



Thrombolytic effect of pro-urokinase in vitro

板東, 博志

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1988-08-24

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1199

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001199>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 板 東 博 志 (徳島県)
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 医博ろ第1007号
 学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当
 学位授与の日付 昭和63年8月24日
 学位論文題目 Thrombolytic Effect of Pro-Urokinase in vitro
 (プロウロキナーゼのin vitroでの血栓溶解能)

審査委員 主査 教授 福崎 恒
 教授 中村和夫 教授 山口延男

論文内容の要旨

[緒言]

プロウロキナーゼ (Pro-UK) はウロキナーゼ (UK) の前駆体で1本鎖であり、プラスミンにより限定分解を受けて2本鎖のUKとなり酵素活性を生じる。Pro-UKはUKと異なりフィブリノーゲンに親和性があるため、Pro-UKの活性化反応はフィブリノーゲンという固相上で生じると考えられる。また組織性プラスミノーゲンアクチベータ (t-PA) もフィブリノーゲンに親和性があり、Pro-UKの作用機序に関与していると考えられる。本研究ではPro-UKの血栓溶解作用は、フィブリノーゲン上においてt-PAとプラスミノーゲンよりプラスミンが生じ、このプラスミンがPro-UKを活性化し、線溶活性を生じることを明らかにした。

[方 法]

Pro-UKはヒト腎細胞培養液よりCM-セファデックスC-50及び抗UK抗体セファロースを用いて精製した。

1. Pro-UKの分子的解析

Laemmliの方法でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない、精製度及び分子量を求めた。また松尾らの方法でenzymographyを行ないプラスミノーゲンアクチベータ活性の有無を調べた。

2. プラスミンによるPro-UKの活性化

Pro-UKをプラスミンセファロースカラムにapplyし、各フラクションのUK活性を発色性合成基質S-2444にて測定した。

Pro-UKの [³H] ジイソプロピルフルオロホスフェイト (DFP) の取り込みを、プラスミン

処理前後にて調べた。また Pro - UK の立体構造を円偏光二色性解析 (CD) にて検討した。

3. フィブリン親和性

Pro - UK のフィブリンに対する親和性をフィブリンセファロースカラムへの吸着性を用いて測定し、さらに UK との比較も行った。またフィブリノーゲンがフィブリンに転換する際の Pro - UK の取り込み率を UK と比較した。

4. Pro - UK の血栓溶解能

^{125}I - フィブリノーゲンを含む血漿をトロンビン - CaCl_2 により凝固させて作製した標識血栓を Pro - UK または UK を含む血漿中で incubate し、放出される ^{125}I により血栓溶解率を求めた。フィブリノーゲンの分解率も測定した。同様の実験系で血栓内に t - PA を添加した場合の血栓溶解能を検討した。さらに血漿中に t - PA を添加した場合の Pro - UK あるいは UK の血栓溶解能を検討した。

5. フィブリン上での Pro - UK の血栓溶解機序

フィブリンセファロースカラムに Pro - UK, プラスミノーゲン, t - PA を順に apply した後、溶出させたフラクション中のプラスミン活性及び UK 活性の有無を調べた。

〔結 果〕

1. Pro - UK の分子的解析

Pro - UK は SDS - PAGE では単一バントに精製されており、分子量は 50,000 Da であった。また還元状態及び非還元状態ともに単一バントを認め 1 本鎖の蛋白であった。Enzymography により分子量 50,000 Da の位置にバンドが認められ、Pro - UK はプラスミノーゲンアクチベータの一種と考えられた。

2. プラスミンによる Pro - UK の活性化

Pro - UK をプラスミンセファロースカラムに通過させると UK 活性が生じた。またプラスミン処理により DFP の取り込みが 70 倍に増加し、Pro - UK の活性化が示された。CD による解析では Pro - UK の活性化により立体構造の変化が観察された。

3. フィブリン親和性

Pro - UK はフィブリンセファロースに吸着したが、Pro - UK が活性化されて UK となると親和性が消失していた。一方 UK はカラムに吸着しなかった。またフィブリン塊への吸着からも Pro - UK が UK よりフィブリン親和性のあることが示唆された。

4. Pro - UK の血栓溶解能

血栓溶解率は 100 IU / ml の濃度では Pro - UK は UK より優れていた。200 IU / ml では UK の方が迅速に血栓溶解作用を発揮したが最終的な血栓溶解率は類似していた。フィブリノーゲンの分解は UK の方が亢進していた。

次に血栓中に t - PA が存在する場合の血栓溶解率は、UK では変化が認められなかつたが、Pro - UK では有意に増加した。

一方、血栓を沈下した血漿中に Pro - UK または UK の他に少量の t - PA を加えた場合も、UK では t - PA 添加により 4 時間後で 10% しか血栓溶解率は増加しなかったが、Pro - UK では t - PA 添加により 2 時間後には 20% も血栓溶解率が増加した。

5. フィブリン上での Pro - UK の血栓溶解機序

フィブリンセファロースに UK, プラスミノーゲン, t - PA を順に apply した場合は溶出分画にはプラスミン活性はなく、UK を apply した直後のフラクションに UK 活性が存在した。一方、Pro - UK, プラスミノーゲン, t - PA を apply した場合は溶出分画にプラスミン活性及び UK 活性が存在し、フィブリン上で Pro - UK が t - PA により活性化された事が示唆された。

〔考 察〕

Pro - UK は高分子 UK の前駆体で 1 本鎖である。本研究に用いた Pro - UK はヒト腎臓から樹立された細胞株の培養液から精製したもので、分子量 50,000 の 1 本鎖糖蛋白で DFP の取り込みがみられず、逆にフィブリンに対する親和性を有していた。このようなフィブリン親和性は、Pro - UK がプラスミンにより UK に変換されると消失したことから、立体構造に由来すると考えられた。一方、フィブリン親和性を有しないヒト肺線癌由来 Pro - UK も報告されているが、本研究に用いた Pro - UK は UK よりも高いフィブリン親和性が存在した。

Pro - UK の血栓溶解能は t - PA の存在により有意に増強された。特に t - PA が血漿中に存在する時に血栓溶解能が増強されていた。この結果よりフィブリン上では t - PA がプラスミノーゲンを活性化し、生じたプラスミンが Pro - UK を UK に変換する。そこでフィブリンに結合しているプラスミノーゲンが UK によりプラスミンになり、フィブリンを分解すると考えられる。このプロセスは、フィブリンセファロースを用いた実験にても明らかになった。

〔結 語〕

ヒト腎細胞培養より得られた Pro - UK は t - PA によりフィブリン上で血栓溶解作用を生じるため、血栓溶解剤としては合目的的であることが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

心筋梗塞における血栓溶解療法は、積極的に梗塞巣の大きさの縮小化をはかる治療法として高く評価されている。しかし、副作用としての出血を防止すると共に静脈内投与を可能とするため、従来のストレプトキナーゼ (SK) やウロキナーゼ (UK) などに代り組織プラスミノーゲンアクチベーター (t - PA) やプロウロキナーゼ (Pro - UK) に大きな期待が寄せられている。

本申請者は、このような観点から、Pro - UK の血栓溶解能を基礎的に検討評価する目的で本実験的研究を実施した。

[方法と結果]

- (1) Pro - UK はヒト腎細胞培養液より CM セファデックス C - 50 及び抗 UK 抗体セファロースを用い精製した。その分子的解析の結果分子量 50,000 Da の 1 本鎖蛋白であることが認められると共に、プラスミノーゲンアクチベーターの 1 種と考えられた。
- (2) Pro - UK をプラスミンセファロースカラムを通過させると UK 活性が生じることよりプラスミンによる Pro - UK の活性化が示された。
- (3) フィブリノーゲンセファロースカラムへの吸着性の検討から、Pro - UK は UK と異なりフィブリノーゲンに対する親和性を有することが示された。
- (4) ^{125}I で標識した血栓を作製し、Pro - UK と UK の血栓溶解能を比較し、前者が後者より優れていることを明らかにした。一方、フィブリノーゲンの分解は UK の方が強いことを認めた。更に、t - PA 添加の Pro - UK 及び UK の血栓溶解能への影響を検討し、Pro - UK では UK と比べ血栓溶解率が明らかに増大するのが認められた。
- (5) フィブリノーゲンセファロースカラムに Pro - UK, プラスミノーゲン, t - PA を順に apply して観察したところ、フィブリノーゲンの上で Pro - UK が t - PA により活性化されることが示された。

以上の成績より、フィブリノーゲン上で t - PA がプラスミノーゲンを活性化し、そこで生じたプラスミンが Pro - UK を UK に変化させ、その結果、フィブリノーゲンに結合しているプラスミノーゲンが UK によりプラスミンになりフィブリノーゲンを分解することが示唆された。そこで、本研究は、Pro - UK がフィブリノーゲン上で血栓溶解作用を営むことを示し、血栓溶解剤として合目的作用を有することを立証するもので、本剤の心筋梗塞その他の血栓性疾患における有用性を支持するもので価値ある集積とみなされる。依って、本申請者は医学博士の学位を得る資格を有するものと認めた。