

血液凝固機序 —血栓形成と細胞機能に及ぼす凝固因子の作用機序—

鈴木 宏治

要 旨：血液凝固系は傷害局所の止血血栓の形成に不可欠であるが，傷害局所以外での血栓形成は凝固制御系によって阻止されている。凝固系と凝固制御系は創傷治癒に必要な細胞機能の活性発現にも重要である。他方，心房細動性の脳塞栓症，下肢深部静脈血栓症，肺塞栓症などは，血液の鬱滞などによる凝固亢進で生じる病的血栓の形成に起因するが，こうした血栓症発症の背景には凝固制御系の破綻が大きな影響を及ぼすことが示唆されている。(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 287-292)

Key words: atrial fibrillation, deep venous thrombosis, thrombotic embolism, blood coagulation, anticoagulation systems

はじめに —血栓症の発症機序—

血栓には傷害時の出血を阻止する生理的な止血血栓と，何らかの病態時に血管内で形成され血液循環を障害する病的血栓がある。

病的血栓は，多様な血管障害性疾患を招来するが，血栓症は動脈硬化を基盤とする動脈血栓症と，静脈での鬱血などに起因する静脈血栓症に大別される。動脈血栓症は主に血小板血栓の形成が原因になり，治療には抗血小板療法が施される。他方，静脈血栓症は主に血液凝固系の活性化によって生じるフィブリン血栓の形成が原因になり，治療には抗凝固療法が行われている。

静脈血栓症として類別される心房細動による脳塞栓症は，心房収縮が正常に作動しないために，心室から送出される血液量が低下して心機能の低下を来すとともに，心房内に血液が停滞して凝固血栓が形成され，この血栓が脳血管を塞栓して発症する。他方，下肢深部静脈血栓症は，長期臥床や非運動状態によって下肢ふくらはぎのひらめ筋内の静脈内に血液が鬱滞して凝固血栓が形成され，この血栓による下肢の運動機能障害を起こす病態である。また，下肢静脈内の血栓が遊離して，肺動脈を閉塞すれば肺機能障害を起こす肺塞栓症を誘発し，致

死することも稀ではない。

血液凝固機序

1. 血液凝固開始反応

血液凝固は，血管傷害部位の止血と創傷治癒に重要な生体防御反応の一つである。生理的な止血機序は，まず傷害組織基底膜のコラーゲンなどに血小板が粘着，凝集して血小板血栓が形成される。次いで，傷害組織の細胞膜に露呈した凝固開始因子の組織因子(tissue factor; TF)に血漿中の凝固系第 VIIa 因子が結合して凝固反応が開始され，フィブリン血栓の生成によって止血する。TF は，血管内皮下の組織構成細胞に広範に存在し，Protein disulfide isomerase(PDI)によってダイマーとモノマーの平衡状態にあるが，細胞傷害に伴って凝固活性を示すモノマーに変換される(de-encryption)。こうした TF 依存性に開始される凝固反応は外因系凝固系と呼ばれる。他方，ガラスや珪酸土など陰性荷電物質に，血液中の第 XII 因子・血漿プレカリクレイン・高分子キニノゲン・第 XI 因子が結合して，TF 非依存性に第 XI 因子が活性化されて開始される凝固反応は内因系凝固系と呼ばれる。血管内の内因系凝固惹起物質には，コラーゲン，リポ蛋白，血小板膜リン脂質，多リン酸化物質などが示唆されている。

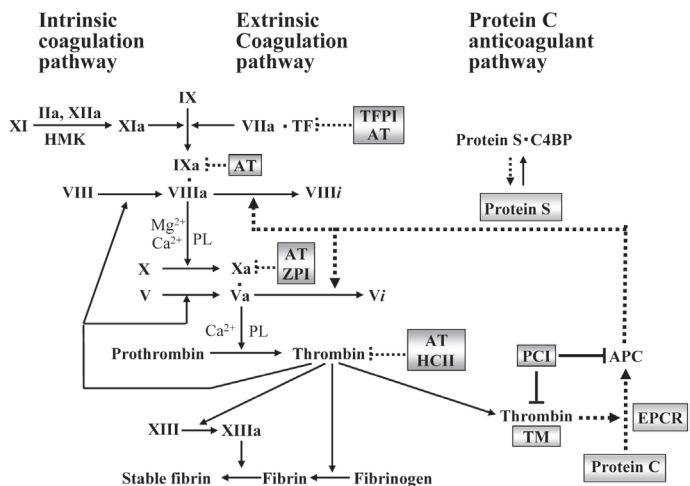


Figure 1 Mechanisms of blood coagulation and its regulation pathways.

AT, antithrombin; HCII, heparin cofactor II; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; ZPI, protein Z-dependent protease inhibitor; APC, activated protein C; PCI, protein C inhibitor; C4BP, C4b-binding protein; TM, thrombomodulin; EPCR, endothelial protein C receptor; PL, phospholipid

Fig. 1 に血液凝固系とその制御系の概要を示す。

一方、感染や傷害などの侵襲時には、活性化白血球や血小板の細胞膜に由来する微小顆粒(マイクロパーティクル;MP)が血中に増加し、一部のMPはTFを含有している。このMPの表面には活性化血小板膜に存在するP-selectinのリガンドであるPSGL-1やCD15が存在し、TF含有MPが傷害部位に集積した活性化血小板のP-selectinを介して結合することによって、血小板上でMPのTF依存性に凝固反応が開始される可能性も示唆されている¹⁾。

2. 凝固カスケード反応とフィブリン血栓の形成

TF 依存性あるいは非依存性に開始された血液凝固反応は、傷害部位の細胞膜に粘着凝集した活性化血小板上で著しく増幅される。活性化血小板膜表面には、ホスファチジルセリンなどの陰性荷電リン脂質が存在し、このリン脂質にビタミン K 依存性凝固因子と呼ばれる γ -carboxyglutamic acid (Gla) 残基を有する凝固因子 (第 VII 因子、第 IX 因子、第 X 因子、プロトロンビンなど) とともに、凝固増幅因子の活性化第 Va 因子と第 VIIIa 因子が結合する。こうして、血小板膜上に集積した凝固因子の分子集合体の中で、プロテアーゼ凝固因子 (第 VIIa 因子、第 IXa 因子、第 Xa 因子) がプロテアーゼ前駆体凝固因子 (第 X 因子とプロトロンビン) を逐次活性化する (Fig. 2)²⁾。とりわけ、第 IXa 因子による第 X 因子の活性化は第 VIIIa 因子の存在下に 10 万倍以上増幅され、また、第 Xa 因子によるプロトロンビンの活性化は第 Va 因子の存在下に 30 万倍以上増幅される。第 VIIIa 因

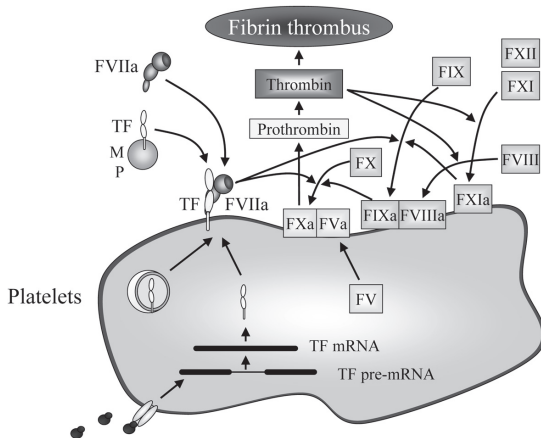


Figure 2 Amplification of blood coagulation on platelets (Modified from Mackman N, et al. ATVB 27: 1687, 2007).

子は第 IXa 因子と第 X 因子の受容体として、また、第 Va 因子は第 Xa 因子とプロトロンビンの受容体として機能し、酵素の基質分解反応を触媒する役目を果たすと考えられている。

こうして、傷害部位では大量のトロンビンが生成され、血小板血栓の上にフィブリン血栓が形成されて止血する。このような逐次的に増幅される凝固反応は凝固カスケード反応と呼ばれる。なお、先述の白血球や血小板由来のMPには大量の陰性荷電リン脂質ホスファチジルセリンが存在し、凝固反応の拡大化に関与すると考えられている。実験的に、血友病などの血液凝固能の低下時には外部からのMPの投与により凝固能の亢進がみら

Table 1 Protease inhibitors on blood coagulation factors

Inhibitors	MW	Concentration (μg/ml)	Target proteases
Antithrombin (AT)	58,000	150	thrombin, Xa, IXa
Heparin cofactor (HCII)	66,000	100	Thrombin
α1antitrypsin (α1AT)	52,000	3000	XIa, APC
C1inhibitor (C1INH)	104,000	250	Plasma kallikrein, XIIa
Protein C inhibitor (PCI)	57,000	4	APC, plasma kallikrein
Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	38,000	63.2 (ng/ml)	VIIa · TF, Xa
Protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI)	72,000	1.3	Xa, XIa

れ、また、凝固亢進時には抗 P-selectin 抗体の投与により血栓形成が抑制されることが報告されている。

さらに、凝固反応で生成されたトロンビンは第 XIII 因子を活性化し、第 XIIIa 因子はそのトランスグルタミナーゼ活性によりフィブリン分子を架橋してフィブリン血栓を安定化する。また、第 XIIIa 因子はフィブロンectinをはじめとする種々の細胞外マトリックス分子を架橋し、傷害組織の修復を進展させる。

血液凝固制御機序

生理的止血に重要なフィブリン血栓の形成は、血管の傷害組織に限局され、傷害部位以外での血栓形成は血管内皮細胞上に備わった凝固制御系によって阻止されている。凝固制御系には、主に傷害部位以外での過剰な凝固反応の進展を阻止するプロテアーゼインヒビターによる凝固制御系と、正常時の血液流動性の維持に働くプロテイン C 凝固制御系がある (Fig. 1)。これまでの多くの臨床的知見から凝固制御因子の先天性欠損症 (遺伝子異常症) は血栓症を発症しやすい血栓性素因であることが明らかにされている。

1. プロテアーゼインヒビターによる凝固制御

血漿には多数のプロテアーゼインヒビターが存在し、過度の凝固反応を阻止している。主なインヒビターには、組織因子系インヒビター (tissue factor pathway inhibitor; TFPI)、アンチトロンビン (AT)、ヘパリンコファクター II (HCII) などがあり、いずれも血管内皮細胞上のヘパリン様分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan; HSPG) に結合して活性を発現する (Table 1)。最近、新しいプロテアーゼインヒビターとしてプロテイン Z 依存性凝固インヒビター (ZPI) が同定された。以下に各インヒビターの性質を述べる。

(1) TFPI

TFPI は血管内皮上の HSPG に結合して、組織因子に結合した第 VIIa 因子および第 Xa 因子を特異的に阻害する。TFPI の一部は遊離型 TFPI として、血中のリボ蛋白質に結合しているが、多くは血管内皮の HSPG に結合しており、血管内皮上での外因系凝固の開始反応を制御すると考えられている。

(2) AT

AT (ATIII とも記される) は、ほとんどすべてのプロテアーゼ凝固因子を阻害するが、生理的にはトロンビンおよび第 Xa 因子の阻害因子として重要である。AT の抗凝固作用の発現には血管内皮上のヘパリン様物質の HSPG が不可欠であり、血栓症を発症した AT 遺伝子の異常症として、ヘパリン結合能やトロンビン阻害活性を欠いた AT 異常分子および AT 蛋白の発現低下に基づく AT 欠損症が報告されている。こうした AT 欠損症患者のほとんどはヘテロ接合体遺伝子異常症であり、患者は加齢に伴い静脈血栓症を発症しやすくなる。なお、ヒトのホモ接合体 AT 遺伝子欠損症の報告はなく、マウスのホモ接合体 AT 遺伝子欠損症は凝固亢進による胎生致死を来すことから、AT は胎児期の血液循環の維持に不可欠と考えられている。

(3) HCII

HCII はトロンビンを特異的に阻害する。その活性は、ヘパリンやデルマタン硫酸によって高められるため、HCII は HSPG が存在する血管内皮とデルマタン硫酸が多い細胞外マトリックスでトロンビン活性を制御していると考えられる。HCII の先天性欠損症は軽度血栓症を発症し、HCII 欠損マウスは血栓傾向を示す。

(4) ZPI

プロテイン Z (PZ) はビタミン K 依存性血漿蛋白質の一つで、長らくその機能は明らかでなかった。1998 年、PZ

依存性に第 Xa 因子を阻害するプロテアーゼインヒビターが血漿から単離され、PZ 依存性プロテアーゼインヒビター (ZPI) と命名された。ZPI は、第 Xa 因子を PZ、リン脂質、Ca²⁺ 依存性に阻害し、第 IXa 因子を PZ 非依存性に阻害する。最近、血栓傾向を示す先天性 ZPI 欠損症が報告され、ZPI は生理的にも重要な抗血栓性因子と考えられている。

2. プロテイン C(PC)凝固制御系

PC 凝固制御系は、健常時の血液流動性維持に重要な凝固制御系で、プロテアーゼ前駆体の PC の活性化によって開始される。血管内では常時、微量のトロンビンが生成されており、このトロンビンは血管内皮細胞上のトロンボモジュリン(thrombomodulin; TM)に結合して、内皮細胞上の PC 受容体(endothelial protein C receptor; EPCR)に結合した PC を特異的に活性化する。活性化 PC(activated protein C; APC)は、そのプロテアーゼ活性で凝固増幅因子の第 Va 因子および第 VIIIa 因子を失活化して凝固反応を阻止し、トロンビンの過剰な生成を阻止する。すなわち、PC 凝固制御系は凝固系に備わっているネガティブフィードバック機構である(Fig. 1)。APC の抗凝固作用の発現には、血小板や内皮細胞に結合したプロテイン S(PS)が補助因子として重要である。また、EPCR に結合した APC は抗炎症作用と細胞保護作用を示す。他方、血管内皮細胞上での過度の PC の活性化と APC の作用は、血漿中の APC インヒビター(protein C inhibitor; PCI)により制御されている。以下に PC 凝固制御系因子について述べる。

(1) プロテイン C(PC)

PC はビタミン K 依存性血漿蛋白質の一つで、循環血液中の PC の一部は血管内皮細胞上の EPCR に結合している。この EPCR 結合 PC は内皮細胞上の TM に結合したトロンビンによって特異的に活性化される。生成した APC は PS と複合体を形成し、PS に結合した第 Va 因子および第 VIIIa 因子を特異的に限定分解して失活化する。また、内皮細胞の PC 受容体(EPCR)に結合した APC は、隣接するトロンビン受容体の一つのプロテアーゼ活性化受容体(Protease-activated receptor-1; PAR-1)を限定分解して活性化し細胞内にシグナルを伝達し、傷害細胞で活性化される転写因子 NF-κB の活性化を阻止して抗炎症作用を示し、またアポトーシスを阻止する遺伝子群を活性化して細胞保護作用を発現する。

最近、APC による PAR-1 の活性化は細胞内のスフィ

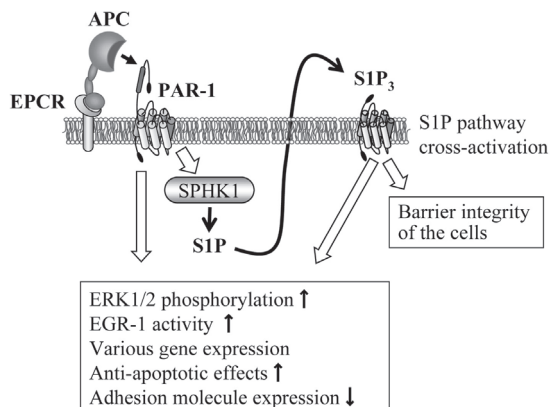


Figure 3 Protective signaling pathways of activated protein C in endothelial cells.

ンゴシン 1 リン酸(Sphingosine-1-phosphate; S1P)キナーゼを活性化して S1P を産生し、この S1P がその細胞膜受容体(SIP₃)を刺激して抗炎症作用や細胞保護作用を示すことが示唆された(Fig. 3)³。他方、トロンビンによる PAR-1 の活性化は細胞に炎症を誘発することが知られているが、EPCR に結合した APC による PAR-1 の活性化は、何故、抗炎症作用を誘発するのか、という問いに対して、最近、以下の説が提唱された。トロンビンによる PAR-1 の活性化は、細胞内の Gq と G12/13 を介する RhoA の活性化を経て NF-κB を活性化し、TF や細胞接着分子を発現し、炎症亢進や凝固亢進状態を誘引する。これに対して、APC や PC が EPCR に結合すると、細胞膜の脂質ラフトに局在する EPCR と PAR-1 を細胞内で連結しているカベオリン(Caveolin)が遊離し、トロンビンや EPCR 結合 APC によるこの PAR-1 の活性化は Gi を介して Rac1 を活性化し、抗炎症作用(細胞保護作用)を示すというものである⁴。

これ以外にも APC の細胞に対する作用として、β1/β3 インテグリンに直接結合して好中球の移動を抑制する作用⁵、インテグリン CD11b/CD18 依存性(EPCR 非依存性)にマクロファージの活性化と組織浸潤を抑制する作用⁶、EPCR 依存性に CD8+ 樹状細胞の分化と活性化を抑制する作用⁷、アポトーシス細胞から遊離する細胞毒のヒストンを分解して、炎症の進展を抑制する作用⁸などが報告されている。

先天性ヘテロ接合体 PC 欠損症は加齢に伴い血栓症を発症しやすくなる先天性血栓性素因の一つであるが、ホモ接合体 PC 欠損症は生後まもなく DIC 様症状の電撃

性紫斑病を発症して致死する。

(2) TM

TM は内皮細胞上に存在するトロンビン機能変換因子であり、トロンビンの凝固促進活性(血小板活性化、フィブリン生成、第 V 因子・第 VIII の活性化作用など)を消失させ、凝固阻害活性(PC 活性化作用)を発現させる。また、TM に結合したトロンビンは、トロンビン活性化線溶阻害因子(Thrombin-activated fibrinolysis inhibitor; TAFI)と呼ばれる塩基性カルボキシペプチダーゼ前駆体を活性化し、血栓溶解を阻止する。この機序は、活性化 TAFIa がフィブリン分子上の t-PA(組織プラスミノゲン活性化因子)やプラスミノゲンが結合するリジン結合部位を分解し、線溶反応を阻止することによるもので、TAFI は血管障害性疾患(心筋梗塞や脳梗塞など)のリスク因子として考えられている。

最近、TM が血中に漏出した細胞障害因子の(High mobility group box-1; HMGB-1)を捕捉し、TM 結合トロンビンが HMGB-1 を分解して抗炎症作用を示すことが判明した⁹⁾。HMGB-1 は転写因子の p53 や NF- κ B の機能発現に関与する核内 DNA 結合蛋白質で、活性化樹状細胞やマクロファージ、壊死細胞などから細胞外に放出されて炎症反応を惹起する物質である。この TM による HMGB-1 の失活化は、PC の活性化を介さない抗炎症作用として注目される。このほかに、TM は細菌膜由来のリボ多糖(エンドトキシン)を捕捉して抗炎症作用を示すことも明らかにされている。こうした抗凝固・抗炎症作用を持つ TM の組み換え蛋白は、全身の微小循環系の凝固亢進に起因する血栓症である DIC に対して著効を示すことが臨床的に証明され、新しい DIC 治療薬として注目されている。

先天性ヒト TM 欠損症は高頻度に静脈血栓症を発症し、また、ホモ接合体 TM 欠損マウスは胎生致死を来することが明らかにされている。

(3) プロテイン S(PS)

PS はビタミン K 依存性血漿蛋白質の一つで、APC の抗凝固作用の発現に補助因子として関与する。PS は細胞膜上で APC や第 Va 因子、第 VIIIa 因子の結合蛋白として機能し、APC による第 Va 因子と第 VIIIa 因子の分解反応を促進する。なお、血中 PS の約 40% は遊離型として、約 60% は補体系制御因子の C4b 結合蛋白質(C4BP)との結合体型として存在するが、遊離型 PS のみが APC の補助因子として機能する。

最近 PS に、TFPI による外因系凝固反応の阻害を促進する作用や、神経細胞の傷害を阻止する抗炎症作用があることが示されたが、その作用機序は明らかでない。

PS 遺伝子の異常は、加齢に伴い血栓症を発症しやすくなる先天性血栓性素因であるが、臨床検査医学的には他の因子の欠損症と同様に、PS 蛋白欠乏症や PS 機能異常症のほかに、C4BP の増加に起因する遊離型 PS 低下症が存在する。PS 欠損症は欧米人に比較して日本人に多く、とりわけ PS 分子の EGF ドメインの SNP であるアミノ酸変異主に静脈血栓症を来す。

(4) EPCR

EPCR は PC および APC に対する細胞膜受容体であり、TM 結合トロンビンによる PC の活性化を促進するとともに、先述したように、PAR-1 を介する APC の抗炎症作用や細胞保護作用の発現に重要である。

EPCR の遺伝子異常による軽度の機能低下症は、静脈血栓症を来すと報告されているが、ホモ接合体 EPCR 欠損マウスは、ホモ接合体 TM 欠損マウスと同様に、凝固亢進や血管新生に異常を来し、胎生致死する。

(5) プロテイン C インヒビター (PCI)

PCI はヘパリンの存在下に、TM 結合トロンビンおよび APC を阻害して、過度の PC 凝固制御系の亢進を阻止する。また、PCI は TM 結合トロンビンによる抗線溶因子前駆体 TAFI の活性化を制御する。こうした PCI の作用は、血管内皮細胞上のヘパリン様分子の HSPG に結合して発現されると推定される。

他方、PCI は精子の機能発現に重要であり、不妊症患者では PCI の発現低下がみられ、PCI 遺伝子欠損マウスの雄では精子形成不全が認められる。われわれはヒト PCI 遺伝子導入マウスを用いて解析した結果、PCI には気道や肺における PC 凝固阻害系の制御、腎における線溶の制御、血管リモデリングの制御、肝障害と肝再生の制御、血管透過性の制御、腫瘍細胞の増殖・浸潤の制御、腫瘍細胞の転移制御、血管新生の抑制(内皮細胞のアポトーシス誘導)などの多様な生理活性を認め、PCI が生体で広く働く多機能セルピンであることを明らかにした¹⁰⁾。

おわりに

血栓症の発症に関わる血液凝固系と凝固制御系の分子機序について概説した。血液凝固は単にフィブリン血栓の形成だけでなく、創傷治癒に必要な多様な細胞における機能の発現と制御に不可欠である。とりわけ、トロ

ンビンと活性化プロテイン C (APC) は、血管内皮細胞や炎症関連細胞の機能の発現と制御調節における両輪として働く生理的に不可欠なプロテアーゼである。したがって血管内に備わる凝固系と凝固制御系は、トロンビンと APC の産生と活性発現を制御調節する生体防御システムと換言することができる。

文 献

- 1) Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, et al: Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000; **96**: 170–175
- 2) Mackman N, Tilley RE, Key NS: Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 1687–1693
- 3) Riewald M, Schuepbach RA: Protective signaling pathways of activated protein C in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 1–3
- 4) Bae JS, Rezaie AR: Protease activated receptor 1 (PAR-1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein C receptor is occupied by its natural ligand. *Thromb Haemost* 2008; **100**: 101–109
- 5) Elphick GF, Sarangi PP, Hyun YM, et al: Recombinant human activated protein C inhibits integrin-mediated neutrophil migration. *Blood* 2009; **113**: 4078–4085
- 6) Cao C, Gao Y, Li Y, et al: The efficacy of activated protein C in murine endotoxemia is dependent on integrin CD11b. *J Clin Invest* 2010; **120**: 1971–1980
- 7) Kerschen E, Hernandez I, Zogg M, et al: Activated protein C targets CD8+ dendritic cells to reduce the mortality of endotoxemia in mice. *J Clin Invest* 2010; **120**: 3167–3178
- 8) Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al: Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Med* 2009; **15**: 1318–1321
- 9) Abeyama K, Stern DM, Ito Y, et al: The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1267–1274
- 10) Suzuki K: The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2008; **6**: 2017–2026

Mechanisms of Blood Coagulation Factors on Thrombus Formation and Cell Activation in Thrombosis and Hemostasis

Koji Suzuki

Suzuka University of Medical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Science, Mie, Japan

Key words: atrial fibrillation, deep venous thrombosis, thrombotic embolism, blood coagulation, anticoagulation systems

Activation of the blood coagulation system is initiated by the binding of factor VIIa to tissue factor, which is de-encrypted on injured endothelial cells and many other extravascular cells. Thrombin, an important coagulation protease, is a multifunctional protein that, besides its functions in hemostasis and thrombosis (atrial fibrillation, deep venous thrombosis, and thrombotic embolism), has many cellular effects that link the coagulation system with the inflammatory response, such as wound healing, atherosclerosis, angiogenesis, tumor cell growth, and metastasis. On the other hand, several anticoagulation systems play roles related to the vascular endothelial cells: the tissue factor pathway inhibitor system, antithrombin system, and protein C anticoagulant system. Congenital deficiencies of factors in the anticoagulant systems cause severe thrombotic diseases. The protein C anticoagulant system is the most important for maintaining blood fluidity in the vessels. Thrombin activates protease-activated receptor-1 (PAR-1) on the cells, which induces inflammation in the cells. Activated protein C (APC) also activates PAR-1 in the presence of endothelial protein C receptor (EPCR), which induces anti-inflammation in the cells. The PAR-1 activations by thrombin and APC/EPCR may play important roles in the expression of specific cellular responses in several physiological processes and in the pathogenesis of several diseases.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2011, **51**: 287–292)

Online publication October 3, 2011

脈管学 Vol. 51 No. 3