

# Nicked $\beta$ 2-glycoprotein I と Angiostatin kringle1-4.5の 血管新生に与える影響

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】  $\beta$ 2 Glycoprotein I ( $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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。 $\beta$ 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  $\beta$ 2GPI となる。Nicked  $\beta$ 2GPI は $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 2GPI は plasminogen kringle 5 に結合することから、kringle 5 を有する AS4.5 と nicked  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 2GPI は AS4.5 と結合性を示さなかったのに対し、nicked  $\beta$ 2GPI は AS4.5 と解離定数  $K_D 3.05 \times 10^{-7}$  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  $\beta$ 2GPI は plasminogen と結合する事から、Glu-plasminogen を固相化して液相の nicked  $\beta$ 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  $\beta$ 2GPI と Glu-plasminogen の結合を阻害した。nicked  $\beta$ 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  $\beta$ 2GPI を添加することによ

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、マトリゲルインベージョンチャンバーを用いた。HUVECを $1 \times 10^5$  cell/mlに調整し、細胞混濁液にAS4.5、intact  $\beta$ 2GPIおよびnicked  $\beta$ 2GPIをそれぞれ添加後、8 $\mu$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 2GPIを添加したものは、その管腔形成抑制効果に変化は認められなかったが、nicked  $\beta$ 2GPIを添加したものは、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  $\beta$ 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  $\beta$ 2GPIの機能解析を行った。nicked  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 2GPIはAS4.5と強固に結合した。また、nicked  $\beta$ 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。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	三輪	聡一
副査	教授	川口	秀明
副査	教授	筒井	裕之
副査	教授	玉木	長良
副査	教授	小池	隆夫

学位論文題名

## Nicked $\beta$ 2-glycoprotein I と Angiostatin kringle1-4.5の 血管新生に与える影響

$\beta$ 2 Glycoprotein I ( $\beta$ 2GPI)は prothrombin と並ぶ、抗リン脂質抗体症候群の主要抗原である。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 $\beta$ 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 $\beta$ 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。 $\beta$ 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  $\beta$ 2GPI となる。nicked  $\beta$ 2GPI は $\beta$ 2GPI の主な機能であるリン脂質結合能を失い、血液凝固因子の活性制御能を失うこと、抗原抗体反応が起こらなくなるなど、リン脂質結合能に依存した機能が消失するものと考えられている。nicked  $\beta$ 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  $\beta$ 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。

本研究では plasminogen から生じ、血管新生を抑制する Angiostatin に注目した。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。

本研究は、nicked  $\beta$ 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検討した。AS4.5 と nicked  $\beta$ 2GPI の結合性の有無を検討する目的で Biacore による結合試験を行ったところ、解離定数は  $K_D 3.05 \times 10^{-7}$  であり、plasminogen との結合とほぼ同程度の結合を示した。この結合が血管新生の場において何らか役割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。最初にヒト大動脈血管内皮細胞 (Human Aortic endothelial cell, HAEC) を用いて MTT assay を行った結果、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  $\beta$ 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 HAEC の増殖が確認された。続いて血管内皮細胞の遊走への影響を評価する目的でヒト臍帯血管内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)を用いた Matrigel を使用した一般的な遊走実験を行った。HUVEC をカウントした結果、AS4.5 単独では内皮細胞遊走を阻害したが、nicked  $\beta$ 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  $\beta$ 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 管腔形成実験を行った。11 日間培養し、染色後管腔面積を画像解析にて評価した。nicked  $\beta$ 2GPI は、AS4.5 の管腔形成阻害効果を阻害した。マウスにシリコンプラグを埋め込む in vivo angiogenesis assay においても同様の結果が得られた。

さらに高濃度 nicked  $\beta$ 2GPI は既報のとおり、血管新生抑制効果を有する事を確認した。AS4.5 優位であっても、nicked  $\beta$ 2GPI 優位であっても血管新生抑制に働くが、AS4.5 の存在下では nicked  $\beta$ 2GPI は血管新生を促進する作用を有する、つまり局所における AS4.5 と nicked  $\beta$ 2GPI のバランスが非常に重要であることが示唆された。

生体内における意義としては、血栓部位において線溶系が活性化したとき、plasmin 生成が活発となり、AS4.5 のみならず nicked  $\beta$ 2GPI の生成が促進される。nicked  $\beta$ 2GPI が AS4.5 に結合することにより、AS4.5 のもつ血管新生抑制作用が解除され、増殖や分化などの機能を正常に戻す事、さらには側副血行路の形成を促す可能性があると考えられる。

公開発表に際し、副査の川口秀明教授から、AS4.5 と nicked  $\beta$ 2GPI の相互作用の検出法について、血管内皮細胞増殖因子との関連についての質問がなされた。副査の筒井裕之教授からは AS4.5 と nicked  $\beta$ 2GPI の疾患・病態との関わりについて質問がなされた。副査の玉木長良教授からは動脈血栓および静脈血栓の中での AS4.5 と nicked  $\beta$ 2GPI のバランスについて、既存の血栓系バイオマーカーとの関係性、炎症との関わりについて、また  $\beta$ 2GPI の管腔形成阻害についての質問がなされた。主査の三輪聡一教授からは、AS4.5 の作用機序や治療応用についての質問がなされた。これらに対して申請者は、実験成績と過去の文献を引用し、丁寧かつ適切に回答した。

この論文は、nicked  $\beta$ 2GPI の新たな生理機能を明らかにするとともに、疎血部位の血管新生を促進する可能性を示したものであり、今後更なる解析により血栓傾向を示す疾患の治療に応用できるものとして期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。