

# $\alpha_2$ -antiplasmin ノックアウトマウス

岡田清孝\*

## $\alpha_2$ -antiplasmin-knockout mice

Kiyotaka OKADA

**Key words:**  $\alpha_2$ -antiplasmin ( $\alpha_2$ -AP),  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor ( $\alpha_2$ -PI),  $\alpha_2$ -AP deficient mice ( $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> mice), fibrinolysis

### 1. はじめに

$\alpha_2$ -antiplasmin:  $\alpha_2$ -AP(あるいは  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor:  $\alpha_2$ -PI, 遺伝子名: serpin f<sub>2</sub>)は, プラスミンの活性を特異的に阻害する線溶系阻害因子である<sup>1)</sup>.  $\alpha_2$ -APは, 肝臓で産生され血中に約 1  $\mu$ mol/L 存在する.  $\alpha_2$ -AP 分子は, 3 個の機能部位を持ち, プラスミンの活性阻害, プラスミノーゲンまたはプラスミンのフィブリンへ結合に対する競合阻害, さらに, プラスミンによるフィブリン分解に対する抵抗性を発揮する.  $\alpha_2$ -AP の先天性欠損症は, 十数家系報告されている.  $\alpha_2$ -AP 欠損症患者の症状は, 外傷や手術後の再出血(後出血)を特徴とする<sup>2)</sup>.

最近, 線溶系の因子は, 各組織の細胞周囲での蛋白分解活性の発現や細胞内情報伝達の誘導などに関与し, 血管新生, 創傷治癒, 細胞の遊走・浸潤などに関わることが, 解明されつつある. その解析法の一つに, 目的因子の遺伝子を欠損させた動物が使用されている. われわれは,  $\alpha_2$ -AP の機能を解析する目的で  $\alpha_2$ -AP の遺伝子欠損マウス( $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウス)を作製し<sup>3-5)</sup>, 種々の病態モデルを用いて解析した<sup>6)</sup>. ここでは,  $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスから得られた結果およびそこから推測される  $\alpha_2$ -AP の機能について述べる.

### 2. $\alpha_2$ -AP 欠損マウスから得られた情報

#### 1) $\alpha_2$ -AP 欠損マウスの表現型と線溶活性

$\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスは, 妊娠, 出産, その後の健康状態および発育・成長が正常であった. 尾の切断後の出血時間は,  $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスとその野生型マウス( $\alpha_2$ -AP<sup>+/+</sup> マウス)との間で有意な差はなかった<sup>4)</sup>. しかし, template bleeding による再出血時間は,  $\alpha_2$ -AP<sup>+/+</sup> マウスに比べ  $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスで延長していた<sup>7)</sup>.

また,  $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスの線溶活性は, 動脈および静脈における実験的血栓形成モデルや血栓溶解モデルにおいて  $\alpha_2$ -AP<sup>+/+</sup> マウスに比べ有意に亢進していた<sup>7-9)</sup>. これらの結果は,  $\alpha_2$ -AP は, 血管内での線溶系の阻害因子として働くことを示している. 一方,  $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスの血液は, 凝固活性化 XIII 因子依存性血栓の赤血球保持に影響しなかった<sup>10)</sup>. また, 血小板の顆粒には,  $\alpha_2$ -AP が存在し活性化の際放出される.  $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスでは, プラスミンの過剰生成を介した ADP による血小板凝集の亢進により, 血小板活性化を促進し, 血栓形成を惹起した<sup>11)</sup>.

#### 2) 心・血管系

心・血管系では,  $\alpha_2$ -AP の欠損によるプラスミン活性の過剰発現が血管平滑筋細胞や線維芽細胞周囲の血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)の遊離切断を起こし, 再内皮化や血管新生を促進した<sup>12)</sup>.

また,  $\alpha_2$ -AP の欠損による VEGF の過剰発現は, 急性心筋梗塞モデルで右心不全(肥大)と肺水腫を引き起こした<sup>13)</sup>. これらの結果は, 心・血管系において障害後の修復過程に重要な役割を果たす VEGF の

\*責任者連絡先:  
近畿大学医学部基礎医学部門研究室  
〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2  
Tel: 072-366-0221  
E-mail: kiyokada@med.kindai.ac.jp

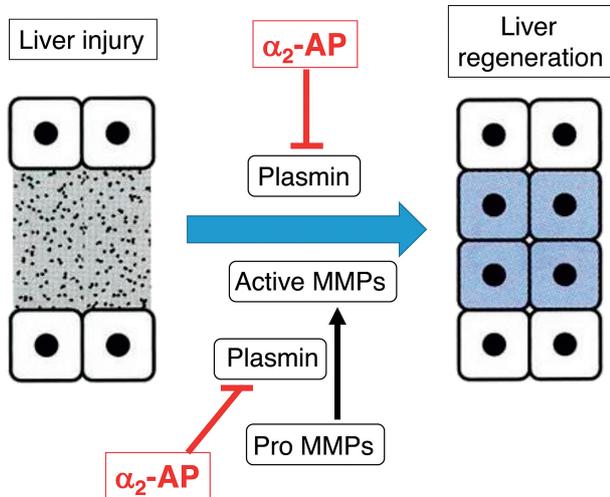


図1 肝修復・再生過程におけるプラスミン/ $\alpha_2$ -AP系  
肝障害後の障害組織の除去においては、細胞外基質の分解にプラスミンおよびそれによって活性化されたマトリックスメタロプロテイナーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)系が働き、肝修復・再生を誘導する。プラスミン活性は、 $\alpha_2$ -APにより阻害される。

発現をプラスミン/ $\alpha_2$ -AP系が制御していることを示唆した。また、 $\alpha_2$ -APは、アンジオテンシンIIによるp53/p21経路を阻害し、血管のリモデリングを制御した<sup>14)</sup>。

### 3) 組織線維化

$\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup>マウスのブレオマイシン誘発皮膚線維化モデルにおいて、皮膚の線維化を軽減した<sup>15-17)</sup>。この現象は、 $\alpha_2$ -APがプロスタグランジンF2aの生合成やtransforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ )の発現を調節し、線維芽細胞の増殖や分化に伴う皮膚および筋組織の線維化を制御することを示唆した<sup>18)</sup>。これらの結果より全身性硬化症に対する新たな治療として $\alpha_2$ -APの制御が考えられる。また、 $\alpha_2$ -APは、腎臓における線維化に対してもTGF- $\beta$ を介した系に関与した<sup>19)</sup>。

### 4) 組織修復・再生

肝臓が障害された後の修復・再生過程では、障害組織の除去後その再構築が行われる。障害組織の除去においては、細胞外基質の分解にプラスミンおよびそれによって活性化されたMMP系の関与が考えられる。 $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup>マウスは、薬物肝障害モデルにおいて $\alpha_2$ -AP<sup>+/+</sup>マウスに比べ細胞外基質の分解促進を伴う肝再生能の亢進を示した<sup>20)</sup>。さらに、同モデル

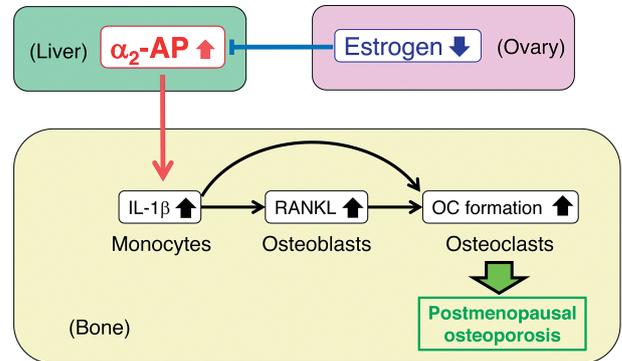


図2 エストロゲン欠乏における $\alpha_2$ -APの骨粗鬆症誘導機序  
閉経後のエストロゲンの欠乏により $\alpha_2$ -APの肝臓での産生が増加すると、血中や局所の単球系細胞(monocytes)でのIL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインの産生が増加する。これが直接あるいは骨芽細胞(osteoblast)でのRANKLの産生増加を介して、破骨細胞(osteoclasts, OC)形成を亢進させ、閉経後の骨粗鬆症を惹起する。

におけるプラスミノーゲン遺伝子欠損マウスでは、細胞外基質の分解抑制を伴う肝再生遅延が見られた。これらのことから、肝再生過程においてプラスミン/ $\alpha_2$ -AP系が障害組織の除去に重要な役割を果たすことが示唆された(図1)。また、 $\alpha_2$ -APの欠損は、皮膚損傷に対してVEGF発現の増加を介した血管新生亢進を伴う創傷治癒の促進が見られた<sup>15)</sup>。

### 5) 骨代謝

骨代謝は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によりバランスよく保たれている。女性では、閉経後エストロゲンのレベルが低下し、骨吸収が骨形成を上回り、骨量の急激な低下で骨折リスクが高まる。また、エストロゲンは、凝固・線溶系因子の発現に関与することが報告されている<sup>21)</sup>。そこで、卵巣摘出モデルを用いて閉経後骨粗鬆症における $\alpha_2$ -APの役割を検討した。血漿中の $\alpha_2$ -AP濃度は、卵巣摘出により有意に増加した<sup>22)</sup>。また、 $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup>マウスは、卵巣摘出による骨密度低下を軽減した。さらに、 $\alpha_2$ -APは、単球様細胞において、破骨細胞形成を促進させ、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ のmRNAレベルを有意に増加させた。これらの結果から、 $\alpha_2$ -APが単球系細胞におけるIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の産生増加を介して、卵巣摘出による骨吸収亢進・骨密度低下に関与することが示唆された(図2)。 $\alpha_2$ -APは閉経後骨粗鬆症の病態に関与し、その治療標的として可能

性がある。

### 6) 免疫・細菌感染

$\alpha_2$ -AP と PAI-1 の両遺伝子欠損マウス ( $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup>・PAI-1<sup>-/-</sup> マウス) は、年齢に依存した血中 IgE レベルの上昇と、組織でのリンパ球浸潤が亢進していた<sup>23)</sup>。このことから、 $\alpha_2$ -AP の免疫系への関与が示唆された。

$\alpha_2$ -AP は、グラム陰性菌による実験的敗血症モデルにおいて起炎菌の増殖、炎症、血栓形成および組織障害の進展を抑制した<sup>24)</sup>。また、 $\alpha_2$ -AP は、ペスト菌の感染に対して、菌が保有するプラスミノゲン活性化蛋白分解酵素 (plasminogen activation protease: Pla) 非依存性の免疫系への関与が示唆された<sup>25)</sup>。

### 7) 脳血管系と脳神経系

実験的脳梗塞モデルでは、脳梗塞サイズが  $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスで減少し、PIg<sup>-/-</sup> マウスで増大した<sup>26)</sup>。さらに、 $\alpha_2$ -AP の抗体投与は、脳虚血障害を軽減した<sup>27)</sup>。また、 $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスは、脳虚血による細胞死や浮腫、再開通後の出血から脳組織が保護され、生存率の改善につながる事が報告された<sup>28)</sup>。これは、 $\alpha_2$ -AP の発現制御により微小血栓形成が低下し、神経細胞死により誘導された MMP-9 発現低下に基づくと考えられる。この結果より、 $\alpha_2$ -AP を標的とした脳梗塞に対する新規治療戦略が考えられる。

また、 $\alpha_2$ -AP は、プラスミン阻害非依存的な海馬神経の樹状突起成長に関与した。さらに、 $\alpha_2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスは、運動機能、認知機能、不安行動、うつ様症状などを引き起こし、 $\alpha_2$ -AP の脳高次機能に関与することが示唆された<sup>29,30)</sup>。

### 3. おわりに

$\alpha_2$ -AP 遺伝子欠損マウスから得られた情報は、 $\alpha_2$ -AP がプラスミン阻害因子としての機能のみならず、プラスミン非依存性の機能としても働くことが推測される。もちろん、マウスからの結果であることは、考慮しなければいけない。線溶系の阻害因子としての  $\alpha_2$ -AP だけではなく、脳梗塞や組織線維化、組織修復・再生、さらには、閉経後骨粗鬆症などの分野での  $\alpha_2$ -AP を標的分子とした新規治療法の開発が期待される。

著者の利益相反 (COI) の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

### 文献

- Collen D, Lijnen HR: Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78**: 3114–3124, 1991.
- 広沢信作：Alpha2-plasmin inhibitor (a2-PI) 欠損症。血栓止血誌 **11**: 301–303, 2000.
- Okada K, Lijnen HR, Dewerchin M, Belayew A, Matsuo O, Collen D, Bernaerts R: Characterization and targeting of the murine alpha2-antiplasmin gene. *Thromb Haemost* **78**: 1104–1110, 1997.
- Lijnen HR, Okada K, Matsuo O, Collen D, Dewerchin M: Alpha2-antiplasmin gene deficiency in mice is associated with enhanced fibrinolytic potential without overt bleeding. *Blood* **93**: 2274–2281, 1999.
- 岡田清孝：マウス alpha2-antiplasmin 遺伝子の解析とジーンターゲットング。血栓止血誌 **10**: 315–319, 1999.
- Matsuno H: Alpha2-antiplasmin on cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* **12**: 841–847, 2006.
- Matsuno H, Kozawa O, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Uematsu T: Plasmin generation plays different roles in the formation and removal of arterial and venous thrombus in mice. *Thromb Haemost* **87**: 98–104, 2002.
- Matsuno H, Kozawa O, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Uematsu T: Inhibitors of fibrinolytic components play different roles in the formation and removal of arterial thrombus in mice. *J Cardiovasc Pharmacol* **39**: 278–286, 2002.
- Matsuno H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Kozawa O: Alpha2-antiplasmin plays a significant role in acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost* **1**: 1734–1739, 2003.
- Byrnes JR, Duval C, Wang Y, Hansen CE, Ahn B, Mooberry MJ, Clark MA, Johnsen JM, Lord ST, Lam WA, Meijers JC, Ni H, Ariens RA, Wolberg AS: Factor XIIIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin  $\alpha$ -chain crosslinking. *Blood* **126**: 1940–1948, 2015.
- Takei M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Kozawa O: Lack of alpha2-antiplasmin enhances ADP induced platelet micro-aggregation through the presence of excess active plasmin in mice. *J Thromb Thrombolysis* **14**: 205–211, 2002.
- Matsuno H, Ishisaki A, Nakajima K, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Kozawa O: Lack of alpha2-antiplasmin promotes re-endothelialization via over-release of VEGF after vascular injury in mice. *Blood* **102**: 3621–3628, 2003.
- Matsuno H, Kozawa O, Yoshimi N, Akamatsu S, Hara A, Mori H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Uematsu T: Lack of alpha2-antiplasmin promotes pulmonary heart failure via overrelease of VEGF after acute myocardial infarction. *Blood* **100**: 2487–2493, 2002.
- Hou Y, Okada K, Okamoto C, Ueshima S, Matsuo O: Alpha2-antiplasmin is a critical regulator of angiotensin II-mediated vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 1257–1262, 2008.
- Kanno Y, Hirade K, Ishisaki A, Nakajima K, Suga H, Into T,

- Matsushita K, Okada K, Matsuo O, Matsuno H: Lack of alpha2-antiplasmin improves cutaneous wound healing via over-released vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in wound lesions. *J Thromb Haemost* **4**: 1602–1610, 2006.
- 16) Kanno Y, Kuroki A, Okada K, Tomogane K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H: Alpha2-antiplasmin is involved in the production of transforming growth factor beta1 and fibrosis. *J Thromb Haemost* **5**: 2266–2273, 2007.
  - 17) Kanno Y, Kawashita E, Minamida M, Kaneiwa A, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H: alpha2-antiplasmin is associated with the progression of fibrosis. *Am J Pathol* **176**: 238–245, 2010.
  - 18) Kanno Y, Kawashita E, Kokado A, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H: Alpha2-antiplasmin regulates the development of dermal fibrosis in mice by prostaglandin F(2 $\alpha$ ) synthesis through adipose triglyceride lipase/calcium-independent phospholipase A(2). *Arthritis Rheum* **65**: 492–502, 2013.
  - 19) Kanno Y, Kawashita E, Kokada A, Kuretake H, Ikeda K, Okada K, Seishima M, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H: alpha2-antiplasmin mediated myofibroblast formation and the development of renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Sci Rep* **4**: 5967, 2014.
  - 20) Okada K, Ueshima S, Imano M, Kataoka K, Matsuo O: The regulation of liver regeneration by the plasmin/alpha2-antiplasmin system. *J Hepatol* **40**: 110–116, 2004.
  - 21) Cleuren AC, Van der Linden IK, De Visser YP, Wagenaar GT, Reitsma PH, Van Vlijmen BJ: 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol rapidly alters transcript levels of murine coagulation genes via estrogen receptor  $\alpha$ . *J Thromb Haemost* **8**: 1838–1846, 2010.
  - 22) Shiomi A, Kawao N, Yano M, Okada K, Tamura Y, Okumoto K, Matsuo O, Akagi M, Kaji H: alpha2-antiplasmin is involved in bone loss induced by ovariectomy in mice. *Bone* **79**: 233–241, 2015.
  - 23) Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhisa T, Matsuo O: Lack of both alpha2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. *Life Sci* **93**: 89–95, 2013.
  - 24) Kager LM, Weehuizen TA, Wiersinga WJ, Roelofs JJ, Meijers JC, Dondorp AM, van 't Veer C, van der Poll T: Endogenous alpha2-antiplasmin is protective during severe gram-negative sepsis (melioidosis). *Am J Respir Crit Care Med* **188**: 967–975, 2013.
  - 25) Eddy JL, Schroeder JA, Zimble DL, Bellows LE, Lathem WW: Impact of the Pla protease substrate alpha2-antiplasmin on the progression of primary pneumonic plague. *Infect Immun* **83**: 4837–4847, 2015.
  - 26) Nagai N, De Mol M, Lijnen HR, Carmeliet P, Collen D: Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* **99**: 2440–2444, 1999.
  - 27) Nagai N, De Mol M, Van Hoef B, Verstreken M, Collen D: Depletion of circulating alpha2-antiplasmin by intravenous plasmin or immunoneutralization reduces focal cerebral ischemic injury in the absence of arterial recanalization. *Blood* **97**: 3086–3092, 2001.
  - 28) Reed GL, Houg AK, Wang D: Microvascular thrombosis, fibrinolysis, ischemic injury, and death after cerebral thromboembolism are affected by levels of circulating alpha2-antiplasmin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**: 2586–2593, 2014.
  - 29) Kawashita E, Kanno Y, Asayama H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H: Involvement of alpha2-antiplasmin in dendritic growth of hippocampal neurons. *J Neurochem* **26**: 58–69, 2013.
  - 30) Kawashita E, Kanno Y, Ikeda K, Kuretake H, Matsuo O, Matsuno H: Altered behavior in mice with deletion of the alpha2-antiplasmin gene. *PLoS ONE* **9**: e97947, 2014.