血小板の活性化と血液凝固 —AT Ⅲ/heparin 抵抗性酵素の活性化—

鈴木 宏治* 西岡 淳二* 橋本仙一郎*

Contributions of platelets to blood coagulation —Activation of the zymogen of antithrombin Ⅲ/ heparin resistant enzyme in platelet-rich plasma—

Koji SUZUKI*, Junji NISHIOKA* and
Senichiro HASHIMOTO*

Key words: blood coagulation, platelet activation,
serine protease, antithrombin Ⅲ

This report shows the presence of an unidentified enzyme zymogen which is activated by thrombin generated accompanied by platelet activation. This enzyme cleaved a synthetic fluorogenic substrate, Boc-Leu-Ser Thr-Arg-MCA, and was not inhibited by antithrombin Ⅲ/heparin. The activation of the zymogen occurred by the addition of Ca^{2+} (5—20 mM) into platelet-rich plasma (PRP), but not platelet-poor plasma (PPP). Thrombin (0.4 U/ml) facilitated the activation of the zymogen in PRP, but little in PPP. The activation of the zymogen depended on platelet count in plasma. Inhibitors for platelet activation, C-AMP and EDTA inhibited the activation of the zymogen in proportion to its concentration. Hirudin (10 U/ml) prolonged the lag time for the appearance of this enzymatic activity after Ca^{2+} addition, and antithrombin Ⅲ/heparin or DAPA, a specific inhibitor for thrombin, obviated the activation of the zymogen completely. Although both normal and prekallikrein deficient human plasma containing washed platelets could generate the noticed enzymatic activity after addition of Ca^{2+} , the physiological buffer containing washed platelets could not. The enzyme was inhibited by benzamidine, DFP, DAPA and partially by hirudin, neither by anti-prothrombin-IgG, anti-protein C-IgG nor protein C inhibitor. These results indicate that the enzyme resistant to antithrombin Ⅲ/heparin and similar to thrombin in substrate specificity may differ from the already known active coagulation factors, plasma kallikrein and protein C, and that this enzyme zymogen could be activated by abundant thrombin generated accompanied by platelet activation.

* 三重大学医学部検査医学〔〒514 津市江戸橋 2-174〕; Department of Laboratory Medicine, Mie University School of Medicine, Mie, Japan.

はじめに

血小板の活性化(凝集, 放出)反応に伴い, 凝固系 FXII, FXI, FX, prothrombin などが著しく活性化される¹⁻⁴⁾. 本論文ではヒト血漿中で血小板の活性化に伴い, antithrombin III (AT III)/heparin 抵抗性の thrombin 様酵素が新たに活性化されることについて述べる.

I. 材料および方法

多血小板血漿 (PRP), 無血小板血漿 (PPP) は正常ヒト新鮮血から遠心分離により調製した. ヒト thrombin⁵⁾, FX⁵⁾, AT III⁶⁾, protein C⁷⁾および protein C inhibitor⁸⁾は既報に従い精製した. 抗 protein C 抗体, 抗 prothrombin 抗体, DAPA [dansylarginyl-N(3-ethyl-1,5-pentaedyl) amide]⁹⁾は自家調製した. C-AMP, aspirin, hirudin, heparin, DFP, benzamidine は市販品を用いた. FXa, thrombin 活性はそれぞれ Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA, Boc-Val-Pro-Arg-MCA (ペプチド研)を用いて測定した. 血小板の活性化に伴い現れる AT III/heparin 抵抗性酵素の活性は以下の如く測定した. 37°C にて PRP および PPP に CaCl₂ (10 mM) または CaCl₂ (10mM)+thrombin (0.4 U/ml) を添加し, 種々の反応時間後, AT III (30 μ g/ml) heparin (6 U/ml) を添加した. 続いて反応溶液中の酵素活性を Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA¹⁰⁾ (ペプチド研) 分解活性として測定した.

II. 結 果

PRP への CaCl₂ または CaCl₂+thrombin の添加により, 大量の AT III (最大 300 μ g/ml)/heparin (最大 20 U/ml) で阻害されない酵素活性が出現した (図 1-a). 本酵素の活性化までの lag time は thrombin 併用添加により短縮された. PPP では CaCl₂+thrombin 添加の場合のみ微量の酵素活性が認められた. 本酵素活性の出現は血漿中の血小板数に依存して認められた (図 1-b). 本酵素の活性化は EDTA 存在下では認められず, 5~20 mM の Ca²⁺ イオンが必要であるが, 活性化酵素は Ca²⁺ イオンと関係なく基質を分解した. 3 回洗浄血小板を

Fig. 1-a Activation of the unidentified enzyme zymogen in PRP and PPP by CaCl₂ or CaCl₂+thrombin. 20 μ l of PRP (3×10^5 platelets/ μ l) added into 80 μ l of CaCl₂ (12.5 mM) in 0.05M Tris-HCl, pH 7.5 (Tris-saline) (●-) or 80 μ l of CaCl₂ (12.5 mM)+thrombin (0.5 U/ml) in Tris-saline (▲-), and 20 μ l of PPP added into 80 μ l of CaCl₂ in Tris-saline (○-) or 80 μ l of CaCl₂ +thrombin in Tris-saline (△-) were incubated at 37°C for various times. At intervals, a mixture of AT-III (final concentration, 30 μ g/ml) and heparin (final concentration, 6 U/ml) was added into the reaction mixture. Thereafter 20 μ l aliquot of the mixture was subjected to the assay for the enzyme activity using 2 ml of 100 μ M Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA. Arrow indicates a clotting time of PRP after addition of CaCl₂.

Tris-saline に浮遊し, CaCl₂+thrombin を添加しても酵素活性はみられず, PPP 中に浮遊した場合は活性が出現することから, 本酵素は血漿由来と考える. 図 2 は CaCl₂ 添加 PRP 中での FXa, thrombin および本酵素活性の出現を経時的に観察したものである. FXa, thrombin の測定には AT III/heparin 処理は行っていない. 本酵素は PRP の凝固時間, thrombin の出現とはほぼ一致したが, thrombin とは失活態度が異なる.

本酵素の活性化に血小板が必要であることから, 次に血小板機能阻害剤の影響を検討した. PRP に予め種々の濃度の aspirin, C-AMP を加え, CaCl₂ 添加30分後の本酵素の活性を測定

Fig. 1-b Effects of various counts of platelets in plasma on the activation of the unidentified enzyme zymogen by the addition of CaCl_2 . Enzyme activity was measured at 30 min after addition of CaCl_2 according to the same method as indicated in Fig. 1-a.

した (図 3). C-AMPに濃度依存的阻害作用が認められた. 一旦活性化された酵素活性は C-AMP の影響を受けないことから, 本酵素の活性化には血小板の活性化が重要であることを示

唆している. 一方, 予め PRP に hirudin(10U/ml)を添加した場合, 活性化の lag time は延長し, また thrombin に特異的阻害剤である DAPA あるいは ATⅢ/heparin の存在下, 酵素活性は出現しなかった.

本酵素の性質について検討を行った. 本酵素が分解活性を示す Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA は protein Ca に特異性が強く¹⁰⁾, また protein Ca は ATⅢ/heparin で阻害されない⁷⁾ことから, 本酵素と protein Ca との異同性を抗 protein C 抗体, 精製 protein C inhibitor を用いて検討した. 本酵素は両阻害物質の影響は受けず, protein Ca とは異なると考えられた. 洗浄血小板添加の prekallikrein 欠損血漿 (Fletcher trait) においても CaCl_2 の添加により本酵素活性が認められ, 本酵素は kallikrein と異なるようである. また抗 prothrombin 抗体処理でも阻害されなかった. しかし, benzamidine, DFP, DAPA で完全に阻害され, hirudin で部分的阻害を受けた.

Fig. 2 Time course of the activation of F.X (△-), prothrombin (○-) and the unidentified enzyme zymogen (●-) after addition of CaCl_2 (10 mM) in PRP. Activity of each enzyme is indicated as a per cent of the maximum enzyme activity. F. Xa and thrombin activities were measured using Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA and Val-Pro-Arg-MCA, respectively, without treating by ATⅢ/heparin. Activity of the unidentified enzyme was measured according to the same method as indicated in Fig. 1-a.

Fig. 3 Effects of the inhibitors for platelet activation on the activation of the unidentified enzyme zymogen in PRP. 20 μ l of PRP was incubated with 80 μ l of CaCl_2 (10 mM) in Tris-saline containing various concentrations of aspirin (-○-) or C-AMP (-●-) at 37°C for 30 min and then treated with a mixture of ATIII (30 μ g/ml) and heparin (6 U/ml). The enzyme activity was measured as the same method indicated in Fig. 1-a.

III. 考察およびまとめ

血液凝固系の制御機構の解明において、血小板の活性化と凝固系因子との関係を明らかにすることは極めて重要であり、これまでも FXII, FXI, FX, prothrombin などについて種々検討されている^{3,4)}。例えば prothrombin の活性化は凝集反応後の血小板膜リン脂質, Ca^{2+} イオン, FVa, FXa からなる血小板 prothrombinase により顕著に促進され, FVa は血小板膜上で FXa レセプターとして機能することなどが明らかにされている^{11,12)}。本研究においてわれわれは血小板の活性化に伴い, 大量に生成する thrombin により活性化されと思われる ATIII/heparin 抵抗性のセリン酵素の存在を明らかにした。この未同定酵素は thrombin, FXa, FXIIa, FXIa, FVIIa¹³⁾, 血漿 kallikrein, protein C とは以下の理由により異なると考えられる¹⁴⁾。1) 大量の ATIII/heparin で阻害されない, 2) 抗 prothrombin 抗体で阻害されない, 3) 血小板添加 Fletcher trait 血漿でも活性化される, 4) 抗 protein C 抗体, protein C inhibitor で阻害されない, などである。本酵素活性は DFP, benzamidine, thrombin 特異阻害剤 DAPA で完全

に阻害され, また hirudin で部分的阻害を受けることから, その性質は thrombin 様であると考えられる。本酵素の活性化は血小板の活性化に依存するが, hirudin 添加 PRP での活性化の遅延, DAPA ならびに ATIII/heparin 添加による活性化の阻害, また微量の thrombin 添加 PPP での活性化が極めて弱いなどの結果から, 本酵素 zymogen の活性化には血小板の活性化時に生成するような大量の thrombin が必要ではないかと推論する。本酵素の同定, 血液凝固ならびに血小板の活性化との関係など, さらに詳細な検討が必要である。

文 献

- 1) Marcus, A.J.: The role of lipid in blood coagulation. In: *Advances in Lipid Research*. (ed. Pralett, R. and Krichivsky, D.) Academic Press, New York, **4**; 1~37, 1967.
- 2) Miletich, J.P., Jackson, C.M. and Majerus, P.W.: Interaction of coagulation Factor Xa with human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**; 4033~4036, 1977.
- 3) Chadwick Cox, A., Inyangetor, P., Esmon, C.T. and White, B.N.: The effect of aggregation and release on platelet prothrombin-

- converting activity. *Blood*, **54**; 659~672, 1979.
- 4) Walsh, P.N. and Griffin, J.H.: Contributions of human platelets to the proteolytic activation of blood coagulation Factor XII and XI. *Blood*, **57**; 106~118, 1981.
 - 5) Miletich, J.B., Broze, Jr., G.J. and Majerus, P.W.: Purification of human coagulation factors II, IX and X using sulfated dextran beads. *Methods in Enzymol.*, 80 (ed. Lorand, L.), p. 221~227, 1981.
 - 6) Damus, P.S. and Rosenberg, R.D.: Anti-thrombin-heparin cofactor. *Methods in Enzymol.*, (ed. Lorand, L.), p. 653~668, 1976.
 - 7) Suzuki K., Stenflo, J., Dahlback, B. and Teodorsson, B.: Inactivation of human factor V by activated protein C. *J. Biol. Chem.*, **258**; 1914~1920, 1983.
 - 8) Suzuki, K., Nishioka, J. and Hashimoto, S.: Protein C inhibitor: Purification from human plasma and characterization. *J. Biol. Chem.*, **258**; 163~168, 1983.
 - 9) Nesheim, M.E., Prendergast, F.G. and Mann, K.G.: Interactions of a fluorescent active-site-directed inhibitor of thrombin: dancyl-arginine N-(3-ethyl-1,5-pentanediy) amide. *Biochemistry*, **18**; 996~1003, 1979.
 - 10) Ohno, Y., Kato, H., Morita, T., Iwanaga, S., Takada, K., Sakakibara, S. and Stenflo, Y.: A new fluorogenic peptide substrate for vitamin K-dependent blood coagulation factor, bovine protein C. *J. Biochem.*, **90**; 1387~1395, 1981.
 - 11) Miletich, J.P., Jackson, C.M. and Majerus, P.W.: Properties of the Factor Xa binding site in human platelets. *J. Biol. Chem.*, **19**; 6908~6916, 1978.
 - 12) Kane, W.H. and Majerus, P.W.: The interaction of human coagulation factor Va with platelets. *J. Biol. Chem.*, **257**; 3963~3969, 1982.
 - 13) Broze, G.J. and Majerus, P.W.: Purification and properties of human coagulation factor VII. *J. Biol. Chem.*, **255**; 1242~1247, 1980.
 - 14) 倉地幸徳: 血液凝固反応の阻害機序. 蛋白質・核酸・酵素, **25**; 1031~1040, 1980.

●日常診療の落とし穴と安全性を示す!

小児の医療事故と救急処置

編集 日本大学小児科教授 馬場一雄 専門医50氏分担執筆
B5判 337頁 図52 表120 定価9,800円(〒240円)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768