

線溶機序

浦野 哲盟

要 旨：線維素溶解(線溶)現象は血管内凝固により生じたフィブリン血栓を溶解する反応である。プラスミノゲン・アクチベーター(PA)がプラスミノゲンを限定分解しプラスミンを産生する過程と、プラスミンにより不溶性のフィブリンを分解する過程に大別できる。いずれも多様な修飾因子やインヒビターにより巧妙に制御されており、未成熟止血血栓は早期には溶解せず、過剰な血栓や不要な血栓は効率よく溶解して血管の開存性を保つ。(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 293-299)

Key words: plasminogen, tissue-type plasminogen activator (tPA), plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)

はじめに

線維素(フィブリン)溶解(線溶)は、凝固により生じた不溶性のフィブリンを可溶性のフィブリン分解産物に分解する反応である¹⁾。従来、血管破綻あるいは組織傷害時に生じた止血血栓が組織修復に伴い不要になった際に、これを溶解・除去する機構と考えられてきた。しかしながら、線溶系因子の異常や機能低下で血栓症をきたす事実より、近年では、線溶系は過剰に産生された血栓や不要な血栓を積極的に溶解し血管の閉塞を防ぐ抗血栓機構であるとされている。線溶系は、PAによりプラスミノゲンを活性化する段階と、生じたプラスミンによりフィブリンが分解される段階に大別できる(Fig. 1)。いずれにも複数の分子が関与し、効率的な酵素反応を可能にすると同時に、不要な反応を抑制している。組織障害の修復中は被覆血栓が必要である一方、過剰な血栓は速やかに溶解される必要がある。様々な修飾因子やインヒビターが時空間的に巧妙に制御している機構を紹介する。

線溶機構

1. プラスミノゲン活性化機構とその制御

生理的なPAとして組織型PA(t-PA)とウロキナーゼ型

(u-PA)が存在するが、血管内線溶には前者が重要であり、血管新生、炎症、癌の転移等に関わる組織線溶には後者が関与する。t-PAは一本鎖の糖タンパクで、主に血管内皮細胞で産生・分泌される。プラスミンによりArg275-Ile276間が限定分解されると重鎖と軽鎖からなる二本鎖t-PA(tct-PA)となる。重鎖はN末端側より、フィブロネクチンのfinger domainに相同性をもつfinger domain, epidermal growth factorに相同性をもつgrowth factor domainと2つのkringle domainより構成され、活性中心は軽鎖にある(Fig. 2)。tct-PAは十分な酵素活性を持つが、他のセリン酵素と異なり一本鎖t-PA(sct-PA)もその約10分の1の活性を有する。さらにフィブリンやフィブリノーゲンに結合すると立体構造が変化し、tct-PAと同程度の酵素活性を示すことから、血漿中ではsct-PAはフィブリノーゲンに結合し十分な酵素活性を有していると考えられる²⁾。血漿中にはPAと1対1の複合体を形成してその活性を阻害するPA inhibitor 1(PAI-1)も存在する。十分な酵素活性を有するtPAとその即時的なインヒビターが同時に存在するため、血漿中のtPA活性ならびにプラスミノゲン活性化ポテンシャルは両者の濃度バランスによって決まることになる(後述)³⁾。

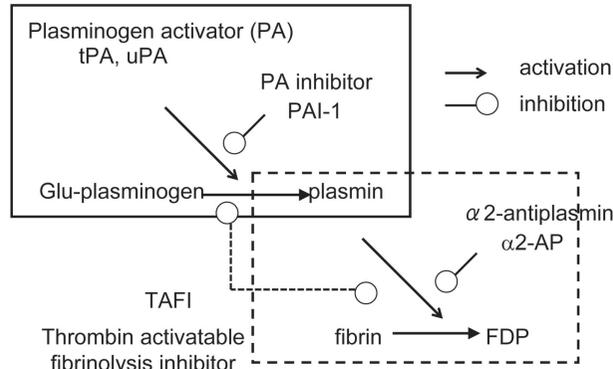


Figure 1 Fibrinolytic cascade.

The solid square indicates the plasminogen activation step, and the dotted square indicates the plasmin-dependent fibrin degradation step.

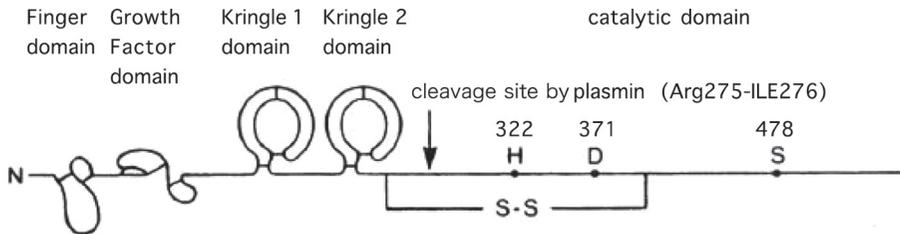


Figure 2 Structure of tPA.

2. フィブリン上でのプラスミノゲン活性化と凝固に伴う活性化促進機構(血栓溶解促進機構)

t-PAとプラスミノゲンはフィブリンに結合し3量体を形成することにより効率的にプラスミンを産生するとともにフィブリンを効率よく分解する¹⁾。t-PAはfinger-およびkringle 2 domainを介してフィブリンに結合する。フィブリン側の結合部位がD-domainに同定されているが、変性タンパクに共通したcrossed β structureに結合すると活性が増強するようだ⁴⁾。プラスミノゲンはkringle domainのリジン結合部位(LBS)あるいはアミノヘキシル結合部位を介して、フィブリン上のリジン残基に結合する。LBSはC末端リジンとの親和性が高いため、リジン残基C末端側を好んで限定分解するプラスミンにより一部分解されたフィブリンはC末端がリジンとなり、さらに効率よくプラスミノゲンが結合する。とくに α 鎖のC末端はフィブリン分解の初期に切断され、新規なプラスミノゲンの結合部位となる。基質であるフィブリンが鋳型となりプラスミン産生が増強するため、効率よく

基質が分解されることになる¹⁾。これにはフィブリンに結合したプラスミノゲンが活性化されやすい高次構造をとることも関わる。生理的に血中に存在するプラスミノゲンはN末端がグルタミン酸でGlu1-plasminogen (Glu1-plg)と呼ばれる。Glu1-plgは、生理的な濃度のCl⁻が存在するとN末端ペプチドがLys50を介して自身のkringle 4のLBSに結合したtightな構造を持つが、フィブリンにLBSを介して結合するとN末端ペプチドが遊離し活性化されやすい高次構造に変化する⁵⁾(Fig. 3)。すなわち血漿中では活性化されにくく、フィブリンに結合すると活性化されやすい構造をとることになる⁶⁾。一方プラスミンによりN末端ペプチドが切断されたLys77-plgはtightな構造をとれず、液層中でも活性化されやすい構造を有し、またフィブリンにも高親和性を示す。プラスミン活性の阻害反応も固相と液相で異なる。 $\alpha 2$ アンチプラスミン($\alpha 2$ AP)によるプラスミン活性の効率的な阻害には反応部位と活性中心の結合のほかに、プラスミノゲンのLBSと $\alpha 2$ APのC末端リジンを介する第2の結

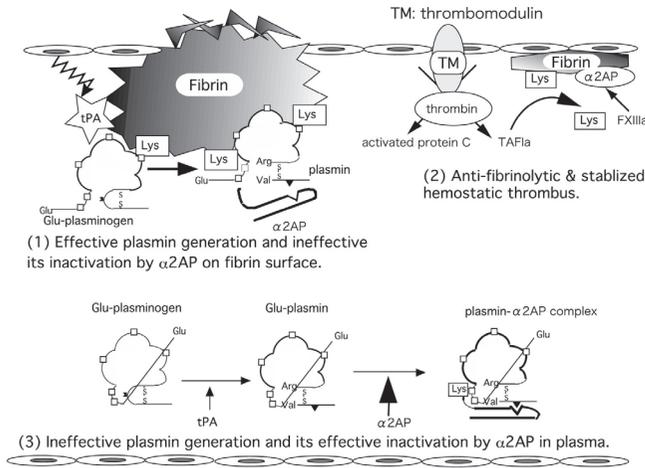


Figure 3 Spatiotemporal regulation of fibrinolysis.

(1) Effective plasmin generation and ineffective inactivation by $\alpha 2AP$ on a fibrin surface (upper left). tPA forms a tri-molecular complex with plasminogen that has a loose conformation on fibrin, which accelerates plasmin generation and the following fibrin dissolution. (2) Anti-fibrinolytic & stabilized hemostatic thrombus (upper right). The hemostatic thrombus is protected from fibrinolysis by cross-linked $\alpha 2AP$ and by TAFIa through a removal of C-terminal lysine residue. (3) Ineffective plasmin generation and its effective inactivation by $\alpha 2AP$ in plasma (bottom). In plasma, Glu1-plg adopts a tight conformation such that it is difficult to activate. Further, generated plasmin is effectively inactivated by $\alpha 2AP$.

合も必要である。しかしフィブリン上ではプラスミンはLBSが占拠されているので $\alpha 2AP$ による障害を受けにくい⁷⁾。このように生体内にはフィブリンができると線溶活性が発現しやすく、またフィブリン上で生成されたプラスミンは活性が障害されにくい機構があり、効率的な血栓溶解に関わると考えられる⁸⁾。

3. 血栓安定化のための線溶活性抑制機構(血栓溶解抑制機構)

プラスミノゲンの結合に重要なフィブリンのC末端リジンを選択的に除去し線溶活性を抑制する機構もあり、thrombin activatable fibrinolysis inhibitor(TAFI)がその中心となる^{9, 10)}。TAFIは分子量約60 kDの一本鎖蛋白で、トロンビンにより限定分解され、活性を持つ(TAFIa)。そのアミノ酸配列から、血漿中 carboxypeptidase B(CPB)、および血漿中にはなく血清中で産生される不安定な carboxypeptidase unstable(CPU)と同一であることが示された^{1, 9)}。血漿中には酵素前駆体として約75 nMの濃度で存在する。限定分解による活性化は、トロンビン単独($km = 2.14 \mu M$, $kcat = 0.0021/sec.$)よりもトロンボモジュリンに結合したトロンビンにより、約1250倍効率良く($km = 1.01 \mu M$, $kcat = 1.24/sec.$)活性化される。TAFIaは carboxy peptidase であり、C末端の ArgあるいはLysを選択的に切断する。補体系のC5aの不活性化にも関わるため炎症あるいは免疫にも関与すると考えられるがその生理的意義は未だ不明である。TAFIaの生理的インヒビターは同定されていないが血中で不安定で容易に失活する。トロンビンやプラスミンによる限定分解

も報告されているが、高次構造の変化が主な機構らしい⁹⁾。またフィブリン安定化因子であるXIIIaは、フィブリン線維間だけでなく、 $\alpha 2AP$ やTAFIもフィブリンに架橋しその溶解を抑制する。これらの機構は未成熟止血血栓の早期の溶解を防ぐうえで重要と考えられる。

4. フィブリン分解とその制御

プラスミンはフィブリンおよびフィブリノーゲンを基質とする。プラスミノゲンの活性化過程も含め生理的にはフィブリン分解が効率的であるが、フィブリノーゲンも標的とし、 αA 鎖C末端および $B\beta I(15)-42$ ペプチド切断から始まり、最終的には2分子のD分画と1分子のE分画に分解する。安定化フィブリンの分解においては γ 鎖がFXIIIaにより架橋されているので、D dimerが生じる点特徴的である。 $\alpha 2AP$ および $\alpha 2M$ が生理的なプラスミンインヒビターである。 $\alpha 2AP$ は液層中のプラスミンと効率的に高分子複合体を形成し活性を阻害するが、上記のようにフィブリンに結合したプラスミン活性の阻害は効率的でない。しかしながらFXIIIaによりフィブリンに架橋されると、フィブリン分解を効率的に阻害するとされる¹¹⁾。炎症時のフィブリン分解には好中球エラストラーゼも関与することが報告されている¹²⁾。切断部位がプラスミンと異なることから分解産物を個別に同定することも可能で、今後臨床的意義が解明されると期待する。

5. 血管内皮上の線溶活性発現とその調節

血管内皮の有する抗血栓性には、tPAの恒常性あるいは反応性の分泌による高い線溶活性も寄与する。われわ

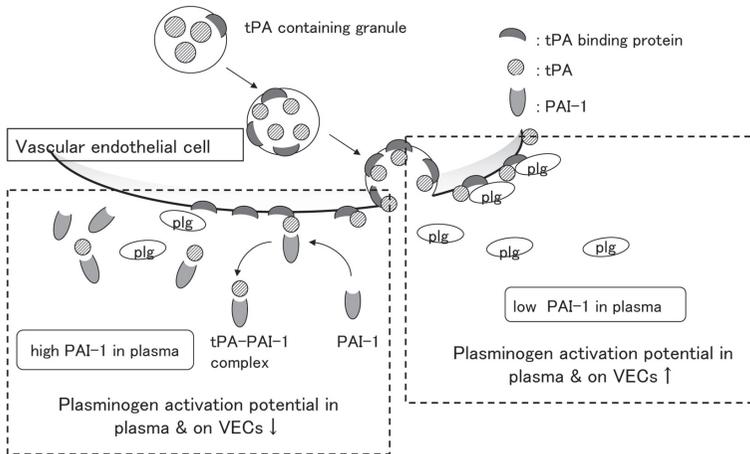


Figure 4 Preservation of high fibrinolytic potential by secreted tPA on vascular endothelial cells and its modification by PAI-1.

After secretion from its containing granules, tPA stays on vascular endothelial cells by binding through its heavy chain, which is essential to preserve high fibrinolytic potential. PAI-1, in turn, removes tPA from the surface by forming high molecular weight complexes.

Table 1 Correlations between plasma levels of tPA and PAI-1, and ECLT as well as free tPA

	ECLT	free tPA [#]
tPA		
mass	0.604 *	NS
activity	-0.905 ***	0.806 ***
free tPA [#]	-0.637 *	-
PAI-1		
total	0.868 ***	-0.852 ***
complex	NS	NS
free	0.863 ***	-0.879 ***
ECLT	-	-0.637 *

free tPA[#]: calculated by equations (1) and (2) shown below as [tPA].



$$[tPA] = k \times \frac{[tPA \cdot PAI-1]}{[PAI-1]} \quad (k = \frac{k_1}{k_2 + k_3}) \dots \dots \text{eq. (2)}$$

これは tPA は分泌顆粒からの開口放出後、重鎖依存性に血管内皮上に滞留する事実を見出した¹³⁾。血管内皮細胞上にはプラスミノゲンの結合蛋白も多く発現しており、これにより内皮上で効率よくプラスミノゲンを活性化し高い線溶活性を維持することが可能となる (Fig. 4)。興味深いことに PAI-1 は高分子複合体を形成して tPA の内皮上からの遊離を促進した。したがって高 PAI-1 血症では内皮結合の tPA 量が減少することにより、血液中だけでなく血管内皮上の線溶活性も抑制されていると予想される。血漿中 tPA 抗原量(多くは tPA-PAI-1 複合体)が

多いと心血管イベントのリスクが高いという、一見奇異な報告の背景を示す知見と考える¹⁴⁾。

病態との関連

1. プラスミノゲン活性化ポテンシャルの抑制と疾患
 プラスミノゲン活性化ポテンシャルは tPA と PAI-1 の濃度バランスで決まることは、包括的に線溶活性を表わすユーグロブリン溶解時間(ECLT)との関連で証明されている¹⁵⁾(Table 1)。ECLT は血漿中 tPA 活性と負の、また free および total PAI-1 量と良好な正の相関を

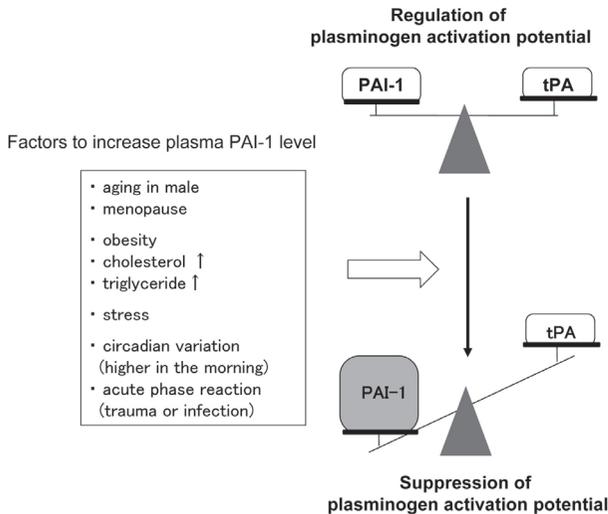


Figure 5 Plasminogen activation potential and its modification.

Plasminogen activation potential is essentially determined by the molar balance between tPA and PAI-1. The balance can easily be altered and a thrombophilic state developed as a result of an increase in plasma PAI-1 levels.

示した。さらに、血漿中においても tPA と PAI-1 が精製系と同様に存在すると仮定して計算した free tPA 量は、血漿中 tPA 活性と正の、また ECLT と負の良好な相関を示した (Table 1)。これらの事実は、個々の血漿の有する線溶ポテンシャルがこれらの濃度バランスで決まることを示す。いずれも血漿中濃度は極めて低い (正常値は 1 nM 以下)、生理的変動が大きくこれに伴い線溶ポテンシャルも変動することになる (Fig. 5)。PAI-1 は急性相蛋白の一つでサイトカイン等の刺激で血中濃度が著増する。敗血症に伴う DIC は凝固優位で微小血栓による臓器障害が特徴であるが、PAI-1 高値による線溶活性の抑制がその背景にあると考えられている。また PAI-1 は脂質異常、肥満等で脂肪組織における産生が高まるため、メタボリック症候群における血栓症リスクの原因と考えられている³⁾。現在開発が盛んである PAI-1 活性阻害薬の有用性が期待される疾患群である。

2. 線溶系因子異常あるいは欠損と病態

線溶系因子の異常により様々な病態を示す。プラスミノゲン欠損症のうち、活性に異常を認める II 型の発現頻度は日本人では極めて高く、栃木型が 90% を占める¹⁶⁾。感染症等の他の要因が加わると血栓症を発症しやすいとされるが、最近では必ずしも危険因子とならないという報告もある¹⁷⁾。プラスミノゲン欠損症に合併する偽膜 (木質) 性結膜炎 (Ligneous Conjunctivitis) は、フィブリンが固く集積したもので、最近本邦でも白内障手術後の発症例が報告された¹⁸⁾。線溶系のインヒビターの異

常では出血を呈する。α2AP の欠損あるいは異常では「後出血」と定義される、血栓形成後の溶解による出血が特徴的である¹¹⁾。FXIII の欠損でも類似した遷延する再出血が認められる。FXIIIa による α2AP のフィブリンへの架橋は止血血栓の安定化に必須と考えられる。PAI-1 欠損が遺伝子レベルで確定している症例は 1 例しかなく¹⁹⁾ その詳細は不明であったが、最近われわれの経験した PAI-1 欠損症例では毎回致死的な月経出血を認めた。また手術後の大量出血も認めた²⁰⁾。浸襲時における tPA 活性の過剰発現も、未成熟止血血栓の早期溶解による出血をもたらすと考えられる。TAFI の遺伝子欠損動物では明らかな出血傾向等は認めず、その生理的意義に関しては未だ議論がある。TAFI には Thr325Ile 遺伝子多型があり、不活性化されにくく抗線溶活性の強い Ile/Ile 型が脳梗塞発症危険因子である事実が最近示され、病態との関連が注目されている²¹⁾。

おわりに

線溶系の制御機構を概説した。炎症やメタボリック症候群に伴う高 PAI-1 血症では血栓症のリスクの増加だけでなく、感染症や外傷時の予後も不良となる。近年 PAI-1 を標的とした薬剤や中和抗体を用いて線溶活性を高める試みがなされている。tPA, PAI-1 および uPA は、炎症、癌の浸潤、あるいは神経の可塑性、神経細胞死等の血管外における役割も注目されている。これらの活性を調節することで治療の標的にも成りうると期待される。

文 献

- 1) Rijken DC, Lijnen HR: New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 4–13
- 2) Urano T, Takada Y, Takada A: Stimulation of the amidolytic activity of single chain tissue-type plasminogen activator by fibrinogen degradation products: possible fibrin binding sites on single chain tissue-type plasminogen activator molecule. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1077**: 245–252
- 3) 井原勇人, 浦野哲盟: プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビターの基礎と臨床. 図説血栓・止血・血管学(一瀬白帝編), 中外医学社, 東京, 2005, 606–613
- 4) Gebbink MF, Bouma B, Maas C, et al: Physiological responses to protein aggregates: fibrinolysis, coagulation and inflammation (new roles for old factors). *FEBS Lett* 2009; **583**: 2691–2699
- 5) Urano T, de Serrano VS, Chibber BA, et al: The control of the urokinase-catalyzed activation of human glutamic acid 1-plasminogen by positive and negative effectors. *J Biol Chem* 1987; **262**: 15959–15964
- 6) 浦野哲盟: t-PA の分子構造と血栓溶解機構. 病態生理 1994; **13**: 673–679
- 7) 青木延雄: 血液病学(三輪史朗, 青木延雄, 柴田 昭編), 文光堂, 東京, 1995, 421–425
- 8) Urano T, Ihara H, Suzuki Y, et al: Coagulation-associated enhancement of fibrinolytic activity via a neutralization of PAI-1 activity. *Semin Thromb Hemost* 2000; **26**: 39–42
- 9) Bajzar L: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 2511–2518
- 10) 浦野哲盟: トロンピン活性化線溶阻害因子. 医学の歩み, 別冊血液疾患 Ver. 2, 1998, 233–236
- 11) Carpenter SL, Mathew P: Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia* 2008; **14**: 1250–1254
- 12) Madoiwa S, Sakata Y: Fibrinogen and fibrin degradation products by leukocyte elastase. *Nippon Rinsho* 2004; **62** (Suppl 12): 611–614
- 13) Suzuki Y, Mogami H, Ihara H, et al: Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Blood* 2009; **113**: 470–478
- 14) 鈴木優子, 浦野哲盟: 「血漿 tPA 及び PAI-1 抗原量測定の意義」—新たな知見からの再考察—. *日本血栓止血学会誌* 2007; **18**: 247–254
- 15) Urano T, Suzuki Y, Arakida M, et al: The expression of exercise-induced tPA activity in blood is regulated by the basal level of PAI-1. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 751–752
- 16) Okamoto A, Sakata T, Mannami T, et al: Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in the Japanese: the Suita Study. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 2397–2403
- 17) Mehta R, Shapiro AD: Plasminogen deficiency. *Haemophilia* 2008; **14**: 1261–1268
- 18) Suzuki T, Ikewaki J, Iwata H, et al: The first two Japanese cases of severe type I congenital plasminogen deficiency with ligneous conjunctivitis: successful treatment with direct thrombin inhibitor and fresh plasma. *Am J Hematol* 2009; **84**: 363–365
- 19) Fay WP, Shapiro AD, Shih JL, et al: Brief report: complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame-shift mutation. *N Engl J Med* 1992; **327**: 1729–1733
- 20) Iwaki T, Tanaka A, Miyawaki Y, et al: Life-threatening hemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete plasminogen activator inhibitor-1 deficiency in humans. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 1200–1206
- 21) Kozian DH, Lorenz M, Marz W, et al: Association between the Thr325Ile polymorphism of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and stroke in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost* 2010; **103**: 976–983

Fibrinolytic System

Tetsumei Urano

Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka, Japan

Key words: plasminogen, tissue-type plasminogen activator (tPA), plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)

Fibrinolysis is the phenomenon by which fibrin clots generated by the coagulation system are dissolved. This can be divided into two steps: plasminogen activation and plasmin-dependent fibrin degradation. Both steps are finely regulated by many factors, which enables the lysis resistance of immature hemostatic thrombi and at the same time, the quick dissolution and removal of excess amounts of thrombi. The first step is essentially determined by a molar balance between tissue plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). The latter is known to increase in plasma levels under a variety of physiological states including aging, obesity, hyperlipidemia, and inflammation, which results in the development of a thrombophilic state. The second step is mainly controlled by both thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and α 2-antiplasmin (α 2-AP). Activated TAFI is a carboxypeptidase and removes C-terminal lysine, which is essential for effective activation of plasminogen on fibrin surfaces. α 2-AP is the principle inhibitor of plasmin and inhibits its activity by forming high molecular weight complexes in fluid phases. It is also cross-linked to fibrin by a function of activated FXIIIa and protects hemostatic fibrin clots from premature dissolution. The details of these control mechanisms are discussed in this review.

(J Jpn Coll Angiol, 2011, **51**: 293–299)