◆トピックス◆

凝固と線溶のクロストークと活性化プロテインCによるその調節

浦 野 哲 盟*

Cross talk between coagulation and fibrinolysis, and their regulation by aPC

Tetsumei URANO*

Key words: fibrinolysis, PAI-1, aPC, thrombin, ECLT

血管内凝固により生成された血栓を溶解する線維素溶解（線溶）反応は、凝固系が活性化されることにより更に促進される事が古くから知られている。これは過剰に産生されたフィブリン血栓を速やかに溶解するという重要な生体反応であると共に、播種性血管内凝固症候群（DIC）の病態にも関与している。今回我々は活性化プロテインC（activated protein C: aPC）が過剰な凝固系活性化と共に、これに伴う線溶系の異常発現も抑制することを見出した。aPCによる線溶促進機構が今まで強調されてきたが、凝固・線溶活性の過剰発現を正常化する事がaPCの本来の生理活性のようにも見える。その機構を紹介する。

1. 凝固に伴う線溶活性の増強

これには種々の機構の関与が示唆されている。組織型プラスミノゲンアクチベーター（tissue plasminogen activator: tPA）によるフィブリン上でのプラスミノゲンの効率的な活性化、およびフィブリン結合プラスミンのアンチプラスミンによる非効率的な阻害、などが知られている。我々は新たな機構として、線溶系の

開始段階を調節するプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター 1（plasminogen activator inhibitor 1: PAI-1）活性を、活性化凝固因子が中和することにより線溶活性が過剰に発現するという仮説を提唱してきた¹⁾。

2. 血管内線溶活性の制御における PAI-1 の重要性

tPA は一本鎖でも十分な活性を有するという他の凝固線溶系のセリン酵素には無い特徴を持つ。血中に活性型酵素とその特異的インヒビターである PAI-1 が同時に存在するために、tPA 活性はこれらの濃度のバランスによって決定されることになる。活性化凝固因子は PAI-1 活性を中和してこのバランスを線溶優位に傾ける。PAI-1 は他の serine protease inhibitor (SERPIN) と同様に、C 末端側の strained loop に存在する反応部位で標的酵素と高分子複合体を形成して酵素活性を阻害するが、ヴィトロネクチンなどの結合蛋白やヘパリンが存在すると、他のセリン酵素とも高分子複合体を形成しその酵素活性を阻害する。これに伴い PAI-1 も活性を失う（活性中和作用）ことになる。aPC による PAI-1 活

* 浜松医科大学 生理学第2講座 [〒431-3192 静岡県浜松市半田山1-20-1]

Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine [1-20-1, Handa-yama, Hamamatsu, 431-3192, Japan]

Tel: 053-435-2248 Fax: 053-435-7020 e-mail: uranot@hama-med.ac.jp

図1 ECLTに及ぼすaPCの影響

Ca⁺⁺の非存在下(左)と存在下(右)のECLTに対するaPC(濃度は横軸に示す), protein S (100 nM), リン脂質 (0.4 mM) の影響を検討した. ECLTはCa⁺⁺添加により短縮した(aPC = 0 nM)が, aPC添加により濃度依存性に延長した.(文献5より許可を得て転載)

性中和作用が最初に報告され, その後, トロンビンやCa⁺⁺結合活性化X因子(FXa)による中和作用が報告された.

3. 活性化凝固因子によるPAI-1活性の中和による線溶活性促進機構

精製系ではトロンビンやFXaがPAI-1活性を中和して線溶を促進することを報告した²⁾. その生理的意義を血漿の線溶活性を総合的に示すユーグロブリンクロット溶解時間(ECLT)を用いて証明した. ECLTはtPAとPAI-1のバランスによって決まるが³⁾, Ca⁺⁺添加により著明に短縮すること, およびこれにはX因子およびプロトロンビンの活性化が不可欠であることを報告した⁴⁾. 今回新たに, Ca⁺⁺添加に伴いユーグロブリン中で産生が亢進したトロンビンによりPAI-1が中和されることが原因であるこ

とを見出した⁵⁾.

Ca⁺⁺添加によりECLTは著明に短縮した(図1)が, その際Ca⁺⁺存在下でのみトロンビン産生が認められた(図2, lane3). ビオチン標識PAI-1を用い, ECLT中の動態を検討したところ, Ca⁺⁺存在下でのみトロンビンとの高分子複合体, および低分子分解PAI-1を認めた(図3, lane 3). 後者は恐らくトロンビンPAI-1高分子複合体の解離により生じたものと考えられた.

ユーグロブリン中のトロンビン産生を抑える目的でaPCおよびプロテインSを用い, その影響を検討した(図1). Ca⁺⁺非存在下のECLTは高濃度のaPCによりわずかに短縮した. Ca⁺⁺添加により短縮したECLTは低濃度のaPCにより濃度依存性に延長したが, 高濃度のaPC添加により, Ca⁺⁺非存在下と同様にわずかに短縮した. aPC添加(80 nM)によ

図2 ユーグロブリン中のトロンビン産生

ECLT 測定開始 15 分後のトロンビン産生をウェスタンブロッティング法で解析した。Ca⁺⁺ 存在下でのみトロンビンは産生されており (lane 3), aPC 添加によりこれが抑制された (lane 4)。 (文献 5 より許可を得て転載)

図3 ユーグロブリン中のビオチン標識 PAI-1 の動態

ECLT 測定開始 15 分後のビオチン標識 PAI-1 をブロッティング法で解析した。Ca⁺⁺ 存在下でのみビオチン標識 PAI-1 はトロンビンと高分子複合体を形成しており (lane 3), aPC 添加によりこれが抑制された (lane 4)。Ca⁺⁺ の非存在下 (lane 2) と存在下 (lane 4) 共にビオチン標識 PAI-1-aPC 複合体を認めた。 (文献 5 より許可を得て転載)

りユーグロブリン中のトロンビン産生 (図 2, lane 4), トロンビン・PAI-1 高分子複合体及び低分子分解 PAI-1 の生成が完全に抑えられた (図 3, lane 4)。これより aPC は Ca⁺⁺ 添加に伴うトロンビン産生を抑制すると同時に、生成トロンビンによる PAI-1 活性中和による線溶活性の増強を抑制することが明らかになった。高濃度の aPC 添加時には aPC-PAI-1 高分子複合

体の形成が認められたため (図 3, lane 2 & 4), これにより ECLT が若干短縮したものと考えられた。

aPC は PAI-1 活性の中和, および thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) 活性化の抑制により線溶活性を増強するとされる。凝固因子であるトロンビンにより活性化されて抗凝固活性を示す aPC が線溶活性を高めるとい

う仮説は、局所における凝固と線溶活性の調節と言う意味で魅力的である。しかしながら生理的濃度では、過凝固とこれに伴う線溶活性の過剰発現を正常化すると考えたほうが合理的であるようだ。

ま と め

血管内線溶活性は tPA と PAI-1 のバランスにより調節されている。これらの血中濃度は微量であるが、それだけに他の因子による修飾を受けやすく線溶活性が大きく変化する可能性がある。凝固因子による PAI-1 活性の中和反応あるいは限定分解による不活性化は、線溶活性の生理的あるいは病的過剰発現という両方の意味から重要であると考えられる。プロテイン C 系による本機構の制御もまた、生理的にも、aPC による治療の観点からも重要であろう。今後 *in vivo*

の検討等、更なる検証が必要である。

文 献

- 1) Urano T, Ihara H, Suzuki Y, Takada Y and Takada A: Coagulation associated enhancement of fibrinolytic activity via a neutralization of PAI-1 activity. *Semin. Thromb Hemost* **26** : 39-42, 2000.
- 2) Urano T, Nagai N, Matsuura M, Ihara H, Takada Y and Takada A: Human thrombin and calcium bound factor Xa significantly shorten tPA-induced fibrin clot lysis time via neutralization of plasminogen activator inhibitor type 1 activity. *Thromb Haemost* **80** : 161-166, 1998.
- 3) Urano T, Sumiyoshi K, Pietraszek MH, Takada Y and Takada A: PAI-1 plays an important role in the expression of t-PA activity in the euglobulin clot lysis by controlling the concentration of free t-PA. *Thromb Haemost* **66** : 474-478, 1991.
- 4) Kojima Y, Urano T, Kojima K, Serizawa K, Takada Y and Takada A: The significant enhancement of fibrinolysis by calcium ion in a cell free system.: The shortening of euglobulin clot lysis time by calcium ion. *Thromb Haemost* **72** : 113-118, 1994.
- 5) Urano T, Castellino FJ, Ihara H, Suzuki Y, Ohta M, Suzuki K, Mogami H: Activated protein C attenuates coagulation-associated over expression of fibrinolytic activity by suppressing the thrombin-dependent inactivation of PAI-1. *J. Thromb Haemost* **1** : 2615-2620, 2003.