

ハイテクリサーチセンターシリーズ

線溶系：血管外での新しい機能

上嶋 繁^{1,2} 石田知可子¹ 河尾直之¹ 岡田清孝¹ 永井信夫¹
松尾 理¹

¹近畿大学医学部第2生理学教室 ²近畿大学農学部食品栄養学科

はじめに

血栓の主成分である fibrin (線維素) を分解 (溶解) する反応は線溶反応と呼ばれ、複数の細胞外プロテアーゼとその阻害因子からなるカスケードによって引き起こされる。また、そのカスケードの構成因子は線溶系因子と総称される。近年、線溶系因子が線溶反応のほかに、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) タンパク質の分解や、細胞表面に存在する受容体を介して多様な生命現象に関わることが明らかとなってきた。本稿では、これらの線溶系因子の多様な機能について説明する。第1章では血栓を溶解する血液線溶と細胞表面で機能する細胞性線溶について、第2章では線溶系因子の受容体について、第3章では線溶系因子が引き起こす細胞内シグナルについて、第4章では肝再生における線溶系因子の機能について、第5章では神経系における線溶系因子の機能についてそれぞれ概説する。

1. 血液線溶系と細胞性線溶

血液線溶系は、血管内に生じた血栓を溶解し血栓を除去する生理機構として知られている。線溶系を構成するタンパク質は線溶系因子であり、それぞれの生物化学的性質やその分子構造および機能に関連する構造解析が行われた。線溶系因子の病態生理学的作用を明らかにする目的で、線溶系因子を遺伝的に欠損したマウスが作成され、その表現系を野生型マウスと比較することにより線溶系因子の働きが検討された。この遺伝子欠損マウスの解析から、線溶系因子は血管内で血栓溶解として作用するだけではなく、血管外の組織中または組織を構成する細胞表面でも重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。本章では、この血液線溶系と組織で作用する細胞性線溶について述べる。

1-1. 血液の線溶系

血液は血管内を絶えず流動体として循環しているが、これは血流を遮断する病的血栓を溶解し除去す

る機能が生体に備わっているからである。血栓は、凝固系の活性化によって可溶性の fibrinogen が不溶性で線維状の fibrin に変換されることにより形成される。出血を防止する血栓は止血血栓と呼ばれ、恒常性の維持に重要な役割を果たす。しかし、止血を目的とせず血管内に生じた血栓は病的血栓と呼ばれ、心筋梗塞や脳梗塞などの原因となる。血管内での血流を確保するために、この血栓を溶解する生理的機構が血液の線溶系であり、線溶系にかかわるタンパク質を線溶系因子と呼んでいる。

血液の線溶系は、血栓の主要な成分である fibrin が plasmin によって可溶性の fibrin 分解産物 (fibrin degradation product; FDP) に分解されることによって達成される。しかし、血液の線溶系酵素である plasmin は fibrin だけではなく fibrin の素であり血液凝固反応 (止血反応) に不可欠な fibrinogen をも分解する。したがって、通常、plasmin はその前駆体で酵素活性を持たない plasminogen (Plg) として肝臓で産生され血液中に存在している。Plg を plasmin に活性化させるのが plasminogen activator (PA) である。PA には組織性 PA (tissue-type PA; t-PA) と一本鎖ウロキナーゼ型 PA (single-chain urokinase-type PA; scu-PA) があり、それぞれ血管内皮細胞で合成されて血液中に分泌されている。ヒト由来 PA の組換え体や改変体は血栓溶解剤として臨床使用されている¹。PA およ

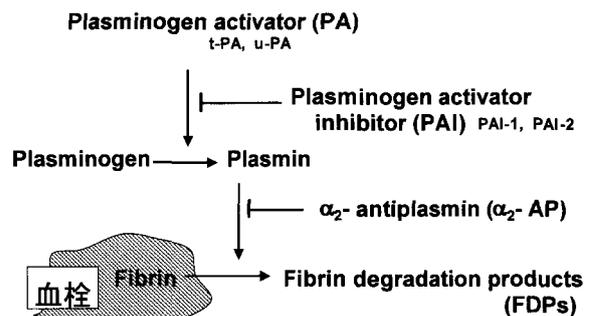


図1 血液線溶系

び plasmin の線溶系活性化因子はそれぞれのインヒビターである plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), PAI-2 および α_2 -antiplasmin (α_2 -AP, 別名 α_2 -plasmin inhibitor) による活性抑制を受け、線溶系全体の活性が制御されている²。すなわち、PA および plasmin が線溶系活性化のアクセルとして働き、PAI-1, PAI-2 および α_2 -AP がブレーキとして働いて血液中の線溶活性が決定される(図1)。また、血管内皮細胞表面上には線溶系因子と結合する受容体や結合部位が存在する。

1-2. 線溶系因子の遺伝子欠損マウス

線溶系因子の生理作用を解明するために、遺伝子ターゲットによる線溶系因子の遺伝子欠損(knock-out: KO)マウスが作成された。線溶系因子 KO マウスの表現型や、これらの KO マウスを用いた病態モデルでの研究から線溶系因子は血管内での血栓溶解に作用するだけではなく血管新生など、様々な生理学的、病態生理学的な現象に関与していることが解明されつつある³。このように、従来の血栓溶解にかかわる血管内での血液線溶系に対して、血管外の組織や細胞周囲での線溶系因子の機能は細胞性線溶として理解されている。細胞性線溶においても、血管外の細胞表面に存在する線溶系因子の受容体や線溶系因子との結合部位が非常に重要な役割を担っている。

細胞表面で効率よく活性化された plasmin は組織中に沈着する fibrin や ECM を構成するコラーゲンを分解するとともに、pro-matrix metalloproteinases (pro-MMPs) を MMPs に活性化させて ECM の分解に寄与する。また、transforming growth factor (TGF)- β などのサイトカインの活性化を介して種々の細胞性反応を引き起こす。さらに、線溶系因子が細胞表面に存在する受容体に結合することにより、細胞内シグナル伝達系が活性化されて種々の細胞性反応が引き起こされる(図2)。

次に、各種病態における線溶系因子の血管外での重要性について、線溶系因子 KO マウスを用いた解

析結果をもとに概説する。

1-3. 細胞の接着および遊走

Urokinase-type plasminogen activator (u-PA) に対する受容体 (uPA receptor: u-PAR) は種々の細胞の表面に存在しており、glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchor で膜に結合している⁴。u-PAR の機能は u-PA 活性の細胞表面での効率的発現のみならず、integrin と機能的ユニットを形成し細胞内情報伝達系を介して細胞接着・遊走および増殖に関与することである^{5,6}。また、u-PAR は u-PA だけではなく u-PA/PAI-1 複合体とも結合し、これらの細胞内への取り込みにより代謝系の機能も発揮する。さらに、u-PAR は ECM に存在する vitronectin (VN) とも結合する⁷。この VN は細胞表面にある VN 受容体 ($\alpha v \beta 3$) を介し細胞の ECM への接着に働く。このことから u-PAR は u-PA 結合非依存性に細胞の ECM への接着を促進・補強させる。また、PAI-1 は VN と結合することからこの u-PAR/VN 系による細胞の ECM への接着に対して阻害因子として働く。このような u-PAR の細胞接着に対する機能は、細胞の接着・移動が頻繁に認められる組織障害後の修復・再生過程において重要な役割を果たすと考えられる。

また、Plg も種々の細胞に結合する⁸⁻¹⁰。この Plg の細胞への結合には Plg 分子内のリジン結合部位 (lysine binding site: LBS) が関与していることから細胞に結合した plasmin は、 α_2 -AP による阻害を受けにくい。したがって、細胞に結合した Plg は PAs により効率良く活性化され、細胞周囲でのタンパク分解活性の役割を果たす¹¹。Plasmin の基質の一つとして ECM が挙げられ、創傷治癒を含め各組織での障害後の修復・再生において、MMPs 系酵素と共に重要な役割を担っている。

MMPs には、collagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2, -9), stromelysins (MMP-3, -7), membrane-type MMPs (MT-MMPs) および macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) などあり¹²、MMPs に対する阻害因子としては tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs; TIMP-1, -2, -3, -4) などが存在している。MMPs は前駆体で存在し、限定分解により活性化され ECM タンパクに対する分解活性を発現する。線溶系の plasmin は MMP-1, MMP-3, MMP-7 および MMP-9 を活性化する¹³。PAs も MMPs の活性化を引き起こす。また、逆に MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 および MMP-12 は Plg を分解する¹⁴。このようなことから、細胞周囲におけるタンパク分解活性は、線溶系酵素と MMPs 系酵素の相互作用

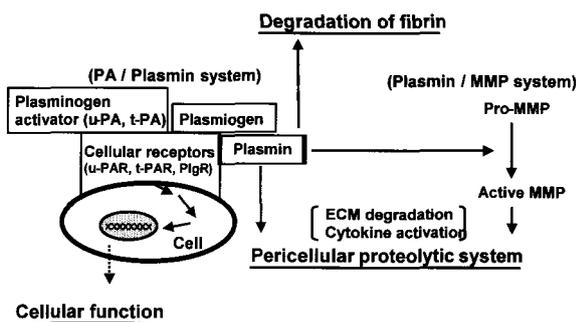


図2 細胞性線溶

によって巧妙に制御されていると考えられる。

1-4. 組織の線維化

細胞周囲のタンパク分解活性は組織の線維化につながる ECM タンパクの分解を誘導するが、線溶系因子は TGF- β を介する組織の線維化にも関与していることが報告された。 α_2 -APKO マウスではプレオマイシンによる TGF- β 1 の誘導が抑制され、組織の線維化も抑制されていた。さらに、 α_2 -APKO マウスから単離した培養線維芽細胞では野生型 (wild type: WT) マウス由来の培養線維芽細胞に比べて TGF- β 1 の産生が非常に低下しており、 α_2 -AP の添加によって TGF- β 1 の産生が回復した。この実験結果から、 α_2 -AP は線維芽細胞での TGF- β 1 の産生を介して組織の線維化を制御していることが明らかにされた¹⁵。

1-5. 血管新生および血管修復

組織障害後の修復・再生過程では新たな組織への栄養供給の手段として血管新生が起こる。この血管新生過程には種々のサイトカインや増殖因子などの血管新生因子がその誘導を引き起こし、反対に血管新生抑制因子がそれを抑制的に制御している¹⁶。血管新生に対して、u-PA/u-PAR 系は integrin との相互作用により細胞情報伝達を介して促進的に働くとされている⁵。これに対して Plg の I から 3 または 4 番目の Kringle 領域を含む N 末端分解産物は、血管新生抑制因子として働き Angiostatin と呼ばれている¹⁷。Angiostatin の作用は血管内皮細胞の膜上に存在する ATP synthase に結合して増殖抑制作用を示す¹⁸。

一方、血管の損傷後の修復・再生過程においては血管内皮細胞や血管平滑筋細胞からの線溶系因子の発現が変動し、それぞれの細胞の増殖や移動に関与している。マウスの血管に対する創傷治癒モデルでは、大腿動脈に対する電気傷害後の内膜肥厚程度で比較検討された¹⁹。すなわち、PlgKO マウスでは WT マウスに比べ血管傷害後の治癒の度合いが有意に低下しており、内膜肥厚形成の抑制が観察された。また、u-PAKO マウスと t-PA/u-PA ダブル KO マウスでは血管傷害後の内膜肥厚形成の抑制が観察され、治癒が有意に低下していた。これらに対し、PAI-1KO マウスでは、血管傷害後の血管平滑筋細胞の移動が増加し、動脈の内膜肥厚形成が促進していた。また、t-PAKO マウスおよび α_2 -APKO マウスの血管傷害後の治癒は WT マウスとほぼ同等であった。これらのことから、動脈血管の創傷治癒では、u-PA/PAI-1 系による Plg 活性化制御が細胞移動に関与し内膜肥厚形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、 α_2 -APKO マウスの

結果は WT マウスと同等であったことから、この血管傷害モデルでの創傷治癒過程におよぼす plasmin 活性制御の役割は低いものと思われる。一方、マウスの心臓虚血モデル²⁰ や上記とは異なる血管障害モデル²¹ を用いた我々の検討結果では、障害後の血管新生因子として働く vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現に対して plasmin/ α_2 -AP 系が制御系として重要な役割を果たしていることが示された。

これらのことから、血管新生や血管損傷後の修復・再生時に線溶系因子は、細胞移動や増殖に対して重要な役割を担っていることが明らかとなった。

1-6. 皮膚の創傷治癒

皮膚組織には線溶系因子が存在し、創傷治癒の過程でケラチノサイトなどから線溶系因子が産生分泌される。マウスの皮膚創傷治癒モデルでは、早期に t-PA 活性が、遅れて u-PA 活性の発現がそれぞれ誘導される²²。また、線溶系の阻害因子である PAI-1, PAI-2 および α_2 -AP²³ はいずれも皮膚の創傷治癒過程で細胞周囲の蛋白分解活性を制御している。

実験的皮膚切開後の創傷治癒モデルにおいて、WT マウスでは、術後10日で痂皮が消失し、11~13日で治癒が完了した。一方、PlgKO マウスでは顕著な治癒遅延が認められた²⁴。組織学的解析を行ったところ、PlgKO マウスの皮膚切開部でケラチノサイト遊走能の抑制が見られた。これらの結果から、皮膚の創傷治癒過程では、plasmin (ogen) がケラチノサイトの遊走能に関わっていることが示唆された。さらに、Lund ら²⁵ は同モデルにおいて MMP の合成阻害剤である galardin の投与により WT マウスおよび PlgKO マウスとも創傷治癒が著しく阻害されたことを報告した。この結果は、線溶系と MMPs 系による蛋白分解活性発現が創傷治癒過程でのケラチノサイトの遊走能に重要であることを示す。

また、同モデルにおける PAs/PAI-1 系の検討では、u-PA/t-PA ダブル KO マウスにおいて PlgKO マウスと同様の顕著な治癒遅延が観察されたが、u-PAKO マウス、t-PAKO マウス、PAI-2KO マウスおよび t-PA/u-PAR ダブル KO マウスでは WT マウスと同等の治癒率および治癒過程を示した²⁶。これに対して、PAI-1KO マウスでは、WT マウスに比べ創傷治癒の顕著な亢進が見られた²⁷。このように、皮膚切開後の創傷治癒モデルでは、その治癒過程でケラチノサイトの遊走能などを誘導する plasmin と、その活性化を制御する PA/PAI-1 系が重要である。

1-7. 癌

線溶系因子は癌細胞の増殖・浸潤・転移の際の組

織破壊に関与するとされている²⁸。事実、癌細胞は u-PA や u-PAR を高発現しており、癌患者での予後不良因子として知られている。

線溶系因子と癌との関わりについて、線溶系因子の KO マウスを用いた検討が行われた。化学物質による皮膚メラノーマ腫瘍の誘導モデルでは、WT マウスに比べて u-PAKO マウスで、その病変の進行が抑制されていた。また、肉腫細胞移植モデルでは u-PAKO マウスで腫瘍細胞のアポトーシス誘導に伴う増殖抑制が認められた。さらに、同モデルで PAI-1KO マウスは血管新生抑制による移植腫瘍の増殖抑制が示された。PlgKO マウスの Lewis 肺癌モデルでは WT マウスに比べ腫瘍の有意な増殖抑制とリンパ節転移の抑制が認められた。

これらの結果から、Plg/u-PA は癌細胞の浸潤・転移・増殖に関与することが実証された。

1-8. アレルギー反応

WT マウスと PAI-KO マウスを卵白タンパク質で感作したところ、鼻粘膜上皮下のコラーゲン沈着は WT マウスに比べて PAI-1KO マウスで低下していた。これは、PAI-1 の欠如による組織線溶の上昇に起因すると考えられた。卵白タンパク質による WT マウスの感作で、血清中の特異的 IgG1 と IgE の増加および脾細胞の培養上清中への IL-4 と IL-5 の分泌増加が認められた。一方、卵白タンパク質による PAI-1KO マウスの感作で、血清中の特異的 IgG2a の増加および脾細胞の培養上清中への IFN- γ の分泌増加が認められた。このことから、PAI-1 は単に組織線溶活性を制御しているだけではなく、免疫応答においても重要な役割を担っていることが示された²⁹。

1-9. まとめ

線溶系因子の KO マウスを用いた病態モデルの解析により、線溶系因子は血管内での血栓溶解だけではなく、様々な臓器・組織での細胞性線溶に関わっていることが明らかにされた。線溶系の中心をなす plasmin はその酵素活性により細胞移動や組織修復、前駆体酵素の活性化などの作用を通じて種々の病態発生に関与している。組織障害後の修復・再生過程において細胞周囲での蛋白分解活性を積極的にコントロールするために、線溶系因子を利用した新たな試みが期待される。

2. 線溶系因子の受容体

細胞膜表面における局所的な線溶活性には、それぞれの線溶系因子に対する受容体および結合タンパク質の発現が重要である。PA によって活性化された plasmin や MMPs が ECM を分解し、さらに受

容体から細胞内へのシグナルも誘起されることでさまざまな細胞の機能に深く関わっている。以下に、u-PAR の発現機構と t-PA 結合タンパク質について述べる。

2-1. u-PAR

u-PAR (CD87) は ~55 KDa の分子量で、1 本鎖 scu-PA と活性化した 2 本鎖 u-PA を結合することができる^{30,31}。u-PAR に結合した u-PA は酵素活性を維持され、液相にある場合に比べより効率的に plg を活性化する。完全な u-PAR は分子内の 5 箇所 (52, 162, 172, 200 および 233 番目の Asn) で糖鎖修飾されており、グルコサミンとシアル酸を糖鎖に有する。さらに u-PAR には、それぞれ約 90 残基からなる 3 つの相同的な繰返しドメイン (ドメイン 1, 2, 3 : D1, D2, D3) が形成されており、u-PA の結合部位は D1 に位置する。C 末領域には GPI-anchor があり、細胞膜の外層に結合している。このような構造から u-PAR は、glycolipid-anchored Ly-6 superfamily タンパク質に属している³²。また u-PAR は phospholipase C (PLC) により分解されると細胞膜から切断、解離し可溶性の soluble u-PAR (su-PAR) となる。急性骨髄性白血病患者では高値の su-PAR が検出される³³。u-PAR は、乳癌、大腸癌、胃癌や肺癌の組織あるいは癌細胞周囲のマクロファージに発現が認められ、特に癌組織の進展先進部に強く発現していることも確認されている³⁴。

u-PAR の発現には EGF, FGF, VEGF, TGF β 1, PMA, IFN- α , INF- γ のような様々な生理活性物質や PKC, PKA/cAMP, MAPK および JNK 系といった調節因子が影響をおよぼす³⁵⁻⁴¹。ヒト u-PAR 遺伝子 (PLAUR) は 7 つのエキソンからなり、染色体 19q13 にコードされている⁴²。完全長 1.4 kb の mRNA と膜結合ペプチド配列を欠損した splicing variant を生じる^{43,44}。u-PAR プロモーター領域には TATA もしくは CAAT box は存在しないが転写因子 AP-1 や Sp1 が結合するモチーフが存在する^{45,46}。大腸癌細胞では、JunD, c-Jun, c-Fos および Fra-1 と結合する AP-1 コンセンサスエレメントが存在する -190/-170 プロモーター領域が MAPK-JUNK 系を介して u-PAR 遺伝子発現の誘導を調節している³⁹⁻⁴¹。さらに、K-ras をノックアウトした細胞では AP-1 モチーフへの転写因子の結合が減少すること、また -190/-170 にある AP-1 コンセンサスエレメントが欠損するとプロモーター活性が抑制されることから、このエレメントは K-ras による u-PAR 発現誘導にも重要である^{47,48}。-152/-135 領域には、Sp-1, AP-2 および PEA3 に対する結合サイトをもつモチーフが存在し、AP-2 α に類似し

た転写因子と考えられている AP-2 like protein や Sp-1, Sp-3 を結合する³⁷. 非常に浸潤性の高い培養大腸癌細胞では, AP-2 like protein の結合は u-PAR プロモーター活性に重要である. また, この転写因子は PMA 刺激による u-PAR 発現増加にも関与している. dominant-negative AP-2 は u-PAR のプロモーター活性やその発現を減少させるだけでなく, u-PAR による proteolysis も抑制する. -152/-135 領域への転写因子 Sp-1 の結合は PMA によるプロモーター活性化に重要であり, 大腸癌細胞では c-Src-oncogene による u-PAR 発現誘導にも関与している⁴⁹. 図 3 に示したプロモーター領域以外に, NF κ B や新規の転写因子である KLF4 も u-PAR の発現制御に関わっている^{50,51}.

転写活性化因子の研究は数多く報告されているが抑制因子についてはあまり知られていない. しかし, PEA3/Ets モチーフの欠損が β 3-integrin による u-PAR 発現の抑制を妨げたことから, このサイトが抑制因子として作用することが示唆された⁵². さらに, 腫瘍抑制因子遺伝子 pcdcd4 も Sp-3 結合を阻害することによって u-PAR の発現を抑制することが報告されている⁵³.

2-2. t-PA receptor と binding protein

細胞膜上において t-PA の高親和性受容体はまだ

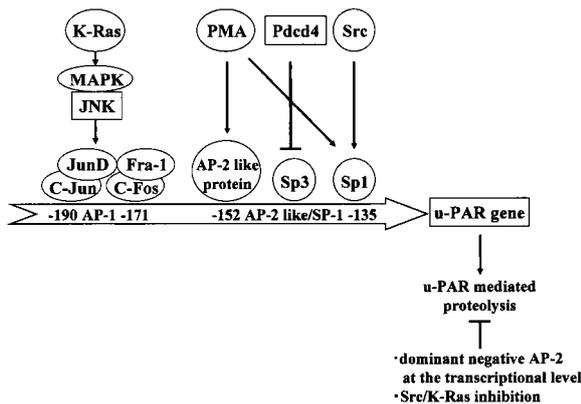


図 3 u-PAR プロモーター領域

同定されていない. しかし, t-PA は多くのタンパク質に結合することができ, その中でも fibrin は最も結合しやすいタンパク質である. fibrin の存在下では, t-PA による Plg 活性化は非存在下に比べて100倍増加する^{54,55}. したがって, fibrin は t-PA の主要な co-factor である. また, これまでに報告されている t-PA receptor には Annexin A2, enolase, cyto-keratin-8 および 18, tubulin などがある (表 1)⁵⁶⁻⁵⁸. Annexin A2 は内皮細胞において t-PA と Plg の受容体としてよく知られており^{8,59}, 最近では培養膵癌細胞 (PANC-1) において t-PA の plasmin 活性化を介して細胞の浸潤を誘起することが報告された⁶⁰. また, t-PA とヒト平滑筋細胞 (VSMC) が特異的に結合し, Plg 活性を増強させることから p63 (CKAP4) が t-PA binding protein として同定されている⁶¹⁻⁶³. さらに t-PA は laminin や fibronectin のような ECM にも結合する^{64,65}. また, t-PA binding protein は細胞膜に局在する分子だけでなく, 細胞質や細胞小器官にも存在することが示されている⁶⁶. 我々が血管内皮細胞から同定した t-PA binding protein は t-PA と特異的に結合し, 細胞膜に局在させることにより t-PA との結合および Plg 活性化を増強することを確認した. t-PA の protease 活性による線溶活性への関与だけでなく, protease 活性に依存しないサイトカインとしての機能も解析されており, 多様な t-PA binding protein が存在すると考えられる.

2-3. まとめ

今後, u-PAR 発現制御に関わる分子は疾患の予見や予後, リスクのモニタリングに対してより正確な情報を提供するために重要であり, u-PAR とその制御因子を阻害することで, 癌の予後の改善が期待されている. また, 血管内皮細胞から分泌された t-PA による線溶活性を細胞表面に局限し, その酵素活性を増強させる t-PA binding protein の存在とその発現機構の解明, さらに線溶系調節機能に対する影響が注目される.

表 1 t-PA binding protein の分類

Protein name	Mass (KDa)	localization	function
Annexin A2	39	membrane, cytoplasm	signal transduction, cell communication
enolase	47	membrane, cytoplasm	metabolism
cyto-keratin 8	53	cytoskeleton	structural component
cyto-keratin 18	47	cytoskeleton	structural component
tublin	50	cytoskeleton	structural component
p63	63	ER	chaperone
LRP-1	600	membrane	metabolism
NMDAR	120	membrane	signal transduction

3. 線溶系因子による細胞内シグナル活性化

線溶系酵素である plasmin, t-PA, u-PA は、血管内に形成した血栓を溶解するだけではなく、血管新生、炎症性細胞遊走、癌の浸潤、創傷治癒、組織再生など様々な生理的・病態生理的役割を果たしている^{3,67}。これら線溶系酵素のうち、u-PA がその受容体である u-PAR に結合し、細胞内シグナルを惹起することは広く知られているが^{68,69}、t-PA や plasmin も細胞内シグナルを活性化し、様々な細胞反応を誘起することが明らかになりつつある。そこで本章では、t-PA および plasmin による細胞内シグナル活性化機構を中心に概説する。

3-1. t-PA による細胞内シグナル活性化

近年、t-PA が自身のクリアランス受容体である low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) を介して細胞内シグナルを活性化することが明らかになった⁷⁰。LRP-1 はリガンド結合部位が存在する 515 kDa の α 鎖と、細胞膜を貫通する 85 kDa の β 鎖からなり、 β 鎖の NPxY モチーフがリン酸化されるとシグナル伝達に必要なアダプタータンパク質である Shc, Dab-1 や CED-6/GULP と複合体を形成する^{71,72}。NPxY モチーフのリン酸化は Src やプロテインキナーゼ (PK) $C\alpha$ によって制御されており^{71,72}、さらに platelet-derived growth factor receptor- β の活性化によっても引き起こされる^{73,74,72}。LRP-1 のシグナル伝達には複数の経路が関与しているが、t-PA は LRP-1 を介して、cAMP/PKA 経路⁷⁵、NF- κ B 経路^{70,76}、ERK1/2 経路⁷⁷、 β 1 integrin/integrin-linked kinase 経路⁷⁸ を活性化し、海馬長期増強を促進するほか⁷⁵、内皮細胞や線維芽細胞における MMP-9 の発現や^{70,77}、筋線維芽細胞の活性化を引き起こす⁷⁸ (図 4)。また、t-PA の脳室内投与によって血液脳関門の透過性が亢

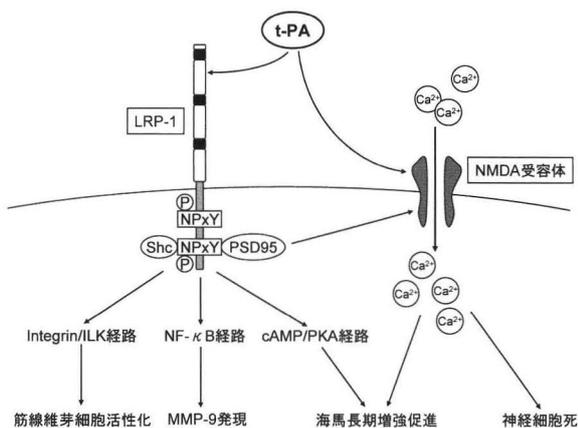


図 4 t-PA のシグナル伝達経路

進するが、この反応は plasminogen/plasmin 非依存性であり、さらに LRP-1 アンタゴニストである receptor-associated protein (RAP) によって完全に抑制される⁷⁹。このような t-PA の作用も LRP-1 を介した細胞内シグナル伝達が何らかの役割を果たしているものと考えられる。また、神経細胞において t-PA は N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の NR1 サブユニットあるいは NR2B サブユニットに結合し細胞内への Ca^{2+} の流入を増加させる^{80,81}。さらに、t-PA と LRP-1 の結合によって NPxY モチーフにアダプタータンパク質である PSD95 が結合し、これが NMDA 受容体と複合体を形成することで Ca^{2+} シグナルと ERK1/2 経路が活性化されることがごく最近明らかになった⁸² (図 4)。以上より、中枢神経系において t-PA は NMDA 受容体の機能を亢進することで、神経細胞死、シナプス可塑性や海馬長期増強などに関与する重要な因子であると考えられる。しかしながら、そのメカニズムについては未だ結論付けられておらず、さらに詳細な検討が必要である。また、t-PA は LRP-1 以外にも annexin A2 や epidermal growth factor 受容体を介して細胞内シグナルを活性化し、膵ガン細胞の増殖やマイクログリアの活性化を引き起こすことから^{83,84}、t-PA は様々な細胞において複雑なシグナル伝達経路に関与しているものと思われる。

3-2. Plasmin による細胞内シグナル活性化

Plasmin は不活性型の成長因子を活性化することで二次的に細胞内シグナルを誘起するほか、Gタンパク質共役型受容体である protease-activated receptors (PARs) を活性化することで直接的に細胞内シグナルを惹起することが明らかになりつつある^{85,86}。PARs には PAR-1~4 の 4 つのファミリーメンバーが存在するが、これらのうち plasmin によって PAR-1 と PAR-4 が活性化される。PAR-1 は主に $G_{q/11}$ タンパク質を介したホスホリパーゼ $C\beta$ 活性化によって細胞内 Ca^{2+} 増加や PKC 活性化を引き起こす。また、PAR-1 は $G_{q/11}\alpha$ 以外にも、 $G_{11/12}\alpha$ や $G_{i\alpha}$ ともカップリングしており、 $G_{11/12}\alpha$ を介して Rho を活性化し細胞移動を引き起こす⁸⁷。Plasmin は細胞移動や増殖、さらにニコチンの報酬効果などに関与するが、これらの反応はいずれも PAR-1 アンタゴニストや PAR-1 遺伝子発現阻害によって抑制される^{85,86,88}。また、PAR-4 は PAR-1 と同様に $G_{q/11}$ タンパク質を介したホスホリパーゼ $C\beta$ 活性化を引き起こすが、その他の経路について検討した報告は少ない。以前から plasmin による血小板凝集が知られていたが、この反応は PAR-4 活性化に

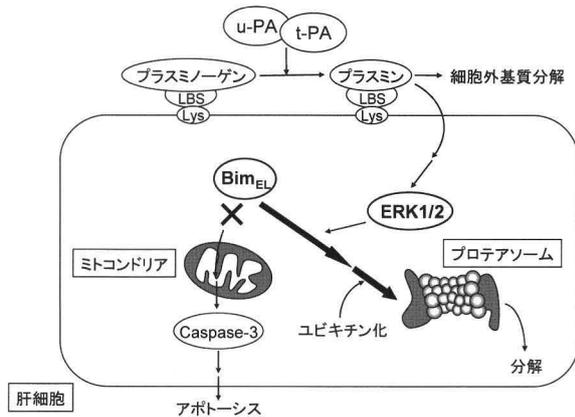


図5 Plasminのアポトーシス抑制におけるシグナル伝達経路

よるものであることが証明された⁸⁹。また, plasmin によるアポトーシスの制御も興味深い。過剰な plasmin の活性化は過度の ECM 分解によって anoikis (ECM の分解によって足場を失った細胞が起こすアポトーシス)を誘導する⁹⁰。一方, 我々は plasmin がリジン結合部位を介して肝細胞膜表面に結合すること, さらに anoikis を誘導しない低濃度 plasmin が ERK1/2 経路を活性化し, BH-3-only タンパク質の 1 つである Bim_{EL} の分解を亢進してアポトーシスを抑制することを見出した (図 5)⁹¹。また, 単球においても低濃度 plasmin は PAR-1 の活性化を介して TNF- α により引き起こされるアポトーシスを抑制することで細胞保護的に働く⁹²。以上より, plasmin によるアポトーシスの制御は局所での plasmin 濃度が非常に重要な要因であると考えられる。

3-3. まとめ

これまで線溶系因子は血栓や ECM を分解する働きばかりが目されてきたが, 上述のように細胞膜表面に発現する分子との相互作用によって細胞内シグナルを惹起し様々な細胞反応を引き起こすことが明らかになりつつある。t-PA は脳梗塞急性期の治療に使用されているが, 重篤な副作用として脳内出血に注意を払わなければならない。これまでの研究成果から, t-PA による脳内出血は恐らく t-PA の血栓溶解作用に起因するものではなく, 血管内皮細胞においてシグナル経路活性化により誘導された MMPs が過剰に ECM を分解した結果である可能性が高い^{70,93}。今後, t-PA や plasmin によるシグナル伝達とそれによって誘起される細胞反応がさらに詳細に検討されれば, 安全性の高い血栓溶解療法の確立や新規脳保護薬の開発に繋がるものと期待される。

4. 線溶系因子のプロテアーゼカスケード調節機構による肝再生機能

肝臓は, 様々な代謝や蛋白合成など複数の機能を持つ臓器である。凝固・線溶系の多数の因子も, 肝細胞によって合成・分泌される。線溶系因子では Plg と α_2 -AP が肝細胞で産生される⁹⁴。一方, 肝臓は再生能力の優れた組織で, その再生過程に様々なサイトカインや増殖因子が関与している⁹⁵。線溶系酵素は肝再生過程に関わる因子を活性化する。また, 障害された細胞やその周囲の組織は再生過程で再構築される。その際, ECM の分解は活性型の MMPs によって起こる。この MMPs の活性化には plasmin が関与している。また, ECM には肝再生に関わるサイトカインや増殖因子がプロテオグリカンを通じて存在している。このような点から肝再生過程において線溶系因子は蛋白分解活性の発現制御に関与していることが考えられる⁹⁶。そこで, 肝再生機構における線溶系因子の関わりについて, その KO マウス⁹⁷を用いた解析結果も含めて総説する。

4-1. 線溶系因子による肝再生増殖・抑制因子の活性化

肝障害後の肝再生過程では肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor ; HGF) が肝細胞の増殖を促進し, TGF- β が肝細胞の増殖を抑制する。この両因子は前駆体として分泌され, 限定分解を受けて活性化体として作用する。この活性化には線溶系因子の蛋白分解活性が関与する。また, 増殖因子は ECM 中に存在し, その分解により放出されて作用する。この ECM の分解にも線溶系因子の関与が考えられる。さらに, 心²⁰・血管系²¹ や皮膚^{98,15} での障害時には plasmin/ α_2 -AP 系が増殖因子の誘導に関与することが認められている。

肝細胞の増殖因子は HGF で分子量約 8 万の一本鎖前駆体として分泌され, 蛋白分解酵素の限定分解により二本鎖活性化体に変換される⁹⁹。活性化 HGF はその受容体 c-Met に結合し機能発現を誘導する¹⁰⁰。HGF の活性化は, 特異的な蛋白分解酵素 (例えば HGF activator¹⁰¹, 凝固因子 XIIa¹⁰², 線溶系酵素^{103,104}) によって起こる。また, HGF は肝臓, 脾臓および腎臓などの ECM 内のプロテオグリカンに結合している¹⁰⁵。ラットの 70% 部分肝切除 (partial hepatectomy ; PH) での血漿 HGF レベルは ECM からの動員により 2 時間以内に増加する¹⁰⁶。また, u-PA 活性は肝切除後 u-PAR 発現の誘導と共に, 1 分以内に急速に増加する。この u-PA 活性の増加は, Plg 活性化を引き起こし ECM 蛋白質の分解を誘導する¹⁰⁷ と共に, HGF を活性化させる¹⁰⁸。

TGF- β は分子量25 kD の活性型に75 kD の LAP (latency associated peptide) と LTBP (latent TGF- β binding protein) が結合した潜在型 TGF- β 大複合体 (large latent TGF- β complex ; LLC) を形成し存在している¹⁰⁹. TGF- β の活性化は複雑で臓器, 状況などにより異なり, thrombospondin 1¹¹⁰, integrin $\alpha v \beta 6$ ¹¹¹ や蛋白分解酵素 (plasmin¹¹², 血漿 kallikrein¹¹³) などで引き起こされる. TGF- β の機能は肝細胞を含む上皮細胞, 血管内皮細胞, 血球細胞などほとんど全ての細胞に対して強い増殖抑制作用を示す. TGF- β はラット PH モデルで肝切除後, 肝細胞や肝星細胞から産生・分泌され肝細胞の増殖を制御する. Plasmin は肝臓内の ECM から潜在型 TGF- β の放出を誘導し, 肝星細胞膜上で LAP を隔離することによって活性化する¹¹².

4-2. 肝障害モデルによる解析

肝臓の障害・再生過程の研究にはラットやマウスなどによる実験動物モデルが数多く使用されている. 障害モデルは異なる機序の障害を誘導する種々の薬物投与や肝臓の一部を切除する部分肝切除などが用いられている¹¹⁴. また, 肝臓から分離した初代肝細胞や樹立化された肝細胞を用いた細胞培養系による解析も行われている.

4-2-1. 肝細胞による線溶系因子の発現

肝細胞は Plg と α_2 -AP の主要な産生・分泌細胞として知られている. 両蛋白質の発現は, サイトカイン¹¹⁵ やホルモン¹¹⁶ などの影響を受ける. ヒトやマウスの Plg 遺伝子のプロモータ領域には IL-6 エレメントが存在している^{117,118}. また, Plg mRNA の発現はマウス肝細胞の培養系において細胞密度に依存する¹¹. マウス α_2 -AP 遺伝子のプロモーター領域には特異的な (TGG) n の繰り返し配列が存在して

いる^{119,120}. これらに対して PAs や PAI-1 は通常の肝細胞でほとんど発現していない. また, 肝細胞の初代培養¹¹ や肝癌細胞株の培養¹²¹ では両者とも発現が認められる. これらの PAs や PAI-1 の発現誘導の結果は肝細胞が静止状態から増殖プロセスにスイッチングされたことを示唆している. 一方, PAs や PAI-1 は肝臓障害後の肝再生過程において産生が誘導される^{106,122}.

4-2-2. 四塩化炭素肝障害モデル

マウス・ラットにおける四塩化炭素 (CCl₄) の腹腔内投与は肝星細胞の活性化を誘導し, ECM 蛋白の過剰産生から肝の線維化を引き起こす¹²³. 著者らは, 四塩化炭素投与後の肝再生能が WT マウスに比べ PlgKO マウスと Plg/ α_2 -AP ダブル KO マウスで遅延し, α_2 -APKO マウスで促進したことを認めた¹²⁴ (図 6). ECM タンパク質である fibronectin 量は WT の肝臓中で 2 日目をピークに増加し, その後 7-14 日で回復した. これに対し α_2 -APKO マウスの肝臓中 fibronectin 量は増加後急速に減少し, 5-7 日で回復したが, PlgKO マウスと Plg/ α_2 -AP ダブル KO マウスでは増加後回復が認められなかった. また, 血漿および肝臓組織中の PAs 活性は四塩化炭素投与後 2-5 日目に u-PA 活性が 2-14 日目に t-PA 活性が増加していた. また, 肝臓から分離した肝細胞は膜上に Plg と u-PA を結合し, PAs による活性化の亢進と α_2 -AP による阻害からの保護を示した¹²⁵. これらの結果は, u-PA/Plg 系が肝再生過程において ECM の分解・再構築に重要な役割を果たすことを示唆した. また, plasmin は肝細胞膜表面に結合し, 自身のプロテアーゼ活性依存性に ERK1/2 経路を活性化させ, アポトーシス促進性蛋白質 BimEL の分解を促進する. この結果から plasmin

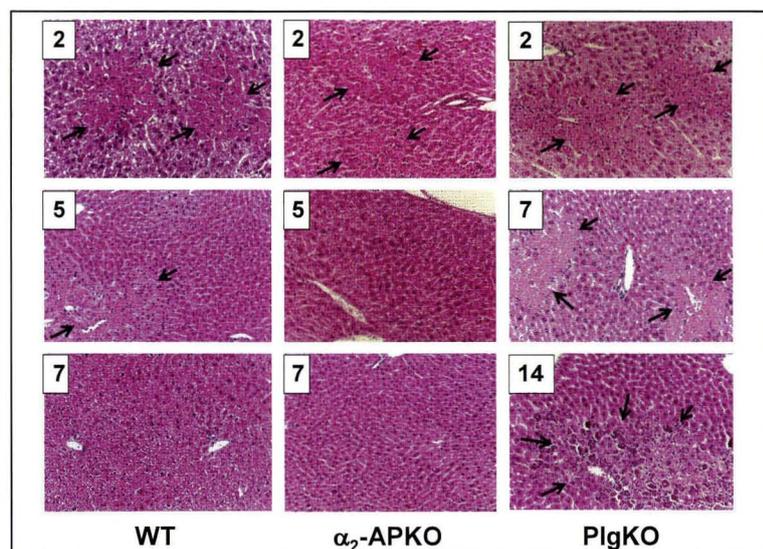


図 6 四塩化炭素肝障害モデルにおける PlgWT マウスと PlgKO マウスの肝組織切片の HE 染色像. PlgWT マウスの肝障害は四塩化炭素投与 2 日後をピークに現れ (虚血部位), その後回復過程をたどり 7 日で再生される. これに対し, PlgKO マウスは 2 日後同程度の障害を示したが, その後回復せず肝再生不全を示した. また, α_2 -APKO マウスは 2 日後同程度の障害を示したが, 5 日で再生された.

は肝再生過程において細胞保護的に働く可能性が示唆された⁹¹。

4-2-3. Fas 抗体モデル

抗 Fas 抗体の腹腔内投与モデルは肝細胞のアポトーシスを誘発し、ヒトの劇症肝炎の病因を反映する¹²⁶。我々は、抗 Fas 抗体投与モデルで u-PAKO マウスが HGF 活性化遅延に基づく肝再生不全を示したことを認めた¹⁰⁸。一方、PAI-1KO マウスは HGF 活性化亢進に基づく肝再生促進を示した。さらに、c-Met のリン酸化は HGF の肝再生能と一致した結果を示した。これらの結果は、u-PA/PAI-1 系が抗 Fas 抗体投与モデルでの HGF 活性化による肝再生誘導において重要な役割を果たすことを示唆した。

4-2-4. PH モデル

マウス・ラットの PH モデルは肝臓の特異的な葉を取り出すことで約30%、70%あるいは90%を切除し、残の葉を損傷なく残存させてその後の肝再生能を評価できる。70% PH モデルの残存葉は取り出された葉の体積・重量を補うために徐々に増大し、7～14日で元の重量まで回復する。我々は、70% PH 後の PlgWT マウスの肝重量が経時的に増加し、10～14日で元の重量に回復したが、PlgKO マウスでは7日まで WT マウス同様増加し、その後増加が止まり10～14日で有意に低値を示したことを認めた¹²⁷。また、70% PH 後10日目の PlgKO マウスの肝臓は fibrin 沈着で囲まれた細胞壊死領域が認められた。この結果、Plg の欠如は70% PH 後通常に肝再生が開始するが、その後 fibrin 沈着の出現により局所的虚血状態が起こり、その後の回復が正常に進行しないことが示された。

4-2-5. アルコール肝障害モデル

エタノール暴露の動物モデルは、ヒトのアルコール性肝臓疾患 (ALD) と類似した病理学的変化を示すと考えられている¹²⁸。Bergheim らは、このモデルで PAI-1WT マウスが肝細胞の TNF- α 依存性の PAI-1 発現を伴う脂肪蓄積、脂肪変性および壊死が見られたが、PAI-1KO マウスでその肝損傷が軽度であったことを報告した¹²⁹。これらの結果はアルコールによって誘発された肝臓の脂肪変性と損傷は TNF- α 依存性 PAI-1 発現の誘導が関与することを示唆した。

4-2-6. 総胆管結紮 (BDL) モデル

肝外性胆汁うっ滞は、マウスやラットでの外科的総胆管結紮 (BDL) でモデル化されている¹³⁰。Wang らは、BDL 後 t-PAKO マウスが WT マウスに比べ胆汁梗塞、アポトーシス細胞および好中球浸入などの増加と肝細胞増殖の減少を示したことを報告した¹³¹。さらに、PAI-1KO マウスでは BDL で誘導さ

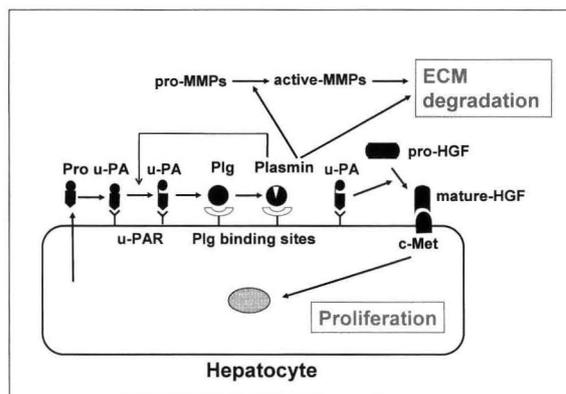


図7 肝再生過程における肝細胞上での線溶系因子の役割。肝細胞は Plg と u-PA を結合させ、局所的に効率良い Plg 活性化を引き起こす。生じた plasmin は細胞周囲の ECM 蛋白質分解を誘導する。また、u-PA/u-PAR 系は HGF の活性化を引き起こし、細胞増殖を誘導する。

れる症状を軽減したが、合成 t-PA 阻害剤投与でその効果は消失した¹³²。また、t-PA 遺伝子の損失は、BDL 後の肝臓での HGF 活性化と c-Met リン酸化を低下させた。以上の結果から、マウス BDL モデルではその誘発症状に t-PA/PAI-1 系が関与することを示唆している。

4-3. まとめ

肝障害後の再生過程における線溶系因子の機能は図7に示す。線溶系因子は肝細胞周囲での蛋白分解活性を制御することで、2方向から肝再生過程に関与する。u-PA は HGF/c-Met 系の活性化を誘導し、肝細胞の増殖を促進する。一方、plasmin は ECM 蛋白質の分解を誘導し、肝再生のための微小環境を整える。

今後、細胞周囲での線溶系因子を中心とした蛋白分解活性の調節は肝再生の新たな医療への応用に期待される。

5. 神経系における線溶系因子の機能

近年の研究により、線溶系因子は神経系 (中枢神経系, 末梢神経系, 自律神経系) においても多様な作用を持つことが明らかとなっている。特に t-PA は中枢神経系に豊富に存在することが以前より知られており^{133,134}、線溶系因子の中でも特に重要な機能を担っている。神経系での t-PA の作用には血栓溶解同様に細胞外プロテアーゼカスケードを介する作用と、受容体を活性化して発現する作用がある。

5-1. 中枢神経系における線溶系因子の機能

中枢神経系においては、t-PA は神経細胞およびマイクログリアに発現している¹³⁵。また、神経細胞の t-PA は軸索末端⁷⁵あるいは樹状突起^{136,137}から

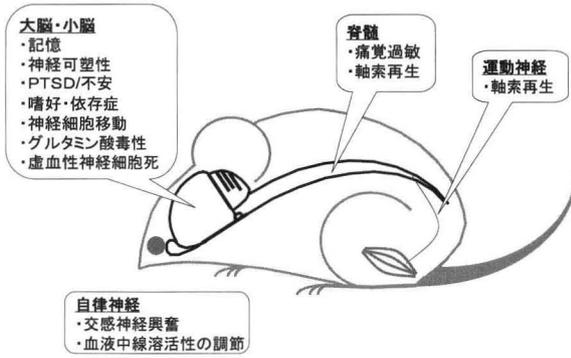


図8 神経系における線溶系因子の機能

神経活動依存的に放出される⁷⁵。図8にまとめたようにt-PAの機能および作用部位は、長期増強(海馬)、神経可塑性(海馬, 大脳皮質視覚野, 扁桃体)、記憶(海馬, 小脳)、神経細胞の移動(小脳)、軸索の伸展(大脳皮質初代培養細胞)、不安・恐怖反応(海馬, 扁桃体)、嗜好(側坐核)、痛覚過敏(脊髄)など多岐にわたる。さらに神経疾患に関連して、グルタミン酸毒性、虚血性神経細胞死、アルツハイマー病などにも関わる。これらの機能のうち虚血性神経細胞死については詳しく後述する。他の機能についての詳細は他の文献を参照にされたい^{138,139}。また、t-PAが神経活動依存的な脳組織血流の制御に寄与することが報告されている¹⁴⁰。

中枢神経系にはPAI-1^{141,142}に加えて、t-PAを選択的に阻害するneuroserpin¹⁴³と呼ばれるセリンプロテアーゼインヒビターが存在し、t-PAの機能を調節していると考えられる。また中枢神経系にはPlgも存在し、神経細胞の移動¹⁴⁴、ECMタンパク質であるlamininの分解を介する神経細胞死の誘導¹⁴⁵⁻¹⁴⁷、BDNFの活性化を介する神経伝達修飾¹⁴⁸、monocyte chemoattractant protein-1のプロセッシングを介するミクログリア活性化¹⁴⁹などに寄与している。これらの作用では、plasminはt-PAによる活性化を介して機能すると考えられる。

受容体を介する作用としては、t-PAがNMDA受容体のNR1サブユニットを切断しリガンドによる活性化を増強することによりグルタミン酸毒性を起す可能性が報告されている^{80,150}が、反論もあり確定していない^{151,152}。またt-PAがNMDA受容体のNR2サブユニットとの相互作用を介してシグナルを伝達することが報告されている^{81,153}。NMDA受容体に加えてLRP-1^{70,75,76,79}、およびannexin A2^{83,154}が神経細胞においてt-PAの受容体として機能していることも示唆されている。一方、plasminはPAR-1を活性化してシグナルを伝達する^{88,155}。神経におけるu-PAの昨日は明らかではないが、正

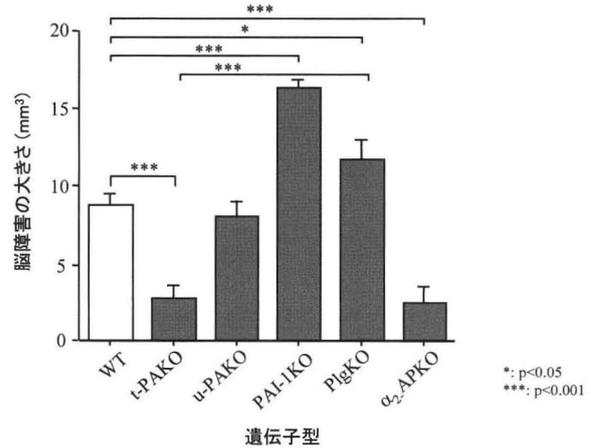


図9 線溶系因子の欠損が脳梗塞に及ぼす影響

常状態の脳ではu-PAはほとんど発現しておらず、重要な機能を担っている可能性は少ないと考えられる。

脳梗塞に伴う虚血性神経細胞死においても線溶系因子は重要な役割を担っていることが知られている。これに関連して、我々は中大脳動脈の永久閉塞による脳梗塞がt-PAにより促進、その阻害因子のPAI-1により抑制されること、逆にplasminにより抑制、その阻害因子のα₂-APにより促進されることを明らかにした¹⁵⁶(図9)。これらの結果はt-PAがplasminを介さずに脳梗塞を増悪し、逆にplasminは脳梗塞を抑制することを意味する。その後の研究により、t-PAが上述のNMDA受容体あるいはLRP-1を介して脳梗塞を増悪することが報告されている^{70,79,80}。また我々は血液中のα₂-APの中和により脳梗塞が抑制されることを明らかにした^{157,158}。plasminの誘導体であるmicroplasminはα₂-APと結合・中和する。そこでmicroplasminを抗脳梗塞薬として利用する研究が進められており¹⁵⁹、2008年現在において第II相試験がヨーロッパで進行中である。

一方、t-PAは血栓溶解剤として虚血性脳梗塞の治療に広く用いられている¹⁶⁰。これに関連して、我々は虚血性脳梗塞におけるt-PAの作用には、1) 血栓溶解による脳虚血状態の解消に基因する脳梗塞の抑制と、2) 細胞毒性に基因する脳梗塞の増悪があり、両者の影響は血管の閉塞の度合いにより決定されることを証明した^{161,162}。さらにt-PAによる脳梗塞治療により出血のリスクが増すこと¹⁶⁰が明らかとなっている。近年の研究により、この出血リスクの増加はt-PAの線溶作用に起因するのではなく、t-PAがLRP-1を介して血管内皮細胞にMMPsを誘導し、血管基底膜の分解を亢進することに起因することが明らかとなっている¹⁶³⁻¹⁶⁵。これ

に関連して、我々は脳血管閉塞後に投与した t-PA が LRP-1 を介して虚血領域の血管内皮細胞に選択的に MMP-3 の発現を誘導することにより出血を増大すること⁹³を報告し、虚血性脳梗塞での t-PA 治療において MMP 活性の抑制により出血リスクを軽減できる可能性を示唆した。

また、我々は u-PAR が u-PA を介さずに脳梗塞を増悪すること、脳虚血後に u-PAR の発現が虚血障害周囲部の血管に選択的に上昇すること¹⁶⁶を明らかにし、u-PAR が血管機能を変調させて脳梗塞を増悪することを示唆している。

5-2. 末梢神経系における線溶系因子の機能

末梢神経系においては、線溶系因子が障害後の痛覚過敏¹⁶⁷および軸索線維の再生に関わること^{168,169}が報告されている。軸索障害後に t-PA は神経およびシュワン細胞から分泌され、plasmin の活性化を介して損傷部位に沈着した fibrin を除去し、軸索の再生を促進すると考えられている。また末梢神経障害に伴う背側神経節での PAI-1 および PAI-2 の発現亢進が報告されており¹⁴²、これらの阻害因子が痛覚過敏における t-PA の作用を調節している可能性も示されている。

5-3. 自律神経系における線溶系因子の機能

t-PA は抵抗血管あるいは心臓に終末する交感神経末端に存在し¹⁷⁰、自律神経活動依存的に循環血液内に放出され血液中の線溶活性を調節する可能性が示されている^{171,172}。また、t-PA は心臓より抽出した交感神経終末シナプトゾームからのアドレナリンの放出を plasmin を介さずに促進すること¹⁷³から、自律神経系の活動を制御している。

5-4. まとめ

上述のように、近年の研究により明らかとなった神経系での線溶系因子の機能は驚くほど多岐にわたる。また、t-PA はプロテアーゼカスケードを介してではなく、受容体を介した作用が多数報告されており、神経系において受容体のリガンドとして重要な機能を担っていると考えられる。これらの線溶系因子の作用のうち病態に関わる作用は新規の創薬のターゲットとして注目を集めているものもある。

終わりに

近年、線溶系の研究の裾野は驚くほどの広がりを見せ、多くの分野で多様な機能が報告されてきた。さらに、最近の研究において線溶系因子が骨髄幹細胞の動員に寄与する可能性が指摘されるなど、その機能は増え続けている。しかしながら、その作用機序が未解明のまま残された機能も少なくない。加えて、病態に関連する機能も多いことから創薬のター

ゲットとしての検討も必要であり、今後の更なる研究の発展が期待されている

一方、血液線溶系においても、PAI-1 について 1) 肥満に伴い白色脂肪組織から血液中への分泌が亢進する¹⁷⁴、2) mRNA の発現が明け方にピークを持つサーカディアンリズムを示す^{175,176}、3) 加齢に伴い発現量が増加する^{177,178} ことなどが報告され、生活習慣病・サーカディアンリズム・加齢に伴う血栓症リスク亢進における線溶系因子の寄与が明らかとなっている。これらの病態メカニズムを踏まえた血栓症の新たな治療法や予防法の確立も期待されている。

文 献

1. Ueshima S, Matsuo O (2006) Development of new fibrinolytic agents. *Curr Pharm Des* 12: 849-857
2. Collen D (1980) On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 43: 77-89
3. Carmeliet P, Collen D (1995) Gene targeting and gene transfer studies of the biological role of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 74: 429-436
4. Dano K, Behrendt N, Brunner N (1994) The urokinase receptor: Protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion. *Fibrinolysis* 8: 189-203
5. Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Chapman HA (1996) Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273: 1551-1555
6. Ueshima S, Fukao H, Okada K, Matsuo O (2004) Growth inhibition of vascular smooth muscle cells derived from urokinase receptor (u-PAR)-deficient mice in the presence of carcinoma cells. *Thromb Res* 113: 41-49
7. Kanse SM, Kost C, Wilhelm OG, Andreasen PA, Preissner KT (1996) The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp Cell Res* 224: 344-353
8. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 269: 21191-21197
9. Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, Miles LA (1995) The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem* 227: 407-415
10. Herren T, Swaisgood C, Plow EF (2003) Regulation of plasminogen receptors. *Front Biosci* 8: d1-8
11. Akao M, Ueshima S, Okada K, Fukao H, Seki T, Ariga T, Matsuo O (2003) Cellular density regulation of plasminogen gene expression in mouse hepatocytes. *Life Sci* 72: 1695-1704
12. Maskos K, Bode W (2003) Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metallo-

- proteinases. *Mol Biotechnol* 25: 241-266
13. Lijnen HR (2002) Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)* 67: 92-98
 14. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA (1999) Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* 274: 29568-29571
 15. Kanno Y, Kuroki A, Okada K, Tomogane K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H (2007) Alpha2-antiplasmin is involved in the production of transforming growth factor beta1 and fibrosis. *J Thromb Haemost* 5: 2266-2273
 16. Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, Garcia M (1993) Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 155: 595-605
 17. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328
 18. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV (1999) Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2811-2816
 19. Carmeliet P, Collen D (1997) Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol* 273: H2091-2104
 20. Matsuno H, Kozawa O, Yoshimi N, Akamatsu S, Hara A, Mori H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Uematsu T (2002) Lack of alpha2-antiplasmin promotes pulmonary heart failure via overrelease of VEGF after acute myocardial infarction. *Blood* 100: 2487-2493
 21. Matsuno H, Ishisaki A, Nakajima K, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Kozawa O (2003) Lack of alpha 2-antiplasmin promotes re-endothelialization via over-release of VEGF after vascular injury in mice. *Blood* 102: 3621-3628
 22. Arumugam S, Jang YC, Chen-Jensen C, Gibran NS, Isik FF (1999) Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinases during cutaneous wound repair. *Surgery* 125: 587-593
 23. Schaefer BM, Maier K, Eickhoff U, Bechtel M, Kramer MD (1996) alpha 2-Antiplasmin and plasminogen activator inhibitors in healing human skin wounds. *Arch Dermatol Res* 288: 122-128
 24. Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K (1996) Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 2: 287-292
 25. Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL, Degen JL, Stephens RW, Dano K (1999) Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *Embo J* 18: 4645-4656
 26. Bugge TH, Flick MJ, Danton MJ, Daugherty CC, Romer J, Dano K, Carmeliet P, Collen D, Degen JL (1996) Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5899-5904
 27. Chan JC, Duszczyszyn DA, Castellino FJ, Ploplis VA (2001) Accelerated skin wound healing in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice. *Am J Pathol* 159: 1681-1688
 28. Almholt K, Johnsen M (2003) Stromal cell involvement in cancer. *Recent Results Cancer Res* 162: 31-42
 29. Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, Sugo T, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Ishida T, Ichimura K, Sakata Y (2005) Protection of plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice from nasal allergy. *J Immunol* 174: 8135-8143
 30. Cubellis MV, Nolli ML, Cassani G, Blasi F (1986) Binding of single-chain prourokinase to the urokinase receptor of human U937 cells. *J Biol Chem* 261: 15819-15822
 31. Stoppelli MP, Tacchetti C, Cubellis MV, Corti A, Hearing VJ, Cassani G, Appella E, Blasi F (1986) Autocrine saturation of pro-urokinase receptors on human A431 cells. *Cell* 45: 675-684
 32. Ploug M, Ellis V (1994) Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. *FEBS Lett* 349: 163-168
 33. Mustjoki S, Sidenius N, Sier CF, Blasi F, Elonen E, Alitalo R, Vaheri A (2000) Soluble urokinase receptor levels correlate with number of circulating tumor cells in acute myeloid leukemia and decrease rapidly during chemotherapy. *Cancer Res* 60: 7126-7132
 34. Mazar AP (2001) The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer Drugs* 12: 387-400
 35. Boyd D (1989) Examination of the effects of epidermal growth factor on the production of urokinase and the expression of the plasminogen activator receptor in a human colon cancer cell line. *Cancer Res* 49: 2427-2432
 36. Li C, Liu JN, Gurewich V (1995) Urokinase-type plasminogen activator-induced monocyte adhesion requires a carboxyl-terminal lysine and cAMP-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 270: 30282-30285
 37. Lund LR, Ellis V, Ronne E, Pyke C, Dano K (1995) Transcriptional and post-transcriptional regulation of the receptor for urokinase-type plasminogen activator by cytokines and tumour promoters in the human lung carcinoma cell line A549. *Biochem J* 310 (Pt 1): 345-

- 352
38. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazzieri R, Mignatti P, Pepper MS (1995) Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270 : 9709-9716
 39. Lengyel E, Wang H, Stepp E, Juarez J, Wang Y, Doe W, Pfarr CM, Boyd D (1996) Requirement of an upstream AP-1 motif for the constitutive and phorbol ester-inducible expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *J Biol Chem* 271 : 23176-23184
 40. Lengyel E, Wang H, Gum R, Simon C, Wang Y, Boyd D (1997) Elevated urokinase-type plasminogen activator receptor expression in a colon cancer cell line is due to a constitutively activated extracellular signal-regulated kinase-1-dependent signaling cascade. *Oncogene* 14 : 2563-2573
 41. Gum R, Juarez J, Allgayer H, Mazar A, Wang Y, Boyd D (1998) Stimulation of urokinase-type plasminogen activator receptor expression by PMA requires JNK1-dependent and -independent signaling modules. *Oncogene* 17 : 213-225
 42. Borglum AD, Byskov A, Ragno P, Roldan AL, Tripputi P, Cassani G, Dano K, Blasi F, Bolund L, Kruse TA (1992) Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Am J Hum Genet* 50 : 492-497
 43. Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Dano K, Appella E, Blasi F (1990) Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *Embo J* 9 : 467-474
 44. Pyke C, Eriksen J, Solberg H, Nielsen BS, Kristensen P, Lund LR, Dano K (1993) An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator. *FEBS Lett* 326 : 69-74
 45. Wang H, Skibber J, Juarez J, Boyd D (1994) Transcriptional activation of the urokinase receptor gene in invasive colon cancer. *Int J Cancer* 58 : 650-657
 46. Soravia E, Grebe A, De Luca P, Helin K, Suh TT, Degen JL, Blasi F (1995) A conserved TATA-less proximal promoter drives basal transcription from the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood* 86 : 624-635
 47. Muller SM, Okan E, Jones P (2000) Regulation of urokinase receptor transcription by Ras- and Rho-family GTPases. *Biochem Biophys Res Commun* 270 : 892-898
 48. Okan E, Drewett V, Shaw PE, Jones P (2001) The small-GTPase RalA activates transcription of the urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) gene via an AP1-dependent mechanism. *Oncogene* 20 : 1816-1824
 49. Allgayer H, Wang H, Gallick GE, Crabtree A, Mazar A, Jones T, Kraker AJ, Boyd DD (1999) Transcriptional induction of the urokinase receptor gene by a constitutively active Src. Requirement of an upstream motif (-152/-135) bound with Sp1. *J Biol Chem* 274 : 18428-18437
 50. Wang Y, Dang J, Wang H, Allgayer H, Murrell GA, Boyd D (2000) Identification of a novel nuclear factor-kappaB sequence involved in expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Eur J Biochem* 267 : 3248-3254
 51. Wang H, Yang L, Jamaluddin MS, Boyd DD (2004) The Kruppel-like KLF4 transcription factor, a novel regulator of urokinase receptor expression, drives synthesis of this binding site in colonic crypt luminal surface epithelial cells. *J Biol Chem* 279 : 22674-22683
 52. Hapke S, Gawaz M, Dehne K, Kohler J, Marshall JF, Graeff H, Schmitt M, Reuning U, Lengyel E (2001) beta(3)A-integrin downregulates the urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) through a PEA3/ets transcriptional silencing element in the u-PAR promoter. *Mol Cell Biol* 21 : 2118-2132
 53. Leupold JH, Yang HS, Colburn NH, Asangani I, Post S, Allgayer H (2007) Tumor suppressor Pcd4 inhibits invasion/intravasation and regulates urokinase receptor (u-PAR) gene expression via Sp-transcription factors. *Oncogene* 26 : 4550-4562
 54. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D (1982) Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 257 : 2912-2919
 55. Collen D (1999) The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost* 82 : 259-270
 56. Beebe DP, Wood LL, Moos M (1990) Characterization of tissue plasminogen activator binding proteins isolated from endothelial cells and other cell types. *Thromb Res* 59 : 339-350
 57. Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S (1994) Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *J Neurochem* 63 : 2048-2057
 58. Hembrough TA, Li L, Gonias SL (1996) Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 271 : 25684-25691
 59. Hajjar KA, Krishnan S (1999) Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* 9 : 128-138
 60. Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R (2004) Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut* 53 : 993-1000

61. Ellis V, Whawell SA (1997) Vascular smooth muscle cells potentiate plasmin generation by both urokinase and tissue plasminogen activator-dependent mechanisms: evidence for a specific tissue-type plasminogen activator receptor on these cells. *Blood* 90 : 2312-2322
62. Werner F, Razzaq TM, Ellis V (1999) Tissue plasminogen activator binds to human vascular smooth muscle cells by a novel mechanism. Evidence for a reciprocal linkage between inhibition of catalytic activity and cellular binding. *J Biol Chem* 274 : 21555-21561
63. Razzaq TM, Bass R, Vines DJ, Werner F, Whawell SA, Ellis V (2003) Functional regulation of tissue plasminogen activator on the surface of vascular smooth muscle cells by the type-II transmembrane protein p63 (CKAP4). *J Biol Chem* 278 : 42679-42685
64. Salonen EM, Zitting A, Vaehri A (1984) Laminin interacts with plasminogen and its tissue-type activator. *FEBS Lett* 172 : 29-32
65. Salonen EM, Saksela O, Vartio T, Vaehri A, Nielsen LS, Zeuthen J (1985) Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem* 260 : 12302-12307
66. Roda O, Chiva C, Espuna G, Gabius HJ, Real FX, Navarro P, Andreu D (2006) A proteomic approach to the identification of new tPA receptors in pancreatic cancer cells. *Proteomics* 6 Suppl 1 : S36-41
67. Carmeliet P, Collen D (1998) Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* 91 : 255-285
68. Blasi F, Carmeliet P (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 : 932-943
69. Ragno P (2006) The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci* 63 : 1028-1037
70. Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH (2003) Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* 9 : 1313-1317
71. Ranganathan S, Liu CX, Migliorini MM, Von Arnim CA, Peltan ID, Mikhailenko I, Hyman BT, Strickland DK (2004) Serine and threonine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein by protein kinase Calpha regulates endocytosis and association with adaptor molecules. *J Biol Chem* 279 : 40536-40544
72. Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK (2005) Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost* 3 : 1884-1893
73. Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RG, Herz J (2002) Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem* 277 : 15507-15513
74. Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, Ulery PG, Mikhailenko I, Lawrence DA, Strickland DK (2002) Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem* 277 : 15499-15506
75. Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, Bu G (2000) Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 20 : 542-549
76. Zhang X, Polavarapu R, She H, Mao Z, Yepes M (2007) Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *Am J Pathol* 171 : 1281-1290
77. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y (2006) Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 281 : 2120-2127
78. Hu K, Wu C, Mars WM, Liu Y (2007) Tissue-type plasminogen activator promotes murine myofibroblast activation through LDL receptor-related protein 1-mediated integrin signaling. *J Clin Invest* 117 : 3821-3832
79. Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA (2003) Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 112 : 1533-1540
80. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 7 : 59-64
81. Norris EH, Strickland S (2007) Modulation of NR2B-regulated contextual fear in the hippocampus by the tissue plasminogen activator system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 13473-13478
82. Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V, Pietrzik CU (2008) The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tPA-mediated activation of NMDA receptors. *J Biol Chem*
83. Siao CJ, Tsirka SE (2002) Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci* 22 : 3352-3358
84. Ortiz-Zapater E, Peiro S, Roda O, Corominas JM, Aguilar S, Ampurdanes C, Real FX, Navarro P (2007) Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2

- activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *Am J Pathol* 170: 1573-1584
85. Pendurthi UR, Ngyuen M, Andrade-Gordon P, Petersen LC, Rao LV (2002) Plasmin induces Cyr61 gene expression in fibroblasts via protease-activated receptor-1 and p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1421-1426
86. Majumdar M, Tarui T, Shi B, Akakura N, Ruf W, Takada Y (2004) Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin alpha(9)beta(1). *J Biol Chem* 279: 37528-37534
87. Kawabata A, Kawao N (2005) Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PARs in the respiratory system: cellular signaling and physiological/pathological roles. *J Pharmacol Sci* 97: 20-24
88. Nagai T, Ito M, Nakamichi N, Mizoguchi H, Kamei H, Fukakusa A, Nabeshima T, Takuma K, Yamada K (2006) The rewards of nicotine: regulation by tissue plasminogen activator-plasmin system through protease activated receptor-1. *J Neurosci* 26: 12374-12383
89. Quinton TM, Kim S, Derian CK, Jin J, Kunapuli SP (2004) Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J Biol Chem* 279: 18434-18439
90. Meilhac O, Ho-Tin-Noe B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Angles-Cano E (2003) Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *Faseb J* 17: 1301-1303
91. Kawao N, Okada K, Kawata S, Okamoto C, Tsuritani M, Ueshima S, Matsuo O (2007) Plasmin decreases the BH3-only protein BimEL via the ERK1/2 signaling pathway in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1773: 718-727
92. Mitchell JW, Baik N, Castellino FJ, Miles LA (2006) Plasminogen inhibits TNFalpha-induced apoptosis in monocytes. *Blood* 107: 4383-4390
93. Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR (2007) Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* 5: 1732-1739
94. Okada K, Yuasa H, Hagiya Y, Takaishi T, Fukao H, Ueshima S, Matsuo O (1995) Fibrinolytic activity in liver tissues of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: S275-276
95. Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* 276: 60-66
96. Okada K, Ueshima S, Matsuo O (2008) Role of fibrinolysis in hepatic regeneration. In: Tanaka K, Davie EW (eds): *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008* Springer Japan, pp 336-347
97. 岡田清孝, 松尾 理 (2005) 線溶系因子ノックアウトマウスと細胞性線溶: 血液疾患-state of arts. Ver. 3. In: 坂田洋一, 小澤敬也 (eds): *別冊医学のあゆみ* 東京, 医歯薬出版, pp 343-348
98. Kanno Y, Hirade K, Ishisaki A, Nakajima K, Suga H, Into T, Matsushita K, Okada K, Matsuo O, Matsuno H (2006) 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
99. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A (1984) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1450-1459
100. Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM (1991) Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6: 501-504
101. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK (1993) Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 143: 949-958
102. Shimomura T, Miyazawa K, Komiyama Y, Hiraoka H, Naka D, Morimoto Y, Kitamura N (1995) Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* 229: 257-261
103. Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM (1995) Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* 270: 603-611
104. Matsuoka H, Sisson TH, Nishiuma T, Simon RH (2006) Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 705-713
105. Yanagita K, Nagaike M, Ishibashi H, Niho Y, Matsumoto K, Nakamura T (1992) Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 802-809
106. Mars WM, Liu ML, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK (1995) Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* 21: 1695-1701
107. Olle EW, Ren X, McClintock SD, Warner RL, Deogracias MP, Johnson KJ, Colletti LM (2006) Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 44: 540-549
108. Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Niwa M, Akita K, Yamada Y, Yoshimi N, Uematsu T, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Mori H (2001) Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor

- after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* 33: 569-576
109. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003) Making sense of latent TGF- β activation. *J cell sci* 116: 217-224
 110. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N (1998) Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β in vivo. *Cell* 93: 1159-1170
 111. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D (1999) The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328
 112. Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S (2001) Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- β . *Gastroenterology* 120: 1784-1800
 113. Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S (2002) Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF- α /kallikrein-mediated activation of latent TGF- β . *Gastroenterology* 123: 352-364
 114. 岡田清孝, 松尾 理 (2008) 線溶系因子と肝再生. *血栓止血雑誌* 19: 216-225
 115. Jenkins GR, Seiffert D, Parmer RJ, Miles LA (1997) Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6. *Blood* 89: 2394-2403
 116. Menoud PA, Sappino N, Boudal-Khoshbeen M, Vassalli JD, Sappino AP (1996) The kidney is a major site of α 2-antiplasmin production. *J Clin Invest* 97: 2478-2484
 117. Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW (1990) Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem* 265: 6104-6111
 118. Bannach FG, Gutierrez A, Fowler BJ, Bugge TH, Degen JL, Parmer RJ, Miles LA (2002) Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression. *J Biol Chem* 277: 38579-38588
 119. Okada K, Lijnen HR, Dewerchin M, Belayew A, Matsuo O, Collen D, Bernaerts R (1997) Characterization and targeting of the murine α 2-antiplasmin gene. *Thromb Haemost* 78: 1104-1110
 120. Lijnen HR, Okada K, Matsuo O, Collen D, Dewerchin M (1999) α 2-antiplasmin gene deficiency in mice is associated with enhanced fibrinolytic potential without overt bleeding. *Blood* 93: 2274-2281
 121. Imagawa S, Fujii S, Dong J, Furumoto T, Kaneko T, Zaman T, Satoh Y, Tsutsui H, Sobel BE (2006) Hepatocyte growth factor regulates E box-dependent plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression in HepG2 liver cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2407-2413
 122. Mueller L, Broering DC, Meyer J, Vashist Y, Goettsche J, Wilms C, Rogiers X (2002) The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J Hepatol* 37: 606-612
 123. Yazigi NA, Carrick TL, Bucuvalas JC, Schmidt CS, Balistreri WF, Bezerra JA (1997) Expansion of transplanted hepatocytes during liver regeneration. *Transplantation* 64: 816-820
 124. Okada K, Ueshima S, Imano M, Kataoka K, Matsuo O (2004) The regulation of liver regeneration by the plasmin/ α 2-antiplasmin system. *J Hepatol* 40: 110-116
 125. Okada K, Ueshima S, Akao M, Seki T, Ariga T, Tanaka M, Matsuo O (in press) Binding of plasminogen to hepatocytes isolated from injured liver, and NP cell-dependent proliferation of hepatocytes. *Blood Coagul Fibrin*
 126. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364: 806-809
 127. Tanaka M, Okada K, Ueshima S, Imano M, Ohyanagi H, Carmeliet P, Matsuo O (2001) Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in plasminogen deficient mice. *Fibrinolysis & Proteolysis* 15: 2-8
 128. Harrison SA, Diehl AM (2002) Fat and the liver--a molecular overview. *Semin Gastrointest Dis* 13: 3-16
 129. Bergheim I, Guo L, Davis MA, Lambert JC, Beier JL, Duveau I, Luyendyk JP, Roth RA, Arteel GE (2006) Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: Critical role of plasminogen activator inhibitor-1. *Gastroenterology* 130: 2099-2112
 130. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ (1999) Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 117: 669-677
 131. Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO (2007) Tissue-type plasminogen activator deficiency exacerbates cholestatic liver injury in mice. *Hepatology* 45: 1527-1537
 132. Wang H, Vohra BP, Zhang Y, Heuckeroth RO (2005) Transcriptional profiling after bile duct ligation identifies PAI-1 as a contributor to cholestatic injury in mice. *Hepatology* 42: 1099-1108
 133. Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361: 453-457
 134. Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, Vassalli JD (1993) Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest* 92: 679-685
 135. Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S

- (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377: 340-344
136. Shin CY, Kundel M, Wells DG (2004) Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *J Neurosci* 24: 9425-9433
137. Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, Scalettar BA (2006) Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J Neurobiol* 66: 564-577
138. Melchor JP, Strickland S (2005) Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost* 93: 655-660
139. Nagai N, Urano T (in press) Role of tPA on the neural system. In: Tanaka K, Davie EW, Ikeda Y, Iwanaga H, Saito K, Sueishi K (eds): *Recent Advances in Thrombosis and Haemostasis* Springer Japan
140. Park L, Gallo EF, Anrather J, Wang G, Norris EH, Paul J, Strickland S, Iadecola C (2008) Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1073-1078
141. Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S (2003) Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 6: 168-174
142. Yamanaka H, Obata K, Fukuoka T, Dai Y, Kobayashi K, Tokunaga A, Noguchi K (2005) Induction of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 132: 183-191
143. Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, Kuhn TB, Sonderegger P (1996) Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *Embo J* 15: 2944-2953
144. Moonen G, Grau-Wagemans MP, Selak I (1982) Plasminogen activator-plasmin system and neuronal migration. *Nature* 298: 753-755
145. Chen ZL, Strickland S (1997) Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91: 917-925
146. Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S (1997) An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 17: 543-552
147. Wu YP, Siao CJ, Lu W, Sung TC, Frohman MA, Milev P, Bugge TH, Degen JL, Levine JM, Margolis RU, Tsirka SE (2000) The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J Cell Biol* 148: 1295-1304
148. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306: 487-491
149. Sheehan JJ, Zhou C, Gravanis I, Rogove AD, Wu YP, Bogenhagen DF, Tsirka SE (2007) Proteolytic activation of monocyte chemoattractant protein-1 by plasmin underlies excitotoxic neurodegeneration in mice. *J Neurosci* 27: 1738-1745
150. Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer JP, Rossier J, Jarrige AC, Mackenzie ET, Colloc'h N, Ali C, Vivien D (2004) Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem* 279: 50850-50856
151. Matys T, Strickland S (2003) Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat Med* 9: 371-372; author reply 372-373
152. Liu D, Cheng T, Guo H, Fernandez JA, Griffin JH, Song X, Zlokovic BV (2004) Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med* 10: 1379-1383
153. Pawlak R, Melchor JP, Matys T, Skrzypiec AE, Strickland S (2005) Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 443-448
154. De Stefano ME, Leone L, Moriconi C, Del Signore A, Petrucci TC, Paggi P (2007) Involvement of the plasminogen enzymatic cascade in the reaction to axotomy of rat sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 36: 174-184
155. Ito M, Nagai T, Mizoguchi H, Fukakusa A, Nakaniishi Y, Kamei H, Nabeshima T, Takuma K, Yamada K (2007) Possible involvement of protease-activated receptor-1 in the regulation of morphine-induced dopamine release and hyperlocomotion by the tissue plasminogen activator-plasmin system. *J Neurochem* 101: 1392-1399
156. Nagai N, Vanlinthout I, Collen D (1999) Comparative effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, and staphylokinase on cerebral ischemic infarction and pulmonary clot lysis in hamster models. *Circulation* 100: 2541-2546
157. Nagai N, De Mol M, Lijnen HR, Carmeliet P, Collen D (1999) Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* 99: 2440-2444
158. Nagai N, De Mol M, Van Hoef B, Verstreken M, Collen D (2001) Depletion of circulating alpha(2)-anti-plasmin by intravenous plasmin or immunoneutralization reduces focal cerebral ischemic injury in the absence of arterial recanalization. *Blood* 97: 3086-

- 3092
159. Nagai N, Demarsin E, Van Hoef B, Wouters S, Cingolani D, Laroche Y, Collen D (2003) Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties. *J Thromb Haemost* 1: 307-313
160. (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333: 1581-1587
161. Nagai N, Zhao BQ, Suzuki Y, Ihara H, Urano T, Umemura K (2002) Tissue-type plasminogen activator has paradoxical roles in focal cerebral ischemic injury by thrombotic middle cerebral artery occlusion with mild or severe photochemical damage in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 648-651
162. Nagai N, Van Hoef B, Lijnen HR (2007) Plasminogen activator inhibitor-1 contributes to the deleterious effect of obesity on the outcome of thrombotic ischemic stroke in mice. *J Thromb Haemost* 5: 1726-1731
163. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998) Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29: 1020-1030
164. Sumii T, Lo EH (2002) Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33: 831-836
165. Zhao BQ, Ikeda Y, Ihara H, Urano T, Fan W, Mikawa S, Suzuki Y, Kondo K, Sato K, Nagai N, Umemura K (2004) Essential role of endogenous tissue plasminogen activator through matrix metalloproteinase 9 induction and expression on heparin-produced cerebral hemorrhage after cerebral ischemia in mice. *Blood* 103: 2610-2616
166. Nagai N, Okada K, Kawao N, Ishida C, Ueshima S, Collen D, Matsuo O (in press) Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) augments brain damage in a murine model of ischemic stroke. *Neurosci Lett* 432: 46-49
167. Yamanaka H, Obata K, Fukuoka T, Dai Y, Kobayashi K, Tokunaga A, Noguchi K (2004) Tissue plasminogen activator in primary afferents induces dorsal horn excitability and pain response after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 19: 93-102
168. Akassoglou K, Kombrinck KW, Degen JL, Strickland S (2000) Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *J Cell Biol* 149: 1157-1166
169. Siconolfi LB, Seeds NW (2001) Induction of the plasminogen activator system accompanies peripheral nerve regeneration after sciatic nerve crush. *J Neurosci* 21: 4336-4347
170. Jiang X, Wang Y, Hand AR, Gillies C, Cone RE, Kirk J, O'Rourke J (2002) Storage and release of tissue plasminogen activator by sympathetic axons in resistance vessel walls. *Microvasc Res* 64: 438-447
171. Peng T, Jiang X, Wang Y, Hand A, Gillies C, Cone RE, O'Rourke J (1999) Sympathectomy decreases and adrenergic stimulation increases the release of tissue plasminogen activator (t-PA) from blood vessels: functional evidence for a neurologic regulation of plasmin production within vessel walls and other tissue matrices. *J Neurosci Res* 57: 680-692
172. Bjorkman JA, Jern S, Jern C (2003) Cardiac sympathetic nerve stimulation triggers coronary t-PA release. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1091-1097
173. Schaefer U, Machida T, Vorlova S, Strickland S, Levi R (2006) The plasminogen activator system modulates sympathetic nerve function. *J Exp Med* 203: 2191-2200
174. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y (1996) Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* 2: 800-803
175. Maemura K, Layne MD, Watanabe M, Perrell MA, Nagai R, Lee ME (2001) Molecular mechanisms of morning onset of myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 947: 398-402
176. Minami Y, Horikawa K, Akiyama M, Shibata S (2002) Restricted feeding induces daily expression of clock genes and *Pai-1* mRNA in the heart of Clock mutant mice. *FEBS Lett* 526: 115-118
177. Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H (2005) Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc Res* 66: 276-285
178. Sugawara J, Hayashi K, Kurachi S, Tanaka T, Yokoi T, Kurachi K (2007) Age-related effects of regular physical activity on hemostatic factors in men. *J Thromb Thrombolysis*