

氏 名 (本籍) あい かわ じゅん いち ろう
相 川 純 一 郎

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 9 4 8 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 1 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 ブ タ 胸 部 大 動 脈 由 来 の コ ン ド ロ イ チ ン 硫 酸 プ ロ テ
オ グ リ カ ン と そ の 抗 血 液 凝 固 活 性 に つ い て

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 多 田 啓 也 教 授 今 野 多 助

教 授 林 典 夫

論 文 内 容 要 旨

本研究の目的は、ブタ胸部大動脈からコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを分離・精製し、アンチトロンビンⅢとヘパリンコファクターⅡを介した抗血液凝固活性の有無を検討し、抗体を作製して、その組織学的分布を調べる事である。

ブタ胸部大動脈（内膜と中膜）から、蛋白分解酵素阻害剤存在下、3M塩化マグネシウムを含む酢酸緩衝液（PH 5.6）でプロテオグリカンを抽出した。次いで、このPG画分を、DEAE-セルロースクロマトグラフィー、セファロースCL-4Bを用いたゲルろ過法で分画し、さらに、ATⅢ-アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、す通り画分(PG-IA)と結合画分(PG-IB)にわけ、2種類のコンドロイチン硫酸PGを得た。セファロースCL-2Bを用いたゲルろ過でPG-IAとPG-IBは均一な分子サイズ分布を示し、それらのプロナーゼ消化によって得られたGAG鎖も、セファロースCL-4Bを用いたゲルろ過で均一な分子サイズをもつ事がわかった。さらにMcDevitteとMuirらの方法によるアガロース・ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、トルイジンブルー染色でPG-IAとPG-IBはほぼ単一のバンドを与えた。またPG-IBはPG-IAに比し、分子量が大きく、また多糖鎖に対して蛋白部分が多く、より大きなコンドロイチン硫酸鎖をもつ事もわかった。

次にヒト血漿から常法に従いアンチトロンビンⅢを精製し、以下の実験に使用した。ATⅢを介する抗血液凝固活性では、PG-IBがPG-IAよりもトロンビン、Xa因子の何れに対してもより強かった。その際PGは、トロンビンやXa因子に直接作用するのではなく、ATⅢとの相互作用があって、はじめて活性を発現することが明らかになった。一方、対照として用いた軟骨のPGは全く活性を示さなかった。そこでPG-IBとPG-IAをプロナーゼで消化しコア蛋白を分解したり、コンドロイチナーゼACやABCで多糖部分を分解すると、PGの抗血液凝固活性は全く消失または著明に低下した。またATⅢ-アガロースを用いた結合実験から、GAG鎖としてPG-IAとPG-IB由来のものは、カラムによく結合するが、プロテオグリカンになると結合性が非常に少なくなり、コア蛋白が阻害的に作用している事も明らかとなった。次にTollefsenらの方法をmodifyして、硫酸分画、ヘパリンカラムとDEAE-セルロースを用いたカラムクロマトグラフィーにより、ヒト血漿からヘパリンコファクターⅡを分離精製して以下の実験に用いた。HCⅡを介する抗血液凝固活性でも、PG-IBはPG-IAよりも強い阻害活性を示した。しかし、ATⅢを介する場合と異なり、HCⅡはトロンビンにのみ特異性を示した。またPGは、この場合もトロンビンに直接作用するのではなく、HCⅡとの作用を通じて、トロンビンの阻害活性を発現することが明らかになった。その阻害活性は、ヘパリンよりも

弱かったが、ブタ皮膚由来のデルマトン硫酸とウロン酸当りで同程度の強さを示した。プロナーゼ消化でコア蛋白を分解しても、活性に変化は認められなかったが、コンドロイチナーゼACやABCで多糖鎖を分解すると活性が消失した事から、HCIIを介する活性はGAG鎖にのみ依存するものとみなされた。また、PG-IBにはデルマトン硫酸性の4糖がハイブリッドとしてコンドロイチン硫酸鎖に含まれており、それを含んだ構造が活性に関係している可能性が示唆された。また4糖のみでは抗血液凝固活性は出現しないこと、4糖の構造として、 $\Delta U-GalNAc(6S)-IdU-GalNAc(4S)$ の構造もしくは $\Delta U-GalNAc-(4S)-IdU-GalNAc(4S)$ の構造をもつ可能性が考えられた。さらに他組織由来のコンドロイチン硫酸鎖（多硫酸化物を除く）ではHCIIを介した抗トロンビン活性を示さなかったため、コンドロイチン硫酸鎖のハイブリッド性が組織特異性を示す可能性も考えられた。

ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼ消化実験から、これらのPGの抗血液凝固活性が少量のヘパリンやヘパラン硫酸の混在にもとづくものでないことも明らかとなった。

PGをウサギの皮下に反復注射する事で、PGに対する抗血清を作製した。抗血清の力価はポリスチレンチューブを用いたELISA法で検定した。またcompetitive inhibitionを用いたELISA法で、抗血清がGAG鎖に対する抗体ではなく、コア蛋白に対する抗体を含む事、PG-IAとPG-IBが免疫学的に異なる抗原性をもつ事、牛肋軟骨由来のPGとは反応しない事などを明らかにした。また、zeta-プローベ膜を用いたWestern blottingを行ない、PG-IAとPG-IBが免疫学的に交差しない事を確認した。

ブタ胸部大動脈を蛍光抗体法で染めると、外膜は染まらず、中膜はびまん性に、内膜は内皮直下から内弾性板が濃染し、PGが密に分布していることが明らかとなった。PG-IAとPG-IBはほぼ同様の分布を示した。

審査結果の要旨

本研究は、ブタ胸部大動脈からコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (PG) を分離・精製し、その抗血液凝固活性を調べる目的で行なわれた。ブタ胸部大動脈 (内膜と中膜) から蛋白分解酵素阻害剤存在下 3 M 塩化マグネシウムを含む酢酸緩衝液でプロテオグリカンを抽出し、さらに DEAE セルロースクロマトグラフィー、セファロース CL-4B を用いたゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等の手法により 2 種類のコンドロイチン硫酸 PG を得た。PG-IB は PG-IA に比し分子量が大きく、また多糖鎖に対して蛋白部分が多く、より大きなコンドロイチン硫酸鎖を持っていた。

AT III を介する抗血液凝固活性では、PG-IB が PG-IA よりもトロンビン、Xa 因子の何れに対しても強力であった。一方対照として用いた軟骨の PG は全く活性を示さなかった。PG-IB と PG-IA をプロナーゼで消化しコア蛋白を分解したり、コンドロイチナーゼ AC や ABC で多糖体部分を分解すると、PG の抗血液凝固活性は全く消失または著明に低下した。

次に HC II を介する抗血液凝固活性に於ても PG-IB は PG-IA より強力であった。しかし AT-III を介する場合と異なり、HC II はトロンビンにのみ特異性を示した。プロナーゼ消化でコア蛋白を分解しても活性に変化は認められず、コンドロイチナーゼ AC や ABC で多糖体鎖を分解すると活性は消失した。したがって HC II を介する活性は GAG 鎖にのみ依存するものとみなされた。また PG-IB にはデルマトン硫酸性多糖がハイブリッドとしてコンドロイチン硫酸鎖に含まれており、それを含んだ構造が活性に関係している可能性が示唆された。

PG に対する抗血清に含まれている抗体はコア蛋白を認識するものであり、PG-IA と PG-IB が異なる抗原性を持つことが示された。また、ブタ胸部大動脈を蛍光抗体法で深めると、内皮直下から内弾性板が濃染し、PG が此の部分に密に分布していることが明らかにされた。

以上の研究は、ブタ胸部大動脈由来のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの抗血液凝固活性に関して新知見を得たものであり、医学博士の授与に値するものと判定された。