◆ 総 説 ◆

bound thrombin と抗凝固剤

小 杉 忠 誠^{*1}, 砂 川 昌 範^{*1}

The Properties of Bound Thrombin and Anticoagulant

Tadayoshi KOSUGI^{*1} and Masanori SUNAGAWA^{*1}

Key words: bound thrombin from crushed clots, bound thrombin from clot-lysis lysate, argatroban, phenotype change of VSM

1. はじめに

血栓溶解療法の施行後にみられる向凝固 (procoagulant) 活性の増強,あるいは,凝固因子活性の増強は,生体のホメオスタシスに基づくネガティブフィードバックであると考えられていた。これは,生体内の凝固線溶系調節の生理学的概念に基づくものであり,このネガティブフィードバックを具体的に担う物質についての検討は,必ずしも充分に行われていなかった。しかしながら,経皮的冠動脈形成術 (PTCA),冠動脈内血栓溶解療法 (PTCR) 後の血管再狭窄の発現機序に関する研究が詳細に行われるようになると,血栓やフィブリンクロット中に活性を保持しているトロンビン (クロット形成後トロンビン) の存在が明らかにされてきた。本稿では,従来から知られている液相トロンビン (native thrombin) とクロット形成後トロンビン (intact thrombin および bound thrombin) の構造的差違や抗凝固剤による阻害反応の違いを述べ,さらにクロット形成後トロンビンの病態形成への関与について,文献を渉猟すると共に我々の研究結果を混じえ

て解説する。

2. クロット形成後トロンビンの構造的特徴

フィブリノーゲン A α 鎖の 8 番目の Phe を Tyr に置換すると,トロンビンによるフィブリノーゲン A α 鎖の Arg¹⁶ 部分での切断が強く抑制される。合成ペプチドフィブリノーゲン A α ペプチド 1-23 (F8Y) と牛トロンビンとの反応複合体の結晶構造解析により, A α 鎖の Phe⁸ の存在が近傍のアミノ酸とトロンビンとの水素結合の形成に必須であると報告されている¹⁾。トロンビンとフィブリノーゲン派生物との結合には,フィブリノーゲンを構成している特定のアミノ酸の存在が必須であるが,フィブリノーゲンの二次構造上の特徴もトロンビンとフィブリノーゲン派生物の結合に重要であるともされている。すなわち,フィブリノーゲン A α 鎖の 1-17 のアミノ酸解析から,フィブリノペプチド A (FPA) の Glu¹¹-Gly¹² の部分での回転がトロンビンとの結合において重要であることが指摘されている²⁾。トロンビンとフ

^{*1} 琉球大学医学部生理学第一講座 [〒 903-0215 沖縄県西原町字上原 207 番地]

1st Department of Physiology, School of Medicine, University of the Ryukyus. [207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan]

Tel : 098-895-1108 Fax : 098-895-1402 e-mail : tkosugi@med.u-ryukyu.ac.jp

Fig. 1 HPLC analysis of bound thrombin from clot-lysis lysate denatured with 4 M urea. Bound thrombin obtained by affinity chromatography was dissolved in 200 μ l of denaturing solution containing 4 M urea and 100 μ l of it was subjected to HPLC analysis (B). Rabbit fibrinogen degradates (A) and bovine thrombin (C) were also subjected to HPLC analysis. The eluates of two peaks (peaks RT 50-1 and RT 50-2) of bound thrombin were subjected to N-terminal sequence analysis. (文献4より)

ィブリン (またはフィブリノーゲン) 派生物の結合物の解析にあたっては、フィブリン形成過程がトロンビンとフィブリノーゲンの段階的反応であるのを考慮しなければならない。すなわち、フィブリンクロット形成の初期は、タイプIフィブリンとフィブリノーゲンの複合体であり、この段階ではタイプIIフィブリンの形成前に γ - γ クロスリンクが生じており、このときのタイプIIフィブリンは、B β 鎖が殆どインタクトのままであると報告されている³⁾。換言すれば、トロンビンとフィブリノーゲンの反応

Fig. 2 HPLC pattern of native thrombin and denatured bound thrombin from crushed clots. The purified bound thrombin from crushed clots (about 5 μ g) was dissolved in 200 μ l of 0.4% SDS, 10% acetonitrile, 0.1% TFA containing 8 M urea (A), 6 M urea (B), or 4 M urea (C), then injected to C4 reverse-phase HPLC. As a control, native bovine thrombin (D) and S-pyridylethylated rabbit fibrinogen (E) were analyzed. The eluates of each peak (peaks RT 28, RT 34, RT 45, and RT 50) of the bound thrombin and peak of native thrombin (RT 50).

(文献5より)

初期ではフィブリノーゲン A α 鎖と γ 鎖が作動し、B β 鎖が全く作動していない時期が存在し、その後に引き続いてB β 鎖の作動が開始すると推察される。家兎フィブリノーゲン、牛トロンビンを用いて作製したフィブリンクロットを、ウロキナーゼで溶解したクロット溶解物からの bound thrombin を 4 M 尿素で処理し、さらに C4 逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析したところ、 α -トロン

Table 1 N-terminal sequence analysis of the fibrin fragments and thrombin recovered from the bound thrombin in clot-lysis lysate

Samples	Peak	Amino acids										Reference sequence
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	
Bound thrombin from clot-lysis lysate	RT 50-1	G	P	R	V	V	D	K	P	x		rabbit fibrin
		G	H	R	P	I	D	x	K	x	x	α -chain GPRVVDKPPS-
		Y	V	A	T	R	E	N	x	x	x	β -chain GHRPIDRKRE-
	RT 50-2	T	F	G	A	G						γ -chain YVATRENxxx-
		I	V	E	G	x						bovine α -thrombin
												A-chain TFGAGEA-
Native thrombin		T	F	G	A	G						B-chain IVEGNDA-
		I	V	E	G	N						

x : not determined

* : Cycle of Edman degradation

(文献 4より)

Table 2 N-terminal sequence analysis of the fibrin fragments and thrombin recovered from the bound thrombin from crushed clots

Samples	Peak	Amino acids					Reference sequence
		1	2	3	4	5 *	
Bound thrombin	RT 28	Y	V	x	x	x	fibrinogen fragments
		G					
		H					
	RT 34	Y	V	A	x	x	Fragment 1 T-V-A-T-R-
		G	P	R			Fragment 2 G-P-R-V-V-
		H		E			Fragment 3 H-V-E-G-
	RT 45	Y	x	x	x	x	
		G					
Native thrombin	RT 50	T	F	G	G	x	bovine α -thrombin
		I	V	E			A-chain T-F-G-A-G-E-A-
	RT 50	T	F	G	A	G	B-chain I-V-E-G-N-D-A-
		I	V	E	G	N	

x : not determined

*: Cycle of Edman degradation

(文献 5より)

ビンとフィブリン断片が得られた。このフィブリン断片はアミノ酸解析から、 α 、 β 、 γ 鎖から構成されていた (Fig. 1, Table 1)⁴⁾。一方、フィブリンクロットから物理的剪断力により得られた bound thrombin では、 α -トロンビンとフィブリノーゲンの α 、 γ 鎖との結合であった (Fig. 2, Table 2)⁵⁾。フィブリノーゲン $A\alpha$ 鎖の 529-539 を抗原決定基とするモノクローナル抗体 (5A2) は、トランスグルタミナーゼによる $A\alpha$ 鎖のクロスリンクを阻害することが報告されている⁶⁾。この結果を考慮

すると、bound thrombin のフィブリノーゲン派生物部分にモノクローナル抗体 (5A2) が反応するならば、 $A\alpha$ 鎖のクロスリンクが未終了のクロットからの bound thrombin であると同定できる。

一方、線溶療法の効果の評価する手段として、循環血中のインタクトフィブリノーゲン量のフィブリノーゲン溶解による減少をモニターする方法がある。即ち、フィブリノーゲン $A\alpha$ 鎖 487-498 に対するモノクローナル抗体 (F-104) を用いた酵素結合免疫測定法 (ELISA)

である⁷⁾。プラスミンがフィブリノーゲン A α 鎖の Arg⁴⁹³-His⁴⁹⁴ 結合を切断すると、F-104 抗体の抗原認識部位 (A α 鎖 487-498) が破壊されるために、結合できなくなる。従って、bound thrombin のフィブリノーゲン派生物部分と F-104 抗体が反応しない場合には、線溶に由来する bound thrombin の可能性がある。また、血小板とフィブリノーゲン被覆ビーズの反応結果の解析から、フィブリノーゲンの γ 鎖の Ala-Gly-Asp-Val と A α 鎖の Arg-Gly-Asp-Ser 部分が、血小板とフィブリノーゲンの凝集に重要であるとの結果が得られている⁸⁾。この結果を参考にすると、血小板の活性化を惹起する bound thrombin は、 α -トロンビンとフィブリノーゲンの A α 、 γ 鎖由来の 2 つのペプチドの結合物であると推定される。一方、フィブリノーゲンの重合反応は、 γ 鎖のクロスリンクを介して行われるが、この重合反応はフラグメント D:E の相互反応を伴っている。この D:E の相互反応はフィブリン特異的抗原決定基の露呈を導き、線溶酵素に対する反応性を亢進させる結果となる⁹⁾。従って、bound thrombin のフィブリノーゲン派生物にフラグメント D:E の結合を検索し得た場合には、線溶に対する感受性が強いクロットに由来する bound thrombin であり、同時に線溶により生成された bound thrombin であると推定される。bound thrombin の構造に関する研究は、上に述べたように native thrombin とフィブリン (またはフィブリノーゲン) 派生物との結合物に関するものが多くみられる。しかしながら native thrombin が可溶性フィブリン分解産物 (FDP) と結合していることも知られており、特に (DD) E、E フラグメントと結合していることが報告されている¹⁰⁾。E フラグメントには、トロンビン結合部位の存在も示されている¹⁰⁾。また、家兎血漿由来の bound thrombin は、家兎血小板の活性化を惹起することも報告されている¹¹⁾。bound thrombin の構造的解析から、その由来するクロットや血

栓の形成過程を知ることとも可能となる。

3. bound thrombin の生成

心筋梗塞に対する線溶療法や冠動脈形成術の術後に、種々の止血機構関与物質の測定が行われ、その結果と予後との関係が検討されている¹²⁾。トロンビン-アンチトロンビン III 複合体 (TAT) の上昇例では予後が不良であることが示されている。心筋梗塞に対する線溶療法の成功の鍵は、TAT の出現減少とトロンビン生成の抑制にあることが示唆されている。冠動脈形成術後には、血栓再形成や静脈血栓の形成が生じるのが通例であるが、血栓形成抑止のためのヘパリン使用は無効であったとする報告もある。PTCA 後や PTCA 等の血栓溶解療法後の凝固亢進に対する治療法の開発には、従来の凝固亢進に対する観点とは全く異質な観点が必要となってきた。液相中のトロンビンとクロット共存下のトロンビンに対する各種抗凝固剤の抑制率の違いが検討され、後者に対してはヘパリンの低い抑制率が示された¹³⁾。さらには、急性心筋梗塞に対して、線溶剤とヘパリンの同時投与を行ってもトロンビン生成が増強し、そのトロンビンの活性が抑制されてもプロトロンビンフラグメントが増加するとの報告もある¹⁴⁾。一方、線溶療法剤であるストレプトキナーゼはプラスミノゲン非依存性の機序によりプロトロンビナーゼ複合体を直接的、あるいは間接的に活性化し、トロンビン生成を引き起こすことが報告されている¹⁵⁾。これらの報告は、線溶療法あるいは機械的な血管拡張術後にトロンビン生成、すなわち bound thrombin が生成することを示している。さらに、これらの bound thrombin の活性の抑制には、ヘパリンは強い有効性を示さないことが示唆されている。bound thrombin の生成は、血栓形成を中心とする血管病変への薬物療法、機械的処置に起因すると考えられる。

Fig. 3 Platelet aggregation rate (A) and concentration of cytosolic free Ca^{2+} (B) in washed platelets stimulated with native (●), intact (▲) or bound (○) thrombin. Results are expressed as mean $\pm$ S.E. of 3 experiments. (文献 19 より)

4. bound thrombin による止血機構 関与物質の活性化

蛇毒由来トロンビン様酵素を用いて作製したクロットを、トロンビンを用いて作製したクロットの対照として用いた実験結果では、bound thrombin は液相下トロンビンと同様に第 V 因子、第 VIII 因子、血小板の活性化を示した¹⁶⁾。bound thrombin の生成量やトロンビン生成の多寡は、トロンビンの生成経路の違いにより影響されることが示されている。すなわち、生理的にはトロンビン生成経路は 2 つに分けられる。その経路の違いにより、生成したフィブリンクロットの構造や線溶に対する抵抗性に差違が認められている。contact phase や活性化型第 XI 因子を介して生成されたトロンビンにより形成されたクロットは、線溶に対して強い抵抗性を示すことが知られている。haemostatic plug の治療抵抗性の強弱は、トロンビン生成に際してどの経路によりトロンビンが形成されたかに依拠している¹⁷⁾。ヒトのトロンビン及びフィブリノーゲンを用いて作製したクロットから得られた bound thrombin は、家兎洗浄血小板の凝集を惹起した¹⁸⁾。家兎フィブリノーゲン、牛トロンビンで作製したクロット形成

後トロンビン (intact thrombin と bound thrombin) は、家兎洗浄血小板に対して、native thrombin と同様に凝集を惹起することが示されている (Fig. 3)¹⁹⁾。

5. bound thrombin の内皮細胞、 血管平滑筋細胞への反応

native thrombin は多くの細胞反応を惹起する²⁰⁾。native thrombin は特に内皮細胞の組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター (PAI-I) の産生を増強する²¹⁾。さらに、native thrombin は内皮細胞内のマトリックスメタロプロテアーゼを活性化し、基底膜の分離を引き起こすことが知られている²²⁾。クロットの物理的剪断力により得られた bound thrombin は、ラット大動脈内皮細胞からプラスミノゲンアクチベータ (PA) 放出を引き起こすことが観察されている。さらに、放出された PA の同定をフィブリンオートグラフィーを用いて行った結果から、t-PA であることが確認された²³⁾。bound thrombin は、native thrombin と同様に内皮細胞から t-PA の放出を示す。PTCA 後、PTCR 後にみられる血管再狭

Fig. 4 Effect of bound thrombin from crushed clots on the expression of SMemb mRNA in cultured rabbit aortic VSM cells. Cultured VSM cells were stimulated for 48 hr by native thrombin (Thr) and bound thrombin from crushed clots (BThr) in the presence (hatched bars) or absence (open bars) of argatroban. Rabbit fibrinogen (Fbg) was used as a control. Relative mRNA expressions of SMemb was normalized by the value of control (rabbit fibrinogen, Fbg) in the absence of argatroban. Data represents means $\pm$ S.E. from 3 to 5 separated experiments (each done in triplicate).

窄には、血栓が内膜肥厚による血管腔狭小化発現に寄与していると考えられる^{24)~26)}。トロンビンを含む凝固因子や組織因子がインターベンション治療後の血管再狭窄発現に関与している^{27)~28)}。一方、血管再狭窄には血管平滑筋細胞の増殖、遊走の亢進が関与している。このような状態下では、血管平滑筋細胞のフェノタイプの変換が生じていると考えられている。家兎胸部大動脈の培養平滑筋細胞を用いて、血管平滑筋細胞のフェノタイプの変換をミオシン重鎖アイソフォームの SM 1, SM 2, SMemb の mRNA 発現量の変化として検索してみると、bound thrombin の刺激は、フィブリノーゲン、トロンビン刺激に比べて SMemb の mRNA 量の増加を示した (**Fig. 4**) (submitted)。bound thrombin は、血管平滑筋細胞の形質変換を引き起こし、増殖型へと変換していることが予想された。

Fig. 5 Comparison of the inhibitory effect heparin against fluid-phase (open bars) and bound thrombin activity (solid bars). Each bar represents the mean of three separate experiments (each done in duplicate), while the lines above the bars represent the SD. (文献 13 より)

6. アルガトロバンによる bound thrombin の活性抑制

クロット形成後トロンビンは、試験管内実験から native, intact, bound thrombin の 3 種に分けることができる¹⁹⁾。液相中のトロンビンとクロット共存下のトロンビンに対する各種抗凝固剤の抑制効果の違いが検討されている。後者に対してはヘパリン/AT-III の効果は弱く、低分子の直接的トロンビン阻害剤の方が有効であったと報告されている (**Fig. 5**)¹³⁾。bound thrombin がヘパリン/AT-III による阻害を受けにくい機序として以下の点が考察されている。トロンビンがフィブリンに結合し、トロンビン構造のヘパリン結合部位が占有されるか、あるいは構造変化を呈したために、ヘパリンの作用が出現しない。しかしながら、低分子の直接的トロンビン阻害剤のトロンビンとの結合部位は、フィブリンの結合によっても影響されない部位であると考えられた。bound thrombin に対するヘパリン-セリンプロテアーゼインヒビター (serpin) 複合体の活性抑制のみられない機序を分子レベルで解明した報告もある。すなわち、AT-III の共存下で活性発現のみられ

Fig. 6 Effects of argatroban on platelet aggregation (A) and cytosolic Ca^{2+} concentration (B) induced by native (●), intact (▲) or bound (○) thrombin. Results are expressed as mean $\pm$ S.E. of 3 experiments. (文献 19 より)

るヘパリンは、bound thrombin の活性中心に接近することはできないが、ヘパリンコファクター II と相互反応を示すヘパリノイドやヘパリンアナログは、bound thrombin の活性抑制が可能となる²⁹⁾。また、低分子量化合物のアルガトロバンは、bound thrombin の活性を阻害する³⁰⁾。家兎洗浄血小板の活性化を示す bound thrombin は、アルガトロバンによりその活性が抑制される (Fig. 6)¹⁹⁾。

また、我々は、クロットの物理的剪断力により得られた bound thrombin を用いて、 α -トロンビンに拮抗的阻害を示すアルガトロバンに対する、bound thrombin の反応性について検討した。bound thrombin の対照として、コラーゲン-トロンビンを用いて検討した。Km 値、Vmax 値の計算からは、bound thrombin の S-2238 に対する親和性は、コラーゲン-トロンビンより強かった。さらには、bound thrombin の S-2238 に対する反応速度はコラーゲン-トロンビンよりも増強していた。アルガトロバンは、コラーゲン-トロンビンを拮抗的に阻害するが、bound thrombin に対しては非拮抗的阻害を示した³¹⁾。過去の報告では、

bound thrombin はヘパリン/AT-III の抑制を受けないか、又は抵抗することが知られている¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾²⁹⁾³²⁾。合成トロンビンインヒビターのアルガトロバンは、直接的抗トロンビン剤であり、トロンビンの疎水性ポケットへの結合によりトロンビン活性を抑制することが知られている³³⁾³⁴⁾。bound thrombin により惹起される血小板の活性化を、アルガトロバンが抑制する¹⁸⁾¹⁹⁾。bound thrombin に対するアルガトロバンの反応様式から、bound thrombin の構造は、触媒部位と疎水性ポケットの接近が生じていると推察される。

7. アルガトロバンの血管平滑筋に対する直接的作用

アルガトロバンは、選択的トロンビン抑制物質であるが、家兎血管平滑筋の形質変換に対して直接的作用が認められるか否かを我々が検討した。ミオシン重鎖アイソフォーム (SM1, SM2, SMem) の mRNA 発現量を、*in situ* hybridization, 逆転写 PCR (RT-PCR) を用いて測定し、さらには形質マーカーとして

Fig. 7 (A) RT-PCR quantitation of relative myosin heavy chain (MHC) isoform mRNA expressions after 3 h (open bars) and 24 h (gray bars) treatment by argatroban (0, 10 and 50 μg/ml, n=5). PCR cycles for SM1, SM2, and SMemb were 28, 30, and 26. Intensity of the specific bands were valued by NIH image and normalized by the value of PBS (3 h or 24 h). Transformation index (bottom panel) of 3 h (hatched bars) and 24 h (hatched gray bars)-treated with argatroban were calculated by dividing relative SMemb mRNA by the sum of relative SM1 and SM2 mRNA expression. Data are represented as means ± S.E. * is significantly different from 3 h-stimulation by 0 μg/ml of argatroban. *P<0.05, by one-way ANOVA. (B) RT-PCR quantitation of relative plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, β-actin, and glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expressions after 3 h (open bars) and 24 h (gray bars) treatment with argatroban (0, 10, and 50 μg/ml, n=5). PCR cycles for PAI-1, β-actin, and GAPDH were 28, 17, and 24, respectively. Intensity of the specific bands were valued by NIH image and normalized by the value of PBS (3 h or 24 h). Data are represented as means ± S.E. *, ** are significantly different from 24 h- and 3 h-stimulation by 0 μg/ml of argatroban, respectively. *P<0.05, **P<0.01, by one-way ANOVA. (文献 35 より)

PAI-1, β アクチン mRNA 発現量を測定した。アルガトロバンと培養平滑筋細胞との 3 時間反応では, SM1/SM2 mRNA 発現量には有意差を認めなかったが, SMemb mRNA 発現

量, SMemb 蛋白量の有意な上昇を認めた。また, PAI-1, β アクチン mRNA 量は 3, 24 時間曝露では, 有意に上昇した。これらの結果から, アルガトロバンは直接的に血管平滑筋の形

質変換を惹起することが認められた (Fig. 7)³⁵⁾。

8. おわりに

bound thrombin は、線溶療法、機械的血管拡張術後に生成される。このトロンビンの生物学的反応、特に血液成分や血管壁構成細胞に対する反応は、液相下トロンビン (native thrombin) のそれと同じであるのか、異なるものであるのか、未だ十分に明らかにされていない。しかしながら、ヘパリンでは bound thrombin に対する抑制効果がみられないのは既に知られている。トロンビンを選択的に抑制する低分子量のアルガトロバンは、bound thrombin の活性を抑制する。しかしながら、抑制反応様式は native thrombin に対するものとは異なっている。bound thrombin の構造解析は未だ不十分であるが、多様な構造の bound thrombin の存在が予想される。bound thrombin の生物学的活性抑制、構造解析にも選択的トロンビン抑制物質であるアルガトロバンは、強力な武器となる。

文 献

- Malkowski MG, Martin PD, Lord ST, Edwards BFP: Crystal structure of fibrinogen-A α peptide 1-23 (F8Y) bound to bovine thrombin explains why the mutation of Phe-8 to tyrosine strongly inhibits normal cleavage at Arg-16. *Biochem J* **326**: 815-822, 1997.
- Nakanishi H, Chrusciel TA, Shen R, Bertenshaw S, Johnson ME, Rydel TJ, Tulinsky A, Kahn M: Peptide mimetics of the thrombin-bound structure of fibrinopeptide A. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1705-1709, 1992.
- Brummel KE, Butenas S, Mann KG: An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. *J Biol Chem* **274**: 22862-22870, 1999.
- Kinjoh K, Nakamura M, Zeng G, Sunagawa M, Kosugi T: The structural characteristics of bound thrombin from clot-lysis lysate. *Hematologia* (in press).
- Kinjoh K, Nakamura M, Zeng G, Sunagawa M, Eguchi Y, Kosugi T: Bound thrombin from crushed clots was composed of α -thrombin and the N-terminal regions of α and γ chains of fibrinogen. *Pathophysiol Haemost Thromb* (in press).
- Mitkevich OV, Sobel JH, Shainoff JR, Vlasik TN, Kalantarov GF, Trakht IN, Streltsova ZA, Samokhin GP: Monoclonal antibody directed to a fibrinogen A α #529-539 epitope inhibits α -chain crosslinking by transglutaminases. *Blood Coag Fibrinolysis* **7**: 85-92, 1996.
- Sobel JH, Trakht I, Pileggi N, Wu HQ: Antipeptide monoclonal antibodies to defined fibrinogen A α chain regions: Anti A α 487-498, a structural probe for fibrinogenolysis. *Blood* **91**: 1590-1598, 1998.
- Liu Q, Rooney MM, Kasirer-Friede A, Brown E, Lord ST, Frojmovic MM: Role of the γ chain Ala-Gly-Asp-Val and A α chain Arg-Gly-Asp-Ser sites of fibrinogen in coaggregation of platelets and fibrinogen-coated beads. *Biochim Biophys Acta* **1385**: 33-42, 1998.
- Mosesson MW, Siebenlist KR, Voskuilen M, Nieuwenhuizen W: Evaluation of the factors contributing to fibrin-dependent plasminogen activation. *Thromb Haemost* **79**: 796-801, 1998.
- Weitz JI, Leslie B, Hodoba M: Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin-independent inhibitors. *Circulation* **97**: 544-552, 1998.
- Gandossi E, Lunven C, Gauffeny C, Roome NO, Berry CN: Platelet aggregation induced in vitro by rabbit plasma clot-associated thrombin, and its inhibition by thrombin inhibitors. *Thromb Haemost* **80**: 840-844, 1998.
- Gulba DC, Barthels M, Westhoff-Bleck M, Jost S, Rafflenbeul W, Daniel WG, Hecker H, Lichtlen PR: Increased thrombin levels during thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. Relevance for the success of therapy. *Circulation* **83**: 937-944, 1991.
- Weitz JI, Hudoba M, Massel D, Maraganore J, Hirsh J: Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest* **86**: 385-391, 1990.
- Merlini PA, Bauer KA, Oltrona L, Ardissino D, Spinola A, Cattaneo M, Broccolino M, Mannucci PM, Rosenberg RD: Thrombin generation and activity during thrombolysis and concomitant heparin therapy in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **25**: 203-209, 1995.
- Brommer EJ, Meijer P: Thrombin generation induced by the intrinsic or extrinsic coagulation pathway is accelerated by streptokinase, independently of plasminogen. *Thromb Haemost* **70**: 995-997, 1993.
- Kumar R, Béguin S, Hemker HC: The influence of fibrinogen and fibrin on thrombin generation-evidence for feedback activation of the clotting system by clot bound thrombin. *Thromb Haemost* **72**: 713-721, 1994.
- Torbet J: The thrombin activation pathway modulates the assembly, structure and lysis of human plasma clots in vitro. *Thromb Haemost* **73**: 785-792, 1995.
- Lunven C, Gauffeny C, Lecoffre C, O'Brien DP, Roome NO, Berry CN: Inhibition by argatroban, a specific thrombin inhibitor, of platelet activation by fibrin clot-associated thrombin. *Thromb Haemost* **75**: 154-160, 1996.
- Zeng G, Kinjoh K, Nakamura M, Kosugi T: The

- activity of postclotting thrombins on platelet activation was identical to that of native thrombin. *J Jpn Coll Angiol* **42**: 25-31, 2002.
- 20) Goldsack NR, Chambers RC, Dabbagh K, Laurent GJ: Thrombin. *Int J Biochem Cell Biol* **30**: 641-646, 1998.
 - 21) Nelken NA, Sorfer SJ, O'keefe J, Vu TKH, Charo IF, Coughlin SR: Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest* **90**: 1614-1621, 1992.
 - 22) Yoshida E, Verrusio EN, Mihara H, Oh DY, Kwaan HC: Thrombin stimulates expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in DU-145 prostate cancer cells. *Fibrinolysis Proteolysis* **11**: 147-154, 1997.
 - 23) Nakamura M, Nakasone T, Takisawa H, Sunagawa M, Kosugi T: Bound-thrombin releases plasminogen activator from rat aortic endothelial cells. *Acta Physiologica Hungarica* **89**: 44, 2002.
 - 24) Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GR, Herman AG: Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 634-645, 1997.
 - 25) Bauters C, Meurice T, Hamon M, McFadden E, Lablanche J-M, Bertrand ME: Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice. *Cardiovasc Res* **31**: 835-836, 1996.
 - 26) Schwartz RS: Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia and/or remodeling. *Am J Cardiol* **81**: 14E-17E, 1998.
 - 27) Arno HM, Levi M, Peters RJG: Tissue factor and coronary restenosis. *Cardiovasc Res* **53**: 313-325, 2002.
 - 28) Ip JH, Fuster V, Israel D, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH: The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* **17**: 77B-88B, 1991.
 - 29) Becker DL, Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI: Molecular basis for the resistance of fibrin-bound thrombin to inactivation by heparin/serpin complexes. *Adv Exp Med Biol* **425**: 55-66, 1997.
 - 30) Klauser RJ, Raake W, Meinetsberger E, Breiter N: Differential inhibition of clot-associated thrombin by various anticoagulants. *Ann Haematol* **70**(suppl.): A55, 1995.
 - 31) Nakamura M, Kinjoh K, Hanashiro K, Tokeshi Y, Sunagawa M, Kosugi T: The bound-thrombin was uncompetitively inhibited by argatroban. *Brit J Haematol* **102**: 138-139, 1998.
 - 32) Hogg PJ, Jackson CM: Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3619-3623, 1989.
 - 33) Okamoto S, Hijikata A, Kikumoto R, Tonomura S, Hara H, Ninomiya K, Maruyama A, Sugano M, Tamao Y: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805: the importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion. *Biochem Biophys Res Commun* **101**: 440-446, 1981.
 - 34) Okamoto S, Hijikata-Okunomiya A, Wanaka K, Okada Y, Okamoto U: Enzyme-controlling medicines: introduction. *Semin Thromb Hemost* **23**: 493-501, 1997.
 - 35) Yoshinaga M, Sunagawa M, Shimada S, Nakamura M, Murayama S, Kosugi T: Argatroban, specific thrombin inhibitor, induced phenotype change of cultured rabbit vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **461**: 9-17, 2003.