TFPI 研究の最近の進歩：新たな展開を期待して

加 藤 久 雄

Recent Progress on TFPI Study : any breakthrough?

Hisao KATOH

Key words: TFPI, endothelial cell, proteoglycan, GPI-anchor, atherosclerosis, restenosis, tissue factor, blood coagulation, protease, anticoagulant

1. はじめに

TFPI (Tissue Factor Pathway inhibitor) は血液凝固の開始反応を阻害するインヒビターとして、1988 年に発見されて以来、膨大な研究によって、その構造と抗血栓性機能の関係が明らかとなり、*in vivo* においても重要な抗血栓性機能を果たしていることが確立されている(総説文献 1, 2 参照)。それにもかかわらず、TFPI の抗血栓性薬剤としての展望は未だ明確ではなく、また、血漿中 TFPI の測定が種々の病態の治療や予防に役立つかどうか未だ確立していない。しかし、一方で、TFPI が内皮細胞をはじめとする血管壁細胞の機能を制御する活性や、傷害された血管の内膜肥厚を抑制する機能領域ももっていることが明らかにされつつある(図 1)。また、TFPI の他に同様な機能をもつインヒビターの検索も行われつつある。ここでは、今後の新たな展開を期待して、TFPI の役割を考えるうえで重要な内皮細胞結合型 TFPI の存在様式と、動脈硬化の進展における TFPI の役割、特に血管内膜増殖抑制機能に注目し、その最近の進歩を紹介したい。なお、この原稿は、平成 14 年 11 月に神戸で開

図 1 TFPI の構造と機能領域

催された学術集会における総説講演の内容に、その後の進歩を付け加えてまとめたものである。

血管壁細胞結合型 TFPI の存在様式

TFPI は血管内皮細胞の他、平滑筋細胞や心筋細胞、単球、繊維芽細胞など種々の血管壁細胞により産生され、血管内に遊離された後、リポタンパク質結合型および遊離型として血漿中に存在する他、血管壁細胞や組織の TFPI リセプターあるいは TFPI 結合タンパク質と結合して血管壁に存在している。その他に血小板にも貯蔵され、凝集時に放出される。血管内に

ヘパリンを投与すると大量の TFPI が内皮細胞から遊離することから、内皮細胞結合型 TFPI は内皮細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合していると推定されており、実際にシンデカンやグリピカンが TFPI リセプターとして同定されている。現在では、血漿中の全 TFPI 抗原量および遊離型 TFPI 抗原量を測定することができるので、種々の疾患における TFPI 濃度について多くの報告があり、心筋梗塞などの循環器疾患では TFPI が増加しており、また TFPI 濃度の低下は血栓症のリスクファクターのひとつとなることなどが明らかにされている。この場合、リポタンパク質結合型 TFPI は C 末端側部分を欠損した truncated form で、弱い抗血栓性活性しかもっていないこと、遊離型 TFPI は内皮細胞結合型 TFPI と相関していることなどから、遊離型 TFPI の測定が重要である。もちろん、内皮細胞結合型 TFPI を直接測定するほうがよいが、患者および健常人にヘパリンを投与して測定することは困難を伴うことが多いので、通常は遊離型 TFPI を測定することが勧められる。ここで問題となるのは、TFPI が内皮細胞とどのようにして結合しているのかということである。先に記したように、当初から内皮細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンが TFPI リセプターと考えられてきたが、実際にはそう単純ではないことが最近の報告から明らかにされつつある。まず第一に、このような細胞との結合実験に用いる組換え体 TFPI の種類によって結果が異なること、次に、組換え体 TFPI を用いた結合実験の結果と内在性 TFPI についての結果が異なること、さらに、トロンボスポンジンや酸化 LDL など TFPI 結合タンパク質が次ぎつぎに報告されてきたことなどから、血管壁細胞結合型 TFPI の存在様式は従来考えられていた以上に複雑であると予想される。最近 Mast らはヒト胎盤をもちいると、表 1 に示すようにヘパリン処理により遊離する TFPI よりもフォスファチジルイノシトール特異的の

表 1 胎盤のヘパリンあるいは PIPLC 処理により遊離する TFPI (文献 3 より引用)

		5 人の胎盤から遊離した TFPI の平均値 (pmol/g 胎盤)
(1)	ヘパリン 10 μ /ml	0.0693
	PIPLC	0.7785
(2)	Sequential incubation	
(a)	ヘパリン	0.0344
	PIPLC	0.8255
(b)	PIPLC	0.8396
	ヘパリン	0.1448

PIPLC: フォスファチジルイノシトール特異的フォス
フォリパーゼ C

(1) 単独処理

(2) 連続処理

フォスフォリパーゼ C (PIPLC) により遊離する TFPI の方が遥かに多いことを報告した³⁾。このことは TFPI が GPI アンカー型タンパク質に直接結合して存在していること、ヘパリン遊離型とは明確に区別すべきことを示唆している。もちろん、TFPI 自身が GPI アンカー型タンパク質である可能性は排除できないし、これらの結果が胎盤特異的な結果である可能性もある。しかし、これらの結果はいままでの結果をふまえ、TFPI の細胞表面における存在様式を新たな観点から見直す必要があることを示していると考えられる。特に GPI アンカータンパク質は細胞表面のミクロドメインである脂質ラフトやカベオレに存在し、特有の機能をもっていることが明らかになっており⁴⁾、その GPI タンパク質に結合した TFPI の機能をもっと重要視する必要がある。さらにヘパリンで遊離するからといって、かならずしもプロテオグリカンのヘパラン硫酸部分だけでなく、タンパク質の酸性領域と結合している可能性もあり、また、プロテオグリカン自身が種々の増殖因子などの細胞のリセプターとして情報伝達に積極的な役割を果たしていることもあきらかになってきた⁵⁾⁶⁾。これらシンデカンやグリピカンのノックアウトマウスの報告⁷⁾ も多くなり、TFPI がこれらのリセプターと結合することにより本当に細胞内のシグナル伝達系が活性化されるの

図2 TFPIの細胞表面における存在様式

●: TFPI, PI-PLC: フォスファチジルイノシトール特異的フォスホリパーゼC, 矢印: PI-PLCによる切断位置, █: GPI-アンカー, ○○: 糖鎖

かが早く明らかになることを期待している。図2に細胞表面におけるさまざまなTFPIの結合様式を示したが、その存在様式の実態と意義の解明がまたれる。

TFPIの動脈硬化の進展における役割: 細胞増殖阻害作用の機構と意義

動脈硬化の進展においてTFPIが密接に関係していることは明らかである。動脈硬化の進展に重要なはたらきをしている血管壁細胞（内皮細胞、単球、Tリンパ球、平滑筋細胞、血小板）はTFPIを産生あるいは結合しているし、動脈硬化の進展に関与している種々の因子（酸化LDL、リポ蛋白質（a）、細胞接着因子、サイトカイン、細胞外マトリックスタンパク質、プロテアーゼなど）と相互作用していることが知られている。さらに、動脈硬化局所には血液凝固の開始因子である組織因子とTFPIが共存していることも知られている。種々の血管壁細胞は種々の刺激を受けて組織因子を産生するとともに、その制御作用としてTFPIを産生し、その結果として血漿中のこれらの因子が増加すると考えられる⁸⁾⁹⁾。動脈硬化を基礎疾患とする循環器疾患でこれらの因子が増加するのはそのためと考えられる。しかし、局所での反応により内皮細胞から産生されたTFPI

が有意に血漿中のTFPIの増加を引き起こすのに十分か疑問である。むしろ、局所でのこのような防御反応が引き金となって、他の血管内皮細胞さらには他の臓器でのTFPIの産生が何らかの因子を介して亢進することにより、血漿中TFPIが増加しているのではないだろうか。

それでは、動脈硬化の進展におけるTFPIの役割は組織因子による血液凝固の開始反応を阻害することだけにあるのだろうか。神窪ら、羽室らの研究により、TFPIが培養細胞であるHUVECや平滑筋細胞に対して増殖を阻害する作用を持っていることが明らかにされた。また、その作用は転写因子の発現を促進することによって示された¹⁰⁾。しかし、TFPIのこのような作用に必要な有効濃度はいずれも数100 nMと非常に高い。このことから、このようなTFPIの作用は*in vivo*では意味がないと考えるか、至適条件ではもっと低い濃度でも有効になるのか、あるいは、*in vivo*では血管壁の局所ではこのような高濃度のTFPIがTFPI結合タンパク質の存在により可能なのか、今後の詳細な研究が必要であろう。

一方、動物実験により、血管壁傷害後の血管内膜肥厚がTFPIにより抑制されることが多くの研究者により明らかにされつつある。ここでは著者らのグループの結果を中心に紹介し、

表 2 TFPI による新生内膜形成の阻害効果
(文献 11 より引用)

	内膜/中膜比	
	TFPI 投与群	コントロール
14 日後	0.119±0.084	0.129±0.097
28 日後	0.118±0.130	0.342±0.216

p=0.030

表 3 Cutting angioplasty 後 Pulse Spray catheter により局所投与した組換え体 TFPI の血漿および組織における残存量 (文献 11 より引用)

	血漿中 TFPI	組織結合型 TFPI
	ng	ng
投与直後	543.0	241.7
1 日後	19.2	5.1
2 日後	0	4.9
4 日後	0	2.6
7 日後	0	0

その意義を考察したい。中村らは cutting balloon によりウサギの腸骨動脈を傷害させた後に組換え体 TFPI を局所投与し、表 2 に示すように、TFPI 投与群では著明に 28 日後における内膜肥厚が抑制されることを明らかにした¹¹⁾。傷害直後に投与した TFPI がどうして 28 日後の内膜肥厚を抑制するのか。投与した組換え体 TFPI が局所にいつまで残存しているのか測定すると、表 3 に示すように、血漿中の TFPI は速やかに消失するのに対して、組織に結合した TFPI は 4 日後にも検出できた。一方、傷害後に中膜に集まるマクロファージの数を調べると、対照群では図 3 に示すように、7 日後に最も多く検出されるが、TFPI 投与群ではその数が著しく減少していた。これらの結果から考察すると、投与後 4 日以内に存在する TFPI が血液凝固反応を阻害するとともに、血管壁細胞にも何らかの作用をして、平滑筋細胞増殖に至る一連の反応を阻害しているのではないかと考えられる。

一方、Yin らは高コレステロール食で 2 週間飼育したウサギの腸骨動脈をバルーンカテーテルにより傷害し、HVJ リポソームを用いて TFPI 遺伝子を導入し、血管の再狭窄を観察し

図 3 Angioplasty 後に傷害された中膜内のマクロファージの数 (文献 11 より引用)

た¹²⁾。図 4 に示すように、対照群では傷害部位の血管が閉塞したが、TFPI 投与群では閉塞は観察されなかった。その結果は組織染色によっても確認された (図 5)。このように、著者ら以外にも TFPI 遺伝子導入により血管内膜の肥厚が抑制されることは報告されているが、組換え体 TFPI の投与の場合とは異なり、TFPI 遺伝子の発現は傷害直後ではないので、急性期の血栓形成は抑制されていないと考えられる。にも関わらず、どうしてその後の内膜肥厚が TFPI により抑制されるのだろうか。

一般的に従来から、傷害後の血管内膜肥厚には血液凝固の開始因子である組織因子の作用あるいはそれに続く血液凝固反応が重要な働きをしていると考えられてきた。事実、組織因子を過剰発現させると再狭窄が促進し¹³⁾、TFPI を過剰発現させると再狭窄が抑制されること¹⁴⁾が知られている。一方、トロンビンの阻害剤では再狭窄抑制の効果はなく、TFPI による組織因子の機能の抑制が重要ではないかと考えられる。組織因子・VIIa 因子複合体による細胞のシグナル伝達系の活性化とそれに続く種々の遺伝子の発現が報告されており¹⁵⁾ (図 6)、TFPI が組織因子のこのような機能を抑制することにより、細胞の増殖、ひいては内膜肥厚を抑制する

図4 TFPI遺伝子投与後4週目の腸骨動脈のアンギオグラフ
A: pcDNA plasmid コントロール B: TFPI 遺伝子投与
矢印は遺伝子導入した腸骨動脈を示す。(文献12より引用)

図5 TFPI遺伝子導入後4週目の腸骨動脈の組織染色 (文献12より引用)
A: 生理食塩水, B: HVJ-AVE liposome vector, C: HVJ-AVE liposome-pcDNA 3.1, D: TFPI 遺伝子
A: adventitia, M: media, I: intima, L: lumen, *: luminal thrombosis.

と考えられている。しかし、先に記したように、傷害直後に発現した組織因子の機能を抑制することだけでは、TFPIによる内膜肥厚の抑

制を説明することはできない。TFPIが血栓形成の阻害という機能の他に直接細胞に作用して内膜肥厚を抑制する可能性が大いにあると著者

図6 組織因子の機能: 血液凝固反応とシグナル伝達系の活性化
シグナル伝達系の活性化により発現する遺伝子を文献15より引用して示した。

は考えている。

おわりに

TFPIの臨床応用という観点から考えると、抗血栓薬剤としての応用が最も有望であるが、現在カイロン社により行われている敗血症患者の治療を目的としたphase IIIの段階であり、その後の進展については明らかでない。一方、本稿で記したように、血管傷害後の再狭窄予防という点からの臨床応用にももっと目を向ける必要がある。抗血栓作用を示すアンチトロンビンIIIがさまざまな機能を持っていることが明らかにされており¹⁶⁾¹⁷⁾、TFPIにももっと多くの機能がかくされていると考えてもふしぎではない。最近、TFPIが癌の転移を防ぐ活性をもっていることが報告された¹⁸⁾¹⁹⁾。また、Kunitz型阻害領域を2つもつプロテアーゼインヒビターであるbikuninにも癌細胞の転移を抑制する作用があることが報告されている²⁰⁾。TFPIの新しい機能の探索と臨床応用への研究がさらに発展することを期待する。

もうひとつは、TFPIと同様な機能をもつタンパク質を探索することも必要である。Fran-

cischettiらはダニの唾液から2つのKunitz型阻害領域をもつインヒビターを発見し、TFPIと同様の機能をもっていることを明らかにした²¹⁾。しかし、このインヒビターはTFPIとは異なり、Xaの活性部位とは結合せず、べつの領域(exosite)と結合することにより、VIIaの活性を阻害する。TFPIと同様の機能を持ち、しかも異なる阻害機構で血液凝固の阻害活性をもつタンパク質が、すでにダニのような下等動物において存在していることも興味深い。また、TFPIの発見にBrozeとともに参加したDr. Wunからの私信によれば、台湾のベンチャーに移った後、TFPIよりも強い阻害活性をもつ組換えタンパク質を発見したという。臨床応用に協力してくれる日本の会社も探しているとのことなので、興味のある方は連絡してほしい(Dr. Tze-Chein Wun, Evas Biopharm Inc., Taiwan, tcwun@hotmail.com)。

文 献

- 1) 加藤久雄, 亀井加恵子: 立体構造から見たTFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)の作用機構. 血栓止血誌 10: 299-304, 1999.
- 2) Kato H: Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor. Basic and clinical

- aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:539-548, 2002.
- 3) Mast AE, Acharya N, Malecha MJ, Hall CL, Dietzen DJ: Characterization of the association of tissue factor pathway inhibitor with human placenta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:2099-2104, 2002.
 - 4) Simons K, Ikonen E: Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572, 1997
 - 5) Bass MD, Humphries MJ: Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signaling. *Biochem J* **368**:1-15, 2002.
 - 6) Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M: Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**:729-777, 1999.
 - 7) Kojima T: Targeted gene disruption of natural anticoagulant proteins in mice. *Int J Hemato* **76** Suppl **2**:36-39, 2002.
 - 8) Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucema M, Huber J, Malli R, Graier WF, Hofer E, Binder BR, Leitinger N: Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca⁺⁺/NFAT. *Blood* **99**:199-206, 2002.
 - 9) Ghrib F, Brisset AC, Dupouy D, Terrisse AD, Navarro C, Cadroy Y, Boneu B, Sie P: The expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in aortic smooth muscle cell is up-regulated in synthetic compared to contractile phenotype. *Thromb Haemostas* **87**:1051-1056, 2002.
 - 10) Shirokuni-Ikejima H, Kokame K, Hamuro T, Bu G, Kato H, Miyata T: Tissue factor pathway inhibitor induces expression of JUNB and GADD45B mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* **299**:847-852, 2002.
 - 11) Nakamura Y, Nakamura K, Ohta K, Matsubara H, Yutani C, Hamuro T, Kato H, Ohe T: Anti-inflammatory effects of long-lasting locally-delivered human recombinant tissue factor pathway inhibitor after balloon angioplasty. *Basic Res Cardiol* **97**:198-205, 2002.
 - 12) Yin X, Yutani C, Ikeda Y, Enyoji K, Ishibashi-Ueda, Yasuda S, Tsukamoto Y, Nonogi H, Kaneda Y, Kato H: Tissue factor pathway inhibitor gene delivery using HVJ-AVE liposomes markedly reduces restenosis in atherosclerotic arteries. *Cardiovas Res* **56**:454-463, 2002.
 - 13) Hasentab D, Lea H, Hart CE, Lok S, Clowes AW: Tissue factor overexpression in rat arterial neointima models thrombosis and progression of advanced atherosclerosis. *Circulation* **101**:2651-2657, 2000.
 - 14) Sato Y, Kataoka H, Asada Y, Marutsuka K, Kamikubo Y, Kono M, Sumiyoshi A: Overexpression of tissue factor pathway inhibitor in aortic smooth muscle cells inhibits migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Res* **94**:401-406, 1999.
 - 15) Camerer E, Gjernes E, Wiiger M, Pringle S, Prydz H: Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J Biol Chem* **275**:6580-6585, 2000.
 - 16) Oelschlager C, Romisch J, Staubitz H, Stauss H, Leithauser B, Tillmanns H, Holschermann H: Antithrombin III inhibits nuclear factor κ B activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood* **99**:4015-4020, 2002.
 - 17) Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Harada N, Okabe H: Antithrombin prevents endotoxin-induced hypotension by inhibiting the induction of nitric oxide synthase in rats. *Blood* **99**:1638-1645, 2002.
 - 18) Lorenzet R, Donati MB: Blood clotting activation, angiogenesis and tumor metastasis: any role for TFPI? *Thromb Haemostas* **87**:928-929, 2002.
 - 19) Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY, Amaya M, Siddiqui F, Desai H, Francis JL: Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemostas* **87**:930-936, 2002.
 - 20) Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T: A Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, inhibits ovarian cancer cell invasion by blocking the calcium-dependent transforming growth factor- β 1 signaling cascade. *J Biol Chem* **278**:7790-7799, 2003.
 - 21) Francischetti IMB, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC: Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* **99**:3602-3612, 2002.