◆トピックス◆

組織性プラスミノゲン・アクチベータ (t-PA) のレセプター

深尾 偉 晴* 松尾 理*

Tissue-Type Plasminogen Activator (t-PA) Receptor

Hideharu FUKAO* and Osamu MATSUO*

Key words: t-PA receptor (t-PAR), u-PA receptor (u-PAR), mannose receptor, liver parenchymal cells, vascular endothelial cells

1. はじめに

血液線溶系の活性化因子である tissue-type plasminogen activator (t-PA) に対する特異的受容体 (t-PA receptor, t-PAR) が最近注目されている。一方, urokinase-type PA の特異的受容体 (u-PAR) はヒト単球由来樹立株 U-937 によって大量に発現されることから, 既に単離・精製され, 遺伝子まで明らかにされている¹⁾。細胞膜への結合様式²⁾, u-PA との結合部位³⁾ などかなりその分子学的性質が明らかにされている。最近では u-PAR の発現と腫瘍細胞の特性との関連について盛んに研究がなされている⁴⁾。このような中で t-PAR の研究はかなり遅れているが, その理由には t-PAR を大量に発現する細胞がみつからず, かつその存在の証明が難しいことがあげられる。しかし, 最近ようやく t-PAR の存在もほぼ確定し, われわれの報告⁵⁾ も含め, その実体の一部が明らかとなりつつある。

現在までのところ, 生体内の細胞が発現する t-PAR は大別して 2 種類存在すると考えられる。すなわち, 肝細胞で主に発現されるものと血管内皮細胞で主に発現されるものである。肝細胞の t-PAR は t-PA の代謝, すなわち血中の t-PA clearance に関与するものであり, そ

の実体は t-PA の糖鎖 (mannose) を認識して結合する mannose receptor として同定されている。一方, 血管内皮細胞の t-PAR は血中の t-PA を細胞膜上に固定化し, t-PA の酵素活性を保持し, t-PA による細胞表面での線溶活性を制御することに関与するものと予想されている。

本稿では肝細胞が発現する t-PAR と血管内皮細胞が発現する t-PAR について, 現在までの研究状況について総説し, さらに最近われわれが明らかにした血管内皮細胞の t-PAR について報告する。

2. 肝細胞の t-PAR

マウスを用いた *in vivo* の系で血中の t-PA は肝臓に取り込まれることが証明され⁶⁾, その後肝臓の細胞群別による取り込みが検討された。Rijken らは (Table 1) に示すように, 肝細胞を実質細胞, 内皮細胞および Kupffer 細胞に分別し, おおのの細胞群に対する t-PA の結合を解析したところ, t-PA は主に肝内皮細胞に特異的に結合した⁷⁾。しかし肝臓全体にしめる実質細胞の割合から, 総取り込み量は主に実質細胞と内皮細胞とで占められており, Kupffer 細胞はほとんど取り込みに関与していなかった。Mannan や mannose を糖鎖に持つ ovalbumin を t-PA 投与前に投与しておくと, 肝臓

* 近畿大学医学部第二生理学教室 [〒 589 大阪府大阪狭山市大野東 377-2]: Department of Physiology, Kinki University School of Medicine, Osakasayama 589, Japan.

Table 1 Relative contribution of the different liver cell types to the total liver uptake of t-PA.

Cell type	Uptake of t-PA	
	% i.d. $\times 10^3$ /mg cell protein	% total liver
Parenchymal	31.9 $\pm$ 2.4	54.5 $\pm$ 4.8
Endothelial	651.2 $\pm$ 71.5	39.5 $\pm$ 3.8
Kupffer	132.0 $\pm$ 29.0	6.1 $\pm$ 1.2

Liver cell isolation was started 5 min after an intravenous injection of 125 I-t-PA. Multiplication of the per cent of the injection dose (i.d.)/mg of cell, with the amount of protein that each liver cell type contributes to total liver protein, results in the t-PA uptake (% of total liver) by each cell type. Data represent the mean of three experiments $\pm$ S.D.

への t-PA の取り込みは著しく阻害された。ところが細胞群別に解析すると、肝の内皮細胞に特異的に上記 mannose 関連物質による t-PA の取り込み阻害がみられ、実質細胞への取り込みはわずかしかな阻害されなかった。その後の検討でも実質細胞の t-PA の認識機構は他の糖受容体 (galactose receptor) でもなく不明である⁸⁾。いずれにしても、肝臓では t-PA の取り込み機構はすくなくとも 2 つあり、実質細胞によるもの ($K_d=3.5$ nM, $B_{max}=68,000$) と内皮細胞によるもの ($K_d=4.0$ nM, $B_{max}=44,000$) とで制御されていると考えられている⁹⁾。最近、ヒト肝臓の組織抽出液から mannose receptor が単離・精製された¹⁰⁾ が、この蛋白は分子量 175,000 であり、既に同定されているヒト胎盤由来の mannose receptor とほぼ同一のものであった。したがって、mannose receptor は肝臓の内皮細胞で発現され、t-PA の血中半減期を一部制御していると考えられる。

3. 血管内皮細胞の t-PAR

血管内皮細胞は本来血栓形成を阻止する機能およびひとたび形成された血栓を効率良く溶解する機能の抗血栓特性を有している¹¹⁾。特に細胞上に血栓成分である fibrin が形成されると、細胞からの t-PA 分泌がわずかに増加するが、t-PA の特異的 inhibitor である type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) の分泌が著減し、結果的に細胞近傍では著しい線溶活性の増加に伴い fibrin 溶解が効果的に起き得る

ことをわれわれは証明している¹²⁾。このような機能に加えて細胞上では t-PA に特異的な受容体が t-PA を結合しその酵素活性を発揮させることにより、極めて局所的な線溶活性が発現されることも予想される。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対して t-PA が特異的に結合することが 1987 年に Beebe¹³⁾ や Hajar ら¹⁴⁾ により相次いで報告された。Beebe は HUVEC に t-PA は単一の結合部位で結合することを示したが ($K_d=240$ nM, $B_{max}=1.2 \times 10^7$ /cell), Hajar らは高親和性と低親和性の二つの結合部位を示した ($K_d=28.7 \pm 10.8$ pM, $B_{max}=3,700 \pm 300$ /cell および $K_d=18.1 \pm 3.8$ nM, $B_{max}=(8.15 \pm 1.46) \times 10^5$ /cell)。その後 Barnathan ら¹⁵⁾ も二つの結合部位を証明し、高親和性結合部位と t-PA との複合体 (105,000) が PAI-1 の monoclonal 抗体と反応したことから、高親和性結合部位は PAI-1 であることを示した。さらに Collen らのグループも PAI-1 monoclonal 抗体や PAI-1 と共有結合しない mutant t-PA (S478A rt-PA) や活性部位を brock した diisopropylphosphate rt-PA などを用いて高親和性結合部位が PA-1 であることを追認した¹⁶⁾。これらの結果は PAI-1 が HUVEC 上で活性を有するとする Sakata らの報告¹⁷⁾ や, extracellular matrix 中で活性型を保持した PAI-1 が細胞を介して液相中の t-PA と反応することを証明した Schleef ら¹⁸⁾ の報告からも裏付けられる。その他、HUVEC に対して 2 本鎖型の

Fig. 1 Radioautography of the complex of t-PA and t-PA binding molecule from human endothelial cells.

Lane 1, ^{125}I -t-PA; lane 2, cell lysate which was obtained from endothelial cells reacted with ^{125}I -t-PA; and lane 3, cell lysate which was obtained from endothelial cells reacted with ^{125}I -t-PA in the presence of 100-fold excess of unlabeled t-PA. Values on the left show molecular weight in kilodaltons.

t-PA より 1 本鎖型の t-PA が 3-4 倍多く結合すること¹⁹⁾ など示されたが, いずれも t-PAR の実体を示すデータはなかった. 1990 年に Hajjar らは HUVEC の細胞膜画分から t-PA に対する単一の結合部位 ($K_d=9.1\text{ nM}$, $B_{\text{max}}=3.1\text{ pmol/mg}$ 膜蛋白)をみだし, 電気泳動的に分子量 40,000 であることを示した²⁰⁾. 同じグループは続いてヒト胎盤の組織抽出液より分子量 42,000 の t-PA の特異的結合蛋白を単離・精製することに成功し, これを正式に t-PAR と同定した²¹⁾. しかしながら, この t-PAR は plasminogen にも特異的に結合する dual-ligand receptor であった. HUVEC 由来の t-PAR と胎盤由来の t-PAR との分子量の差は糖付加の差であるとしているが, 果して両者は本質的に同一のものであるかどうかは不明である. さらにこの 2 報ではいずれも t-PA と t-PAR とが結合し, 複合体を形成することを示すデータが欠落している. また, HUVEC には分子量

Fig. 2 Radioautography after ligand blotting with ^{125}I -t-PA (A), ^{125}I -Glu-plasminogen (B) and ^{125}I -anti- α -enolase IgG (C) blotted on nitrocellulose membrane. Lanes in (A) were reacted with ^{125}I -t-PA (lane 1), ^{125}I -t-PA in the presence of 100-fold excess of unlabeled t-PA (lane 2) or 6-aminohexanoic acid (lane 3), and in (B), ^{125}I -Glu-plasminogen (lane 1), ^{125}I -Glu-plasminogen in the presence of 6-aminohexanoic acid (lane 2), and lane in (C), ^{125}I -anti- α -enolase IgG. Values on the left show molecular weight in kilodaltons.

45,000 の plasminogen 結合蛋白が存在することが示されており²²⁾, 胎盤由来の t-PAR との関連も明らかにされていない.

われわれは HUVEC の浮遊状態で t-PA の結合を解析した⁵⁾. この系では細胞による extracellular matrix (ECM) 形成が無いため ECM に集積される PAI-1 の影響が全く除外でき, したがって細胞上の t-PA 結合部位に対する結合のみが解析される. ^{125}I -t-PA (40 nM) を 2×10^5 個の浮遊 HUVEC に対して振とうさせながら 4°C , 90 min 反応させた. 反応後 t-PA とその結合分子を disuccinimidyl suberate で化学的に架橋させ, 細胞を溶解した画分を SDS-PAGE, autoradiography で解析した (Fig. 1). t-PA は細胞から分子量 90,000 の複合体として回収された (lane 2). この系で大過剰量の非標識 t-PA が存在すると, この複合体は出現しなかった (lane 3) ことから, t-PA は明らかにその特異的結合分子と結合し, 複合体

を形成することが証明された。この複合体は anti-t-PA IgG に反応し、anti-PAI-1 IgG には反応せず t-PA の結合分子が PAI-1 でないことも確認された。この t-PA 結合分子の分子量を直接解析するために、浮遊 HUVEC を溶解した試料について t-PA, Glu-plasminogen および α -enolase IgG に対する ligand blot を行った (Fig. 2)。その結果、 ^{125}I -t-PA は分子量 20,000 の位置に結合し、その結合は大過剰の非標識 t-PA でも 6-aminoheptanoic acid でも阻害されたことから (Fig. 2, A), 分子量 20,000 の分子は t-PA に特異的な結合分子であり、かつその結合は t-PA の lysine-binding site を介しているものと考えられた。一方、浮遊 HUVEC では plasminogen に対して分子量 50,000 の部位が特異的に結合し (Fig. 2, B), この部位は anti- α -enolase IgG に反応する部位とほぼ同一であった (Fig. 2, C)。以上から、浮遊 HUVEC でも plasminogen の結合部位が発現されており、その実体は現在、細胞由来の plasminogen receptor として最も可能性の高い α -enolase²³⁾ 類似物質であることも示唆された。

4. おわりに

血管内皮細胞には u-PA も特異的に結合することが証明されており²⁴⁾, u-PA の存在が予想される。したがって、u-PA による抗血栓機能もあり得ると思われる。しかし、一般に生体内での u-PA は血管外線溶に関与していることから、やはり血管内皮細胞による血管内での線溶系制御には t-PA が重要な因子であると考えられる。今後は t-PA や PAI-1 に加えて t-PA も線溶系因子のひとつとして解析されるであろう。さらに、t-PA の発現を制御する機構を明らかにすることにより、血管内皮細胞の抗血栓性が一層明らかになり、血栓形成の予防、血栓溶解の促進など臨床的にも応用できる知見が期待される。そのため現在、血管内皮細胞由来の t-PA の単離・精製とその物質の同定と物性の解析が急がれている。

参考文献

1) Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt

N, Lund LR, Danø K, Appella E, and Blasi F: Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. EMBO J, 9: 467-474, 1990.

2) Ploug M, Ronne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, and Danø K: Cellular receptor for urokinase plasminogen activator: Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosylphosphatidylinositol. J Biol Chem, 266: 1926-1933, 1991.

3) Behrendt N, Ploug M, Patthy L, Housen G, Blasi F, and Danø K: The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. J Biol Chem, 266: 7842-7847, 1991.

4) Cohen RL, Xi X-P, Crowley CW, Lucas BK, Levinson AD, and Shuman MA: Effects of urokinase receptor occupancy on plasmin generation and proteolysis of basement membrane by human tumor cells. Blood, 78: 479-487, 1991.

5) Fukao H, Haguya Y, Nonaka T, and Matsuo O: Analysis of binding protein for tissue-type plasminogen activator in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 187: 956-962, 1992.

6) Fuchs HE, Berger H, and Pizzo S: Catabolism of human tissue plasminogen activator in mice. Blood, 65: 539-544, 1985.

7) Kuiper J, Otter M, Rijken DC, and Van Berkel TJC: Characterization of the interaction *in vivo* of tissue-type plasminogen activator with liver cells. J Biol Chem 263: 18220-18224, 1988.

8) Stang E, Roos N, Schluter M, Berg T, and Krause J: Evidence for carbohydrate dependent endocytosis of tissue-type plasminogen activator by liver cells. Biochem J, 285: 799-804, 1992.

9) Otter M, Kuiper J, Bos R, Rijken DC, and Van Berkel TJC: Characterization of the interaction both *in vitro* and *in vivo* of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with rat liver cells: Effects of monoclonal antibodies to t-PA. Biochem J, 284: 545-550, 1992.

10) Otter M, Zockova P, Kuiper J, Van Berkel TJC, Barrett-Bergshoeff MM, and Rijken DC: Isola-

- tion and characterization of the mannose receptor from human liver potentially involved in the plasma clearance of tissue-type plasminogen activator. *Hepatology*, **16**: 54-59, 1992.
- 11) 深尾偉晴, 松尾 理: 血管内皮細胞の高線溶能による抗血栓機序の解析. *脈管学*, **31**: 711-715, 1991.
- 12) Fukao H, Ueshima S, Tanaka N, and Matsuo O: Suppression of plasminogen activator inhibitor 1 release by fibrin from human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Res*, **57** (suppl X): 11-20, 1990.
- 13) Beebe DP: Binding of tissue plasminogen activator to human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Res*, **46**: 241-254, 1987.
- 14) Hajjar KA, Hamel NM, Harpel PC, and Nachman RL: Binding of tissue plasminogen activator to cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, **80**: 1712-1719, 1987.
- 15) Barnathan ES, Kuo A, Van der Keyl H, McCrae KR, Larsen GR, and Cines DB: Tissue-type plasminogen activator binding to human endothelial cells: Evidence for two distinct binding sites. *J Biol Chem*, **263**: 7792-7799, 1988.
- 16) Russell ME, Quertermouse T, Declerck PJ, Colten D, Harber E, and Homey CJ: Binding of tissue-type plasminogen activator with human endothelial cell monolayers: Characterization of the high affinity interaction with plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem*, **265**: 2569-2575, 1990.
- 17) Sakata Y, Okada M, Noro A, and Matsuda M: Interaction of tissue-type plasminogen activator inhibitor 1 on the surface of endothelial cells. *J Biol Chem*, **263**: 1960-1969, 1988.
- 18) Schleef RP, Podor TJ, Dunne E, Mimuro J, and Loskutoff DJ: The majority of type 1 plasminogen activator inhibitor associated with cultured human endothelial cells is located under the cells is accessible to solution-phase tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, **110**: 155-163, 1990.
- 19) Aerts RJ, Gillis K, and Pannekoek H: Single-chain and two-chain tissue-type plasminogen activator (t-PA) bind differently to cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost*, **62**: 699-703, 1989.
- 20) Hajjar KA, and Hamel NM: Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding sites for tissue plasminogen activator and urokinase. *J Biol Chem*, **265**: 2908-2916, 1990.
- 21) Hajjar KA: The endothelial cell tissue plasminogen activator receptor: Specific interaction with plasminogen. *J Biol Chem*, **266**: 21962-21970, 1991.
- 22) Dudani AK, Hashemi S, Aye MT, and Ganz PR: Identification of an endothelial cell surface protein that binds plasminogen. *Mol Cell Biochem*, **108**: 133-140, 1991.
- 23) Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, and Plow EF: Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: Identification of α -enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry*, **30**: 1682-1691, 1991.
- 24) Barnathan ES, Kuo A, Kariko K, Rosenfeld L, Murray SC, Behrendt N, Ronne E, Weiner D, Henkin J, and Cines DB: Characterization of human endothelial cell urokinase-type plasminogen activator receptor protein and messenger RNA. *Blood*, **76**: 1795-1806, 1990.