

SHRSP の脳, 腎臓および肝臓組織中の線溶系因子

上嶋 繁 岡田清孝 深尾偉晴
高石知明 松尾 理

近畿大学医学部第2生理学教室

抄 録

脳卒中の発症におよぼす血液線溶系の変化を検討するために, 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) と Wister Kyoto rat (WKY) の脳, 腎臓および肝臓組織抽出液中の plasminogen activator (PA) 活性と PA inhibitor (PAI) 活性を測定した. SHRSP の脳と腎臓組織中の PA 活性は, それぞれ WKY の1.5倍と2.9倍であったが, 肝臓組織中における SHRSP の PA 活性は WKY の1/1.5であった. また, 脳と腎臓組織中の PAI 活性は WKY の方が SHRSP よりもそれぞれ1.2倍強かった. 脳組織中に認められた PA 活性は tissue-type PA (t-PA) 由来であり, 腎臓と肝臓組織中に認められた PA 活性は t-PA と urokinase-type PA (u-PA) 由来であった. さらに, 脳および腎臓組織中の PAI 活性は PAI-1 に由来し, 肝臓組織中の線溶阻害活性は α_2 -PI であることが明らかになった. WKY よりも SHRSP の脳組織中において線溶系の活性化が強く, これが SHRSP の脳卒中易発症に関与するものと考えられた.

Key words: SHRSP, WKY, fibrinolysis, plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor

緒 言

血液線溶系は plasminogen activator (PA) が plasminogen を plasmin に活性化し, 酵素活性を有する plasmin が血栓の主要成分である fibrin を溶解する系である¹. この PA には血管内皮細胞が分泌する tissue-type PA (t-PA) と尿由来の urokinase-type PA (u-PA) がある. また, 血液中には plasmin 活性を阻害する α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -PI)² や PA 活性を阻害する PA inhibitor (PAI)³ が存在しており, 血液線溶系を制御している.

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP)^{4,5} において, 脳卒中の発症には高血圧だけでなく血液成分の生化学的変化, すなわち血液の凝固系または線溶系の変化が重要な役割を果たしていると考えられる. そこで対照として Wister Kyoto rat (WKY) を用いて SHRSP の各組織中の血液線溶系の変化を検討した. 特に, 脳卒中を引き起こす脳組織, u-PA と関係の深い腎臓組織および蛋白質合成をつかさどる肝臓組織中における PA と PAI について SHRSP と WKY で比較した.

材料および方法

SHRSP, WKY とともに生後4-48週齢の雄性ラットを用いた. ラットの脳, 腎臓および肝臓はペントバルビタール (50 mg/Kg) の麻酔下で摘出し生理食塩水で充分洗浄後, 0.15 M KCl を含む50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイトした. そして, 各組織抽出液は遠心分離により調整した. t-PA はヒト melanoma 細胞 (Bowes 株) 培養液から, 一本鎖 u-PA (scu-PA) はヒト腎細胞培養液から, 二本鎖 u-PA (tcu-PA) はヒト尿から, PAI-1 はヒト繊維芽細胞 (HT 1080) から, さらに plasminogen はヒト血漿からそれぞれ精製して用いた. t-PA, u-PA および PAI-1 に対する抗体はウサギを用いた常法により作製した.

PA 活性は plasminogen と, plasmin に対する合成基質 (S-2251) を用いた方法および, t-PA や u-PA に対する合成基質 (S-2288, S-2444) を用いて測定した⁶. PAI 活性は検体と u-PA または t-PA を 37°C, 30分間反応後, 上記 PA 活性測定法により残存 PA 活性を測定し, 用いた PA 1U を抑制する量を PAI 1U として算出した. 各組織抽出液中の PA と PAI の分子量を決定するために PA はさら

に硫酸分画, Zn chelate-Sepharose および Concanavalin A-Sepharose affinity chromatography を行なって精製した。また PAI はさらに硫酸分画, 酸処理, DEAE cellulose および anti-PAI-1 IgG-Sepharose column を用いた chromatography を行なって精製した。精製 PA は fibrin と plasminogen を含んだ SDS-PAGE 用ゲルにて電気泳動後, fibrin の溶解バンドを観察する enzymography⁷ 法にて解析した。また, 精製 PAI-1 は SDS-PAGE 後, u-PA と plasminogen を含む fibrin-agarose gel に転写させ, fibrin 溶解阻害バンドを観察する reverse fibrin autography⁸ 法にて解析した。

結果と考察

脳と腎臓の組織抽出液中 PA 活性および PAI 活性は波長 280 nm の吸光度で評価した蛋白質濃度あたりの活性量で比較した。また肝臓組織中の PA 活性は等量の抽出液中の活性量で比較した (表 1)。

脳組織抽出液中の PA 活性は, 以前に我々が報告⁹ したように, SHRSP (0.169 IU/A280) の方が WKY (0.112 IU/A280) の 1.5 倍高値を示した。また, 脳組織抽出液より精製された PA は SHRSP, WKY とともに分子量が約 72,000 の t-PA であることを enzymography 法および抗 t-PA 抗体により PA 活性が消失したことから確認した。WKY の脳組織抽出液中 PAI 活性は 0.55 IU/A280 であり SHRSP の脳組織抽出液中 PAI 活性 (0.47 IU/A280) の 1.2 倍であった。

Reverse fibrin autography 法と抗 PAI-1 抗体により PAI 活性が消失したことより, 脳組織抽出液中に存在する PAI は分子量が約 40,000 の PAI-1 であることが明らかとなった。

WKY と SHRSP の脳組織中には t-PA と PAI が存在していたが, WKY の場合と比較して SHRSP の方が高 PA 活性, 低 PAI 活性を示した。したがって WKY よりも SHRSP の脳組織中において線溶系の活性化が強く, これが SHRSP の脳卒中易発症性に関与するものと考えられた。

腎臓組織抽出液中の PA 活性は SHRSP (0.179 IU/A280) の方が WKY (0.060 IU/A280) の 2.9 倍高値を示し, PAI 活性においては WKY (0.13 IU/A280) が SHRSP (0.11 IU/A280) よりも 1.2 倍高い値を示した。これより, 脳組織の場合と同様, 腎臓においても SHRSP の線溶系の活性化が WKY よりも強いことが示唆された。

両ラットの腎臓組織中の PA 活性は t-PA と u-PA に由来することが enzymography 法とそれぞれの抗体による活性の消失より明らかとなった。しかし, 量的には t-PA が u-PA よりも多く存在しており, 腎臓は尿中に大量の u-PA を分泌しているものの, t-PA がその組織局所における線溶系の調節に重要な役割を担っているものと考えられた。さらに, 両ラットの腎臓組織中の PAI 活性が PAI-1 に由来することが reverse fibrin autography 法と抗 PAI-1 抗体による PAI 活性の消失より明らかになった。

肝臓抽出液中の PA 活性は WKY (26.8 IU) の方が SHRSP (18.5 IU) よりも約 1.5 倍高かった。一方, 脳および腎臓組織中の PA 活性は WKY よりも SHRSP の方が 1.5--2.0 倍高値であったことから両ラットの組織間での線溶活性に差が存在すると思われた。ラットの肝臓組織中に t-PA が存在することは既に報告^{10,11} されており, 今回の実験においてもラットの肝臓組織中の PA 活性が t-PA と u-PA に由来することが enzymography 法とそれぞれの抗体による活性の消失により確認された。また, ラット肝臓組織中の線溶阻害物質を reverse fibrin autography 法にて検討したところ, 分子量約 70,000 に線溶阻害活性バンドが認められた。この線溶阻害活性バンドは酸処理により消失したことから α_2 -PI であると思われた。

文 献

- Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. *Thrombs Haemost* 1980; 43: 77-89.
- Moroi M. Aoki N. Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma. *J Biol Chem*

表 1 WKY と SHRSP の脳, 腎臓および肝臓組織抽出液中の PA と PAI 活性

	PA 活性		PAI 活性	
	WKY	SHRSP	WKY	SHRSP
脳 組 織	0.112 IU/A280	0.169 IU/A280	0.55 IU/A280	0.47 IU/A280
腎 組 織	0.060 IU/A280	0.179 IU/A280	0.13 IU/A280	0.11 IU/A280
肝 臓 組 織	26.8 IU	18.5 IU	—	—

各組織抽出液中の PA 活性および PAI 活性は合成基質を用いて測定した。脳と腎臓の組織抽出液中 PA 活性および PAI 活性は波長 280 nm の吸光度で評価した蛋白質濃度あたりの活性量で表現した。また肝臓組織中の PA 活性は等量の抽出液中の活性量で表現した。

1976 ; 251 : 5956-5965.

3. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987 ; 69 : 381-357.

4. Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka A. Establishment of the stroke prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ Res* 1974 ; 34/35(suppl) : 143-153.

5. Okamoto K, Hazama F, Yamori Y, Haebbarb H, Nagaoka A. Pathogenesis and prevention of stroke in spontaneously rat. *Clin Sci Mol Med* 1975 ; 48 : 161-163.

6. Randy M, Norrman B, Wallen P. A sensitive assay for tissue plasminogen activator. *Tromb Res* 1982 ; 27 : 743-749.

7. Matsuo O, Sakai T, Bando H, Okada K, Nakajima S, Takagi O, Izaki S. Plasminogen activator in bronchoalveolar fluid. *Haemostasis* 1986 ; 16 : 43-50.

8. Erickson LA, Lawrence DA, Loskutoff DJ. Reverse fibrin autography ; A method to detect and partially char-

acterize protease inhibitors after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1984 ; 120 : 43-49.

9. Matsuo O, Okada K, Fukao H, Suzuki A, Ueshima S. Cerebral plasminogen activator activity in spontaneously hypertensive strokeprone rats. *Stroke* 1992 ; 23 : 995-999.

10. Quax PHA, Van den Hoogen M, Verheijen JH, Padro T, Zeheb R, Gelehrter TD, Van Berkel TGC, Kuiper J, Emeis JJ. Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rat tissues in vivo. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 15560-15563.

11. Seki T, Watanabe K, Saitou K, Ariga T. Purification and characterization of hepatic plasminogen activator (h-PA) in the conditioned medium of rat hepatocytes in primary culture. *Biosci Biotech Biochem* 1993 ; 57 : 1369-1371.