

## PAI-1の欠損マウス

濱本高義<sup>\*1</sup>, 岩永貞昭<sup>\*1\*2</sup>

## Targeted Disruption of the Murine Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene

Takayoshi HAMAMOTO<sup>\*1</sup> and Sadaaki IWANAGA<sup>\*1\*2</sup>

Key words: plasminogen activator inhibitor-1, development, embryonic stem, vessel

## はじめに

プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) は、血管内および組織内で起きる線溶反応を制御する生理的に重要なインヒビターであり、そのターゲットは組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) とウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) の阻害にあると考えられている。

従来, PAI-1 については、次のような知見がある<sup>1)</sup>。①遺伝子は約 12.3 kb で、第 7 染色体の q21.3-22 にあり、9 つのエクソンが 8 つのイントロンで分断されている。②ヒト PAI-1 は 23 アミノ酸残基のシグナルペプチドと、379 アミノ酸残基の成熟タンパク質から構成される分子量約 50,000 の 1 本鎖糖タンパク質である。③ PAI-1 はセリンプロテアーゼインヒビターファミリー (SERPIN) に属し、ATIII や  $\alpha_1$  アンチトリプシンなどとアミノ酸配列上に相同性がある。

④産生部位は免疫組織学的検討から主に血管内皮細胞とされているが、血小板の他多くの臓器にも存在する。⑤ PAI-1 の血中濃度は約 0.4

nM といわれ、正常域幅が比較的大きく急性期タンパク質の 1 つでもある。またホルモン制御下にあるらしく日内変動も大きい。⑥培養細胞系を用いた実験から、PAI-1 の産生増加調節因子としてエンドトキシンやトロンビン、TGF $\beta$ 、サイトカインが報告されている。さらにマウスを用いた実験から、エンドトキシンで刺激した場合、非刺激時と比較して、肝臓での PAI-1 mRNA の増加が著しいという。血管壁では、PAI-1 の産生は血管内皮細胞が主体であるが、エンドトキシンで刺激すると、さらに産生が増強される。一方、TGF $\beta$  で刺激した場合は、脂肪組織での PAI-1 mRNA の増加が見られる。このように、PAI-1 の生体内での産生は、各種の刺激剤などで、組織や臓器での発現が異なる。⑦ PAI-1 は、他の SERPIN とアミノ酸配列や高次構造が類似するにもかかわらず、tPA と uPA を特異的に阻害する。その理由は、PAI-1 による阻害反応が一般的な活性セリン残基と PAI-1 の反応基との結合だけでなく、PAI-1 と tPA のフィンガードメインやクリングル-2 ドメイン、また、uPA のクリングルドメインを介した特異的かつ可逆的な相互作用が寄与して

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

\*2 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 [〒 470-11 愛知県豊明市掛掛町田楽ヶ久保 1-98]: Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University

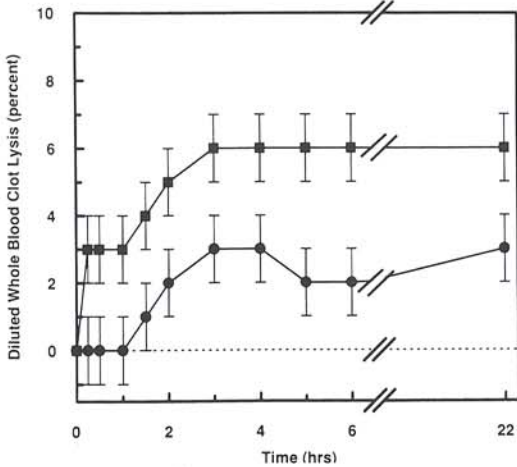


図1 希釈全血クロット溶解(文献3から引用). PAI-1<sup>-/-</sup>マウス(■), PAI-1<sup>+/+</sup>マウス(●). (転載許可取得)

いるからである.

さて, 最近, 線溶系分野は uPA レセプターの発見を契機に新しい展開を見せている. すなわち, 線溶系が血管内血栓の溶解だけでなく, 炎症・癌細胞の浸潤, 転移・排卵・血管新生・発生分化などにも深く関与していることが明らかになりつつある. そうした線溶で働く PAI-1 については, これまで血管内線溶の制御を中心に理解されてきたが, 最近では血管外線溶 (組織内線溶) への関与も推定されている. 本稿では, PAI-1 のノックアウトマウスについての報告を紹介する.

### PAI-1 欠損マウスからの情報

1996年, Carmeliet らは<sup>2)3)</sup> PAI-1 のノックアウトマウスを作製し, その発生や機能障害について正常マウスと比較検討した. 実験では, PAI-1 遺伝子を欠損させるため, ヘテロ接合体 PAI-1 欠損マウス (PAI-1<sup>+/-</sup>) 同士を掛け合わせて PAI-1<sup>-/-</sup> マウスを作出した. 産生比率は, 正常 (PAI-1<sup>+/+</sup>), PAI-1<sup>+/-</sup>, とホモ接合体 PAI-1<sup>-/-</sup> マウスで 1:2:1 であった. 彼らの報告では, PAI-1<sup>-/-</sup> マウスの胎仔の発生や分化の段階での組織学的あるいは, 性差も含めて形態学的な所見は正常と何ら変わりがなかったという. また, 最近報告された組織因子<sup>4)</sup> や V 因子<sup>5)</sup> の欠

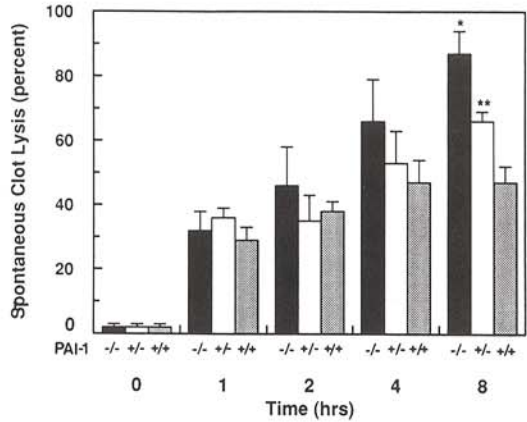


図2 <sup>125</sup>I-fibrin 肺塞栓の自然溶解 (文献3から引用).

<sup>125</sup>I-fibrin 標識した Plasma クロットを頸静脈内に注入し, それぞれの時間に, 心臓と肺に残存する放射活性を測定した.

-/-, PAI-1<sup>-/-</sup> マウス; +/-, PAI-1<sup>+/-</sup> マウス; +/+, PAI-1<sup>+/+</sup> マウス.

\*P=0.03 vs PAI-1<sup>+/-</sup> マウス及び P=0.002 vs PAI-1<sup>+/+</sup> マウス.

\*\*P=0.02 vs PAI-1<sup>+/+</sup> マウス.

(転載許可取得)

損マウスのように, 胎児の段階での致死は見られない. さらに, PAI-1 欠損マウスと同様に, uPA のインヒビターである PAI-2 の欠損マウスにおいても, 発生成長段階で正常マウスと何ら差はなかった<sup>6)</sup>.

ヒトの場合, PAI-1 欠損症の患者が出血症状を呈するのに対し, PAI-1 欠損マウスは出血傾向もなく, また, 定常状態ではフィブリノーゲンやヘモグロビンの血中含量はもとより, 血小板数や APTT, TT にも異常は確認されていない. この理由について Carmeliet らは, マウスとヒトの凝固メカニズムに相違があるためと推測しているが, その詳細は明らかでない.

しかし, この一連の研究から, PAI-1<sup>-/-</sup> マウスの血管内線溶阻害能は, PAI-1<sup>+/+</sup> あるいは PAI-1<sup>+/-</sup> に比して優位に低下していることが示された (図1および図2, 図3). また, *in vivo* では, PAI-1 はエンドトキシンなどの刺激で血管内皮細胞や血小板から分泌され, 血中濃度が上昇し, それが DIC や血栓症などの直接の原因にはならないまでも, 血栓溶解を遅延させるこ



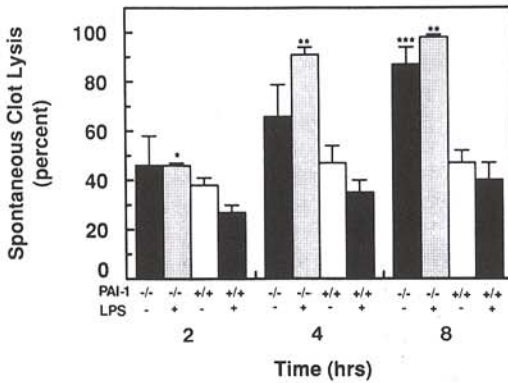


図3 エンドトキシンを腹腔内投与した場合の<sup>125</sup>I-fibrin肺塞栓の自然溶解(文献3から引用)。エンドトキシンを投与あるいは未投与のマウスに,<sup>125</sup>I-fibrin標識したPlasmaクロットを頸静脈内に注入し,それぞれの時間に心臓と肺に残存する放射活性を測定した。  
-/-, PAI-1<sup>-/-</sup>マウス; +/+, PAI-1<sup>+/+</sup>マウス。LPS(+), エンドトキシン投与; LPS(-), エンドトキシン未投与。  
\*P=0.008 vs PAI-1<sup>+/+</sup>エンドトキシン投与マウス。  
\*\*P<0.001 vs PAI-1<sup>+/+</sup>エンドトキシン投与マウス。  
\*\*\*P=0.002 vs PAI-1<sup>+/+</sup>エンドトキシン未投与マウス。(転載許可取得)

とで臓器障害の発生や増悪の要因になることが知られている。実際に, エンドトキシンを投与した*in vivo*の検討で, PAI-1<sup>+/+</sup>が血栓を26匹中11匹発症したのに対し, PAI-1<sup>-/-</sup>では25匹中1匹のみにすぎなかった<sup>3)</sup>。

従って, PAI-1欠損マウスを用いた研究により, PAI-1の血管内線溶制御因子としての生理的意義は裏づけられたといえる。しかし, 最近の研究結果<sup>6)</sup>から PAI-1<sup>-/-</sup>マウスでは, ①血管のバイパス手術や血管内血栓のバルーン療法で臨床問題になっている血管の再狭窄(血管障害に起因する内膜肥厚の形成に関連)が, 正常マウスと比較すると起き易い, ②動脈硬化の進展は抑制され, ③PAI-1濃度と正の相関のある肺の炎症の進展も抑制されるという。また最近, Stefanssonら<sup>7)</sup>は, PAI-1がピトロネクチンと結合することにより, 平滑筋細胞上のピトロネ

クチンレセプターとピトロネクチンの結合を介した平滑筋細胞の基底膜への接着と細胞移動を阻害することを見出しており, その機序が線溶阻害を介したものではないことを報告した。従って, PAI-1が血管内・血管外線溶阻害のほか, 線溶阻害とは別の機序で生理的に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

ここで挙げた PAI-1<sup>-/-</sup>マウスの報告を見る限り, 残念ながら新しい情報はむしろ少なく, 従来知られていた PAI-1の生理的意義を確認した程度であった。tPA または uPAの単一欠損マウス(tPA<sup>-/-</sup>あるいはuPA<sup>-/-</sup>)あるいは複合欠損マウス<sup>8)</sup>(tPA<sup>-/-</sup>かつuPA<sup>-/-</sup>)で, 誕生後の成長過程において, 腎炎や生存期間の短縮, 創傷治癒の遅延などの異常症状が観察されたのに対し, PAI-1欠損マウスに極立った症状が出ないのは, 数多くのSERPIN族がPAI-1の代用に使われている可能性がある。本来, SERPINの機能にはredundantな面がある点, PAI-1の生理的機能の解析を困難にしていると思われる。

#### おわりに

以上述べたように, PAI-1の欠損マウスは, ①組織因子<sup>4)</sup>やトロンボモジュリン<sup>8)</sup>, トロンピンレセプター<sup>9)</sup>, V因子<sup>5)</sup>などの欠損マウスとは異なり, 胚及び胎仔は発育途中で死亡せず, 正常マウスと同様に見かけ上健康体で誕生し生育した。②また, PAI-1欠損マウスは, 血栓溶解機能は正常に比べるとほとんど差がなく, 出血傾向は示さず, ヒトの臨床的研究結果と異なる部分もあった。しかし, 最近報告されたuPAやtPA<sup>6)</sup>, プラスミノゲン<sup>10)</sup>ノックアウトマウスでは, それらの正常マウスと比較すると血管の内膜肥厚は起きにくいといった結果からも, 血管傷害後の再狭窄形成に線溶亢進が深く関与している可能性は濃い。それ故に, 臨床において再狭窄抑制は, 抗凝固療法・抗血小板療法だけでは片手落ちであるかもしれない。さらに, 線溶系は脳の機能や発達にも関与するらしく<sup>6)</sup>, PAI-1<sup>-/-</sup>マウスを用いたこうした面での詳細な研究が望まれる。

## 文 献

- 1) Lawrence DA and Ginsburg D: Plasminogen activator inhibitors (High KH, Roberts HR, eds): Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc. 1995, 517-543.
- 2) Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, Nuffelen AV, Prendergast G, Cole M, Bronson R, Collen D, Mulligan RC: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest* **92**: 2746-2755, 1993.
- 3) Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, Ream B, van den Oord JJ, De Mol M, Mulligan RC, Collen D: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice II. Effect on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J Clin Invest* **92**: 2756-2760, 1993.
- 4) 中垣智弘, 水口 純, 岩永貞昭: 組織因子の欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 153-155, 1997.
- 5) 牟田健吾, 水口 純, 濱本高義, 岩永貞昭: 血液凝固 V 因子の欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 222-225, 1997.
- 6) Carmeliet P and Collen D: Targeted gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation systems in mice. *Fibrinolysis* **10**: 195-213, 1996.
- 7) Stefansson S and Lawrence DA: The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin  $\alpha_v\beta_3$  binding to vitronectine. *Nature* **383**: 441-443, 1996.
- 8) 亀井慎太郎, 水口 純, 岩永貞昭: トロンボモジュリンの欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 218-221, 1997.
- 9) Connolly AJ, Ishikawa H, Kahn ML, Farese RV Jr, Coughlin SR: Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature* **381**: 516-519, 1996.
- 10) Carmeliet P, Moons L, Ploplis V, Plow E, Collen D: Impaired arterial neointima formation in mice with disruption of the plasminogen gene. *J Clin Invest* **99**: 200-208, 1997.