◆トピックス◆

補体膜攻撃複合体の内皮細胞を介する血液凝固

服 部 隆 一

Enhanced Coagulation through Deposition of Membrane
Attack Complexes on Endothelium

Ryuichi HATTORI*

Key words: Complement, Membrane attack complex, Endothelium, vWF, prothrombinase

種々の病態において、血管内皮上、または血液中で補体系の活性化が起こり、内皮は自己の補体の攻撃を受ける可能性がある。この時の内皮の反応について以下に概説する。

1. 補体活性化の経路

補体の活性化には classical と alternative pathway の2経路がある。前者では、抗原抗体複合体に C1q が結合することから反応が始まる。後者の場合は C3 から活性化が始まる。いずれの経路でも、C5b67 が形成され、これは膜親和性が高いため、膜に付着する。膜についた C5b67 に C8 が結合し、さらに C9 の結合と polymerization が起こり、C5b-9 から成る膜攻撃複合体 (membrane attack complex: MAC) が形成され、膜に pore ができる。

2. 内皮上での補体の活性化¹⁾

classical pathway の活性化により内皮上に MAC を形成させた。まず、ヒトの培養臍帯静脈内皮細胞とこの細胞の膜に対する抗体 (家兎で作成) をインキュベートした。細胞を洗滌後、抗ヒト C8 抗体で C8 を吸収したヒト C8 欠損血清を添加し、細胞上に C5b67 を付着させた。血清を除去し、細胞を洗滌してから、精製したヒト C8 と C9 を添加し、MAC を形成さ

せた。この時、十分量の C9 の存在下に、C8 の量を調節することにより MAC の生成量をコントロールした。

3. MAC による内皮細胞からの von
Willebrand 因子 (vWF) 分泌と
P-selectin の内皮上への発現増加

内皮細胞に MAC を形成させる最終段階の C8, C9 の反応時、¹²⁵I でラベルした P-selectin に対するモノクローナル抗体 S12 を添加し、内皮への S12 の結合を定量し、同時に細胞上清中の vWF の量を ELISA で測定した。

P-selectin は分子量 140 kD の granule membrane protein (GMP) で、以前は GMP-140 と呼ばれていた。これは lectin domain により細胞を select する機能を有する selectin の一つで、白血球、および単球を認識する²⁾。存在部位は storage granule (内皮 Weibel-Palade 体、血小板 α 顆粒) の膜で、内皮細胞³⁾ や血小板²⁾ の活性化に伴い、granule 内容物が放出される時に、P-selectin (GMP-140) は細胞表面に出現する。内皮細胞では、いったん細胞表面に現われた後、internalization される³⁾。

図1に示す如く、MACの生成量に比例して、内皮上清への vWF 分泌量、および ¹²⁵I-S12 の

* 京都大学医学部内科第三講座 (〒 606 京都市左京区聖護院川原町 54): The Third Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01.

図1 MACによる内皮からのvWF分泌とP-selectin発現増加

Untreated=未処置内皮, C8 D Control=C5b67まで付着した内皮, Histamine=Histamine (10^{-5} M)による刺激を受けた内皮, 文献1)より引用。

内皮への結合が増加した。この反応は saturable であり、最大反応はヒスタミンの最高量刺激に匹敵するものであった。細胞傷害を示すLDH漏出は僅かで、上清中のvWFはウエスタンブロッティングでは高分子量のマルチマー(分子量が大きい程血小板、細胞外マトリックスへの結合能が高い)を呈したことから、Weibel-Palade体由来であることが確認された(単なる細胞傷害による場合はvWFダイマーが放出される)。

MAC形成により、内皮細胞外から中へのカルシウム流入が起こり、細胞内カルシウム濃度が上昇した。細胞外液のカルシウム濃度を低下させると、上記のvWF分泌、S12結合は低下した。また、スフィンゴシンにより部分的ではあるが、反応が抑制されたので、カルシウム流入に続いて、protein kinasesの活性化がシグナル伝達に関与していることが示唆された。

4. MACによる内皮Prothrombinase活性上昇⁴⁾

内皮細胞は血液凝固因子Vaに結合部位を提供し、さらにXa因子とコンプレックスを形成

し、prothrombinをthrombinに変換するprothrombinase活性を発揮する。内皮上にMACを形成させる時に、C8、C9とともにVa、Xa、prothrombinを添加し、上清中のthrombin活性をchromogenic substrateを用いて測定した。

MAC(C5b-9)により、prothrombinase活性はコントロール内皮の約3倍に上昇した(図2)。一方抗血栓作用を示す内皮のthrombomodulin活性は不変であった。細胞内カルシウム流入により、vWF分泌をもたらすヒスタミンやカルシウムイオノフォアでは、prothrombinase活性は3-20%程度の上昇にとどまり、prothrombinase活性上昇はMACに特異的であると考えられた。さらに、上清を遠心すると上清中のprothrombinase活性は4分の1まで低下したことから、活性はmicroparticleに存在することが示唆された。そこで、上清に膜を染める色素を添加してから、FITCでラベルした抗Va抗体と抗C9抗体を加え、flow cytometryで分析した。両抗体は同様の分布パターンを呈したことから、MACを含んだmicroparticleが内皮から遊離し、これがVaに結

図2 MACによる内皮 Prothrombinase 活性の上昇

No cells=細胞の生えてない well での測定値, Cells=内皮細胞の生えた well での測定, Control=未処置内皮, C8 D Serum=抗体なしに C8 欠損血清とインキュベートした内皮, IgG=抗体とのみインキュベートした内皮, C5 b 67=C5 b 67 付着内皮, C5 b-8=C5 b-8 付着内皮, C5 b-9=MAC (C5 b-9) 付着内皮, 文献4) より引用.

表1 抗内皮抗体が検出されることがある疾患

Thrombotic thrombocytic purpura
Heparin-associated thrombocytopenia
Hemolytic uremic syndrome
Wegener's granulomatosis
Polyarteritis nodosa
Temporal arteritis
Takayasu's arteritis
Rheumatoid vasculitis
Systemic lupus erythematosus
Hypersensitivity vasculitis
Kawasaki disease

文 献

- 1) Hattori R, et al.: Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. J Biol Chem **264**: 8053, 1989.
- 2) McEver RP: Selectins. Thromb Haemost **65**: 223, 1991.
- 3) Hattori R, et al.: Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. J Biol Chem **264**: 7768, 1989.
- 4) Hamilton KK, et al.: Complement protein C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase complex. J Biol Chem **265**: 3809, 1990.
- 5) Brasile L, et al.: Identification of an autoantibody to vascular endothelial cell-specific antigens in patients with systemic vasculitis. Am J Med **87**: 74, 1989.
- 6) Paul LC, et al.: Vascular endothelial alloantigens in renal transplantation. Transplantation **40**: 117, 1985.

合部位を提供し, prothrombinase 活性を高めていたと考えられた。

5. 炎症と血栓症

血管内皮細胞に対する抗体は表1に示すように, 血栓症を来す疾患や血管炎⁵⁾で認められる。また, 抗内皮抗体は臓器移植後の拒絶反応とも関連していることが示唆されている⁶⁾。抗内皮抗体が存在すれば, 内皮はMACの攻撃を受けることになり, 血栓症を生じやすい状態になる。これは炎症と血栓症を結ぶ一つのメカニズムと考えられる。

執筆の機会を与えていただきました安部 英帝京大学副学長, 京都府立医科大学中川雅夫教授に深く感謝致します。