◆トピックス◆

マウス敗血症モデルにおける線溶系の役割

山 本 晃 士*

Pathological Role of Fibrinolytic System in a Murine Model of Sepsis

Koji YAMAMOTO*

Key words: Plasminogen activator inhibitor-1, Urokinase, Tissue factor, Fibrin deposition, Sepsis

はじめに

グラム陰性桿菌による重症感染症においてはしばしば、菌の有するエンドトキシン (Lipopolysaccharide : LPS) によって DIC および敗血症性ショックが引き起こされる¹⁾。現在までに LPS 投与による敗血症の動物モデルとして、サル、ウサギ、ラットなどを使った研究成果がいくつか報告されている。いうまでもなく敗血症性ショックの主因は、微小血管内凝固とそれに引き続く多臓器不全であり、この凝固亢進状態には血管内皮細胞の果たす役割が大きいと考えられている。すなわち、エンドトキシンによって惹起される炎症反応においては、主として免疫担当細胞から TNF- α , interleukin などの炎症性メディエーターが放出されるが、それにより血管内皮細胞における tissue factor (外因系凝固の起始因子) の発現は亢進し、抗凝固分子としてはたらく thrombomodulin の発現は抑制される²⁾。私たちはマウス敗血症モデルにおいて、線溶系因子 (tissue-type plasminogen activator : t-PA, urokinase : u-PA, plasminogen activator inhibitor-1 : PAI-1) および tissue factor : TF に焦点をあて、各 mRNA の組織レベルでの発現制御と微小血栓形成過程との関連を調べた³⁾

のでここに述べる。

1. エンドトキシンによる線溶系因子および tissue factor の発現制御

腹腔内 LPS 投与マウスより、肝、腎、副腎、肺、心臓、脳の各組織を摘出し、RNA を抽出した後、t-PA, u-PA, PAI-1, TF の各 mRNA の発現量の経時的变化を定量的 RT-PCR 法⁴⁾により解析した。図 1 に示すように、腎、副腎、肺、心臓のすべてにおいて PAI-1 mRNA は著明に増加した (7-60 fold $\uparrow$) が、t-PA mRNA の変化は軽度であった。面白いことに u-PA mRNA は腎、副腎、心臓において著明に減少した (70~80% $\downarrow$) が、肺においては変化しなかった。TF mRNA は腎、副腎、肺においては増加した (2-6 fold $\uparrow$) が、肝、心臓での発現は抑制された⁵⁾。脳では各 mRNA とも発現量の変化は見られなかったが、これはおそらく脳血液関門によって、投与された LPS が脳実質内に到達できないことによるのではないかと推測された。このように、LPS による各 mRNA の発現変化には組織特異性のあることがわかる。

次に、これら各 mRNA の発現変化を in situ hybridization 法により、腎組織において視覚的に検討した (図 2)。PAI-1 mRNA の増加は LPS 投与 3 時間後をピークに腎全実質にて認

* 名古屋大学医学部第一内科 (〒466 名古屋市昭和区鶴舞町 65) : First Department of Internal Medicine, 65 Tsuruma, Shouwa, Nagoya 466, Japan

図1 マウス組織におけるLPS投与後のt-PA(□), u-PA(○), PAI-1(●), TF(■)のmRNAレベルの経時的変化(定量的RT-PCR法による解析)

められたが、それは糸球体内および尿細管周囲の血管内皮細胞における発現増加であった。u-PA mRNAはLPS投与により、主たる生成の場である腎髄質⁹⁾にて著明にその発現が抑制されたが、投与24時間後にはほぼ正常レベルに回復した。t-PA mRNAは腎皮質の糸球体内において軽度増加した。TF mRNAは腎皮質において発現増加が認められたが、それは、通常はTF mRNAを発現していない尿細管上皮細胞においてであった。

2. LPS投与による組織内フィブリン沈着の経時的変化および考察

このような線溶系因子およびtissue factorの発現変化と組織における微小血栓形成との関連を調べるため、LPS投与後の組織内フィブリン沈着の経時的変化について、ラビット抗マウ

ス・フィブリン抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。その結果、LPS投与24時間以内にフィブリン沈着が認められたのは腎、副腎のみであり、肝、肺、心臓、脳を含むその他の組織ではフィブリンを検出できなかった。腎におけるフィブリン沈着は、皮質糸球体内の毛細血管ループおよび、皮質、髄質の尿細管周囲の微小血管内に認められたが、その沈着はLPS投与3時間後をピークとして徐々に減少し、投与24時間後にはほとんど検出されなくなった(図3A-D)。これと同様のフィブリン沈着の経時的変化は、副腎皮質の微小血管内においても認められた(図3E-F)。この結果は両組織における線溶系因子のmRNA発現の経時的変化とよく符合している。すなわち、PAI-1 mRNAの顕著な発現増加とu-PA mRNAの著明な発現減少である。PAI-1 mRNAの著明な発現増加が両組織

図2 マウス腎臓におけるLPS投与後のPAI-1, TF, t-PA, u-PAのmRNA分布の経時的変化 (in situ hybridization法による解析)

図3 マウス腎、副腎におけるLPS投与後のフィブリン沈着の経時的変化
(免疫組織化学法による解析)

におけるフィブリン沈着に必須であることは、PAI-1 ノックアウト マウス⁷⁾を用いた同様の実験により裏付けられた (PAI-1 ノックアウトマウスの腎、副腎にはLPS投与後もフィブリン沈着が認められなかった)。また、同様に PAI-1 mRNA の発現増加と u-PA mRNA の発現減少とを認めたにもかかわらず、TF mRNA の発現が減少した心臓の微小血管内にフィブリン沈着を検出できなかったことから、当該組織における TF mRNA の発現増加もフィブリン沈着促進にとって重要な要因であろうと考えられた。腎、副腎と同程度の著明な PAI-1 mRNA の発現増加と TF mRNA の発現増加を認めた肺にて、やはりフィブリン沈着を検出できなかったことは、当該組織における u-PA mRNA の発現抑制がフィブリン沈着にとって必要であり、t-PA mRNA の発現変化とは無関係であるこ

とを示唆している。この結果は、t-PA ノックアウト マウスよりもむしろ、u-PA ノックアウトマウスの組織内においてフィブリン沈着が散見されたという事実⁸⁾とも合致する。これらの観察結果は、従来よりの“血液中のフィブリン溶解の主役は t-PA “ という定説⁹⁾と相反するものであり、組織内の微小血栓溶解における u-PA のかくれた重要性が明らかとなった。また、組織における微小血栓形成および溶解にとっては、systemic な血液中の凝固線溶系因子レベルの変化よりむしろ、各組織、局所での発現変化 (local expression level) が重要であるという可能性も考えられる。グラム陰性桿菌感染症による DIC には meningococcal bacteremia にもなっており、有名な “Waterhouse-Friderichsen syndrome “ がある¹⁰⁾が、この病態にみられる急性腎不全および副腎不全は、腎、

副腎内の微小血栓による組織壊死が原因と考えられている。敗血症性ショックにおいてこの両臓器が特に微小血栓を起こしやすい背景には、線溶系因子（主として PAI-1 と u-PA）の著明な組織内発現変化があると考えられる。

おわりに

線溶系因子の病態生理学的な研究は、一連のノックアウト マウス（PAI-1, t-PA, u-PA, u-PA receptor, plasminogen 等）の確立により、著しく進歩した。これらを用いた非常に興味深い研究報告は枚挙にいとまがなく、ここに紹介できないのが残念である。凝固系因子に関しても、fibrinogen, TF, TFPI, F.VII, prothrombin, thrombomodulin 等のノックアウト マウス、さらには APC resistance の原因とされる F.V-Leiden のトランスジェニック マウスと、その数はふえるばかりである。これらのモデルを用いることにより、各因子の *in vivo* における生理および病理学的な意義が、ますます明らかにされるだろうと期待される。

（本研究は米国スクリプス研究所の David J. Loskutoff 博士との共同研究によるものである。）

文 献

- 1) Coalson JJ: Pathology of sepsis, septic shock, and multiple organ failure. In Perspective on Sepsis and Septic Shock. Anonymous Society of Critical Care Med. Fullerton, CA. 27-59, 1986.
- 2) Moore KL, SP Andreoli, NL Esmon, CT Esmon and NU Bang: Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium *in vitro*. J Clin Invest 79: 124-130, 1987.
- 3) Yamamoto K and DJ Loskutoff: Fibrin deposition in tissues from endotoxin-treated mice correlates with decreases in the expression of urokinase-type but not tissue-type plasminogen activator. J Clin Invest 97: 2440-2451, 1996.
- 4) Wang AM, MV Doyle and DF Mark: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9717-9721, 1989.
- 5) Mackman N, MS Sawdey, MR Keeton and DJ Loskutoff: Murine tissue factor gene expression *in vivo*: tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. Am J Pathol 143: 76-84, 1993.
- 6) Sappino A-P, J Huarte, J-D Vassalli and D Belin: Sites of synthesis of urokinase and tissue-type plasminogen activators in the murine kidney. J Clin Invest 87: 962-970, 1991.
- 7) Carmeliet P, JM Stassen, L Schoonjans, B Ream, JJ Van den Oord, M De Mol, RC Mulligan and D Collen: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. J Clin Invest 92: 2756-2760, 1993.
- 8) Carmeliet P, L Schoonjans, L Kieckens, B Ream, J Degen, R Bronson, R De Vos, JJ Van den Oord, D Collen and RC Mulligan: Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. Nature 368: 419-424, 1994.
- 9) Hoylaerts M, DC Rijken, HR Lijnen and D Collen: Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator: Role of fibrin. J Biol Chem 257: 2912-2919, 1982.
- 10) McGehee WG, SI Rapaport and PF Hjort: Intravascular coagulation in fluminant meningococcemia. Ann Intern Med 67: 250-260, 1967.