

学 位 論 文 題 名

Response of plasma tissue factor pathway inhibitor to diet-induced hypercholesterolemia in crab-eating monkeys

（カニクイザルにおける食事誘導性高コレステロール血症での
血漿組織因子経路インヒビターの反応）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

[緒言]

Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) は、組織因子/第VIIa因子により開始される外因系凝固反応を阻害するプロテアーゼインヒビターで、血管内皮細胞で産生され、その大部分がリボ蛋白もしくは内皮細胞表面に結合して存在している。そして、血漿中では、LDL/VLDL結合型、HDL結合型、遊離型の3つの存在様式がある。このような抗血栓性を持つTFPIが、動脈硬化、血栓形成の病態においてどのように機能しているか、またどのように変動するかということはまだ十分解明されていない。そこで今回は、動脈硬化の基礎疾患となりうる高脂血症に着目し、サルを疾患モデルとして用い、食事負荷により高コレステロール血症を誘導して、TFPIの変動を検討した。

[材料と方法]

3から8歳のカニクイザル9匹を実験に用いた。0.3%コレステロール、15%バターを混入した食事を負荷し、高コレステロール血症を誘導した。

TFPIの活性測定は、two stage の Fluorogenic assayを用いた。サル血漿にヒト第X因子とヒト第VIIa因子、ウサギ脳組織因子、塩化Caを添加、ついで第X因子の蛍光性ペプチド基質を加え、第X因子活性化反応の阻害の程度でインヒビター活性を表わした。TFPIの抗原測定にはサル recombinant TFPIのモノクローナル、ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ法によるEnzyme immunoassay(EIA)を開発し、これを用いて測定した。また、TFPIの分別定量を行なうために、Superdex200のカラムにてゲル濾過を行なった。

[結果]

サル6匹のコレステロール値とTFPI活性の平均値の変化をみると、高コレステロール食負荷後4週目で、コレステロール値は約3倍に上昇、また、TFPI活性は約1.5倍に上昇した。その後20週までその上昇したレベルが続いている。

ゲル濾過後の各分画の検討では、分子量100万を越える分画にコレステロール、TFPI活性とも大きいピークが認められ、LDL/VLDL結合型TFPIと考えられた。また、分子量30万から15万の分画に、コレステロールの小さなピークとTFPI活性の二峰性のピークが認められ、HDL結合型TFPIと考えられた。また、遊離型のTFPIは痕跡的であり、明らかなピークを形成していなかった。

高コレステロール血症時には、LDL/VLDL分画において、コレステロール値とTFPI活性はともに大きく増加していた。この分画の変化は他の分画の変化より大きいことより、血漿中の総TFPIの変化に最も影響を与えていたと考えられた。また、HDL分画においては高分子HDLのTFPI活性は減少し、低分子HDLのTFPI活性は増加していた。遊離型のTFPIについては、負荷後も変化はなかった。

LDL/VLDL分画におけるTFPI活性の増加が、蛋白量の増加によるものか、比活性の上昇によるものかを調べるため、EIAにて抗原量を測定した。ゲル濾過後の各分画で活性と抗原量を測定すると、高コレステロール血症時には、LDL/VLDL分

画において、TFPIの活性と抗原量は共に同程度の比率で増加していた。このことより、この分画において実際にTFPIの蛋白量が増加しているものと判断された。

ヒトにおいて、ヘパリンを投与すると内皮細胞に結合して存在しているTFPIが遊離し、血漿中のTFPI濃度が増加することが報告されている。しかし、高コレステロール血症時にこのヘパリンの効果に変化が生じるかどうかはまだ知られていない。我々は今回のモデルを用いこの問題についても検討を加えた。今回の検討では正常コントロール時も高コレステロール血症時も、200単位/Kg体重の量のヘパリン投与によりTFPI濃度は約5倍に増加し、両者で有意な差を認めなかった。また、ヘパリン投与後血漿のゲル濾過の検討では、LDL/VLDL分画、HDL分画、および遊離型のいずれの分画においても投与前に比べTFPIの増加を認めた。そして、このヘパリン投与後血漿を4度で24時間放置した後に、ゲル濾過を行ってみるとLDL/VLDL分画のTFPIは減少しHDL分画のTFPIは増加していた。

[考察]

今回の検討において、高コレステロール血症においてTFPI活性が増加したが、これは、LDL/VLDLのリポプロテインが増加するのに伴って、LDL/VLDL結合型TFPIの量も増加するためであることが明かとなった。また、HDL結合型TFPIでは、低分子HDLのTFPI活性は増加していたが、この変動には高コレステロール血症時のHDLの組成の変化が関与している可能性が考えられた。

ゲル濾過によるサル血漿TFPIの分別定量の結果は、ヒトの結果と良く類似していた。また、コレステロール値の上昇がTFPIの上昇を来たす点でもサルとヒトの結果は一致していた。一方、齧歯類のウサギ、ラットでは、ゲル濾過の結果も高コレステロール血症に対する反応もヒトとは異なっている事が報告されている。これはヒト、サルとウサギ、ラットの間でTFPIの構造に差があることが原因と考えられる。今回の結果より、動脈硬化における血栓形成とTFPIの関係を調べるために動物実験をする場合、その動物種についても考慮すべきことが明らかとなつた。

内皮結合型TFPIの量を反映すると思われるヘパリン遊離性TFPIの検討では、正常時と高コレステロール血症時で差を認めなかつた。この結果は単に数週間の高コレステロール血症があるだけでは、内皮結合型TFPIの量に変化を来たさない事を示唆するものといえる。この現象の説明としては、(1) 今回の程度のコレステロールの負荷では、TFPIの産性能が低下する程の内皮損傷が生じていない、

(2) TFPIが毛細血管、静脈で主に産生されていて、そのため動脈で仮に産生低下が生じても全体では変化が認められない、などが考えられる。

高コレステロール血症時に増加したLDL/VLDL結合型TFPIの由来については、今回のヘパリン投与後血漿のゲル濾過の結果で、ヘパリン遊離性のTFPIがLDL/VLDL分画、またHDL分画にも存在していた事より、内皮結合型TFPIがLDL/VLDL結合型TFPIへ移行した可能性が高いと考えられた。

[結語]

(1) サルの高コレステロール血症モデルにおいて、コレステロールの上昇に伴い、TFPI活性も上昇した。この上昇は比活性の上昇ではなく、LDL/VLDL結合型TFPIの蛋白量の増加よることが明らかとなった。

(2) サルのTFPIの血中での性状、動態は他の動物種に比べヒトに近似しており、サルは疾患モデルとして最適と考えられた。また今回開発した測定系はその検討に有用である。

(3) 本モデルでのヘパリン投与の検討により、数週間の高コレステロール血症の負荷では、内皮結合型TFPIの量に大きな変化を来さなかつた。また、ヘパリン遊離性のTFPIがLDL/VLDL結合型TFPIに移行しうることより、高コレステロール血症時に増加したLDL/VLDL結合型TFPIの由来については、内皮結合型TFPIである可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主査教授 阿部 弘
副査教授 石橋 輝雄
副査教授 小林 邦彦

学位論文題名

Response of plasma tissue factor pathway inhibitor to diet-induced hypercholesterolemia in crab-eating monkeys

(カニクイザルにおける食事誘導性高コレステロール血症での
血漿組織因子経路インヒビターの反応)

[序論]

Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) は、外因系凝固反応を阻害するプロテアーゼインヒビターで、血管内皮細胞で產生され、血漿中でリポプロテインと結合しうる。このような特徴を持つTFPIが、血栓性疾患でどのような変動をしめすか充分に解明されていない。そこで動脈硬化、血栓性疾患の基礎疾患となりうる高コレステロール血症を、サルに食事負荷して誘導し、TFPIの変動を検討した。

[材料と方法]

カニクイザル9匹を実験に用いた。0.3%コレステロール、15%バターを混入した食事を負荷し、高コレステロール血症を誘導した。TFPIの活性測定にtwo stage の Fluorogenic assayを開発した。血漿に第X因子、第VIIa因子、組織因子、塩化Caを添加し、ついで第X因子の蛍光性ペプチド基質を加え蛍光強度を測定し、第X因子活性化反応の阻害の程度でインヒビター活性を表わした。また、TFPIの抗原量測定には、サルリコンビナントTFPIのモノクローナル、ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ法によるEIAを開発し、これを用いて測定した。また、TFPIの分別定量を行なうために、Superdex200のカラムにてゲルfiltrationを行なった。ヘパリン遊離性TFPIの量を検討するため、ヘパリン負荷テストとして、200単位/Kg体重の量のヘパリンを静脈内投与し、5分後に採血を行った。

[結果]

分別定量のためにサル血漿をゲルfiltrationすると、分子量100万を越える分画にコレステロール、TFPI活性とも大きいピークが認められ、LDL/VLDL結合型TFPIと考えられた。また、分子量30万から15万の分画に、コレステロールの小さなピークとTFPI活性の二峰性のピークが認められ、HDL結合型TFPIと考えられた。また、分子量4-5万に遊離型TFPIの小さなピークを認めた。サルTFPIの分別定量の結果は、マウス、ラットの他の動物に比べ、ヒトのパターンとよく近似していた。

サル6匹における高コレステロール食負荷後のコレステロール値とTFPI活性の変化をみると、高コレステロール食負荷後4週目で、コレステロール値は約3倍に上昇、また、TFPI活性は約1.5倍に上昇した。その後20週までその上昇したレベルが続いていた。高コレステロール血症でのTFPIの変化をゲルfiltrationで検討してみると、LDL/VLDL結合型TFPIのピークが大きく増加していた。一方、他の分画は、負荷後も大きな変化はなかった。

LDL/VLDL結合型TFPIの活性の増加が、蛋白量の増加によるものか、比活性の上昇によるものかを調べるため、EIAにて抗原量の測定を試みた。その結果、高コ

コレステロール血症時に、LDL/VLDL結合型TFPIの活性と抗原量は同程度の比率で増加していた。このことより、この分画において実際にTFPIの蛋白量が増加しているものと判断された。

ヘパリン負荷テストを行うと、血漿TFPIは5倍に増加した。このヘパリン遊離性TFPIについてもゲル濾過を行ってみると、LDL/VLDL分画、HDL分画でもTFPIの増加を認め、内皮から遊離したTFPIがリポプロテインと結合しうることが明らかとなった。また、高コレステロール血症でのヘパリン遊離性TFPIの量を検討してみたが、正常時と比べ有意な変化を認めなかった。

[考察]

サルTFPIの分別定量の結果は、マウス、ラットに比べるとヒトの結果に近似していたが、これは、ヒト、サルとマウス、ラットの間でTFPIやリポプロテインの構造、存在様式に差があることが原因と考えられる。今回の結果より、生体内でのTFPIの動態を検討する場合、その動物種についても考慮すべきであり、サルは動物モデルとして最適であると考えられた。

高コレステロール血症においてTFPI活性が増加したが、これは、LDL/VLDLのリポプロテインが増加するのに伴って、LDL/VLDL結合型TFPIの蛋白量が増加するためであることが明らかとなった。また、その増加したTFPIは内皮細胞結合型TFPIから移行した可能性が考えられた。

内皮細胞結合型TFPIの量を反映すると思われるヘパリン遊離性TFPIの検討では、正常時と高コレステロール血症時で差を認めなかった。この結果は単に数週間の高コレステロール血症があるだけでは、内皮細胞結合型TFPIの量に変動をきたさない事を示唆するものといえる。今後長期的な負荷により、動脈硬化を完成させた時の検討が必要と考えられた。

本研究は高コレステロール血症におけるLDL/VLDL結合型TFPIの増加を中心とする血漿TFPIの動態を明らかにしたものである。動脈硬化性疾患の血栓形成の病態生理を解明する上で、非常に有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。