HDL の線溶系活性化作用について*

朔 啓二郎** 荒 川 規矩男** Masood AHMAD***
Pia GLAS-GREENWALT*** Moti L. KASHYAP***

I. はじめに

血液線溶系の活性化は plasminogen (Pgen) が種々の活性化因子、生理的には tissue type plasminogen activator (TPA) 等により、plasmin (PI) に転換されて誘起される¹⁾。この血液線溶系に血中脂質がどのように関与するかについての報告は少

なく、過去の臨床データとして、高脂血症患者(食餌性も含む)に線溶能低下を認めたという報告がいくつかあるにすぎない^{2,3)}。今回、われわれは抗動脈硬化因子といわれる HDL に焦点をしぼり、その血液線溶系に及ぼす影響を in vitro で検討したので報告する。

Fig. 1 Effects of addition of VLDL, LDL, HDL and lipoprotein deficient plasma (d > 1.21 g/ml) on fibrinolysis by fibrin plate method.

* 1986年1月、日本動脈硬化学会 昭和60年度冬季大会において発表
** 福岡大学医学部第二内科
*** シンシナティ大学医学部内科

Fig. 2 A: Effect of addition of apo A-I on the time course of hydrolysis of S-2251 by urokinase activated plasminogen.
B: Effects of addition of apo A-I, apo HDL₂ and apo HDL₃ on hydrolysis of S-2251 by urokinase activated plasminogen.

II. 材料および方法

1. 試薬

Fibrinogen (bovine plasminogen-free または plasminogen-rich) は Organon Teknika 社, bovine thrombin は Park Davis 社, urokinase は Abbott Lab, plasminogen は Sigma Chemical 社, S-2251 は Kabi Vitrum 社より購入した。

2. リポ蛋白分離およびアポ蛋白精製

健常女性 (45 歳) より早朝空腹時採血し, 血漿を分離した。VLDL, LDL, HDL, HDL₂, HDL₃ の各リポ蛋白分画は超遠心法により以前述べた

方法で分離し⁴⁾, EDTA buffer (0.05 M sodium diethyl barbiturate, 0.1 M NaCl, 2.7 mM EDTA, 1.5 mM NaN₃, pH 7.8) にて透析した。アポ蛋白 (apo) A-I は HDL 脱脂後, preparative isoelectric focusing を用い精製した⁴⁾。

3. 線溶能 assay

1) Fibrin plate 法^{5,6)}

プラスチックシャーレ (15×100 mm) に 6 ml の bovine (plasminogen-rich) fibrinogen solution (最終濃度 0.1%) を入れ, 0.2 ml の bovine thrombin (20 NIH unit/ml) を加え, fibrin plate を作製した。検体 (リポ蛋白または control buffer, 80 μl)

は, urokinase (UK) (10 CAT units/ml, 40 μ l) と混合後, 30 μ l を plate に apply し, 37°C で17時間 incubate 後の lysis area (mm²) を測定した。Lysis area の大きさにより検体の plasminogen activation に及ぼす影響を観察した。

2) Chromogenic substrate (S-2251) を用いた assay 法⁷⁾

Plasmin および UK activated plasminogen に対する chromogenic substrate S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) (3.5 mmol/l, 70 μ l), plasminogen (0.06 units/ml, 200 μ l), UK (50 CAT unit/ml, 70 μ l) および検体(アポ蛋白または control buffer, 70 μ l) を混合後, 37°C で incubate し, 遊離した pNA を 405 nm で経時的に測定し, 検体の plasminogen activation に及ぼす影響を観察した。

III. 結 果

1. Fibrin plate 法

Control として buffer を用いた際の lysis area (mm²) の平均を 100% とし, lysis area の変化を percent で表示した (Fig. 1)。HDL の著明な線溶活性化作用と d>1.21 g/ml 分画の抑制作用を認めた。

2. S-2251 を用いた assay 法

Figure 2A に示すごとく HDL の主蛋白 apo A-I の著明な線溶活性化作用を認めた。Fig. 2B に apo A-I, apo HDL₂, apo HDL₃ の線溶能に及ぼす作用の比較を示した。

IV. 考 察

線溶は血管内皮細胞由来の plasminogen activator により誘起される局所的反応であるが, apo

A-I が生体内でどのようなメカニズムで働きかけているかについては不明である。しかし, HDL の主蛋白である apo A-I が urokinase-plasminogen interaction を活性化する役割を演じていることは上記実験より推察できる。Apo A-I の主な生理作用である reverse cholesterol transport に加え, このような血栓症防止作用が in vivo でも実動しているなら, HDL は動脈硬化症発症の防御因子として二重の役割を果たしている可能性を示唆するものである。

文 献

- 1) Collen, D.: On the regulation and control of fibrinolysis. *Thrombos. Haemostas.*, **43**: 77-89 (1980).
- 2) O'Brien, J. R.: Blood coagulation before and after a fatty meal in patients with coronary-artery disease and in healthy controls. *The Lancet*, **I**: 410-412 (1958).
- 3) Spottl, F., Holzknecht, F., and Braunsteiner, H.: Inhibitors of the plasminogen-activation in patients with primary "carbohydrate-induced" hypertriglyceridemia. *J. Atheroscler. Res.*, **8**: 821-826 (1968).
- 4) Saku, K., Gartside, P. S., Hynd, B. A. and Kashyap, M. L.: Mechanism of action of gemfibrozil on lipoprotein metabolism. *J. Clin. Invest.*, **75**: 1702-1712 (1985).
- 5) Haverkate, F. and Brakman, P. In: *Progress in chemical fibrinolysis and thrombosis*. J. F. Davidson, M. M. Samama, and P. C. Desnoyers (ed.), vol. 1, p. 151, Raven Press, New York (1975).
- 6) Glas-Greenwalt, P., Kant, K. S., Allen, C. and Pollak, V. E.: Fibrinolysis in health and disease: severe abnormalities in systemic lupus erythematosus. *J. Lab. Clin. Med.*, **104**: 962-976 (1984).
- 7) Takada, A., Urano, T. and Takada, Y.: Influence of coagulation on the activation of plasminogen by streptokinase and urokinase. *Thrombos. Haemostas.*, **42**: 901-908 (1979).

Summary

Apolipoproteins of Human High Density Lipoproteins Activate Fibrinolysis

Keijiro SAKU*, Kikuo ARAKAWA*, Pia GLAS-GREENWALT**,
Masood AHMAD** and Moti L. KASHYAP**

*The Second Department of Internal Medicine,
Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-01, Japan

**Department of Internal Medicine,
University of Cincinnati Medical Center, Cincinnati, OH 45267 U.S.A.

The effects on fibrinolysis of purified normal human high density lipoproteins (HDL) and their apolipoproteins (apo) were assessed in an in vitro system containing urokinase, plasminogen and fibrin. HDL significantly increased lysis area of plated fibrin compared to controls. The hydrolysis of a chromogenic substrate (S-2251: H-D-Val-Leu-Lys-pNA) specific to plasmin or urokinase activated plasminogen was higher in the presence of

apo A-I, apo HDL₂, and apo HDL₃. These data suggest that the major protein of HDL—apo A-I—and possibly certain minor apo constituent(s) of HDL may participate in the fibrinolytic process and propose a new function for HDL.

Key words: Fibrinolysis, Urokinase, Plasminogen, Chromogenic substrate (S-2251), High density lipoproteins, Apolipoprotein A-I.