

## ◆トピックス◆

## プラスミノゲン/プラスミン系因子の欠損マウス

嘉悦 洋\*, 水口 純\*

Targeted Gene Deletions of Plasminogen/Plasmin System in Mice

Hiroshi KAETSU\* and Jun MIZUGUCHI\*

**Key words** : plasminogen/plasmin system, gene targeting, fibrinolysis, pericellular proteolysis, wound healing

## はじめに

血液凝固および線溶系(プラスミノゲン/プラスミン系)はクロットの形成と溶解のバランスを決定しており、血栓症、動脈硬化症、および再狭窄症などの種々の心血管障害の病因と考えられている。更に、凝固・線溶系は、胚発生、生殖、創傷治癒、癌、および脳機能のような種々の生物学的過程に関与していることが明らかにされてきた<sup>1)</sup>。

プラスミノゲン/プラスミン系は、酵素前駆体のプラスミノゲン(plg)およびplgを基質としてプラスミンに変換する2種のプラスミノゲンアクチベータ(PA)、すなわち、組織型(tPA)およびウロキナーゼ型(uPA)から構成される<sup>2)</sup>。このシステムの制御は、プラスミノゲンアクチベータインヒビター(PAI)によって調節されるPAレベルと $\alpha_2$ プラスミンインヒビター( $\alpha_2$ PI)によって調節されるプラスミンのレベルの2段階で行われる。PAI族の中では、PAI-1が生理的にもっとも重要であると考えられており、PAI-1はビトロネクチン(VN)により活性型の構造へと安定化されるとともに、細胞外マトリックスの特定の部位に局在化

される。PAに対するほかのインヒビターには、PAI-2のほか、PAI-3(プロテインCインヒビター)、プロテアーゼネキシン-1(PN-1)、および $\alpha_2$ マクログロブリン( $\alpha_2$ M)がある<sup>3)</sup>。フィブリン特異的に結合するtPAは主としてクロット溶解に働くが、uPAもその特異的なレセプター(uPAR)をもつ細胞表面上で、plgを活性化しつつ細胞周囲のタンパク質分解に関与する。PAまたはPA-PAI複合体は、低比重リポタンパクレセプター関連タンパク質(LRP)またはgp330によって細胞特異的にクリアランスされる<sup>4)</sup>。

プラスミノゲン/プラスミン系は、主に血栓溶解に働くなどその病理的意義は明白であるが、一方、この系の生物学的意義の重要性については血管新生や生殖能に関わるなど幾つか示唆されてきたものの、それを具体的に示す実験モデルに乏しかった。しかし、近年開発されたジーンターゲティング技術により、これらのタンパク質分解酵素システムの遺伝子の一つひとつノックアウトすることが可能となり、プラスミノゲン/プラスミン系因子のマウス個体レベルでの生物学的役割がより明確になった。

本稿では、プラスミノゲン/プラスミン系因

\* (財)化学及血清療法研究所血液製剤研究部 [〒860-8568 熊本市大窪1-6-1] Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute 1-6-1 Okubo, Kumamoto 860-8568, Japan]

子の欠損マウスに関する知見を紹介し, こうした系の生理的および病態生理的役割について述べる.

## プラスミノーゲン/プラスミン系因子の欠損マウスから得られる情報

### 1) プラスミノーゲンアクチベータ (PA) の欠損マウス

1994年, Carmeliet らのグループは tPA と uPA それぞれの欠損マウスを作成した<sup>5)</sup>. tPA 欠損 (tPA<sup>-/-</sup>) マウスはクロット溶解能が低下しており, 一方, uPA 欠損 (uPA<sup>-/-</sup>) マウスではしばしばフィブリン沈着が認められた. 更に, tPA と uPA の両分子を欠損したダブルノックアウトマウス (tPA<sup>-/-</sup>/uPA<sup>-/-</sup>) では, 広範な特発性フィブリン沈着が認められ, 成長, 生殖能, および生存率が低下した<sup>6)</sup>.

tPA または uPA のいずれかを欠損したマウスの排卵効率率は正常であったが, tPA と uPA の両者を欠損したマウスでは 26%低下した<sup>6)</sup>. 従って, PA 活性は排卵反応に関与してはいるものの, tPA と uPA が排卵に必須というわけではない.

また, uPA<sup>-/-</sup> マウスを用いた解析から, uPA が *Cryptococcus neoformans* (無性生殖酵母状真菌の 1 属) に対する肺の炎症性反応に関与することが明らかにされた<sup>7)</sup>. 更に, Shapiro らは, uPA<sup>-/-</sup> マウスがボトリオミセス症 (botryomycosis) というまれな細菌感染に対して固有の疾病素因を有すること, および uPA 遺伝子の破壊に関連して, 胸膜炎, リンパ節局所や脾臓でのリンパ小節の消滅, 異栄養性石灰化, および直腸脱出症などの異常が生じることを報告した<sup>8)</sup>. これらの結果は, uPA が皮膚の微小環境に関与しているとともに, PA が線溶系以外に哺乳類の幾つかの生理作用に広範囲にわたって関与することを示唆する.

### 2) ウロキナーゼレセプター (uPAR) の欠損マウス

uPAR 欠損 (uPAR<sup>-/-</sup>) マウスは, 生存力, 成長, および生殖能のいずれでも異常は認められず<sup>9)10)</sup>, 頸静脈に注入されたマウス血漿クロットの溶解も正常であった<sup>10)</sup>. また, thioglycolate 刺激後の腹膜腔へのマクロファージの侵入も, uPAR<sup>-/-</sup> マウスと uPAR<sup>+/+</sup> マウスの間で差は見られない<sup>10)</sup>.

tPA<sup>-/-</sup> マウス, uPAR<sup>-/-</sup> マウス, および tPA と uPAR の両分子を欠損したダブルノックアウトマウス (tPA<sup>-/-</sup>/uPAR<sup>-/-</sup>) の解析で, いずれか一方の分子の欠損マウスでは, 肝洞様血管へのフィブリン沈着はほとんどまたは全く認められないが, tPA<sup>-/-</sup>/uPAR<sup>-/-</sup> マウスではほぼ全ての成体マウスにフィブリン沈着が確認された<sup>11)</sup>. 従って, uPAR は線溶において生理的役割を有しており, tPA と uPAR は相補的な線溶系因子であると考えられる. しかしながら, tPA<sup>-/-</sup>/uPAR<sup>-/-</sup> マウスで認められる全般的障害は, tPA<sup>-/-</sup>/uPA<sup>-/-</sup> マウスでの障害に比べると程度が低い. 以上の結果をまとめると, 細胞表面上での uPAR を介した plg の活性化は肝でのフィブリンの排除には重要であるが, uPAR および tPA の非存在下でも, uPA はほとんどの組織のフィブリン沈着に対して十分な線溶活性を発揮していると結論される.

### 3) プラスミノーゲン (plg) の欠損マウス

plg 欠損 (plg<sup>-/-</sup>) マウスについては, 重篤な血栓症を引き起こし致死性も高いものの, 発生や生殖への影響は小さいことが明らかにされている<sup>12)</sup>. また, plg<sup>-/-</sup> マウスで見られる創傷治癒の遅延および各種障害には, フィブリノーゲン (フィブリン) が必須であることから, プラスミンの生理的役割はフィブリン溶解に集約されると考えられていた. しかし, 最近の報告で, excitotoxin (カイニン酸などのグルタミン酸アナログ) で誘導される神経変性 (神経細胞死) に対して plg<sup>-/-</sup> マウスが抵抗性を獲得する際には, フィブリノーゲン (フィブリン) の有無で

影響を受けないことが明らかにされた<sup>13)</sup>。従って、プラスミンは神経変性過程でフィブリン以外の基質に作用し、中枢神経系の病的環境下で機能していることが考えられる。

#### 4) プラスミノーゲンアクチベーター (PAI) の欠損マウス

PAI-1 欠損 (PAI-1<sup>-/-</sup>) マウスは、正常マウスと同様に誕生・生育し、出血傾向が認められない点でヒトの臨床的研究結果と異なっている<sup>14)</sup>。また、PAI-2 欠損 (PAI-2<sup>-/-</sup>) マウスも、発生・成長段階で正常マウスと何ら差はない<sup>1)</sup>。

PAI-1<sup>-/-</sup> マウスは止血障害には陥らないものの、軽度の線溶亢進状態にあり、エンドトキシン投与後の静脈血栓症の発生率は正常マウスに比べて有意に低下していた<sup>14)</sup>。

Eitzman らは、PAI-1 の過剰発現マウスと PAI-1 欠損マウスを用いて、プレオマイシン投与による炎症性肺傷害後に生じるコラーゲンの蓄積 (肺線維症) の程度を評価したが、PAI-1 の発現レベルとコラーゲンの蓄積には相関があり、PAI-1 欠損マウスでは有意なコラーゲン量の低下が認められた<sup>15)</sup>。

Lijnen らは、tPA, uPA, および PAI-1 の 3 種をそれぞれ欠損したマウスから、更に 2 または 3 種を同時に欠損したマウスを作成した<sup>16)</sup>。tPA<sup>-/-</sup>/PAI-1<sup>-/-</sup> マウスおよび uPA<sup>-/-</sup>/PAI-1<sup>-/-</sup> マウスは見かけ上正常であり、分娩周期や同産児数などもそれぞれ、tPA または uPA を単独で欠損したマウスと同じであった。tPA<sup>-/-</sup>/uPA<sup>-/-</sup> マウスの肝には石灰化を伴う広範なフィブリン沈着が認められたが、3 種を同時に欠損した tPA<sup>-/-</sup>/uPA<sup>-/-</sup>/PAI-1<sup>-/-</sup> マウスではフィブリン沈着が軽減されていた。

#### 5) 内膜肥厚形成とプラスミノーゲン/プラスミン系因子

マウス大腿動脈に電気傷害を与え、その後の治癒過程を評価する内膜肥厚モデルにおいて、plg<sup>-/-</sup> マウスでは創傷治癒が有意に障害されており、内膜肥厚形成の減少が観察される<sup>12)</sup>。また、PAI-1<sup>-/-</sup> マウスでは、細胞移動が増強され、

傷害を受けた後の血管の創傷治癒および動脈の内膜肥厚形成が促進されることが明らかとなっており<sup>17)</sup>、plg<sup>-/-</sup> マウスでの結果とよく対応している。

#### 6) 動脈硬化とプラスミノーゲン/プラスミン系因子

Xiao らは、プラスミノーゲンの動脈硬化への関与を明らかにするため、動脈硬化の素因を持つアポリポ蛋白質 E 欠損 (apoE<sup>-/-</sup>) マウスと plg<sup>-/-</sup> マウスを交配し、両因子を欠損する apoE<sup>-/-</sup>/plg<sup>-/-</sup> マウスを作成した<sup>18)</sup>。apoE の欠損状態で plg を更に欠損させると、血管内膜の粥腫形成が大きく促進されるが、plg の欠損のみでは感知できるほどの動脈硬化には至らない。

#### 7) 癌とプラスミノーゲン/プラスミン系因子

化学物質による原発性皮膚メラノサイト腫瘍の誘導試験で、uPA<sup>-/-</sup> マウスおよび正常マウスともに細胞性青色母斑が 100% 誘導され、その 95% 以上が下部組織へ浸潤していたが、病変部の進行は、正常マウスに比べて uPA<sup>-/-</sup> マウスで抑制されていた<sup>19)</sup>。従って、メラノサイト病変の浸潤への uPA 活性の関与は低いが、メラノーマ誘導に関しては uPA が悪性化の進行に寄与していると考えられる。

Bugge らは、plg<sup>-/-</sup> マウスでは Lewis 肺癌による罹患状態が軽減され、かつ原発巣腫瘍切除後の生存率が高まることを報告した<sup>20)</sup>。一方、原発性腫瘍の形成および転移については、plg<sup>-/-</sup> マウスと正常マウスとの間で差がないことから、これらの反応にはプラスミン以外のタンパク質分解活性が関与しているのではないかと示唆される。

また、Eitzman らは、PAI-1 の過剰発現マウスと PAI-1 欠損マウスを用いて局所の腫瘍増殖と肺への転移を分析したが、いずれのトランスジェニックマウスも正常マウスと比較して原発巣の腫瘍サイズ、肺転移数、および生存率に有意な差は認められなかった<sup>21)</sup>。

8) 脳の機能とプラスミノーゲン/プラスミン系因子

Meiri らは, uPA を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは, 脳の皮質および海馬に顕著な uPA 活性が認められるとともに, 場所, 嗅覚, および味覚に関する学習能力に障害が生じていることを明らかにし<sup>22)</sup>, プラスミノーゲン/プラスミン系因子の脳機能への関与を示唆した。

tPA<sup>-/-</sup>マウスでは, 海馬 CA1 経路および

CA2 経路の両者において, 神経細胞間の伝達効率の長期増強状態の後期 (late phase of long-term potentiation, L-LTP) が選択的に低下しているが, 海馬依存性の学習および記憶能力への影響は認められない<sup>23)</sup>。一方, Frey らは, tPA<sup>-/-</sup>マウスは海馬 CA1 での通常ホモシナプス L-LTP を欠いているが, CA1 領域にその代償となるガンマアミノ酪酸依存性で異なる様式の LTP を有することを報告している<sup>24)</sup>。

ヒトの記憶獲得に重要な海馬での神経変性

表 1 プラスミノーゲン/プラスミン系因子のノックアウトマウスとヒトでの特異性変異症例 (文献 1 より引用・改変)

欠損因子	マウス	ヒト
tissue-type plasminogen activator (tPA)	クロット溶解能の低下 L-LTP の選択的低下 神経変性に対する抵抗性の獲得	未知
urokinase-type plasminogen activator (uPA)	随時のフィブリン沈着 内膜肥厚の形成障害 腫瘍の悪性化抑制 胸膜炎 リンパ小節の消滅 C. neoformans に対する肺での炎症性細胞反応の低下	未知
tPA : uPA	重篤な特発性血栓症 内膜肥厚の形成障害 皮膚創傷治癒の遅延 全身的健康不良および生存期間の短縮 排卵および生殖能の低下	未知
urokinase receptor (uPAR)	正常	未知
tPA : uPAR	肝シヌソイドへのフィブリン沈着	未知
plasminogen (plg)	重篤な特発性血栓症 内膜肥厚の形成障害 皮膚創傷治癒の遅延 全身的健康不良および生存期間の短縮 離乳後の成長遅延および雌での生殖能低下 動脈硬化素因の増強 Lewis 肺癌による罹患状態の軽減 Lewis 肺癌原発巣の腫瘍切除後の生存率の上昇 神経変性に対する抵抗性の獲得	血栓症
plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	出血傾向無し 血管内線溶阻害能の低下 (軽度の線溶亢進状態) 静脈血栓症の発生率低下 内膜肥厚の形成促進 肺線維症の抑制	出血傾向
plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2)	正常	未知
tPA : PAI-1	tPA 欠損に同じ	未知
uPA : PAI-1	uPA 欠損に同じ	未知
tPA : uPA : PAI-1	tPA : uPA 欠損に比し肝でのフィブリン沈着が軽減	未知

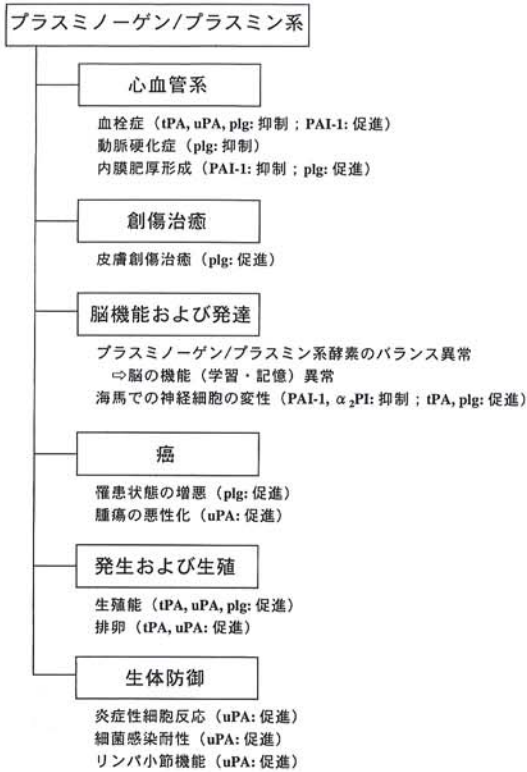


図1 ノックアウトマウスを用いた研究によって明らかにされたプラスミノゲン/プラスミン系の *in vivo* での役割 (文献1より引用・改変)

は、アルツハイマー病をはじめとした種々の病態下で起きるが、先に述べた  $plg^{-/-}$  マウスの場合と同様に  $tPA^{-/-}$  マウスでも、excitotoxinで海馬に誘導される神経変性に対する抵抗性が獲得される<sup>25)</sup>。更に、 $tPA$  が存在し  $plg$  は存在しないミクログリアでは、 $tPA$  を介した  $plg$  非依存性の経路でミクログリアが活性化されることを示唆するデータも得られている<sup>26)</sup>。

以上のことから、プラスミノゲン/プラスミン系酵素のバランス異常 (uPA 過剰発現,  $tPA$  欠損, および  $plg$  欠損など) が、脳の機能に大きく影響を与えると推定される。

表1に、プラスミノゲン/プラスミン系因子のノックアウトマウスとヒトでの特異性変異例を比較してまとめた。また、図1には、ノックアウトマウスによって明らかにされたプラス

ミノゲン/プラスミン系の *in vivo* での役割をまとめて示す。

## おわりに

プラスミノゲン/プラスミン系因子を欠損したマウスを用いた研究から、この系がフィブリンクロットのクリアランス、創傷治癒、および組織の再構築に重要であることが確認された。また、この系は、動脈の内膜肥厚形成、動脈硬化、脳の機能、および腫瘍の悪性化にも関与していると考えられた。一方、プラスミノゲン/プラスミン系は、発生、生殖、および排卵などにおいて、従来考えられていたほど必須ではないようである。プラスミノゲン/プラスミン系の役割が、 $tPA$ ,  $uPA$ , または  $plg$  を欠損したマウスに負荷を加えることでより明確となったことから、病態生理的環境下におけるこの系の重要性が示唆される。

謝辞: 御校閲を戴きました岩永貞昭先生 (藤田保健衛生大学・客員教授) に深謝いたします。

## 文献

- 1) Carmeliet P, Collen D: Targeted gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation systems in mice. *Fibrinolysis* **10**: 195-213, 1996.
- 2) Lijnen HR: Pathophysiology of the plasminogen/plasmin system. *Int J Clin Lab Res* **26**: 1-6, 1996.
- 3) Lawrence DA, Ginsburg D: Plasminogen activator inhibitors, in High KA, Roberts HR (eds): *Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995, 517-543.
- 4) Andreasen PA, Sottrup-Jensen L, Kjoller L, Nykjaer A, Moestrup SK, Petersen CM, Gliemann J: Receptor-mediated endocytosis of

- plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett* **338**: 239-245, 1994.
- 5) Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC: Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**: 419-424, 1994.
  - 6) Leonardsson G, Peng XR, Liu K, Nordström L, Carmeliet P, Mulligan R, Collen D, Ny T: Ovulation efficiency is reduced in mice that lack plasminogen activator gene function: Functional redundancy among physiological plasminogen activators. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 12446-12450, 1995.
  - 7) Gyetko MR, Chen GH, McDonald RA, Goodman R, Huffnagle GB, Wilkinson CC, Fuller JA, Toews GB: Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*: A murine transgenic model. *J Clin Invest* **97**: 1818-1826, 1996.
  - 8) Shapiro RL, Duquette JG, Nunes I, Roses DF, Harris MN, Wilson EL, Rifkin DB: Urokinase-type plasminogen activator-deficient mice are predisposed to *Staphylococcal botryomycosis*, pleuritis, and effacement of lymphoid follicles. *Am J Pathol* **150**: 359-369, 1997.
  - 9) Bugge TH, Suh TT, Flick MJ, Daugherty CC, Rómer J, Solberg H, Ellis V, Danó K, Degen JL: The receptor for urokinase-type plasminogen activator is not essential for mouse development or fertility. *J Biol Chem* **270**: 16886-16894, 1995.
  - 10) Dewerchin M, Nuffelen AV, Wallays G, Bouché A, Moons L, Carmeliet P, Mulligan RC, Collen D: Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J Clin Invest* **97**: 870-878, 1996.
  - 11) Bugge TH, Flick MJ, Danton MJS, Daugherty CC, Rómer J, Danó K, Carmeliet P, Collen D, Degen JL: Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5899-5904, 1996.
  - 12) 嘉悦 洋, 水口 純: プラスミノーゲンの欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 410-413, 1997.
  - 13) Tsirka SE, Bugge TH, Degen JL, Strickland S: Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9779-9781, 1997.
  - 14) 濱本高義, 岩永貞昭: PAI-1 の欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 406-409, 1997.
  - 15) Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest* **97**: 232-237, 1996.
  - 16) Lijnen HR, Moons L, Beelen V, Carmeliet P, Collen D: Biological effects of combined inactivation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 gene function in mice. *Thromb Haemost* **74**: 1126-1131, 1995.
  - 17) Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Janssens S, Lupu F, Collen D, Gerard RD: Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: A gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* **96**: 3180-3191, 1997.
  - 18) Xiao Q, Danton MJS, Witte DP, Kowala MC, Valentine MT, Bugge TH, Degen JL: Plasminogen deficiency accelerates vessel wall disease in mice predisposed to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10335-10340, 1997.
  - 19) Shapiro RL, Duquette JG, Roses DF, Nunes I, Harris MN, Kamino H, Wilson EL, Rifkin DB: Induction of primary cutaneous melanocytic neoplasms in urokinase-type plasminogen activator (uPA)-deficient and wild-type mice: Cellular blue nevi invade but do not progress to malignant melanoma in uPA-deficient animals. *Cancer Res* **56**: 3597-3604, 1996.
  - 20) Bugge TH, Kombrinck KW, Xiao Q, Holmbäck K, Daugherty CC, Witte DP, Degen JL: Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen-deficient mice. *Blood* **90**: 4522-4531, 1997.
  - 21) Eitzman DT, Krauss JC, Shen T, Cui J, Ginsburg D: Lack of plasminogen activator inhibitor-1

- effect in a transgenic mouse model of metastatic melanoma. *Blood* **87**: 4718-4722, 1996.
- 22) Meiri N, Masos T, Rosenblum K, Miskin R, Dudai Y: Overexpression of urokinase-type plasminogen activator in transgenic mice is correlated with impaired learning. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3196-3200, 1994.
- 23) Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P: Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8699-8704, 1996.
- 24) Frey U, Müller M, Kuhl D: A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci* **16**: 2057-2063, 1996.
- 25) Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S: Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* **377**: 340-344, 1995.
- 26) Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S: An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* **17**: 543-552, 1997.
-