◆ 総 説 ◆

免疫と Thrombin-activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI)

朝井 鈴佳, 佐藤 知雄, 岡田 秀親, 岡田 則子

朝井 鈴佳

The role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in the immune system

Suzuka ASAI, Tomoo SATO, Hidechika OKADA, Noriko OKADA

2000年 岐阜大学農学部獣医学科卒業
2001-2005年 名古屋市立大学大学院 医学研究科 生体防御学(博士課程)
2005年 4月より同教室研究員

Key words: TAFI (proCPR), carboxypeptidase R (CPR), carboxypeptidase N (CPN), complement, anaphylatoxin, TAFI (proCPR) deficient mice

はじめに

凝固線溶反応には多くの因子が関与しており、そのバランスが崩れることにより生体への出血傾向や DIC 等の病態が引き起される。凝固反応でフィブリンが形成されると、そのフィブリン塊を溶解する線溶反応が動き出す (図 1)。線溶反応に対しても抑制する機構が存在し、その因子のひとつに Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) がある。プラスミノーゲンはフィブリンの C 末端の Lys に結合することにより t-PA 等でプラスミンに活性化される。TAFI はトロンビンにより活性化され TAFIa となりフィブリンの C 末端の Lys を切断するので、プラスミンの生成を阻害して効率的な線溶を抑制すると考えられる。そのため、血液中の TAFI を過剰に持つことは血栓症のリスクが高くなると考えられ、血栓塞栓症¹⁾、狭心症や冠動脈疾患^{2) 3) 4)}、脳梗塞^{5) 6)} のリスクファクターであることが報告されている。凝固線溶系における TAFI の発見は、1995 年

Nesheim ら⁷⁾による。しかしながら同一のタンパク質が、1989 年には Okada らによって C 末端 Arg を切断する酵素 Carboxypeptidase R (CPR) として⁸⁾、同年 Hendriks らによって 37°C で急速に失活する熱不安定な酵素 CPU として⁹⁾、1991 年には Eaton らにより腭液中 CPB とは異なる血漿中の酵素 P-CPB として¹⁰⁾ 報告されている。

局所での凝固が引き起こされるような病態では局所での炎症が起こる。DIC のように生体内の各所での凝固が起こる場合には、全身性の炎症が亢進しそれによって多臓器不全に陥るケースが稀ではない。線溶阻害 (凝固亢進) に働く TAFI は、このような病態においては悪役にされがちである。しかしながら TAFI には過剰な炎症を抑制するという側面もある。本章では TAFI 遺伝子欠損マウスより得られた知見を紹介しながら、TAFI と炎症との関係を説明したい。

名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御学分野 [〒 467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1]

Department of Biodefense, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University [1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan]

Tel: 052-853-8194 Fax: 052-842-3460 e-mail: suzuka@med.nagoya-cu.ac.jp

図1 凝固線溶系における TAFI の役割

組織障害や異物の侵入があると、血液凝固系が活性化されフィブリンが形成される。これに対し線溶系が活性化され、プラスミンがフィブリンを分解する。プラスミンの形成はフィブリンのC末端リジンにプラスミノゲンのリジン結合部位 (LBS) が結合することにより促進される。凝固系の活性化過程で産生されたトロンビンはトロンボモジュリン (TM) に結合すると、プロテインCを活性化させてAPCにするが、一方でTAFIを活性化させてTAFIaにする働きがある。TAFIaはフィブリンのC末端リジンを切断するため、プラスミノゲンとフィブリンの結合が断たれ、その結果プラスミンの生成が抑制されて線溶が著しく阻害される。

補体による異物の排除機構

生体への微生物感染などが生じた場合、微生物を自分以外の異物と認識してそれを排除するための生体防御反応が始動する。補体反応もその役割を担っているが、その反応系には産生された抗体との免疫複合体の形成が必要な古典的経路の他、レクチン経路と第二経路の3種類の活性化経路が存在する (図2)。レクチン経路はMBP (Mannose binding protein) やフィコリンが微生物表面の糖鎖と結合する事によって開始される。第二経路はこのような認識物質の存在なしで、補体成分であるC3の分子内にあるチオエステル結合が水分子による開裂を受ける事により活性化される。したがって、第二経路はわずかながらではあるが常に活性化されていると考えられる。これらすべての経路の過程において補体成分のC3をC3aとC3bに分解するC3転換酵素が形成される。種特異的補体制御膜因子の存在しない異物表面上では、膜上に結

合したC3bが第二経路のB因子とD因子の作用を受けて第二経路のC3転換酵素であるC3bBbを形成し、ポジティブフィードバックによって反応が拡大する。またC3転換酵素であるC4b2aやC3bBbにC3bが追加されると、C5転換酵素活性を持ちC5bが形成される。そしてC5bを起点にしてC6, C7, C8及びC9といった補体成分が順次反応して最終的には非自己の膜の表面に、膜傷害複合体 (MAC: membrane attack complex) を形成して細胞融解 (殺菌) を誘導する。しかし、この反応は種特異的補体制御膜因子の存在する自己の細胞上では抑制されるので、侵入異物にのみ補体反応が起こる。

アナフィラトキシン

補体の活性化過程ではC3bやC5bが生成される際、アナフィラトキシンと呼ばれるC3aやC5aが放出される。これらは炎症局所にお

図2 補体活性化とアナフィラトキシン産生過程

補体の活性化経路には古典的経路, レクチン経路と第二経路がある. いずれの場合にも C3 が活性化され産生された C3b によってさらに C5 が活性化され C5b が産生される. 自己の細胞膜上には種特異的補体制御因子が存在するため補体反応が起こらないが, 異物表面には C5b が結合し補体反応が続く. その結果膜侵襲複合体 (MAC) が形成され膜破壊が生じて異物が除去される. 補体の活性化過程では C3a や C5a が放出される. これらはアナフィラトキシンと呼ばれ, アナフィラキシーショックを引き起こすだけでなく, 炎症性サイトカインの産生を亢進する.

図3 異物の侵入による傷害と TAFI との関係

微生物など異物が体内へ侵入すると, 補体の活性化が起こりそれによってヒスタミンや好中球の放出が起こる. また IL-1, IL-6, IL-8 や TNF- α といった炎症性サイトカイン類や活性酸素の産生が起こる. 組織障害によって生じたブラジキニンはアラキドン酸カスケードを活性化させるため, プロスタグランジンやロイコトリエン類が産生される. これらは体に及ぼす影響を増強しあう作用を持ち, 痛みの増強, 微小血管の拡張, 血管透過性の亢進, 白血球の遊走と浸潤, 微小血栓形成を各所で誘導し, 結果として組織破壊が引き起こされる. 炎症反応の過程で活性化された TAFIa は, ブラジキニンやアナフィラトキシンの不活性化を担い, 各臓器における炎症の抑制に貢献していると考えられる.

いて, 好中球や血小板等炎症性細胞の集積を誘導し, 細胞接着性を増強する. また肥満細胞や好塩基球からのヒスタミン等の放出によってアラキドン酸カスケードの活性化も誘導され, その結果 PGI₂ や PGE₂ の放出も生じる. その他好中球からのエラスターゼ放出や, IL-1,

IL-6, IL-8 といった炎症性サイトカインやブラジキニン等のケミカルメディエータの産生亢進にも貢献している. したがって微生物の侵入等により補体が活性化され C3a や C5a が全身性に過剰に産生された場合には, 血管透過性の異常な亢進と気管支等の平滑筋の収縮が生じ,

図4 LPS投与後の肝臓におけるTAFIとCPNのtotal RNA発現の比較

LPSを0.5mg/kg腹腔内投与した後、時間を追って肝臓のtotal RNAを抽出し、TAFIとCPNの発現量をノーザンブロットにより比較した。コントロールとしてLPSの代わりに生理的食塩水を投与し12時間後に肝臓のtotal RNAを抽出した。その結果TAFIの発現量はLPS投与12時間をピークにして増強されたが、CPNについては発現量に変化が確認できなかった（文献15より引用、一部改変）。

呼吸困難やアナフィラキシーショックといった症状を呈す。C3aとC5aはC3転換酵素やC5転換酵素の働きによってC3あるいはC5の α 鎖アミノ酸末端から遊離する分子で、C末端部はそれぞれ-Leu-Ala-Arg, -Leu-Gly-Argとなっている¹¹⁾。そして、C末端のArgが切断されC3a-des-Arg及びC5a-des-Argの構造になることによって不活性化される。TAFIaはC末端のArgやLysを切断する作用があるので、これらアナフィラトキシンの不活性化に重要な役割を果たし、過度な炎症反応を抑制していると考えられる（図3）。

TAFIの構造

TAFIは肝臓で423個のアミノ酸からなる前駆体として生合成されるが、N末端の22個のアミノ酸はシグナルペプチドであり細胞内で除かれる¹⁰⁾。血漿中のTAFIは55kDaの糖タンパク質で、4-15 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で存在する。TAFIはトロンビン、プラスミンあるいはトリプシンなどによって、N末端側の92個のアミノ酸が切断され活性化型であるTAFIaとなる。TAFIaの37°Cでの安定性は低く、半減期は7-8分と非常に短い。またトロンビンやトリプシン、プ

図5 LPS投与後のTAFI及びCPNの活性値の比較

LPS投与後のマウス血清及び血漿のCP活性値を0, 1, 6, 12, 24, 36及び48時間後に測定した。LPS 0.5mg/kg ($\diamond$)及び4mg/kg ($\triangle$)投与後の血清、LPS 0.5mg/kg ($\square$)及び4mg/kg ($\circ$)投与後の血漿を用いてCP活性値を調べた。血清のCP活性値はTAFIaとCPNのCP活性を加算した値を、血漿のCP活性値はCPNのみのCP活性値を示す。TAFIaの活性値はLPS投与後わずかに上昇した後減少し、再び上昇して24時間をピークとしている。血中のTAFIがLPS投与直後にTAFIaとなって消費され、その後大量に産生されて血中へ分泌されたことを示唆している。一方CPNの活性値はLPS投与によっても変化が確認できなかった（文献15より引用、一改変）。

ラスミンによっても切断されて不活性化型となる^{12) 13)}。

TAFIa が炎症反応を抑える事を示唆する報告

血漿中には TAFI の他にも CP 活性を持つカルボキシペプチダーゼ N (CPN) が存在し, C3a や C5a の C 末端 Arg を切断する¹⁴⁾. しかしながら CPN は CPR と異なり, 37°C で安定であり活性化型として血漿中に存在する. TAFIa は馬尿酸-Arg 及び馬尿酸-Lys の切断についてどちらにも作用はするが, CPR と呼ばれる通り Arg に対する切断効率の方が高い⁸⁾. 我々はマウスへ LPS を腹腔内投与し, その後の TAFI の total RNA 発現レベルと血中における CP 活性値を測定した¹⁵⁾. 図 4 に示すように LPS を 0.5mg/kg 腹腔内投与後の肝臓での TAFI の total RNA レベルは 12 時間後をピークとして発現の増強が確認できた. また血中活性値は 24 時間後をピークとして上昇した (図 5). その一方で CPN に関しては total RNA の上昇も血中での活性値も変化が見られなかった. また最近, 好中球エラスターゼによっても TAFI が活性化されることが明らかにされた¹⁶⁾. これらの報告から, TAFI が炎症の急性期に非常に重要な役割を果たしている事が示唆された.

全身性の炎症における TAFI の重要性

TAFI が炎症反応の急性期において重要な役割を果たしている事が示唆されたため, 我々は TAFI 遺伝子欠損マウスを作製し *in vivo* でこれを証明することを試みた. これまでのところ我々を含め 3 つのグループから TAFI 遺伝子欠損マウスが報告されている. Nagashima らは TAFI 遺伝子欠損マウスを用い, 凝固線溶系における TAFI の重要性を中心として実験を行ったが, 野生型との差は有意ではなかった¹⁷⁾. しかしその後, 同じマウスを用いて Myles らが行った実験では, 次のような差が得られた¹⁸⁾. ブラジキニンを生体型マウスの静脈内へ投与した場合, 血圧の降下が観察された. さらに変異型トロンビン (E229K) をブラジキニンと共に

投与すると, 血圧の降下がブラジキニン単独投与と比較し有意に抑制された. E229K は凝固作用を持たず, トロンボモジュリンと結合した場合には Protein C と TAFI を活性化するが, 特に TAFI に対する作用が強いと示唆されている変異型トロンビンである¹⁹⁾. 一方 TAFI 遺伝子欠損マウスの場合には, E229K をブラジキニンと同時に投与してもその効果が見られず, 血圧はブラジキニン単独投与と同様に降下した. このことから, 野生型マウスではトロンビンによって活性化された TAFIa がブラジキニンの C 末端 Arg を切断し, ブラジキニンによる血圧降下を抑制したと示唆された. 次に我々が作成した TAFI 遺伝子欠損マウスから得られた結果²⁰⁾に基づいて, TAFI の炎症抑制作用を説明しよう. まず我々は急性炎症モデルとして, LPS を 15mg/kg 腹腔内へ投与した (表 1). また慢性炎症モデルとして LPS を 3mg/kg 腹腔内へ複数回投与した (図 6). どちらの場合にも致死率には野生型との間での有意な差が得られなかった. LPS 単独投与の実験は, 先に述べた Nagashima らも行っているが致死率にはやはり有意差は見られなかった¹⁷⁾. 次に我々はコブラ毒因子 (CVF) の投与を考えた. CVF は補体の第二経路を無制限に活性化するため補体系が潤渇する程の反応が起こる. その結果血中での C3a や C5a の濃度が上昇するが²¹⁾, 動物が死亡することはない. その理由として TAFI が存在するために, 産生された C3a や C5a が急速に不活性化されるためと解釈されていた. そこで TAFI 遺伝子欠損マウスへの CVF の投与を試みた. しかし TAFI 遺伝子欠損マウスにおいても死亡するマウスは出現しなかった. この結果については, 血液中に存在する CPN が C3a や C5a を不活性化しているためと考えられる. LPS は IL-1 や TNF- α 等の炎症性サイトカインの産生を誘導し, 炎症反応の過剰な亢進を引き起こす事は周知の通りであるが, 一方マウスやラットの静脈内へ投与した場合には, 血管内皮細胞上の C5a レセプター発現の増強作

表1 LPS (15mg/kg) を腹腔内投与したときの生存率

Genotype	Survival (n)	Total (n)	Rate (%)
+/+	6	9	67
+/-	7	10	70
-/-	7	9	78

+/+:野生型マウス, +/-:ヘテロ接合体マウス, -/-:TAFI 遺伝子欠損マウス

表2 LPS (5mg/kg) 投与後に CVF (30U/mouse) 投与したときの生存率

	Genotype	Survival	Total	Rate (%)
LPS (5mg/kg) i.v.	+/+	5	5	100
	-/-	6	6	100
CVF (100U) i.p.	+/+	3	3	100
	+/-	2	2	100
	-/-	5	5	100
LPS (5mg/kg) i.v. ^a +	+/+	7	7	100
CVF (30U) i.p.	+/-	7 ^b	7	100
	-/-	4 ^c	10	40

^a LPS 投与から CVF 投与までの時間: 6 時間

^b ヘテロ接合体の場合 1 匹が 3 日目に死亡した

^c TAFI 遺伝子欠損マウスの場合 6 匹が 24 時間以内に死亡した

図6 TAFI 遺伝子欠損マウスへの LPS 投与後の生存率
LPS3mg/kg を 24 時間ごと 7 回 (▲) 腹腔内投与し生存率を調べた。野生型 (+/+), ヘテロ接合体 (+/-) 及びホモ接合体 (-/-) 間で有意な差は確認できなかった (文献 20 より引用, 一部改変)。

用があることも示唆されている²²⁾⁻²⁶⁾。そこで、我々は最初に LPS (5mg/kg) を静脈内投与し、時間を空けてから CVF (30U/mouse) の腹腔内投与を試みた。この結果、野生型及びヘテロ接合体では死亡するマウスがいなかったのに対し、TAFI 遺伝子欠損マウスの致死率は 60% となった (表 2)。この結果から、C5a レセプター

の発現増強下で補体がさらに強力に活性化された場合には、CPN に加え TAFIa が存在することで致死的な状態から回避している可能性が示唆された。

局所における炎症と TAFI の重要性

te Velde らは TAFI 遺伝子欠損マウスにおいて、結腸の吻合術後に起こった腹膜炎については、野生型マウスとの間に有意な差が観察できなかったものの、皮膚の創傷治癒については野生型マウスに比べ遅延する事を明らかにした²⁷⁾。TAFI 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの皮膚の一部を損傷させた場合に、欠損マウスにおいてはその修復過程においてケラチノサイトの移行に異常が見られた。これは細胞外基質の機能が阻害されている事を示唆していると筆者らは述べている。この過程は TAFIa による炎症性の不活性化機構ではなく、t-PA 刺激を介したプラスミン形成を TAFIa が阻害する機構の破綻によると説明している。すなわち

図7 モルモット皮内への TAFI 遺伝子欠損マウス血清投与

モルモットの皮膚を外側から観察した場合の写真(左)と、同じ皮膚を内側から観察した場合の写真(右)。モルモットにはエバンスブルーを静脈より前投与してある。A は生理的食塩水、B 及び C は野生型マウスの血清、D 及び E は TAFI 遺伝子欠損マウスの血清投与部位を指す。C と E の血清は、皮内投与する前にザイモザンと混合し 37 度 1 時間インキュベーションし、血清中の補体を活性化してある。C の部位では変化が見られなかったのに対し E の部位ではブルースポットが強く発現したことから、通常は TAFI が存在することによって血液中で生成された C3a や C5a が即時に不活性化されると示唆された(文献 20 より引用、一部改変)。

TAFI の欠損がプラスミンの過剰な形成を誘導し、フィブリンを過剰に除去してしまうためである。この報告では創傷後 4 日目と 7 日目の組織像が結果として挙げられており、創傷治癒の後期における TAFI の重要性を示している。しかしながら、TAFI の炎症の抑制における役割をより明確にするためには、炎症の急性期である 1-2 日目における組織像を調べる必要があるだろう。TAFI は好中球から放出されるエラスターゼによっても活性化される事からも、特に炎症が開始される時期での役割が重要であると考えられるからである。ただし、局所での創傷における TAFI の重要性が示唆された貴重な報告である。我々は局所的な炎症反応における TAFI の役割をより明確にするため次のような実験を行った。TAFI 遺伝子欠損マウスの血清を採取し、ザイモザンと混合してインキュベーションをした。ザイモザンは CVF と同様、

補体の第二経路を活性化するため、ザイモザン処理した血清中には C3a 及び C5a が含まれる。このような状態の血清を、エバンスブルーを静脈内へ前投与しておいたモルモットの皮内へ投与した。マウスの血清中に C5a 等のアナフィラトキシンが残っていれば、毛細血管の透過性が亢進されブルースポットが現れることになる。コントロールとして野生型マウスの血清を用いた。その結果、未処理及びザイモザン処理した野生型マウスの血清投与部位には何の変化も現れなかった(図 7)。一方で、ザイモザン処理した TAFI 遺伝子欠損マウスの血清については、投与部位に明らかなブルースポットが認められた。また未処理の TAFI 遺伝子欠損マウスの血清によってさえ、わずかながらではあるがブルースポットが現れた。したがって、TAFI 遺伝子欠損マウスの血清中では C3a や C5a の残存し、それによりモルモット血管透過性の亢進による局所での炎症反応が生じたと考えられる。

ブラジキニンやオステオポンチンの不活性化

先述したように補体が活性化され C3a や C5a が産生されると、IL-1、IL-6 やブラジキニンのような炎症性メディエータの産生が亢進される。またオステオポンチン(OPN)は、凝固系が動く際にはトロンビンによって切断され活性化型となる。活性化型 OPN は細胞接着や、炎症組織への単球やマクロファージの走化性亢進などにも関与する²⁸⁾。ブラジキニンはその C 末端に Arg が存在し、TAFIa によって切断されて不活性化される^{29) 30)}。活性化型 OPN もまた C 末端に Arg が露出する型となるが、この Arg も TAFIa によって切断され不活性化されることが最近報告された¹⁸⁾。

TAFIa による致死からの回避機序

通常アナフィラキシーショックは、補体の活

性化の始まりから致死までが約20分から1時間程度と非常に短時間である^{31) 32)}。しかしながら TAFI 遺伝子欠損マウスを LPS で感作した後 CVF を投与する実験系では、そのような短時間内での致死ではなかった。したがって24時間を指標にしているが、死亡までの時間から推測すると TAFI 遺伝子欠損マウスの死亡は C3a や C5a といったアナフィラトキシンのみによるものではないと考えられる。もちろん LPS の前投与による C5a レセプター発現の増強のない場合には死亡するマウスがいなかったことから、C5a の TAFIa による不活性化は致死からの回避においては最も重要であると示唆された。血中には CPN も存在し、アナフィラトキシンの不活性化に貢献しているが、C3a と C5a を不活性化する作用を比較した場合に CPN については C3a の不活性化を、一方 TAFIa については C5a の不活性化をより効率的に行うとの報告がある³⁰⁾。よって CPN のみが血液中に存在しても、アナフィラトキシンを十分に不活性化できないと示唆される。また C5a によって産生される炎症性メディエータ、特にブラジキニンや活性化型 OPN など、C 末端に Arg を持つペプチドによる臓器障害も十分に抑制されない。異物の侵入から補体の活性化、その後の炎症反応の流れの中で TAFIa の果たす役割は広範囲に影響を及ぼすものであり、凝固線溶系と炎症反応系を含めた広い視野での理解が求められるであろう。

おわりに

近年 Tissue Factor (TF) やトロンビンといった凝固系因子の炎症との関連が重視されている。これらの因子は凝固と炎症の両者を亢進する傾向にあるが、凝固線溶系に対して TAFIa は線溶を阻害する一方で、炎症に対しては抑制するという少々特異な存在である。TF やトロンビンの炎症病態での動向がクローズアップされる中で、TAFI はまだその役割についてこれ

まで十分な検証がなされてこなかった。今回は TAFI 遺伝子欠損マウスを用いた報告を主に取り上げたが、TAFI が欠損することによって CPN がかなりの部分を代償することも考えられる。したがって、凝固系ではマウスの体内で TAFI が欠損していても表現型として現れなかった可能性がある。凝固線溶系においてはトロンビンによって活性化される因子としてプロテイン C の存在もあり、それらの因子とのバランスが保たれることが病態との関連に影響を及ぼすであろう。しかし一方で、炎症反応においては野生型との間に有意差が見られたのは、TAFI が炎症における急性期タンパク質としての役割を果たしているからである。TAFI は肝臓で産生されるため肝炎に及ぼす影響もあるだろうし、免疫複合体が意味を持つ腎不全においてもその役割は検討課題であろう。先にも述べたが、DIC のような病態においては凝固線溶系のバランスの崩れとともに、敗血症や全身性の炎症、それによる多臓器不全があり、TAFI の動向を検討することが不可欠であると考えられる。そして将来的には TAFI を用いた全身性及び局所的な炎症性疾患の治療や、凝固線溶系における TAFI 濃度のバランスを考えた治療法の展開が期待される。

文 献

- 1) Eichinger S, Schonauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Schneider B, Quehenberger P, Kyrle PA: Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood* **103** : 3773-3776, 2004.
- 2) Brouwers GJ, Leebeek FW, Tanck MW, Wouter Jukema J, Kluft C, de Maat MP: Association between thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Thromb Haemost* **90** : 92-100, 2003.
- 3) Lau HK, Segev A, Hegele RA, Sparkes JD, Teitel JM, Chisholm RJ, Strauss BH: Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): a novel predictor of angiographic coronary restenosis. *Thromb Haemost* **90** : 1187-1191, 2003.
- 4) Schroeder V, Chatterjee T, Mehta H, Windecker S, Pham T, Devantay N, Meier B, Kohler HP: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. *Thromb Haemost* **88** : 1020-1025, 2002.

- 5) Montaner J, Ribo M, Monasterio J, Molina CA, Alvarez-Sabin J: Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke* **34** : 1038-1040, 2003.
- 6) Santamaria A, Oliver A, Borrell M, Mateo J, Belvis R, Marti-Fabregas J, Ortin R, Tirado I, Souto JC, Fontcuberta J: Risk of ischemic stroke associated with functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor plasma levels. *Stroke* **34** : 2387-2391, 2003.
- 7) Bajzer L, Manuel R, Nesheim ME: Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* **270** : 14477-14484, 1995.
- 8) Campbell W and Okada H: An arginin specific carboxypeptidase generated in blood during coagulation of inflammation which is unrelated to carboxypeptidase N. *Biochem Biophys Res Commun* **162** : 933-939, 1989.
- 9) Hendriks D, Scharpe S, van Sande M, Lommaert MP: A labile enzyme in fresh human serum interferes with the assay of carboxypeptidase N. *Clin Chem* **35** : 177, 1989.
- 10) Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem*: **266** : 21833-21838, 1991.
- 11) 山本哲郎, 神原武. 補体由来の炎症化学伝達物質. 日本臨床 (特集: 補体系の免疫化学) **46** : 1974, 1988.
- 12) Boffa MB, Bell R, Stevens WK, Nesheim ME: Roles of thermal instability and proteolytic cleavage in regulation of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* **275** : 12868-12878, 2000.
- 13) Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME: Plasma and recombinant thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties. *J Biol Chem* **273** : 2127-2135, 1998.
- 14) Plummer TH Jr, Hurwitz MY: Human plasma carboxypeptidase N. Isolation and characterization. *J Biol Chem* **11** : 3907-3912, 1978.
- 15) Sato T, Miwa T, Akatsu H, Matsukawa N, Obata K, Okada N, Campbell W, Okada H: Pro-carboxypeptidase R is an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not. *J Immunol* **165** : 1053-1058, 2000.
- 16) Kawamura T, Okada N, Okada H: Elastase from activated human neutrophils activates procarboxypeptidase R. *Microbiol Immunol* **46** : 225-230, 2002.
- 17) Nagashima, M., Yin ZF, Zhao L, White K, Zhu Y, Lasky N, Halks-Miller M, Broze GJ Jr., Fay WP, Morser J: Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) deficiency is compatible with murine life. *J Clin Invest* **109** : 101-110, 2002.
- 18) Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, Pearl RG, Leung LL: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem* **278** : 51059-1067, 2003.
- 19) Tsiang M, Paborsky LR, Li WX, Jain AK, Mao CT, Dunn KE, Lee DW, Matsumura SY, Mattetucci MD, Coutre SE, Leung LL, Gibbs CS: Protein engineering thrombin for optimal specificity and potency of anticoagulant activity in vivo. *Biochemistry* **35** : 16449-16457, 1996.
- 20) Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, Motoyama N, Okada H, Okada N: Absence of procarboxypeptidase R induces complement-mediated lethal inflammation in lipopolysaccharide-primed mice. *J Immunol* **173** : 4669-4674, 2004.
- 21) Lachmann PJ, Halbwachs L, Gewurz A, Gewurz H: Purification of cobra venom factor phospholipase A contaminant. *Immunology* **31** : 961-968, 1976.
- 22) Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann NC, Sarma JV, Mahdi F, Murphy HS, Speyer C, Lu KT, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA: Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol* **169** : 5962-5970, 2002.
- 23) Riedemann, NC, Guo RF, Sarma VJ., Laudes IJ, Huber-Lang M, Warner RL, Albrecht EA, Speyer CL, Ward PA: Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. *J Immunol* **168** : 1919-1925, 2002.
- 24) Haviland DL, McCoy RL, Whitehead WT, Akama H, Molmenti EP, Brown A, Haviland JC, Parks WC, Perlmutter DH, Wetsel RA: Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol* **154** : 1861-1869, 1995.
- 25) Akatsu H, Miwa T, Sakurada C, Fukuoka Y, Ember JA, Yamamoto T, Hugli TE, Okada H: cDNA cloning and characterization of rat C5a anaphylatoxin receptor. *Microbiol Immunol* **41** : 575-580, 1997.
- 26) Fukuoka Y, Ember JA, Hugli TE: Cloning and characterization of rat C3a receptor: differential expression of rat C3a and C5a receptors by LPS stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* **242** : 663-668, 1998.
- 27) te Velde EA, Wagenaar GT, Reijerkerk A, Roose-Girma M, Borel Rinkes IH, Voest EE, Bouma BN, Gebbink MF, Meijers JC : Impaired healing of cutaneous wounds and colonic anastomoses in mice lacking thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost* **10** : 2087-2096, 2003.
- 28) Yamamoto N, Sakai F, Kon S, Morimoto J, Kimura C, Yamazaki H, Okazaki I, Seki N, Fujii T, Uede T: Essential role of the cyptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **112** : 181-188, 2003.
- 29) Shinohara T, Sakurada C, Suzuki T, Takeuchi O, Campbell W, Ikeda S, Okada N, Okada H: Pro-carboxypeptidase R cleaves bradykinin following activation. *Int Arch Allergy Immunol* **103** : 400-404, 1994.
- 30) Campbell W, Lazoura E, Okada N, Okada H: Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol Immunol* **46** : 131-134, 2002.
- 31) Mizuno M, Nishikawa K, Okada N, Matsuo S, Ito K, Okada H: Inhibition of a membrane complement regulatory protein by a monoclonal antibody induces acute lethal shock in rats primed with lipopolysaccharide. *J Immunol* **162** : 5477-5482, 1999.
- 32) Fujita E, Farkas I, Campbell W, Baranyi L, Okada H, Okada N: Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide that is complementary to a region of C5a. *J Immunol* **172** : 6382-6387, 2004.