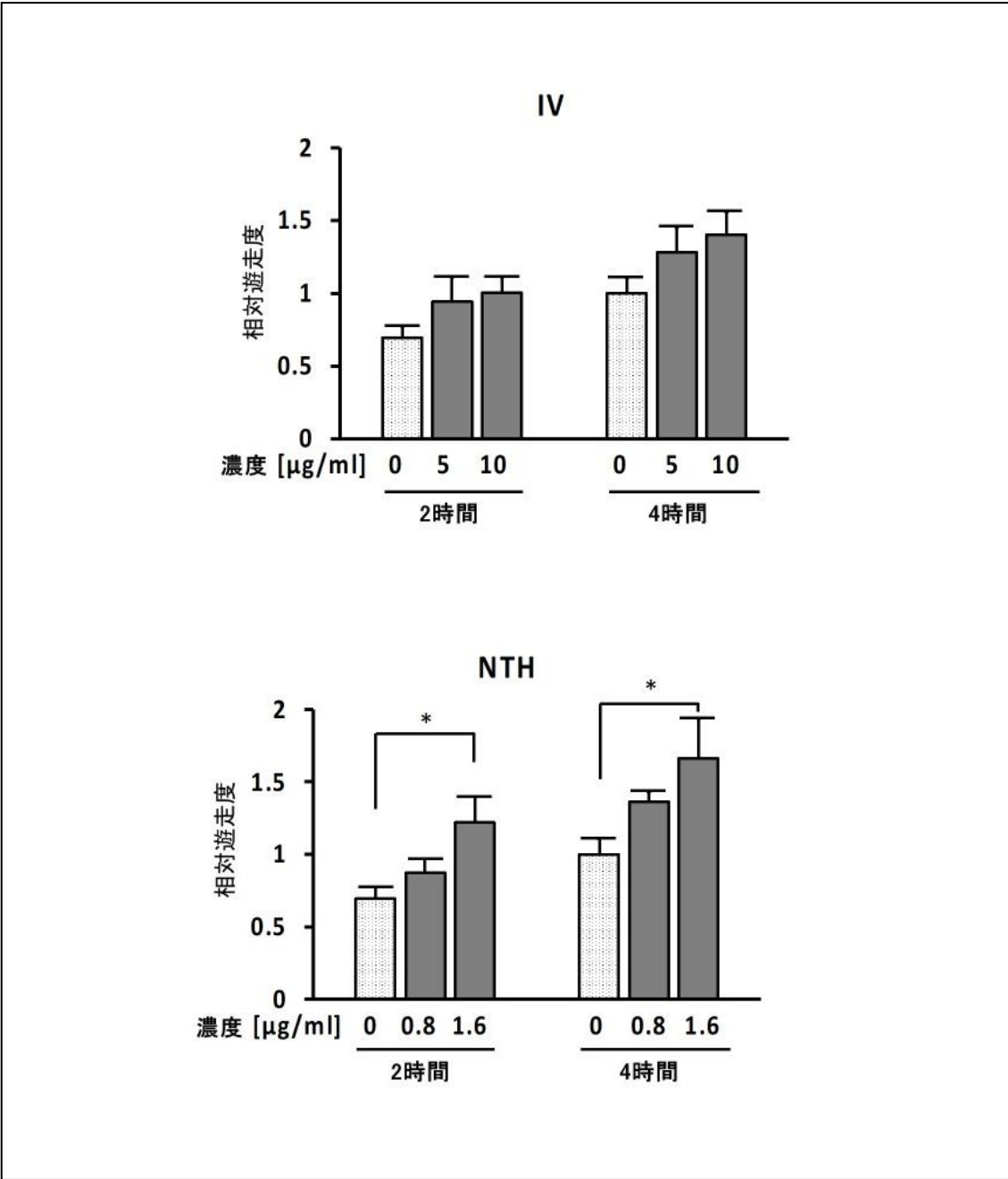
図19 VE-カドヘリンを介した細胞間接合に対するNTH 1(IV)の早期からの影響。

(A-D) HUVEC単層を図1と同様に、0分、10分、30分、4時間だけ培養し、細胞を蛍光タグ：ファロイジン(赤)、抗VE-カドヘリン(緑)、Hoechst(青)で染色した。矢印はいくつかの主要な細胞間ギャップを示す。スケールバー:50 $\mu$ m。結果は4回の実験の代表例である。(E), (F) 各培養物の全体のギャップ面積を定量化し、各シリーズの培養物の0分での面積に対する値として表した。データは4つの独立した実験の平均 $\pm$ 標準偏差である(\* $p$ <0.01および\*\* $p$ <0.05,  $n$ =4)。

### 第3項 NTH $\alpha$ 1(IV)による内皮細胞の遊走への影響

NTH  $\alpha$ 1(IV)が内皮細胞の遊走にどのように関与するか調べた。コントロールの4h後の細胞が遊走し、カバーした面積を基準とし、各条件の創傷領域の割合を算出した(図20)。NTH  $\alpha$ 1(IV)を0.8 $\mu$ g/ml添加した場合、2h後及び、4h後のカバーされた創傷領域はコントロールよりも大きい傾向を示したが有意な差はなかった。しかし、NTH  $\alpha$ 1(IV)を1.6  $\mu$ g/ml添加した場合、4h後のカバーされた創傷領域はコントロールの約1.7倍大きく有意な差があった。変性IV型コラーゲンを添加した場合もNTH  $\alpha$ 1(IV)と同様であり、10  $\mu$ g/mlの濃度を添加すると4h後のカバーされた創傷領域はコントロールより約1.5倍大きくなった。これらの結果から、NTH  $\alpha$ 1(IV)と変性IV型コラーゲン

は内皮細胞の遊走を促進させることが示された。IV型コラーゲン添加では、試料濃度を高くするとカバーされた創傷領域はコントロールと比べて大きくなる傾向は示したが、有意な差を示さなかった。IV型コラーゲンは細胞間結合を抑制はしないが、遊走を促進させる別の機構が存在することが考えられた。



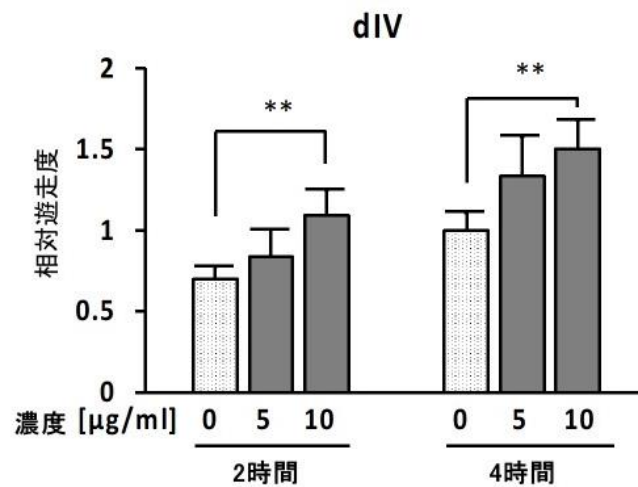


図20 細胞遊走に対するNTH  $\alpha 1$ (IV)の効果

HUVEC単層をセルスクレーパーで削り、スクラッチ創を作成した。細胞増を傷つけた後、細胞を洗浄し、IV型コラーゲン(IV)、変性IV型コラーゲン(dIV)、またはNTH  $\alpha 1$ (IV) (NTH)を含む新しい培地に混ぜ、傷を作成してから0、2、4時間後に観察した。細胞の移動は、ImageJを用いて被覆面積を定量化することにより決定した。移動量は、コラーゲンなしで培養した4時間後との相対値で表した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差である(\* $p < 0.01$ および\*\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )。

#### 第4節 考察

この研究の目的はNTH  $\alpha 1$ (IV)が血管内皮細胞間結合に及ぼす影響を明らかにすることである。NTH  $\alpha 1$ (IV)は、HUVEC のVE-カドヘリンによる細胞間結合を抑制し、細胞遊走を促進した。この際に、VE-カドヘリンは、エンドサイトーシスにより細胞周縁から細胞内部に移動した。NTH  $\alpha 1$ (IV)は生理的条件下で生成されるものであり(13,62,63)、これらの結果は、NTH  $\alpha 1$ (IV)の生理的な機能を示したものである。NTH  $\alpha 1$ (IV)は、このような機能によって、血管新生の初期段階で発芽伸長を促す因子の一つである可能性が考えられた。NTH  $\alpha 1$ (IV)の細胞への生理的な作用については、本研究で初めて明らかになった。in vivoやin vitroの血管新生モデルでは、新生血管や血管内皮細胞ネットワークの細胞内やその周囲で発現が亢進することが示されており、血管新生への関与が示唆されていた(12,13)。NTH  $\alpha 1$ (IV)は、血管内皮細胞の細胞間結合を制御することで、血管新生に関与することが強く示唆される。



IV型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖のNC1 domainは、arrestenとよばれ、血管新生の内因性阻害剤の1つであることが報告されている(64-66)。これは $\alpha 1\beta 1$ インテグリンと $\alpha 1$ (IV)のNC1 ドメインが結合することで、ECM成分と $\alpha 1\beta 1$ インテグリンの相互作用が遮断されると起こることが報告されている。本研究では、NTH  $\alpha 1$ (IV)は、VE-カドヘリンによる細胞間結合を抑制することと、細胞遊走を増加させることを示し、NC1ドメインがもつ効果とは対照的に血管新生を促進させる機能を示した。NC1ドメインを欠損したIV型コラーゲンを変性処理した試料でも、VE-カドヘリンによる細胞間結合の抑制や細胞遊走の促進が起こったことから、3本らせん構造を持たないTH ドメイン部分がこれらへ影響する可能性が考えられた。そうであれば、NTH  $\alpha 1$ (IV)は、一つのポリペプチド鎖に相反する機能を内包していることになる。IV型コラーゲン遺伝子産物は、3本らせん構造の有無でそれぞれに固有の機能を持つことに加え、クリプティックな切断によっても更なる機能が発現する、多様な特性を持つことを示している。すなわち、NTH  $\alpha 1$ (IV)は、TH ドメイン部分での相互作用を介してVE-カドヘリンによる細胞間結合を抑制し、血管内皮細胞の遊走を促進させることで、血管新生の初期段階で重要な発芽伸長を促す因子の一つである可能性が考えられた。

NTH  $\alpha 1$ (IV)によるVE-カドヘリンの細胞間結合抑制の効果は、10分後で起き、24時間後もこの現象が持続することがわかった。早期にVE-カドヘリンのエンドサイトーシスを引き起こす要因として、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)がある。VEGFは血管内皮細胞膜のVEGF receptor 2 (VEGFR2)の自己リン酸化をわずか5分程度で誘導する。しかしながら、NTH  $\alpha 1$ (IV)添加によって VEGFR2のリン酸化の影響は認められなかった (Data not shown)。NTH  $\alpha 1$ (IV)によるVE-カドヘリンの細胞間結合の抑制効果はVEGF/VEGFR2システムに関与しないことが考えられる。現時点では、NTH  $\alpha 1$ (IV)によるVE-カドヘリンの細胞間結合の抑制効果のメカニズムは不明である。

NTH  $\alpha 1$ (IV)はHUVECの細胞遊走を促進した。VE-カドヘリンの細胞間結合が抑制されることが、細胞遊走促進の主要な要因と考えられる。

## 第4章 Endo180が及ぼす血管内皮細胞間の結合への影響

### 第1節 序文

第三章より、我々はNTH  $\alpha 1$ (IV)が、HUVEC のVE-カドヘリンによる細胞間結合を抑制し、細胞遊走を促進させることを示した。しかし、NTH  $\alpha 1$ (IV)の受容体は不明である。我々はNTH  $\alpha 1$ (IV)の受容体としてEndo180に着目した。Endo180は細胞膜上に存在するマンノース受容体ファミリーのひとつであり、コラーゲン受容体と考えられている(67-69)。マンノース受容体ファミリーはマンノース受容体、M型ホスホリパーゼA2受容体、DEC-205が存在する。Endo180はN末端側からN末端システインリッチドメイン、ファイブロネクチンII型(FN-II)ドメイン、8個のC型レクチンドメイン(CTLD)、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインで構成されている。このうちFN-IIドメインおよび2番目のCTLD(CTLD-2)がコラーゲンの結合と細胞への内在化に関与することが報告されている(70-72)。CTLD-2はEndo180とIV型コラーゲンの相互作用に関与し、Ca<sup>2+</sup>依存性レクチン活性を介して結合することが報告されている(72)。結合したコラーゲンはEndo180を介したエンドサイトーシスにより細胞内へ吸収され、リソソームへ送達される。この際、断片化したコラーゲンだとより効率的に取り込まれ、それを介してリソソーム分解が行われる(73-79)。

Endo180は、I型コラーゲンよりgelatinの方が結合能は高いこと(80)、様々なコラーゲンのうち、IV型コラーゲンが最もEndo180によって取り込まれると示している(69)。このようなEndo180のコラーゲンに対する親和性の特性から、CO L4A1 遺伝子産物である変性IV型コラーゲン やNTH  $\alpha 1$ (IV)は、3本らせん構造を持たないためにEndo180との親和性がより高いと考えられる。本章では、Endo180が及ぼす内皮細胞間結合への影響を検討した。

### 第2節 実験材料と方法

#### 第1項 試薬

Human placental type IV コラーゲン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dithiothreitol (DTT; Wako, Osaka, Japan) and iodoacetamide (IAA; Wako), 0.22 $\mu$ m membrane filter (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). N-ethylmaleimide (NEM; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) CNBr-activated Sepharose 4B (Sigma-Aldrich), cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free PIC; Roche applied Science, Indianapolis, IN, USA), phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore), anti-human VE-カドヘリン monoclonal antibody (F-8) (Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (A-11032) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A-11017) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), anti-Rabbit IgG, horseradish peroxidase-conjugated and anti-Mouse IgG, horseradish peroxidase-conjugated (Thermo Fisher), anti-human Endo180 monoclonal antibody (B-10) (Santa Cruz), Hoechst 33258 and

Fluoresceinisothiocyanate isomer-I (FITC; Dojindo Molecular Technologies Inc., Kumamoto, Japan).

## 第2項 Endo180のsiRNAを用いたノックダウン

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC; Lonza, Walkersville, MD)を6~8継代で使用した。4well plateに $3.5 \times 10^4$  cell/well播種し、2日間 EGM-2 Bullet Kit (Lonza) で提供されている成長因子とウシ胎児血清(FBS)が添加されたEBM-2で前培養した。前培養したHUVEC細胞は、抗生物質を除いたEBM-2培地にEndo180を標的とするsiRNA(Endo180 siRNA1, 5'-GAU CUU CGG UGA AUC AGA ATT-3'; およびEndo180 siRNA2, 5'-CCC AAC GUC UUC CUC AUC UTT-3', Japan Bio Services Co., LTD, Saitama, Japan)とLipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher)を混ぜて40 nMのsiRNAでトランスフェクトした。Negative siRNAとして, (5'-UCU ACU CCU UCU GCA ACC CTT-3', Japan Bio Services Co.) を用いた。ノックダウンの効率はウェスタンブロッティングで評価した。実験は、トランスフェクションから72時間後に開始した。

## 第3項 Wound healing assay

上記で示したようにEndo180をsiRNAでノックダウンした後、コンフルエントになるまで培養したHUVECをセルスクレーパーで削り、PBSで洗浄した。その後0h、2h、4h後に撮影した。Image jを用いて創傷領域の画像から創傷領域の面積の変化量を測定した。

## 第4項 内在化アッセイ

タンパク質のFITCラベル化は以下の方法で行った。3mg/mlの各種コラーゲンと0.5M NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.5で溶解したFITC(0.6mg/ml)を1:1で3h遮光して混合した。6M HClで中和後、0.5M 酢酸で透析した。Endo180を欠損させたあるいはwild typeのHUVECを培養後、FITCラベル化した変性IV型コラーゲン、IV型コラーゲン、あるいはgelatinを各5μg/ml含む0.2% FBS EBM-2培地で24h培養した。その後、細胞を剥離し、4 well dishに再度播種し、3h後に4% PFAで固定化し、細胞骨格をローダミンファロイジンで赤色、細胞核をヘキストで青色に染色した。蛍光画像は蛍光顕微鏡(FSX100; Olympus)で取得した。



### 第3節 結果

#### 第1項 細胞膜上のEndo180欠損はVE-カドヘリンの細胞間結合を抑制

コラーゲン受容体であるEndo180はI型コラーゲンよりもgelatinに対し、高い結合能を示すこと、様々なコラーゲンのうち、IV型コラーゲンを最もよくEndo180取り込むことから、我々は、NTH  $\alpha 1$ (IV)はEndo180を介してVE-カドヘリンの細胞間結合に影響を及ぼすと仮説を立てた。

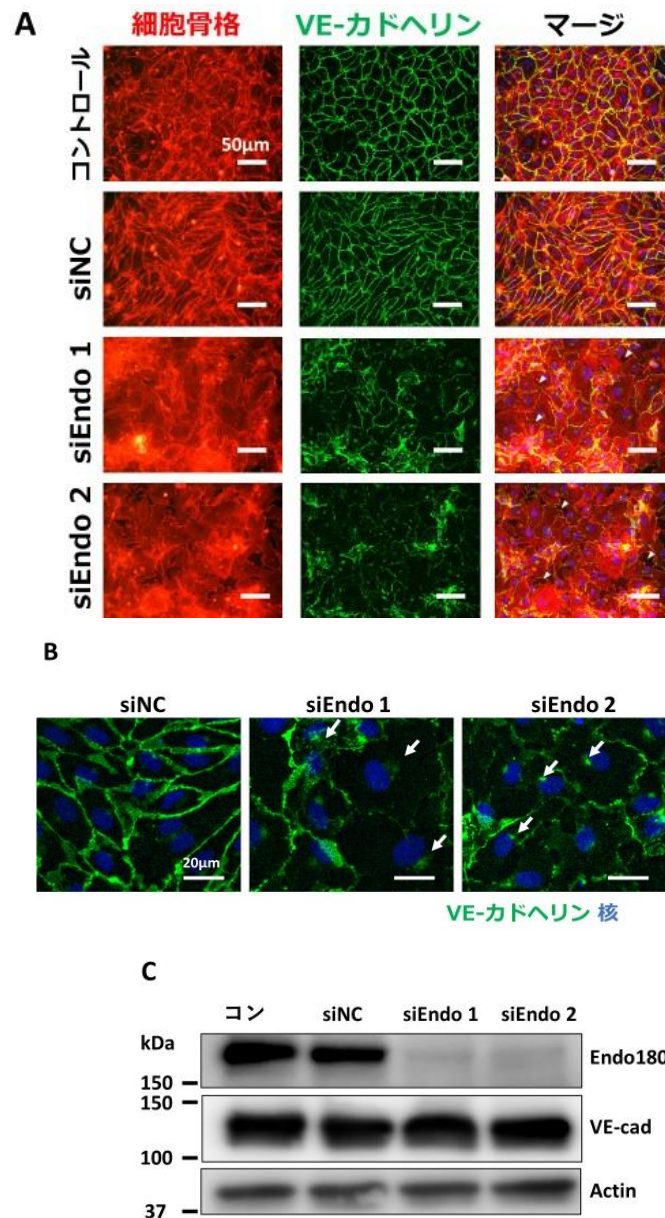


図21 HUVECのEndo180欠損は、VE-カドヘリンによる細胞間結合を抑制

HUVECを方法に記載したように、ネガティブsiRNA (siNC)、Endo180 siRNA 1 (siEndo 1)、およびEndo180 siRNA 2 (siEndo 2) で処理した。(A) 細胞は蛍光タグで染色した: ファロイジン (赤)、抗VE-カドヘリン (緑)、ヘキスト (青)。スケールバー: 50µm。矢印はいくつかの主要な細胞間ギャップを示す。(B) (A)のパネルの拡大図を示した。VE-カドヘリンの細胞内、特に核周辺へ集積 (矢印) が認められた。スケールバー: 20µm。(C) Endo180とVE-カドヘリンのウェスタンブロット法の解析により、ノックダウンがVE-カドヘリン総タンパク質に影響を与えないことが示された。

Endo180がVE-カドヘリンの細胞間結合抑制に関与しているかどうか検討した。このためHUVECを、Endo180を標的とするsiRNAで処理し、Endo180をノックダウンした。Endo180のノックダウンは、抗Endo180抗体を用いたウエスタンブロットにより確認された(Fig. 21C)。VE-カドヘリンは、Fig. 1と同様に免疫蛍光染色し、細胞間結合を視覚化した。Endo180が欠如したHUVECでは、VE-カドヘリンの細胞間結合が抑制された(Fig. 21A)。また、この時、VE-カドヘリンは細胞内に多く留まっており、HUVECにNTH  $\alpha$ 1(IV)または、変性IV型コラーゲンを添加した際と同様に、VE-カドヘリンのエンドサイトーシスが誘起されたと考えられる(Fig. 21B and 21C)。この結果は、Endo180がVE-カドヘリンのエンドサイトーシスに抑制的に関与することを示唆している。

## 第2項 Endo180欠損細胞におけるコラーゲンの内在化

HUVECによる各種コラーゲンの取り込みを検討した。HUVECにFITC標識した各コラーゲンを添加して24h培養した。その後、細胞内のFITC標識したコラーゲンだけを観察するために、細胞を分散処理し、回収後再播種した。3h後に細胞は培養器に接着したので固定化し、観察した。NTH  $\alpha$ 1(IV)はFITCラベルして取り込み実験に用いるには量的に困難だったため、VE-カドヘリンによる細胞間結合に対し、NTH  $\alpha$ 1(IV)と同様の効果を示す変性IV型コラーゲンをを用いた。各試料のFITCラベル化は、抗FITC抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した(図22)。その

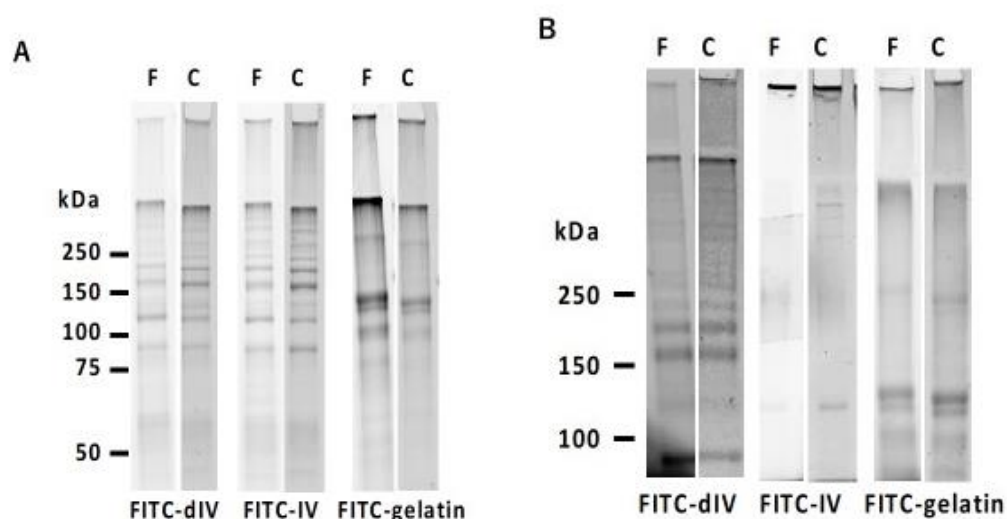
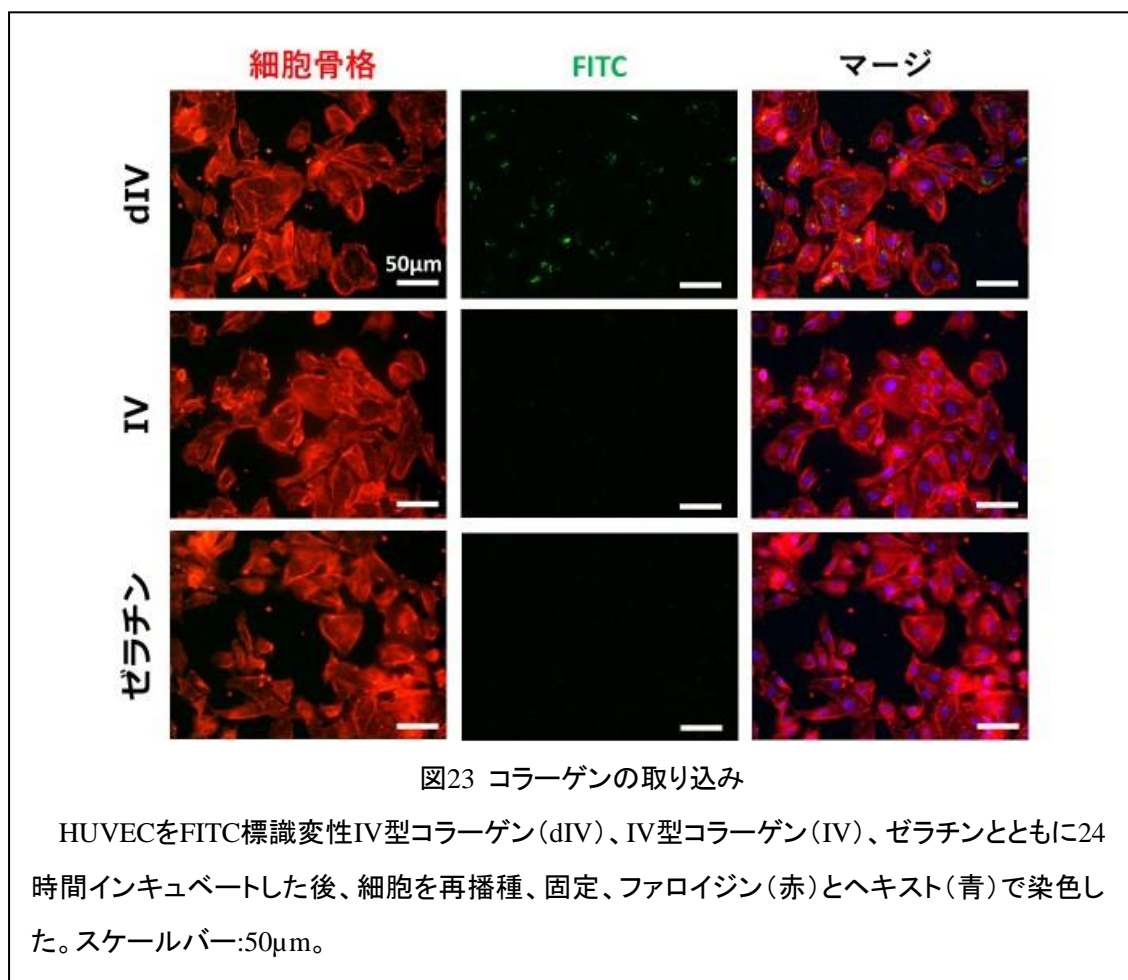


図22 FITC標識コラーゲンおよびゼラチンの分析

FITC標識後の変性IV型コラーゲン(dIV)、IV型コラーゲン(IV)、ゼラチンを還元条件下(A: アクリルアミド濃度7.5%)および非還元条件下(B: アクリルアミド濃度5%)でSDS-PAGEを行った。各サンプルの左レーンにFITCの蛍光撮影(F)、右レーンにCBB染色(C)をそれぞれ示し、同じゲルを用いている。

結果、変性IV型コラーゲンは取り込みが観察された(図 23)が、IV型コラーゲン及びゼラチンの取り込みは、この条件ではほとんど観察できなかった。このことから、変性IV型コラーゲンは、IV型コラーゲン及びゼラチンよりもEndo180との結合能力が高い可能性が考えられた。



次にEndo180をsiRNAによってノックダウンしたHUVECでのFITC標識した各コラーゲンの取り込みを、同様に調べた。Endo180を欠損させた細胞は、変性IV型コラーゲンの取り込みは確認された(Fig. 24A)。このことから、Endo180以外に変性IV型コラーゲンを内在化する受容体の存在を示している。この受容体は、変性したIV型コラーゲンに特異的であると考えられた。また、変性IV型コラーゲンの取り込みは、Endo180を欠損したHUVECの方が、コントロールのHUVECより内在化した変性IV型コラーゲンの量は有意に多くなった( $p < 0.01$ ) (Fig. 24B)。このことから、Endo180以外の受容体による変性IV型コラーゲンの取り込みは、細胞膜上からEndo180が消失することで促進すると考えられた。

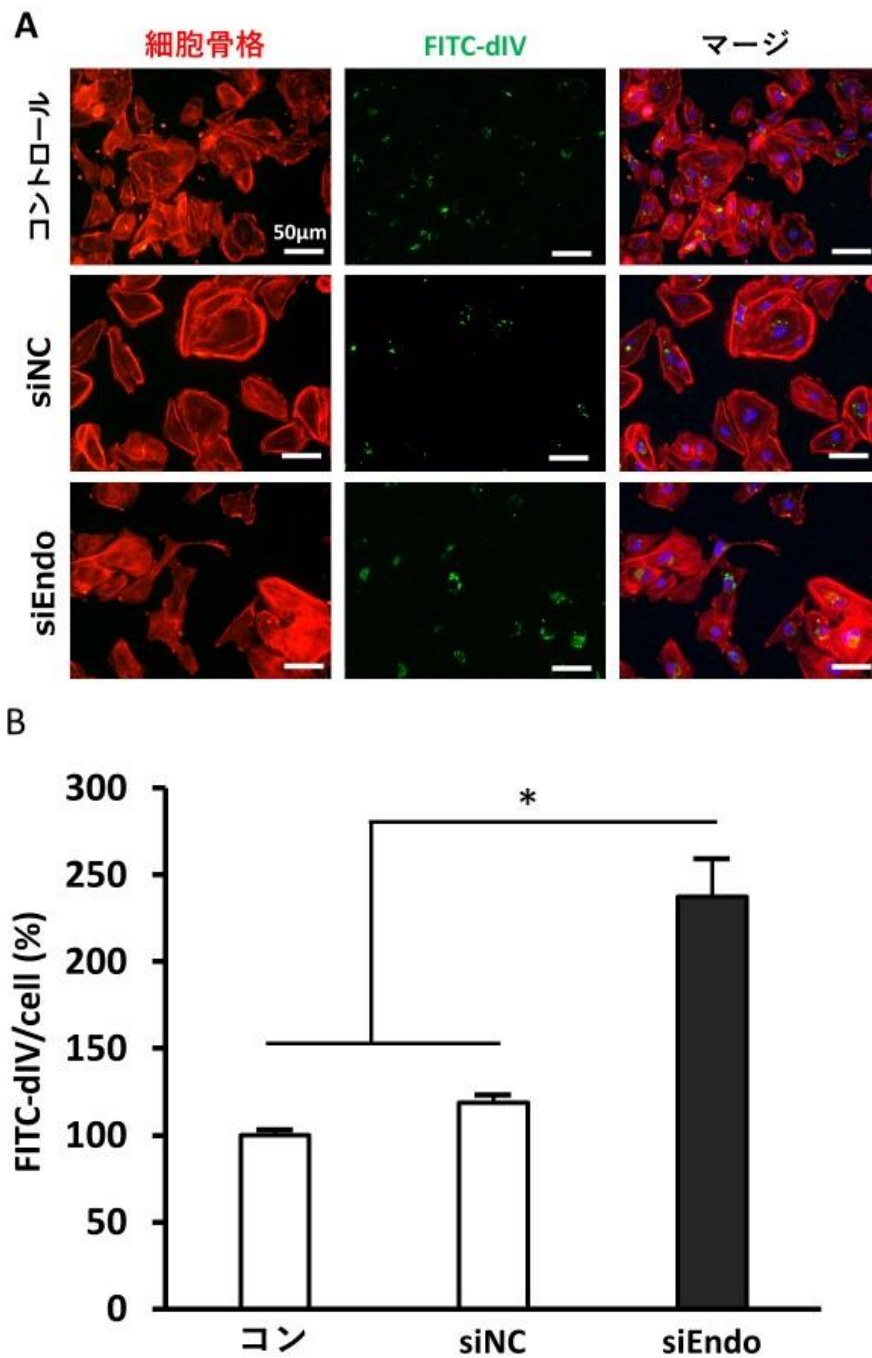


図24 Endo180と変性IV型コラーゲン蓄積の関係

(A)HUVECによるFITC-変性IV型コラーゲンの内在化を、siRNA処理なし(コントロール)、ネガティブsiRNA (siNC)、Endo180 siRNA 1 (siEndo) で示したものである。HUVECをFITC標識変性IV型コラーゲン (FITC-dIV)、と24時間インキュベートし、その後細胞を再播種、固定、ファロイジン (赤) およびヘキスト (青) で染色をした。スケールバー:50 $\mu$ m。(B) 細胞あたりのFITC変性IV型コラーゲンの緑色シグナルの相対強度を示すグラフ。

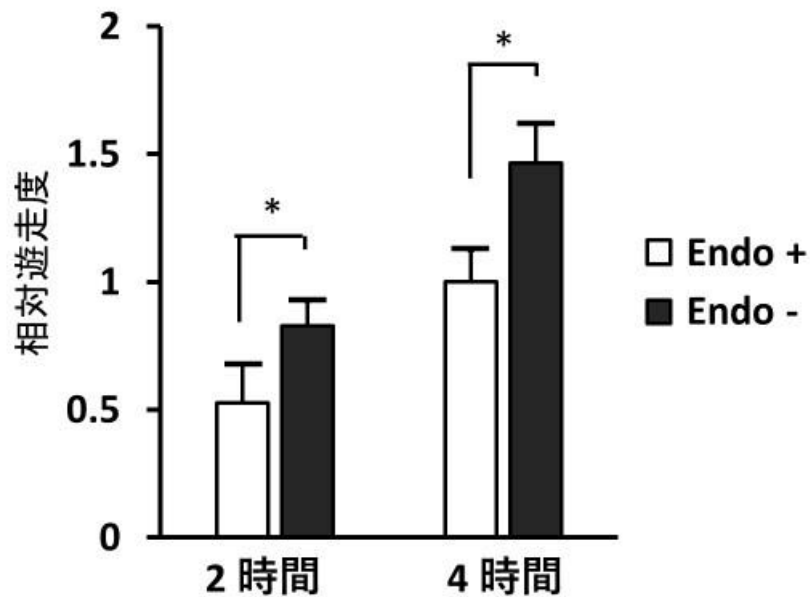


図25 HUVECのEndo180欠損は、細胞遊走を促進

HUVECを方法に記載したように、Endo180 siRNAで処理した。その後、HUVEC単層をセルスクレーパーで削り、スクラッチ創を作成した。Endo+: siRNA処理していない細胞、またはネガティブsiRNA処理した細胞。Endo-: Endo180 siRNA処理し、Endo180が欠損した細胞。これらの細胞を傷つけた後、細胞を洗浄してから0、2、4時間後に観察した。細胞の移動は、ImageJを用いて被覆面積を定量化することにより決定した。移動量は、Endo+の細胞の4時間後との相対値で表した。データは3回の独立した実験の平均値±標準偏差である(\* $p < 0.01$  および\*\* $p < 0.05$ ,  $n=3$ )。

### 第3項 Endo180欠損細胞における細胞遊走

細胞膜上からEndo180の消失が、内皮細胞の遊走にどのように関与するか調べた。コントロールの4h後の細胞が遊走し、カバーした面積を基準とし、各条件の創傷領域の割合を算出した(図25)。Endo180を欠損したHUVEC では、2h後及び、4h後のカバーされた創傷領域はコントロールよりも大きい傾向を示した。2h後は有意な差はなかったが、4h後のカバーされた創傷領域はコントロールの約1.7倍大きく有意な差があった。この結果はHUVECにNTH  $\alpha 1(IV)$ または、変性IV型コラーゲンを添加した際と同様であり、NTH  $\alpha 1(IV)$ や変性IV型コラーゲンを添加した際にEndo180が細胞膜上から消失しうる可能性が考えられた。



#### 第4節 考察

HUVECのNTH  $\alpha 1$ (IV)受容体は、Endo180ではないかと仮定し、実験を行った。Endo180は、VE-カドヘリンのエンドサイトーシスに抑制的に作用することが示唆された。これらのことから、NTH  $\alpha 1$ (IV)の細胞内への取り込みがEndo180のエンドサイトーシスによって起こり、細胞膜からEndo180が欠如することで、VE-カドヘリンのエンドサイトーシスが誘起され、細胞間結合の抑制を促す可能性が考えられた。またEndo180が欠如したHUVECは遊走も促進した。Endo180の特性として、I型コラーゲンよりIV型コラーゲンと、また、I型コラーゲンにおいては3本らせん分子よりは変性したゼラチンとの結合能が高いことが報告されている(69, 80)。我々は、HUVECにおいてIV型コラーゲンやゼラチンではなく、変性IV型コラーゲンが内在化されることを確認したが、この現象はEndo180の特性で説明できる。すなわち、COL4A1遺伝子産物である変性IV型コラーゲンやNTH  $\alpha 1$ (IV)は、3本らせん構造を持たないためにEndo180との親和性がより高いと考えられる。また、短時間での細胞間ギャップ面積の変化の結果から、NTH  $\alpha 1$ (IV)は変性IV型コラーゲンより受容体に対し高い親和性を示していると考えられた。NTH  $\alpha 1$ (IV)はホワイトマッシュルーム凝集素で認識される糖鎖を有しているので(62)、糖鎖を介した受容体への結合が抑制効果をさらに強める可能性は考えられる。また、本研究で用いたIV型コラーゲン標品は、ペプシン処理により調製されたものであり、切断を受けたペプチド配列が、受容体への結合に関与する可能性も考えられる。

我々は、変性コラーゲンの取り込みがEndo180以外の受容体によっても起こることを示した。NTH  $\alpha 1$ (IV)によるVE-カドヘリンの細胞間結合の抑制は、Endo180以外の受容体を介する可能性は排除できない。IV型コラーゲンは $\alpha 1\beta 1$ 及び、 $\alpha 2\beta 1$ インテグリンと親和性があることが報告されている(81)。コラーゲンの取り込みに関して、 $\alpha 2\beta 1$ インテグリンはコラーゲンの食作用の仲介をすることが報告されている(82)。近年、Yamanotoらによって、 $\beta 1$ インテグリンの細胞膜上からの欠損がVE-カドヘリンのエンドサイトーシスを引き起こすことが報告されている(83)。これらのことから、NTH  $\alpha 1$ (IV)が $\beta 1$ インテグリンによってエンドサイトーシスし、細胞膜上の $\beta 1$ インテグリンが減少することでVE-カドヘリンの細胞間結合抑制を起こす可能性は考えられる。

近年、細胞膜上からEndo180が消失するとuPA/uPA受容体によるプラスミノゲン活性化を促進させることが報告されている(3)。本研究により、NTH  $\alpha 1$ (IV)はEndo180あるいはその他の受容体のエンドサイトーシスを引き起こす可能性を示した。よって、NTH  $\alpha 1$ (IV)はEndo180を介してプラスミンを活性化させる新たな因子の可能性が考えられた(図26)。しかし、現段階では、NTH  $\alpha 1$ (IV)がEndo180と結合しエンドサイトーシスするというデータはなく、Endo180以外の受容体を介する可能性は排除できない。今後、NTH  $\alpha 1$ (IV)の受容体を特定し、NTH  $\alpha 1$ (IV)によるVE-カドヘリンの細胞間結合抑制のメカニズムを解析する必要がある。

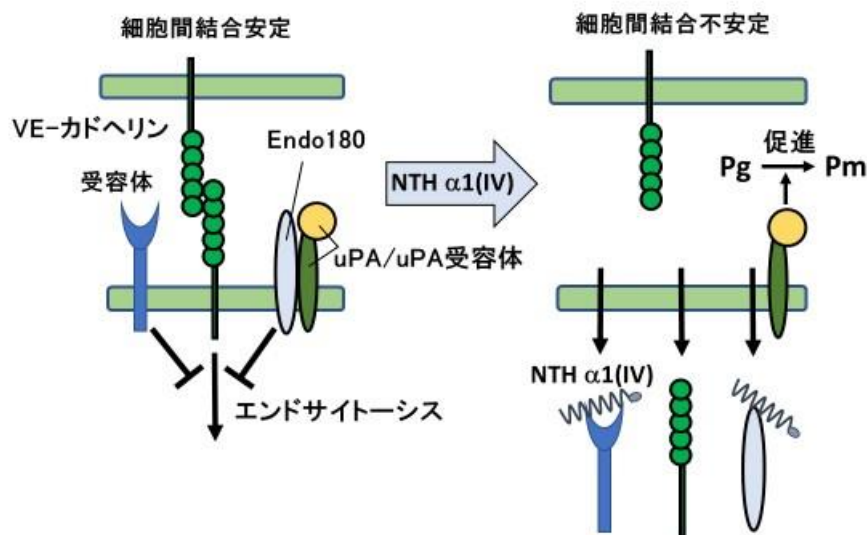


図26 NTH  $\alpha 1(IV)$ がプラスミン活性化を促す仮説

Endo180の存在はVE-カドヘリンによる細胞間結合を形成し、安定を維持している。Endo180が欠損するとVE-カドヘリンのエンドサイトーシスが惹起され、細胞間結合が抑制される。この現象はNTH  $\alpha 1(IV)$ によっても起きる。また、NTH  $\alpha 1(IV)$ が細胞内に取り込まれる現象と細胞間結合の抑制は相関性があり、Endo180とその他の受容体がNTH  $\alpha 1(IV)$ の取り込みに関与している。よって、NTH  $\alpha 1(IV)$ はEndo180あるいはその他の受容体のエンドサイトーシスにより内在化すると、細胞膜上からEndo180が消失し、VE-カドヘリンによる細胞間結合が抑制されたと考えられる。同時に、Endo180の細胞膜上の消失により、uPA/uPA受容体を介してプラスミノゲン(Pg)からプラスミン(Pm)に活性化が促進すると考えられる。



## 第5章 総括

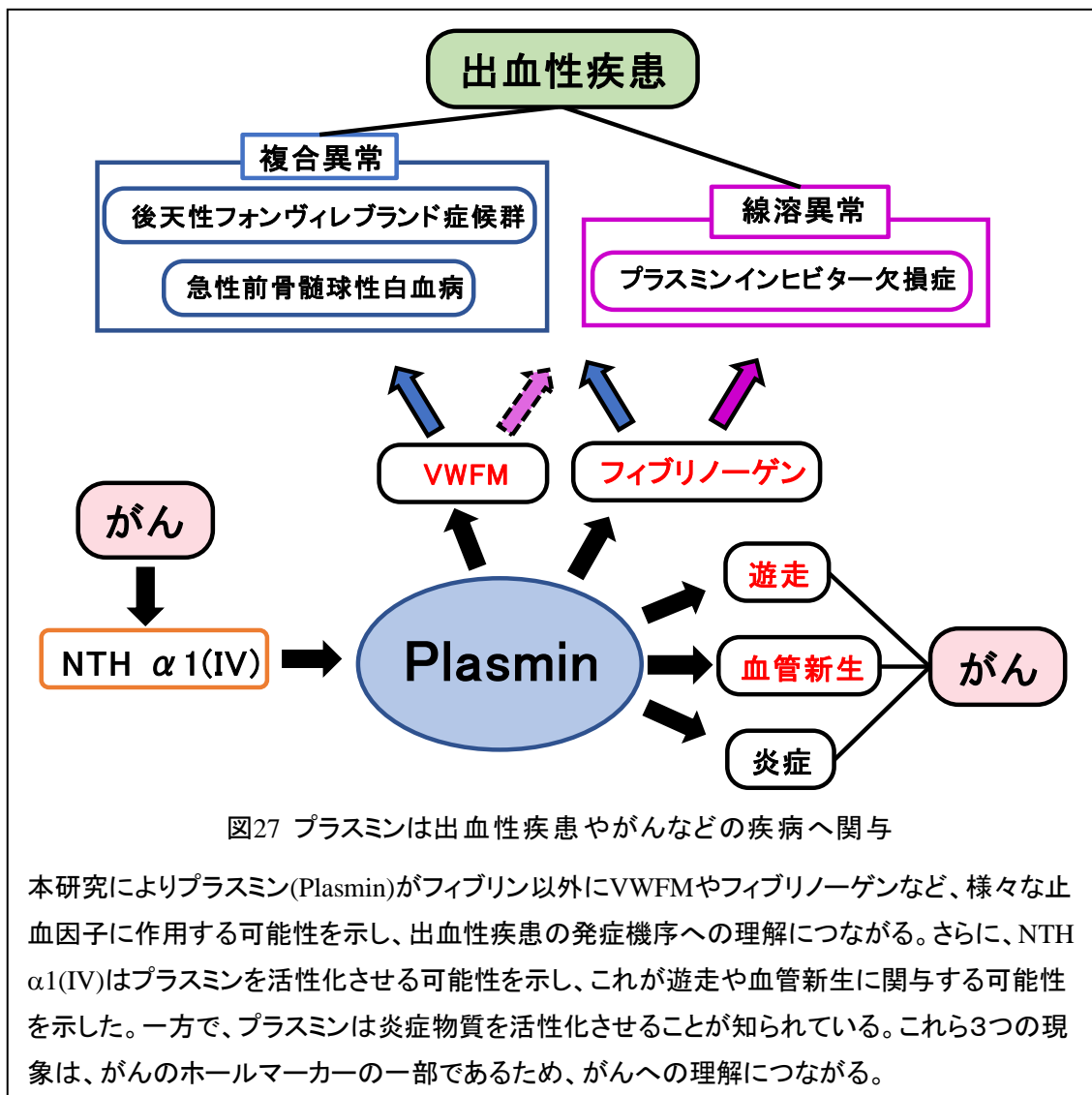
本論文では、プラスミンの新たな生理的機能について検討を行った。

第2章では、プラスミンが止血因子VWFMとフィブリノーゲンの切断をすることを明らかにし、これが止血障害を引き起こす可能性を示唆した。この知見はプラスミンが関わる出血性疾患で、本研究が示したプラスミンの新たな生理的機能が発症に関与することが考えられる。これまでに知られている出血性疾患の原因として、血管異常、血小板異常、凝固因子異常、線溶異常、複合異常(血小板異常、凝固因子異常、線溶異常の合併)がある。線溶異常に含まれる、 $\alpha_2$ プラスミンインヒビター欠損症と、複合異常に含まれる急性前骨髄球性白血病や後天性フォンヴィレブランド症候群は、プラスミンが活性化している症例があることから、これらの病気の発症機序を解明できたと考えられた。ヒト血漿を用いた本研究は、種差を考慮する必要がないため、潜在的に重要である。しかし、プラスミノーゲン活性化が生体内でVWFMやフィブリノーゲンを切断できるかは明らかでないので、動物モデルを用いた研究が必要である。

第3章、4章では、NTH  $\alpha 1$ (IV)添加、または細胞膜上からEndo180の欠損が内皮細胞間結合を抑制し、遊走を促進させることを明らかにした。また、NTH  $\alpha 1$ (IV)がEndo180を介してプラスミンを活性化させる可能性を示唆した。この現象は血管新生を引き起こす可能性が考えられる。成体でおこる血管新生は、がんや創傷治癒の際など虚血に陥った組織において、いくつかの血管内皮の増殖を刺激する因子により誘導される。がん細胞は自らの増殖に必要な酸素・栄養の供給を得るために血管新生を盛んに誘導することが知られている。つまり、がん細胞の周辺には血管新生が起きており、血管新生の抑制をターゲットとする薬剤は、がんに対する新しい治療法を提供することになると期待できる。本研究により、NTH  $\alpha 1$ (IV)は血管新生の初期段階で起きる発芽伸長に重要な因子である可能性があるため、NTH  $\alpha 1$ (IV)をターゲットとした薬剤の開発は、新規抗がん剤として期待できる。しかし、NTH  $\alpha 1$ (IV)の受容体はEndo180以外にも存在し、NTH  $\alpha 1$ (IV)がEndo180と結合するのか、NTH  $\alpha 1$ (IV)によってプラスミノーゲンが活性化するか検討する必要がある。

さらに、NTH  $\alpha 1$ (IV)の細胞への生理的な作用については、本研究で初めて明らかになった。NTH  $\alpha 1$ (IV)は血管新生時だけでなく、がん細胞も分泌している。本研究で示したNTH  $\alpha 1$ (IV)とEndo180が関与する細胞間結合抑制および、細胞遊走は、がん細胞自身の増殖、遊走、転移に関与する可能性が考えられる。このため、今後がん細胞にて、NTH  $\alpha 1$ (IV)が及ぼす影響を検討していく必要がある。

また、本研究で示すプラスミンのように、1つの因子を軸として研究することは、さまざまな要因が複合して起こる出血性疾患やがんなどの疾病を、総合的に理解する上で有効な方法論ではないかと考えられた(図27)。



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さった今村保忠先生、辛英哲先生に心より感謝申し上げます。不自由なく研究するための環境を整えて頂き、日頃より温かく見守って下さったとともに、多くのご支援、ご指導を賜りましたことに心より感謝申し上げます。

私が研究室にいる間、共に実験を行い、助けて下さった生体機能化学研究室の皆様有難うございました。

最後になりましたが、援助してくれた両親に深く感謝します。

## 参考文献

1. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldins, C.-H. (1994) *J. Biol. Chem.* Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth Factor. **269**, 26988–26995
2. Cunningham, S. A., Waxham, M. N., Arrate, P. M., and Brock, T. A. (1995) Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 20254–20257
3. Messaritou, G., East, L., Roghi, C., Isacke, C. M., and Yarwood, H. (2009) Membrane type-1 matrix metalloproteinase activity is regulated by the endocytic collagen receptor Endo180. *J. Cell Sci.* **122**, 4042–4048
4. Kiely CM, Grant ME. (2002) The collagen family: structure, assembly and organization in the extracellular matrix in *Connective Tissue and its Heritable Diseases: molecular, genetic and medical aspects* (Royce PM., and Steinmann B., eds) pp. 159–221, John Wiley & Sons, Inc., New York
5. Kefalides, N. A. (1968) Isolation and characterization of the collagen from glomerular basement membrane. *Biochemistry.* **7**, 3103–3112
6. Timpl, R. (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **180**, 487–502
7. Takahashi, S., Yoshikawa, K., Sasaki, T., Takeda, Y., Imamura, Y., Sado, Y., and Hayashi, T. (1999) Serum-dependent secretion of nondisulfide-bonded and unfolded type IV collagen  $\alpha$  chains by cultured fetal lung fibroblasts. *Connect. tissue.* **31**, 161–168
8. Toth, M., Sado, Y., Ninomiya, Y., and Fridman, R. (1999) Biosynthesis of 2(IV) and 1(IV) Chains of collagen IV and interactions with matrix metalloproteinase-9. *J. Cell. Physiol.* **180**, 131–139
9. Tokimitsu, I., Takehana, M., Hori, H., Nagai, Y., and Tajima, S. (1994) Identification of nondisulfided pro  $\alpha$  1 (IV) chain produced by cultured B16 melanoma cells. *J. Biochem.* **116**, 1039–1043
10. Tajima, S., and Tokimitsu, I. (1996) Non-disulfided pro  $\alpha$  1(IV) chain in B16 melanoma cell culture. *J. Dermatol. Sci.* **13**, 25–29
11. Engvall, E., Ruoslahti, E., and Miller, E. J. (1978) Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J. Exp. Med.* **147**, 1584–1595
12. Shin, Y., Moriya, A., Tohnishi, Y., Watanabe, T., and Imamura, Y. (2019) Making cell culture more physiological: basement membrane-like structures containing NTH  $\alpha$ 1(IV) are formed around the endothelial cell network in a novel in vitro angiogenesis model. *Am. J. Physiol.* **317**, C314–C325

13. Sugiyama, H., Tokunaka, K., Hayashi, T., Imamura, Y., Morita, M., and Yamato, M. (2015) Non-triple helical form of type IV collagen  $\alpha 1$  chain. *Heliyon*. **1**, e00051-e00064
14. Togashi, K., Suzuki, S., Morita, S., Ogasawara, Y., Imamura, Y., and Shin, Y. (2020) Excessively activated plasminogen in human plasma cleaves VWF multimers and reduces collagenbinding activity. *J. Biochem.* **168**, 355–363
15. Togashi, K., Shin, Y., Y., Imamura, Y., Non-triple helical form of type IV collagen alpha1 chain induces disruption of vascular endothelial-cadherin mediated cell-to-cell junctions. *J. Biochem.* In press.
16. Zhou, Y. F., Eng, E. T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., and Springer, T. A. (2012) Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*. **120**, 449–458
17. Valentijn, K. M., Sadler, J. E., Valentijn, J. A., Voorberg, J., and Eikenboom, J. (2011) Functional architecture of weibel-palade bodies. *Blood*. **117**, 5033–5043
18. Springer, T. A. (2011) Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 130–143
19. Ju, L., Chen, Y., Zhou, F., Lu, H., Cruz, M. A., and Zhu, C. (2015) Von Willebrand factor-A1 domain binds platelet glycoprotein Ib $\alpha$  in multiple states with distinctive force-dependent dissociation kinetics. *Thromb. Res.* **136**, 606–612
20. Levy, G. G., Nichols, W. C., Lian, E. C., Foroud, T., McClintick, J. N., McGee, B. M., Yang, A. Y., Siemieniak, D. R., Stark, K. R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S. B., Chandrasekaran, V., Stabler, S. P., Sabio, H., Bouhassira, E. E., Upshaw, J. D., Ginsburg, D., and Tsai, H.-M. (2001) Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. **413**, 488–494
21. Zheng, X., Chung, D., Takayama, T. K., Majerus, E. M., Sadler, J. E., and Fujikawa, K. (2001) Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* **276**, 41059-41063
22. Soejima, K., Mimura, N., Hirashima, M., Maeda, H., Hamamoto, T., Nakagaki, T., and Nozaki, C. (2001) A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: Possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J. Biochem.* **130**, 475–480
23. Moake, J. L. (2002) Thrombotic microangiopathies. *N. Engl. J. Med.* **347**, 589–600
24. Furlan, M., Robles, R., and Lämmle, B. (1996) Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*. **87**, 4223–4234
25. Furlan, M., Robles, R., Galbusera, M., Remuzzi, G., Kyrle, P. A., Brenner, B., Krause, M., Scharer, I., Aumann, V., Mittler, U., Solenthaler, M., and Lämmle, B. (2002) von Willebrand factor–cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic–uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1578–1584

26. Tsai, H.-M., and Lian, E. C.-Y. (1998) Antibodies to von Willebrand factor–cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1585–1594
27. Collen, D., and Lijnen, H. R. (2009) The tissue-type plasminogen activator story. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1151–1155
28. Sakata, Y., and Aoki, N. (1982) Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J. Clin. Invest.* **69**, 536–542
29. Aoki, N., and Harpel, P. C. (1984) Inhibitors of the fibrinolytic enzyme system. *Semin. Thromb. Hemost.* **10**, 24–41
30. Crippa, M. P. (2007) Urokinase-type plasminogen activator. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 690–694
31. Duffy, M. J. (2004) The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 39–49
32. Sun, H., Ringdahl, U., Homeister, J. W., Fay, W. P., Engleberg, N. C., Yang, A. Y., Rozek, L. S., Wang, X., Sjöbring, U., and Ginsburg, D. (2004) Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science*. **305**, 1283–1286
33. Shin, Y., Miyake, H., Togashi, K., Hiratsuka, R., Endou-Ohnishi, K., and Imamura, Y. (2018) Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by plasmin in human plasma: risk of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biochem.* **163**, 381–389
34. Tersteeg, C., De Maat, S., De Meyer, S. F., Smeets, M. W. J., Barendrecht, A. D., Roest, M., Pasterkamp, G., Fijnheer, R., Vanhoorelbeke, K., De Groot, P. G., and Maas, C. (2014) Plasmin cleavage of von willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy. *Circulation*. **129**, 1320–1331
35. Federici, A. B., Berkowitz, S. D., Zimmerman, T. S., and Mannucci, P. M. (1992) Proteolysis of von Willebrand factor after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. *Blood*. **79**, 38–44
36. Furlan, M., Robles, R., Solenthaler, M., Wassmer, M., Sandoz, P., and L  , B. (1997) Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. **89**, 3097–3103
37. Anderson, P. J., Kokame, K., and Sadler, J. E. (2006) Zinc and calcium ions cooperatively modulate ADAMTS13 activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 850–857
38. Raines, G., Aumann, H., Sykes, S., and Street, A. (1990) Multimeric analysis of von Willebrand factor by molecular sieving electrophoresis in sodium dodecyl sulphate agarose gel. *Thromb. Res.* **60**, 201–212
39. Ledford-Kraemer, M. R. (2010) Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am. J. Hematol.* **85**, 510–514
40. Brophy, T. M., Ward, S. E., McGimsey, T. R., Schneppenheim, S., Drakeford, C., O’Sullivan,

- J. M., Chion, A., Budde, U., and O'Donnell, J. S. (2017) Plasmin cleaves von willebrand factor at K1491-R1492 in the A1-A2 linker region in a shear- and glycan-dependent manner in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 845–855
41. Han, Y., Xiao, J., Falls, E., and Zheng, X. L. (2011) A shear-based assay for assessing plasma ADAMTS13 activity and inhibitors in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion.* 51, 1580–1591
  42. Bowen, D. J. (2003) An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. *J. Thromb. Haemost.* 1, 33–40
  43. Fowler, W. E., Fretto, L. J., Hamilton, K. K., Erickson, H. P., and McKee, P. A. (1985) Substructure of human von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 76, 1491–1500
  44. Chen, J., Ling, M., Fu, X., López, J. A., and Chung, D. W. (2012) Simultaneous exposure of sites in von willebrand factor for glycoprotein ib binding and ADAMTS13 cleavage studies with ristocetin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2625–2630
  45. Anonick, P. K., Vetter, W. H., and Gonias, S. L. (1989) Kinetics of the reaction of streptokinase-plasmin complex with purified human and mouse alpha 2-macroglobulin Implications for mechanism. *J. Biochem.* 264, 745–752
  46. Paul, S., and Castelliwo, F. J. (1977) Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase. *J. Biol. Chem.* 252, 492-498
  47. Wohner, N., Kovács, A., MacHovich, R., and Kolev, K. (2012) Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathways. *Thromb. Res.* 129, e41–e46
  48. Schneider, S. W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R. R., and Schneider, M. F. (2007) Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 104, 7899–7903
  49. Vergauwe, R. M. A., Uji-I, H., De Ceunynck, K., Vermant, J., Vanhoorelbeke, K., and Hofkens, J. (2014) Shear-stress-induced conformational changes of von Willebrand factor in a water-glycerol mixture observed with single molecule microscopy. *J. Phys. Chem. B.* 118, 5660–5669
  50. Rastegar-Lari, G., Villoutreix, B. O., Ribba, A.-S., Legendre, P., Meyer, D., and Baruch, D. (2002) Two clusters of charged residues located in the electropositive face of the von Willebrand factor A1 domain are essential for heparin binding. *Biochemistry.* 41, 6668–6678
  51. Aisina, R. B., and Mukhametova, L. I. (2014) Structure and function of plasminogen/plasmin system. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 40, 590–605
  52. Müller, J. P., Pippig, D. A., Vanderlinden, W., Mielke, S., Bruetzel, L. K., Benoit, M., Schneppenheim, R., Obser, T., Löf, A., Beer, C., and Lipfert, J. (2016) Force sensing by the vascular protein von Willebrand factor is tuned by a strong intermonomer interaction. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci U S A. 113, 1208–1213
53. Skipwith, C. G., Cao, W., and Long Zheng, X. (2010) Factor VIII and platelets synergistically accelerate cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 under fluid shear stress. *J. Biol. Chem.* 285, 28596–28603
  54. O'Donnell, J. S., McKinnon, T. A. J., Crawley, J. T. B., Lane, D. A., and Laffan, M. A. (2005) Bombay phenotype is associated with reduced plasma-VWF levels and an increased susceptibility to ADAMTS13 proteolysis. *Blood.* 106, 1988–1991
  55. Gerritsen, H. E., Turecek, P. L., Schwarz, H. P., Lämmle, B., and Furlan, M. (1999) Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb. Haemost.* 82, 1386–1389
  56. Dicke, C., Schneppenheim, S., Holstein, K., Spath, B., Bokemeyer, C., Dittmer, R., Budde, U., and Langer, F. (2016) Distinct mechanisms account for acquired von Willebrand syndrome in plasma cell dyscrasias. *Ann. Hematol.* 95, 945–957
  57. Sadler, J. E. (2008) Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura clinical features of idiopathic TTP. *Blood.* 112, 11–18
  58. Tersteeg, C., Joly, B. S., Gils, A., Lijnen, R., Deckmyn, H., Declerck, P. J., Plaimauer, B., Coppo, P., Veyradier, A., Maas, C., De Meyer, S. F., and Vanhoorelbeke, K. (2017) Amplified endogenous plasmin activity resolves acute thrombotic thrombocytopenic purpura in mice. *J. Thromb. Haemost.* 15, 2432–2442
  59. Yakovlev, S. A., Rublenko, M. V., Izdepsky, V. I., and Makogonenko, E. M. (1995) Activating effect of the plasminogen activators on plasminogens of different mammalia species. *Thromb. Res.* 79, 423–428
  60. Dong, X., Leksa, N. C., Chhabra, E. S., Arndt, J. W., Lu, Q., Knockenhauer, K. E., Peters, R. T., and Springer, T. A. (2019) The von Willebrand factor D'D3 assembly and structural principles for factor VIII binding and concatemer biogenesis. *Blood.* 133, 1523–1533
  61. Iwata, M., Imamura, Y., Sasaki, T., and Hayashi, T. (1995) Evidence for a short form of  $\alpha 1(\text{IV})$  as a major polypeptide in bovine lens capsule. *J. Biochem.* 117, 1298–1304
  62. Kajimura, D., Takahashi, S., Yoshikawa, K., Hattori, S., Sado, Y., Imamura, Y., and Hayashi, T. (2004) Non-helical type IV collagen polypeptides in human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 11–16
  63. Yoshikawa, K., Takahashi, S., Imamura, Y., Sado, Y., and Hayashi, T. (2001) Secretion of non-helical collagenous polypeptides of  $\alpha 1(\text{IV})$  and  $\alpha 2(\text{IV})$  chains upon depletion of ascorbate by cultured human cells. *J. Biochem.* 129, 929–936
  64. Sudhakar, A., Nyberg, P., Keshamouni, V. G., Mannam, A. P., Li, J., Sugimoto, H., Cosgrove, D., and Kalluri, R. (2005) Human  $\alpha 1$  type IV collagen NC1 domain exhibits distinct



- antiangiogenic activity mediated by  $\alpha 1\beta 1$  integrin. *J. Clin. Invest.* 115, 2801–2810
65. Boosani, C. S., Mannam, A. P., Cosgrove, D., Silva, R., Hodivala-Dilke, K. M., Keshamouni, V. G., and Sudhakar, A. (2007) Regulation of COX-2 mediated signaling by alpha3 type IV noncollagenous domain in tumor angiogenesis. *Blood.* 110, 1168–1177
  66. Colorado, P. C., Torre, A., Kamphaus, G., Maeshima, Y., Hopfer, H., Takahashi, K., Volk, R., Zamborsky, E. D., Herman, S., Sarkar, P. K., Ericksen, M. B., Dhanabal, M., Simons, M., Post, M., Kufe, D. W., Weichselbaum, R. R., Sukhatme, V. P., and Kalluri, R. (2000) Anti-angiogenic Cues from Vascular Basement Membrane collagen 1. *CANCER Res.* 60, 2520–2526
  67. Kjølner, L., Engelholm, L. H., Høyer-Hansen, M., Danø, K., Bugge, T. H., and Behrendt, N. (2004) uPARAP/endo180 directs lysosomal delivery and degradation of collagen IV. *Exp. Cell Res.* 293, 106–116
  68. Wienke, D., MacFadyen, J. R., and Isacke, C. M. (2003) Identification and Characterization of the Endocytic Transmembrane Glycoprotein Endo180 as a Novel collagen Receptor. *Mol. Biol. Cell.* 14, 3592–3604
  69. Engelholm, L. H., List, K., Netzel-Arnett, S., Cukierman, E., Mitola, D. J., Aaronson, H., Kjølner, L., Larsen, J. K., Yamada, K. M., Strickland, D. K., Holmbeck, K., Danø, K., Birkedal-Hansen, H., Behrendt, N., and Bugge, T. H. (2003) uPARAP/Endo180 is essential for cellular uptake of collagen and promotes fibroblast collagen adhesion. *J. Cell Biol.* 160, 1009–1015
  70. Jürgensen, H. J., Johansson, K., Madsen, D. H., Porse, A., Melander, M. C., Sørensen, K. R., Nielsen, C., Bugge, T. H., Behrendt, N., and Engelholm, L. H. (2014) Complex determinants in specific members of the mannose receptor family govern collagen endocytosis. *J. Biol. Chem.* 289, 7935–7947
  71. Nørregaard, K. S., Krigslund, O., Behrendt, N., Engelholm, L. H., and Jürgensen, H. J. (2020) The collagen receptor uPARAP/Endo180 regulates collectins through unique structural elements in its FNII domain. *J. Biol. Chem.* 295, 9157–9170
  72. Jürgensen, H. J., Madsen, D. H., Ingvarsen, S., Melander, M. C., Gårdsvoll, H., Patthy, L., Engelholm, L. H., and Behrendt, N. (2011) A novel functional role of collagen glycosylation: Interaction with the endocytic collagen receptor uPARAP/ENDO180. *J. Biol. Chem.* 286, 32736–32748
  73. Honardoust, H. A., Jiang, G., Koivisto, L., Wienke, D., Isacke, C. M., Larjava, H., and Häkkinen, L. (2006) Expression of Endo180 is spatially and temporally regulated during wound healing. *Histopathology.* 49, 634–648
  74. East, L., McCarthy, A., Wienke, D., Sturge, J., Ashworth, A., and Isacke, C. M. (2003) A targeted deletion in the endocytic receptor gene Endo180 results in a defect in collagen uptake. *EMBO Rep.* 4, 710–716

75. Mousavi, S. A., Fønhus, M. S., and Berg, T. (2009) Up-regulation of uPARAP/Endo180 during culture activation of rat hepatic stellate cells and its presence in hepatic stellate cell lines from different species. *BMC Cell Biol.* 10, 39-49
76. Shi, F., Harman, J., Fujiwara, K., and Sottile, J. (2010) collagen I matrix turnover is regulated by fibronectin polymerization. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 298, C1265-C1275
77. Smith, L., Wagner, T. E., Huizar, I., and Schnapp, L. M. (2008) uPARAP expression during murine lung development. *Gene Expr. Patterns.* 8, 486–493
78. Engelholm, L. H., Nielsen, B. S., Netzel-Arnett, S., Solberg, H., Chen, X. D., Lopez Garcia, J. M., Lopez-Otin, C., Young, M. F., Birkedal-Hansen, H., Danø, K., Lund, L. R., Behrendt, N., and Bugge, T. H. (2001) The urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/endo180 is coexpressed with its interaction partners urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloprotease-13 during osteogenesis. *Lab. Invest.* 81, 1403–1414
79. Mazar, A. P. (2001) The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer. Drugs.* 12, 387–400
80. Jürgensen, H. J., Madsen, D. H., Ingvarsen, S., Melander, M. C., Gårdsvoll, H., Patthy, L., Engelholm, L. H., and Behrendt, N. (2011) A novel functional role of collagen glycosylation: Interaction with the endocytic collagen receptor uPARAP/ENDO180. *J. Biol. Chem.* 286, 32736–32748
81. Vandenberg, P., Kern, A., Ries, A., Luckenbill-Edds, L., Mann, K., and Kiilm, K. (1991) Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol.* 113, 1475–1483.
82. Lee, W., Sodek, J., and McCulloch, C. A. G. (1996) Role of Integrins in Regulation of collagen Phagocytosis by Human Fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 168, 695-704
83. Yamamoto, H., Ehling, M., Kato, K., Kanai, K., Van Lessen, M., Frye, M., Zeuschner, D., Nakayama, M., Vestweber, D., and Adams, R. H. (2015) Integrin  $\beta 1$  controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. *Nat. Commun.* 6, 6429-6442