Tissue-type Plasminogen Activator (t-PA)/ Plasminogen Activator Inhibitor

森 下 英理子* 松 田 保**

I. Tissue-type Plasminogen Activator (t-PA)

1) 発見の経緯

線溶系は、血管内に生じた血栓の溶解が主たる作用であるが、その他にも血管新生、排卵、組織修復、癌細胞の転移など、組織中でおこる種々の反応に関わっている。その反応とは、プラスミノゲンアクチベータ (PA) がプラスミノゲンを活性化してプラスミンとし、生じたプラスミンがフィブリンや組織蛋白を分解する反応である (Fig. 1)。

1940年代後半から1950年代にかけて、組織や組織抽出液 (1947年 Astrup ら), 尿 (1951年 Williams ら), 血液中 (1951年 Lewis ら) に、プラスミノゲンを活性化する物質、つまり PA が存在することが明らかにされた。1960年代後半からは、PA には分子量も機能も異なる2種類が存在することが明らかになり、1980年に Collen が尿由来のものをウロキナーゼ型 PA(u-PA)、組織由来のものを組織型 PA(t-PA) とそれぞれ命名した。

Fig. 1 フィブリン溶解 (線溶) 機序。

2) 分子構造¹⁾

t-PA は、分子量 72,000 の一種のセリン蛋白分解酵素で、530 個のアミノ酸よりなる一本鎖糖蛋白質である。分泌時に 32 個からなる leader sequence が切られる。t-PA 分子内には、35 個のシステイン残基をもち、17 個の S-S 結合を形成している。糖含有量は約 7% である。

一本鎖 t-PA は、Fig. 2 の矢印で示した Arg275-Ile276 の部分がプラスミンで切断され、二本鎖 t-PA となる。一本鎖 t-PA は、プラスミノゲンや u-PA のような不活性型ではなく、活性やフィブリン親和性をもった活性型プロテアーゼであるが、二本鎖 t-PA とはかなり異なった性質をもつことが知られている。

t-PA のプラスミノゲン活性化能は、フィブリンの非存在下では二本鎖型のほうが数倍大きい。しかし、フィブリンによる t-PA の活性増強効果が一本鎖型のほうがより強く現れるため、フィブリン存在下では両者はほぼ同等の活性を示す。一本鎖と二本鎖 t-PA との間には立体構造上かなりの違いがあるものと考えられる。

1 次構造は Fig. 2 に示すように、N 末端からフィンガードメイン、EGF (epidermal growth factor) 様ドメイン、クリングル 1(K1) ドメイン、クリングル 2(K2) ドメインおよびセリンプロテアーゼドメインからなる。フィンガードメインはフィブリンとの結合部位として、また一本鎖 t-PA の PAI-1 との結合部位として重要である。EGF 様ドメインは Tyr67 を中心とした 3~8 個のアミノ酸が肝実質細胞による t-PA の代謝に関与すると考えられている。K1 ドメインの機能については不明であるが、K2 ドメインはフィブリン結合能に重要であり、また二本鎖 t-PA と PAI-1 との結合にも関与している。ちなみに、クリングルドメインは u-PA の中には 1 個、プラスミノゲン中には 5 個、リポ蛋白 (a) 分子中には 38 個存在する。

セリンプロテアーゼドメインには His322, Asp371, Ser478 から構成される活性中心が存在し、プラスミノゲンの活性化 (限定分解) に重要である。この部位は、他のセリ

* 金沢大学医学部検査部, ** 同 第三内科

原稿受取日: 1995 年 10 月 9 日

Eriko Morishita¹ and Tamotsu Matsuda²: Department of Laboratory Medicine¹ and Internal Medicine (III)², School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, Japan.

Fig. 2 組織型プラスミノゲンアクチベータの一次構造 (文献 1 を改変)。

ンプロテアーゼとも相同性がきわめて高い。

3) 遺伝子

t-PA の遺伝子は第 8 染色体上に存在し、36 kb 程度の大きさであり、14 個のエクソン、13 個のイントロンからなる。各エクソンは特徴的なそれぞれの機能ドメインに対応しており、フィンガードメインは第 4 エクソン、EGF 様ドメインは第 5 エクソン、セリンプロテアーゼドメインは 5 個のエクソンよりコードされている。これらのコードパターンは、u-PA、プラスミノゲンらのセリン蛋白分解酵素とほぼ同様で、いずれも同じ祖先遺伝子から進化してきたことを示す。

4) 生理的機能

t-PA はおもに血管内皮細胞から活性をもった一本鎖の形で産生されるが、腫瘍細胞 (メラノーマ) が産生することもある。血中に放出された t-PA の生体内半減期は、約 2 ～ 5 分と短い。

(1) t-PA による線溶機構 (Fig. 3)

循環血漿中での t-PA によるプラスミノゲン活性化はきわめて効率が悪く、少量のプラスミンが生成されたとしても、すべて α_2 -プラスミンインヒビター (α_2 -PI) によって

速やかに失活されてしまう。つまり、治療目的に PA を投与したような場合を除き、流血中ではプラスミン生成は生じないと考えられる。

これに対して、循環血漿中でひとたびフィブリン形成がおきると、フィブリン親和性を有する t-PA とプラスミノゲンはフィブリン上で三量体を形成し、t-PA によるプラスミノゲン活性化が強力に行われる。フィブリン上に生じたプラスミンは、 α_2 -PI によって失活されないため、効率的にフィブリン分解が促進される。

t-PA の作用上の特徴は、① u-PA と異なりフィブリン親和性が高い、② フィブリンの存在により酵素活性が非存在下の数百倍～千倍にも増強する、という点である。つまり、t-PA が高フィブリン親和性によりフィブリンに結合し、フィブリン上で酵素活性を著明に増加させることは、血栓溶解にとってきわめて合理的といえよう。

(2) PAI-1 による阻害反応

t-PA は、PAI-1 によりその酵素活性が阻害される。その反応はまず、PAI-1 の反応中心 Arg346-Met347 (P_1 - P_1') が t-PA による bait region として開裂をうける。そして、t-PA の活性中心であるセリン残基と PAI-1 の Arg346 が非可逆

Fig. 3 組織型プラスミノゲンアクチベータによるフィブリン上および血管内皮細胞上での線溶現象。

的な共有結合を作り、t-PA は活性を失う。この阻害反応はきわめて速やかであり、t-PA の活性セリン残基と PAI-1 の反応中心の結合だけでなく、可逆的な 2 次的結合部位が存在する。その 2 次的な t-PA 側結合部位として、一方鎖 t-PA との反応ではフィンガードメインが³、二方鎖 t-PA との反応では K2 ドメインが考えられている。この PAI-1 との結合部位は、t-PA のフィブリン結合部位の近傍にあるため、t-PA と PAI-1、フィブリンとの結合には競合がみられる。

(3) 血管内皮細胞での t-PA 産生、分泌

t-PA は種々の刺激により、容易に血管内皮細胞から血中に放出される。Table 1 に、これまでに検討されてきた主な刺激因子による t-PA、PAI-1 産生量の変動を示した。凝固系の中心的役割を果たすトロンビン刺激により t-PA が放出され、線溶系の活性化が惹起されることは生体にとって好都合といえよう。また、all trans retinoic acid という急性前骨髄性白血病の治療薬で、合併した DIC に対しても著効するビタミン A 誘導体が t-PA 産生を促進するとの報告

Table 1 各種刺激物質による血管内皮細胞からの t-PA および PAI-1 分泌への影響。

刺激物質	t-PA	PAI-1
トロンビン (0.01~10 NIH U/ml)	↑	↑
エンドトキシン (0.1~1.0 μg/ml)	— ↑	↑
ヒスタミン (10 μM)	↑	— ↑
インターロイキン-1 (IL-1) (2.5~5.0 U/ml)	↓	↑
インターフェロン-γ (IFN-γ) (2×10 ⁵ JRU/ml)	↓	↑
tumor necrosis factor (TNF) (50~500 U/ml)	—	↑
transforming growth factor-β (TGF-β)	—	↑
塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) (30~100 ng/ml)	↑	—
内皮細胞増殖因子 (ECGF)+ヘパリン	—	↓
phorbol myristate acetate (PMA) (100 nM)	↑	↓
酪酸塩エステル (2~10 mM)	↑	↓
ニコチン (10 ⁻⁸ M)	↑	—
デキサメタゾン (10 ⁻⁷ M)	—	↑
イオノフォア A23187 (10 ⁻⁹ ~10 ⁻⁶ M)	↑	—
活性化プロテイン C (APC) (60 nM)	—	↓
フィブリン塊	—	↓
リポ蛋白 (a) (25 μg/ml)	↓	↑
オキシダント	↑	—
all trans retinoic acid (10 μM)	↑	—

は興味深い。

(4) t-PA レセプター (t-PAR)

すでに、肝細胞では t-PAR の存在が報告されているが、これらのレセプターは t-PA の代謝に関与しているものと思われる。一方、血管内皮細胞膜上の t-PA に対する特異的なレセプターは、血管内線溶を制御する因子として重要であると予測される (Fig. 3)。ヒト血管内皮細胞上の t-PAR の存在についてはいくつかのグループより報告されており、現在その分子学的性質について検討されている。

5) 測定法の原理と正常値

t-PA は、血液中では free t-PA (active t-PA) および t-PA/PAI-1 複合体の形で存在する (約 8 割が複合体形成)。また、血中 t-PA は非常に低い値であるが二相性の日内変動を示す。抗原量の測定には各種 ELISA キットが発売されており、free のものあるいは free と複合体の両者 (total t-PA) を測定することができる。一方、活性の測定法としては、合成発色基質を用いる方法がある。total t-PA 抗原量の正常値は、3~10 ng/ml であり、30 ng/ml 以上は異常高値と考えられる。また、運動負荷や DDAVP 投与により増加する。

生体の線溶能の指標としては、理想的には free t-PA を定量することが望ましい。しかし注意すべき点は、採血後も試験管内に残存する active PAI-1 が短時間に free t-PA と反応して t-PA/PAI 複合体を形成してしまうため、正確な free t-PA の定量が困難なことである。そこで free t-PA 測定に際しては、即時的に酸性化することにより採血後の PAI-1 による中和を防ぐことが推奨されている。

6) 臨床的意義

(1) t-PA と動脈硬化性疾患

深部静脈血栓症や心筋梗塞患者では、駆血後の t-PA 放出の低下、PAI-1 の増加が認められ、これらの線溶能低下状態の患者では静脈血栓症の再発や再梗塞が多いとの報告がある。一方、健康人を対照とした prospective study で、その後、脳卒中を発症した群は発症しなかった群に比べて有意に t-PA 抗原量が高値であったとの報告があり、t-PA 高値は脳梗塞の危険因子であると指摘している。興味深い成績ではあるが、免疫学的に t-PA を測定する場合は、ほとんど t-PA/PAI-1 複合体を測定していると考えられるので、今後 free t-PA 測定による再検討が望まれる。

(2) 治療への応用

t-PA はフィブリン親和性が高いため、血栓溶解剤として心筋梗塞などに広く使用されており、確実な血栓溶解効果が認められている。さらに半減期の長い、フィブリン親和性、酵素活性の高い理想的な血栓溶解剤を求めて、各種の mutant t-PA が開発されている。

II. Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)

1) 発見の経緯

1983 年頃より t-PA が血栓溶解剤として急性心筋梗塞に対して使用されるようになったが、TIMI phase I trial で再開通後の再閉塞の頻度が高いことが問題となった。その原因の一つとして、t-PA を速やかに失活させる生理的なインヒビターの存在が考えられ、1983 年にいくつかのグループより、ヒト血漿中に t-PA インヒビター (PAI) が発見された (Wiman ら)。1984 年にはヒト血管内皮細胞より抽出され、血管内皮細胞が t-PA インヒビターの主な産生部位であろうと考えられた。

その後の研究により、PAI は産生部位の差により少なくとも免疫学的に 4 種類のものがあることが明らかにされた。血漿中および血小板に存在し、血管内皮細胞、肝臓などで産生される PAI-1、胎盤および単球に含まれている PAI-2、活性化プロテイン C インヒビターと同一分子である PAI-3、プロテアーゼネキシンである。このうち、PAI-1 が t-PA、u-PA の生理的インヒビターであり、血栓溶解に重要であると考えられるので、本稿では PAI-1 について以下詳述する。

2) 分子構造

PAI-1 は、分子量約 50,000 の糖蛋白で、セリンプロテアーゼインヒビターファミリー (SERPIN) に属する。ヒト、ウシ、ラット、マウスの PAI-1 について、全アミノ酸配列が cDNA クローニングにより決定されている。PAI-1 は、アミノ酸 402 個からなるポリペプチドとして産生され、細胞内 processing をうけ 379 個のアミノ酸からなる一本鎖のものとして分泌される。いずれの種の PAI-1 もアミノ酸配列の相同性が高い。PAI-1 の反応中心は、C 末端付近に位置する Arg346 (P₁)-Met347 (P₁') である。

構造上特徴的なことは、システイン残基をもたないという点である。分子内 S-S 結合が存在しないためか、活性型の PAI-1 は不安定で半減期約 90 分 (37°C) で活性のない“潜在型”に移行する。この潜在型 PAI-1 は、尿素やグアニジンなどの変性剤の処理によってふたたび活性が回復することから、分子内に構造変化がおこるためと考えられる。しかし、生体内物質では陰性荷電を有したリン脂質にその作用があるとされるだけで、生理的条件下での活性化機構は不明である。

血漿中に放出された活性型 PAI-1 は、接着性蛋白であるビトロネクチンと可逆的に結合することも知られている。複合体を形成すると、潜在型への移行の半減期が約 2 倍に延長するという報告もある。しかし、ビトロネクチンの役割は、血液中で PAI-1 を安定化させることよりも、PAI-1 を組織に固着させることにあるらしいが、不明な点は多い。

3) 遺伝子

PAI-1 遺伝子は第7染色体上に存在し、16 kb 程度の大きさであり、9 個のエクソン、8 個のイントロンよりなる。この遺伝子の 5' フランキング領域には、約 520 bp にもおよぶ t-PA の 5' フランキング領域と共通の配列が認められる。

免疫組織学的検討から、血管壁に PAI-1 が検出される。また胎盤や副腎にも PAI-1 が検出されており、意外にも脂肪組織に比較的多量の PAI-1 mRNA が認められる。PAI-1 は血小板中に蓄えられているが、血小板活性化の際に放出され、産生は母細胞である骨髓巨核球で行われる。肝臓においては、生理的状态では微量の PAI-1 mRNA が検出されるのみである。

4) 生理的機能

(1) PAI-1 による線溶系の制御

PAI-1 は、PAI 活性をもつ PAI-2 などと比較し、きわめて効率良く t-PA、u-PA を失活させる。このことは、線溶開始活性は主に PAI-1 により制御されていることを示す。この阻害反応は 1 対 1 の複合体形成反応である。この反応の効率の良さは、活性部位以外に特異的な可逆結合反応をする部位が存在することにより説明できる。t-PA 側の結合部位については前述した。一本鎖 u-PA は酵素活性がないので PAI-1 とは結合しないが、二本鎖 u-PA はクリングルドメインで PAI-1 と特異的に結合する。一方、PAI-1 側の結合部位としては、negative charge を有する Glu350~Asp355 や、Asp125~Glu130 が考えられている。

(2) PAI-1 の阻害因子

PAI-1 は、活性化プロテイン C (APC)、トロンビン、好中球エラスターゼと反応して失活する。PAI-1 は APC と複合体を形成し、APC の活性を失活させると同時に、PAI-1 自体も酵素阻害活性を失う。しかし、APC と PAI-1 との結合速度は t-PA との結合に比べて遅く、その意義は必ずしも明らかではない。トロンビン、好中球エラスターゼは PAI-1 を限定分解することにより、PAI-1 を失活させる。PAI-1 はオキシダントに対しても感受性が高い。炎症などには、白血球から好中球エラスターゼやオキシダントが放出されるため、PAI-1 活性は影響を受けるものと思われる。

(3) PAI-1 産生の調節因子

Table 1 に示したが、PAI-1 の産生は種々の因子により刺激を受け調節されている。代表的な刺激因子として、エンドトキシン、トロンビン、サイトカイン (TNF- α , IL-1)、成長因子 (TGF- β)、副腎皮質ホルモンなどが PAI-1 産生を亢進させる²⁾。

また、動脈硬化の危険因子であるリポ蛋白 (a) が、培養血管内皮細胞において PAI-1 の産生を増加させるという。その他、血清インスリン濃度、血清トリグリセライド (TG)

が PAI-1 濃度と正相関することから、インスリンや VLDL が PAI-1 産生を刺激しているとの報告もある。

前述したような刺激因子を投与した場合、血管に富む臓器に PAI-1 mRNA の増加が顕著となるが、それ以外に刺激因子に特異的な変化をみることがある。たとえば、エンドトキシンを投与した場合、肝臓での PAI-1 mRNA の増加が著明となり、血管壁では非刺激時には血管平滑筋細胞での産生が主体であるのに、刺激後は内皮細胞での産生が強くなる。これは、これらの刺激因子に対するレセプターの有無や、組織特異性などが関わっていると考えられる。

5) 測定法の原理と正常値

PAI-1 は血中では、活性型 PAI-1、t-PA 不活化能を欠く潜在型 PAI-1 および t-PA/PAI-1 複合体の形で存在する。血中の濃度は約 20 ng/ml であるが、正常域幅が比較的大きく、日内変動があり朝方高く夕方低い。急性期反応性蛋白であるため、炎症、組織の破壊、その他さまざまな刺激によって濃度が上昇する。

抗原量の測定は、活性型、活性型および潜在型、複合体などをそれぞれ分けて測定できる各種 ELISA がある。活性の測定法としては、被検血漿に t-PA 一定量を添加し、残存 t-PA を合成基質法で測定する。採血時の注意すべき点は、t-PA 測定と同様である。

6) 病理的ないし臨床的意義

(1) PAI-1 欠損マウスと高 PAI-1 血症マウス

PAI-1 遺伝子欠損マウスを作製したところ、軽度の線溶能亢進と静脈血栓発症に対して強い抵抗性を示したが、出血傾向は認めなかった。また、PAI-1 遺伝子を移入した高 PAI-1 血症トランスジェニックマウスを用いた検討では、静脈系に血栓が多発した。このような動物実験の報告より、PAI-1 高値は血栓症をひきおこす要因の一つと推測される。

(2) 動脈硬化との関連

血中 PAI-1 値は、肥満度 (body mass index)、血中インスリン濃度、TG 値などの動脈硬化の危険因子と有意に正相関する。II 型糖尿病では、高インスリン血症が動脈硬化の危険因子となることが知られているが、著者らの検討ではこれらの患者では PAI-1 濃度が増加していた。つまり、高インスリン状態が PAI-1 上昇を介して、動脈硬化進展に関与している可能性が考えられる。また高脂血症、特に TG 血症では PAI-1 が増加しており、血栓傾向に一部関連しているのかも知れない。

動脈硬化性疾患のなかでは、虚血性心疾患に関する報告が多くみられ、PAI-1 増加による線溶能の低下が背景にあると考えられている。著者らの検討でも、冠動脈造影で有意狭窄を有する症例では、正常冠動脈群に比し有意に PAI-1 が上昇していた。心筋梗塞既往者では PAI-1 が高い症例

が多く、また、これらの低線溶能を示す群では再梗塞が多いとの報告もある。虚血性心疾患に比べると、脳梗塞と PAI-1 に関する報告は少ない。若年発症脳梗塞患者を対象とした検討では、PAI-1 は健常群と有意差を認めず、著者らの検討でも同様であった。

(3) PAI-1 とその他の病態

敗血症では、エンドトキシンやサイトカインなどが増加しており、PAI-1 産生の増加、血中レベル増加をきたす。増加した PAI-1 は、臓器障害の程度や死亡率と有意に相関し、予後因子として重要であるとの報告もある。一方、PAI-1 の産生細胞からの放出障害による先天的な血中 PAI-1 欠損症の患者では、幼少児期より出血傾向を示すことが報告さ

れており、PAI-1 の生理的重要性が示される。

文 献

- 1) Lijnen HR and Collen D: Strategies for the improvement of thrombolytic agents. *Thromb Hemost*, 66: 88-110, 1991
- 2) Keijer J, Linders M, van Zonneveld A-J, Ehrlich HJ, de Boer J-P, and Pannekoek H: The interaction of plasminogen activator inhibitor-1 with plasminogen activators (tissue-type and urokinase-type) and fibrin: Localization of interaction sites and physiologic relevance. *Blood*, 78: 401-409, 1991