綜 説

トロンボモジュリン

石 井 秀 美* 風 間 睦 美**

Thrombomodulin

Hidemi ISHII* and Mutsuyoshi KAZAMA**

Key words: thrombomodulin, protein C, thrombin, diabetes mellitus, SLE, DIC

は じ め に

血管内皮細胞は血管の内腔をただ一層で覆っている血管固有の細胞である。内皮細胞の機能は多様であるが、特に本細胞のもつ抗血栓性機能と止血・血栓性機能は出血性素因や血栓症の病態を考えるうえで重要である。内皮細胞の抗血栓性作用としては、1) Thrombomodulin の産生、2) ヘパリン様物質の産生、3) 組織 Plasminogen activator の産生と放出、4) PGI_2 の産生と放出などが知られている。一方、内皮細胞の止血・血栓作用としては、1) 組織 Thromboplastin (Factor III) の産生、2) vWF (von Willebrand factor) の産生と放出、3) Factor V, IX および X の結合能 (Prothrombinase 活性の提示)、4) Plasminogen activator inhibitor の産生と放出、5) Platelet aggregating factor の産生と放出などが知られている。

内皮細胞の示す抗血栓性作用のうち、Thrombomodulin の役割はその機能が多面的であることから血液凝固の制御機構上重要である。そこで、本稿では内皮細胞の膜上で機能している Thrombomodulin に焦点をあて、最近の知見をもとに本タンパク質の機能を整理し、さらに

は著者らによって発見された血流中の Thrombomodulin についても概説したい。

I. Thrombomodulin の構造

家兎¹⁾、牛²⁾ およびマウス³⁾ の Thrombomodulin は肺から、そしてヒトの Thrombomodulin は著者ら⁴⁾ および Kurosawa ら⁵⁾ によって胎盤から精製された。家兎 Thrombomodulin の分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、還元下 74Kd、非還元下 68Kd と当初報告されたが、近年に至って native な Thrombomodulin は還元下 110Kd を示すと報告された⁶⁾。Thrombomodulin は精製過程で細胞内のメタロ・プロテアーゼによって分解されやすく、このため高分子の native Thrombomodulin を得るためには精製操作中に o-phenanthroline を添加することが有効であると示唆されている⁷⁾。一方、ヒト・Thrombomodulin の分子量は還元下 105Kd、非還元下 75Kd と報告されている⁴⁾。ヒト Thrombomodulin の精製操作中では o-phenanthroline は添加されておらず、ヒト Thrombomodulin でも native 型がこれより大きいのか否かについてはまだ結論を得ていない。Thrombomodulin は還元状態の方

* 帝京大学薬学部臨床生化学〔〒199-01 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐1091-1〕, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Kanagawa, Japan

** 帝京大学医学部第一内科〔〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1〕, Department of Medicine, School of Medicine, Teikyo University, Itabashi, Tokyo, Japan

が非還元下よりその分子量が大きく算出されることから本タンパク質は球状を呈しているものと考えられる。Thrombomodulin のクローニングはヒト⁸⁾⁹⁾、牛¹⁰⁾、マウス¹¹⁾ですでに終了し、アミノ酸配列が明らかにされている。ここではヒト・Thrombomodulin について紹介する。本タンパク質は575個のアミノ酸から成り、うち18個がシグナルペプチド部分である。図1に示したように、N末部が内皮細胞の外側に突出し、C末部が細胞の内側に入り込んでいる。本タンパク質の構造はN末ドメイン, epidermal growth factor (EGF)-like ドメイン, o-glycosylation-rich ドメイン, 膜貫通ドメイン, 細胞内ドメインの5つに分けられる。N末ドメインはこれまでにわかっているタンパク質とは明らかな相同性を有さず、またその末端部はなんらかによってブロックされている。EGF-like ドメインには6つの EGF 様構造が繰り返されている。Thrombomodulin は Thrombin と 1:1 の割合で複合体を形成するが、Thrombomodulin の Thrombin 結合部位は EGF-like ドメインのN末側から5番目であることが示された¹²⁾¹³⁾。細胞内ドメインは38個のアミノ酸から成り、チロシン1残基、スレオニン2残基が存在し、プロテインキナーゼCによりリン酸化される可能性が示唆されている¹⁴⁾。

Thrombomodulin の糖部分に関する研究はまだあまり多くないが、家兎 Thrombomodulin はコンドロイチン硫酸タイプのプロテオグリカンであることが示唆されている⁶⁾。そして Thrombomodulin はコンカナバリン A (ConA) とも結合し、ConA と結合した Thrombomodulin は Protein C 活性化(後述)における Cofactor 機能を失う¹⁴⁾。

II. Thrombomodulin の機能

1. Thrombin の procoagulant 活性阻害

Thrombin は血液凝固を促進させる procoagulant 活性と血液凝固を抑制させる anticoagulant 活性のまったく相反する二つの面を持っている。Thrombin の procoagulant 活性としては、① fibrinogen の fibrin への転換反応、② Factor V, VIII, XIII の活性化、③ 血小板

図1 Thrombomodulin の構造⁸⁾

凝集惹起作用などが知られている。Thrombomodulin はその EGF-like ドメインで Thrombin と結合し¹²⁾¹³⁾、1対1の複合体を形成すると Thrombin のもつこれらの procoagulant 活性をすべて阻害する¹⁵⁾¹⁶⁾。その複合体形成にカルシウムは必須ではないが、複合体の安定化にはカルシウムが寄与する¹⁷⁾。この複合体形成で Thrombin の procoagulant 活性が阻害されるのは Thrombin の protease 活性が阻害されるのではなく、複合体形成で Thrombin の立体構造が変化を受け、Thrombin が procoagulant 活性を示す際の基質と Thrombin の結合が阻害されるためである¹⁸⁾。

2. Protein C 活性化の cofactor の作用

Thrombin の anticoagulant 活性は Protein C の活性化を通しておこなわれる。Protein C 活性化の生理的物質としては現在のところ Thrombin しか知られていない。Thrombomodulin は Thrombin と複合体を形成すると Thrombin の立体構造を変化させ、内皮細胞上の Thrombomodulin の場合には Thrombin の Protein C 活性化能を約 20,000 倍に¹⁹⁾、精製 Thrombomodulin の場合には約 1,000 倍に増強させる²⁾⁴⁾²⁰⁾。この複合体による Protein C の活性化にはカルシウムが要求される²⁰⁾。カルシウムは Protein C と結合しその構造を変化させ、

図2 Thrombomodulin および Thrombin による Protein C の活性化機構
TM, Thrombomodulin; Gla, Protein C の γ -carboxyglutamic acid 含有ドメイン

立体構造の変化した Protein C の γ -カルボキシグルタミン酸(Gla) ドメインが、カルシウムを架橋として Thrombomodulin の Gla ドメイン認識部位に結合する。すなわち Thrombomodulin 分子は Thrombin と Protein C の両者を結合させ、Thrombin と Protein C の親和性を高め反応の場を提供しているものと考えられる¹⁷⁾²¹⁾(図2)。Thrombin は Thrombomodulin 分子を介して Protein C の一部を限定分解し不活性型 Protein C を活性型に変換する。活性化された Protein C は Thrombomodulin から遊離する。活性型 Protein C は serine protease の性質を示し、凝固に必須な Factor Va および VIIIa を分解し、血液凝固カスケードを制御する²²⁾²³⁾²⁴⁾。また、活性型 Protein C は plasminogen activator inhibitor を不活性化し、線溶系の亢進にも機能を発揮することが知られている²⁵⁾。

3. Factor Xa 活性の阻害

Factor Xa は Prothrombin を限定分解し Thrombin を生成する serine protease である²⁶⁾。本酵素は Thrombin と構造上の類似点が多い。たとえば、その B 型・H-鎖のアミノ酸配列は Thrombin β -鎖のそれとよく類似して

いる。Thompson と Salem²⁷⁾は Thrombomodulin が Factor Xa と結合し、Factor Xa の酵素活性を阻害することを示した。Factor Xa は血小板あるいはリン脂質、Factor Va、カルシウムイオンの存在下で prothrombinase 活性を示すが、その活性も Thrombomodulin によって阻害される。

4. ヘパリン様作用

Thrombomodulin は分子中に糖を含有する glycoprotein である⁶⁾。前述したように Thrombomodulin 分子中の糖は N-glycoside と o-glycoside 結合でタンパク質に結合していることが示唆されている¹³⁾。精製家兎 Thrombomodulin はイオン交換クロマトグラフィーで等電点が酸性のものと中性のものに分けられ、酸性 Thrombomodulin は分子中はコンドリチン硫酸タイプの糖を含有し、Antithrombin-III による Thrombin 活性阻害作用を促進するいわゆるヘパリン様作用のあることが報告された⁶⁾⁷⁾²⁸⁾。著者らも家兎 Thrombomodulin の示すこのヘパリン様作用を確認した。しかし、精製ヒト Thrombomodulin ではこのヘパリン様作用を確認することができなかった。逆にヒト Thrombomodulin は Antithrombin-III の Th-

図 3 血管内皮細胞上での Thrombomodulin の機能
TM, Thrombomodulin; Xa, 活性型 Factor X:

rombin 活性阻害作用を抑制してしまうという報告もみられる²⁹⁾。ヒト Thrombomodulin は家兎 Thrombomodulin より anticoagulant 作用が弱い³⁰⁾、このようなヘパリン様作用にも両者の差があらわれているようである。

5. Thrombin 除去作用

Thrombin は内皮細胞膜上の Thrombomodulin と複合体を形成するとエンドサイトーシスにより内皮細胞内に取り込まれ (internarization), Thrombin はリソゾーム内で分解され、Thrombomodulin は再び膜表面にリサイクルしてくるという現象が報告された³¹⁾。すなわち、内皮細胞膜上の Thrombomodulin は Thrombin と結合し、Protein C を活性化させると同時に、内皮細胞内に Thrombin を取り込み除去することを示唆している。しかし、一方で内皮細胞膜表面の Thrombomodulin は Thrombin と結合してもエンドサイトーシスは起こらないという報告もあり³²⁾、一定の見解を得ていない。このエンドサイトーシスの問題は内皮細胞表面での Thrombomodulin の発現調節を考える上でも重要な問題である。LDL レセプターは Thrombomodulin と構造上非常に類似し

ている。LDL レセプターも N 末部が内皮細胞外に出ており、C 末部が細胞質側に入り込み、またその構造中には EGF-like ドメインを 3 つ保持している³³⁾³⁴⁾。EGF 様構造の機能が初めて解明されたのは LDL レセプターにおいてである³⁴⁾。LDL はそのレセプターの N 末部に結合した後、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソーム内で pH が下がると LDL を遊離する。EGF 様構造はこの遊離を促進し、レセプターを細胞表面へリサイクルさせる³⁴⁾。Thrombomodulin は EGF 様構造で Thrombin と結合するので、リガンド結合部位は LDL の場合とはまったく違う。すなわち両者間の構造は類似していても各ドメインの果たす役割は違うことから、Thrombomodulin と LDL レセプターでは細胞内での挙動が異なる可能性も示唆される。

以上、Thrombomodulin の機能を凝固制御の面からまとめると図 3 のようになる。出血などで血液の凝固機転が開始され、最初に微量の Thrombin が産生されると、この Thrombin は Factor V および VIII の活性化を介して雪だるま式に Factor Xa および Thrombin の産生を

促す。しかし一定量以上の Factor Xa および Thrombin が産生されると、その Xa および Thrombin は血管内皮細胞上の Thrombomodulin に吸着される。Factor Xa は不活性化され、Thrombin はその procoagulant 活性が減弱化され、逆に Protein C 活性化能 (anticoagulant 活性) が著しく増強される。活性化された Protein C は Factor Va および VIIIa を分解して、Thrombin の産生を抑制して過剰な凝固反応を抑制する。さらに、活性型 Protein C は plasminogen activator inhibitor 活性を不活性化し、線溶亢進にも向わせる。

III. 内皮細胞での Thrombomodulin の発現調節

培養内皮細胞に菌体外毒素(endotoxin,LPS)³⁵⁾ やインターロイキン-1 (IL-1)³⁶⁾ などの炎症のメディエーターや細胞壊死因子 (tissue necrosis factor, TNF)³⁷⁾ を添加すると、内皮細胞表面ならびに細胞全体での Thrombomodulin の活性および抗原量が著しく低下することが報告された。炎症時および癌患者に TNF を投与すると血栓が生じやすいが、その原因の一つとして Thrombomodulin 量の減少があげられる。これらサイトカインによって内皮細胞内の Thrombomodulin 量が減少し、Thrombin の procoagulant 活性が有意になり、Protein C の活性化が低下する。そのために炎症時や TNF 投与で血栓が生じやすいのかもしれない。これらの物質による Thrombomodulin 量の低下は細胞内での合成の低下ではなく、分解の亢進によっておこると報告された³⁸⁾。また、発癌のプロモーターであり、protein kinase C の活性化物質としてもよく知られている phorbol myristate acetate (PMA, TPA) もマウス血管腫細胞の Thrombomodulin 量を初期に低下させ、後に上昇させることが報告された¹¹⁾。この PMA 処理で Thrombomodulin はその serine 残基部分がリン酸化を受けることが示された¹¹⁾。しかし、このリン酸化が細胞内でのシグナル・トランスダクション上のような意味があるのか。また Thrombomodulin の合成と分解がそのリン酸化でどのように調節されているのかは今後

表 1 ヒト組織における Thrombomodulin の分布
($\mu\text{g/g}$ 湿重量)

組織	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Mean $\pm$ SD
肺	11.9	6.2	—	9.8	9.3 $\pm$ 3.0
心臓	2.7	3.7	—	—	3.2
肝臓	4.5	6.9	—	1.5	4.3 $\pm$ 2.2
脾臓	5.6	8.9	7.4	3.4	6.3 $\pm$ 2.1
腎臓	2.7	4.0	2.4	2.8	3.0 $\pm$ 0.6
脾臓	1.6	3.8	—	11.3	5.6 $\pm$ 5.1
動脈	0.8	2.8	2.4	2.2	2.1 $\pm$ 0.8
皮膚	—	1.0	1.9	2.2	1.7 $\pm$ 0.5
胎盤	8.2	9.9	8.0	6.9	8.3 $\pm$ 1.1

の問題として残されている。さらに、このマウス血管腫細胞を用いた実験で、細胞内 Thrombomodulin の代謝回転 (turn over rate) が検討されており、その半減期 ($t_{1/2}$) は $19.8\pm 3.9\text{hr}$ と算出されている¹¹⁾。

IV. Thrombomodulin の組織分布

組織免疫学的手法を用いた Thrombomodulin の臓器および組織分布はヒト³⁹⁾および家兎⁴⁰⁾⁴¹⁾ではほぼ同様な結果を得ており、各臓器組織の動・静脈、リンパ管、毛細血管の内皮細胞に広く分布している。著者ら⁴²⁾はラジオイムノアッセイ法を開発し、ヒトの各組織における Thrombomodulin の抗原量を測定した (表 1)。肺に最も多く、次いで胎盤、脾臓、脾臓、肝臓、心臓、腎臓の順であった。腎臓では内皮細胞に加え、糸球体の capillary loops にも弱いながらもその分布が報告されている³⁹⁾⁴⁰⁾。家兎の脳で Thrombomodulin の抗原が認められるが⁴⁰⁾、ヒトでは脳の血液と脊髄液の交換が行われる脈絡叢で Thrombomodulin は豊富に分布しているものの、他の部位では Thrombomodulin の分布は認められていない³⁹⁾⁴²⁾。内皮細胞以外の細胞では胎盤の合体細胞で Thrombomodulin が検出された³⁹⁾。この細胞は母体から胎児に栄養を送る部位にあり、この部位での血液の凝固は胎児に致命症となる。それを阻止するために Thrombomodulin が多く分布しているのかもしれない。

図 4 各種疾患の患者血漿中の Thrombomodulin 抗原量

V. 血中および尿中に存在する可溶性 Thrombomodulin

Thrombomodulin は内皮細胞のみでなく血中および尿中にも分布することが著者らによって明らかにされた⁴³⁾。ヒト血漿中の Thrombomodulin を抗 Thrombomodulin 抗体カラムで分離すると、分子量 105,000 から 28,000 までの不均一な 6 つの分子として検出される⁴⁴⁾⁴⁵⁾。尿中の Thrombomodulin も血中の Thrombomodulin とほぼ同様の構成であるが、分子種が一つ多い 7 種を検出した⁴⁴⁾⁴⁵⁾。血中および尿中 Thrombomodulin は共に Protein C 活性化の cofactor 機能を持っているが Thrombin との親和性は組織から精製した分子量 105,000 の Thrombomodulin に比べ 1/3 から 1/5 弱く、その Kd 値は 1.1nM であった⁴³⁾。それは血中 Thrombomodulin の大部分が組織 Thrombomodulin の分解物であると推測される低分子量の Thrombomodulin で構成されているためと思われる。血中 Thrombomodulin の生理機能を考えると、血中の Antithrombin-III と Thrombomodulin の Thrombin に対する親和性を考慮しなければならない。健康者の血漿中 Thrombomodulin 量は著者らの開発した enzyme-linked immunosolubent assay (ELISA) 法で測定する

と約 35ng/ml であった⁴⁴⁾。Antithrombin-III は血漿中で 200μg/ml⁴⁶⁾、Thrombin との親和性は 0.1nM⁴⁷⁾ と報告されている。このことは Thrombin が血中で生じて Antithrombin-III と素速く結合し、血流中の Thrombomodulin は Protein C 活性化にはほとんど寄与していないことを示唆する。

血中 Thrombomodulin の由来を検討した⁴⁵⁾。① 組織から精製した Thrombomodulin を血清または血漿と長時間インキュベートしても血中で認められるような低分子の Thrombomodulin はまったく出現して来ないこと、② 培養内皮細胞の研究から、Thrombomodulin は組織 plasminogen activator inhibitor とは異なり内皮細胞が刺激を受けたときでさえ細胞から分泌されないこと、③ 内皮細胞が障害されたときに初めて培養液中へ逸脱すること、④ 破壊された内皮細胞の培養液中には血中 Thrombomodulin と同じ分子種が認められることなどから、血中 Thrombomodulin は血管内皮細胞が障害を受けて、細胞内プロテアーゼで低分子に分解され、血中へ逸脱したものと考えられる。従って血中 Thrombomodulin は血管内皮細胞の障害を診断する分子マーカーとして、臨床検査の面からその有用性に期待が寄せられる。

種々疾患の血漿または血清中の Thrombom-

odulin 抗原量を ELISA 法で測定した⁴⁹⁾(図 4). 血栓性疾患である深部静脈血栓症 (DVT), 閉塞性血栓性血管炎 (TAO), 閉塞性動脈硬化症 (ASO), 脳梗塞症(cerebral infarction), 肺動脈血栓症 (pulmonary embolism) などは健常者の血漿 Thrombomodulin 値と差がなく, また特に高値を示す検体もみられなかった. また心疾患である狭心症 (angina pectoris), 急性心筋梗塞症(AMI), 慢性心筋梗塞症 (OMI) でも血漿 Thrombomodulin 値は健常者のそれと差がなかった.

一方, 膠原病である全身エリテマトーデス (SLE) の22例では血中 Thrombomodulin 値が $127.5 \pm 177 \text{ ng/ml}$ と健常者の Thrombomodulin 値の約 4 倍と高値を示し, 中には 200 ng/ml 以上の高値を示す検体が 5 例も含まれていた⁴⁹⁾. SLE 患者血清中の補体消費量 (CH_{50}) は Thrombomodulin 値の上昇と逆相関を示す傾向が認められ, 血中 Thrombomodulin 値が高い検体は補体がより消費されているようである. 播種性血管内凝固症候群 (DIC) 患者の血漿でも Thrombomodulin 値は $76 \pm 42 \text{ ng/ml}$ と高値で, DIC の発現と共に高値を示し, DIC からの回復につれて Thrombomodulin 値は低下していく傾向が認められている⁴⁹⁾.

糖尿病患者の血漿 Thrombomodulin 値は男性 36 例で $73 \pm 76 \text{ ng/ml}$ と高値を示していた⁴⁵⁾^{50) 51)}. このうち合併症として網膜症 (retinopathy) を有する患者検体では $102 \pm 26 \text{ ng/ml}$ と著しく高値で, Scott の分類による網膜症の進行程度と血漿 Thrombomodulin 値の間に正の相関が認められた⁴⁵⁾(図 5). また腎症を合併している糖尿病患者血漿でも Thrombomodulin 値は $158 \pm 34 \text{ ng/ml}$ と高値を示していた⁴⁵⁾.

一方, 糖尿病とは関連をもたない腎疾患でも血中 Thrombomodulin 値は高値を示し, 特に腎不全の患者血清では $132 \pm 41 \text{ ng/ml}$ と高値であった⁴⁹⁾. 腎不全患者における血中 Thrombomodulin 値と血中クレアチニン値との間に正の相関がみられ, 血中 Thrombomodulin の高値は Thrombomodulin の腎からの排泄低下によることが示唆される. しかし, ① 尿 Thrombomodulin にも血中 Thrombomodulin と同様に

図 5 糖尿病患者の網膜症進行程度 (Scott 分類) と血漿中 Thrombomodulin 抗原量の関係

分子量 105,000 という高分子の Thrombomodulin があること, ② ネフローゼ症候群で尿中に多量のタンパク質が漏出しても, Thrombomodulin は尿中へ健常値を越えて漏出せず, 血中でも異常が認められないこと, ③ 動物実験で家兔の腎動・静脈を結紮しても血中 Thrombomodulin 値は上昇しないことなどから, 腎不全時の血中 Thrombomodulin 高値が単に腎臓での過低下で説明するのは困難であり, 腎不全時に血中 Thrombomodulin が高値を示す機構は今後の研究結果を待たねばならない.

いずれにしても, 全身性の血管障害を合併することが知られている膠原病, DIC, 糖尿病で血中 Thrombomodulin が高値を示し, 局所的な血管障害を伴う血栓性の疾患では健常値と差のないことから, 血中 Thrombomodulin は全身性の内皮細胞障害で高値を示す新しい血中の分子マーカーとして日常の臨床検査での利用に期待がもたれる.

VI. Thrombomodulin の医薬への応用

Thrombomodulin は Thrombin による Protein C の活性化を促進する cofactor であること, Thrombin の procoagulant 活性を阻害することから医薬への応用が考えられている. Kumada ら³⁾はラット肺から精製した Thrombomodulin を用いて, Thrombin で誘導されるマウスの血栓塞栓症への予防効果を検討した.

マウスに 15U の Thrombin を腹腔に投与すると control 群は平均 61 分で死亡したが Thrombin 投与の 3 分前に 17 μ g の Thrombomodulin を静注しておく、死亡時間は 2 倍の 131 分に延長し、外因性の Thrombomodulin は血栓予防効果のあることを報告した。しかし、Thrombomodulin の血栓治療効果は期待できないようである。一方、鈴木らおよび旭化成グループ⁵²⁾は recombinant のヒト Thrombomodulin を医薬に応用すべく研究中であり、今後の成果に期待がもたれる。

文 献

- 1) Esmon, N. L., Owen, W. G. and Esmon, C. T.: Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J. Biol. Chem.*, **257**; 859~864, 1982.
- 2) Jakubowski, H. V., Kline, M. D. and Owen, W. G.: The effect of bovine thrombomodulin on the specificity of bovine thrombin. *J. Biol. Chem.*, **261**; 3876~3882, 1986.
- 3) Kumada, T., Dittman, W. A. and Majerus, P. W.: A role for thrombomodulin in the pathogenesis of thrombin-induced thrombocytolysis in mice. *Blood*, **71**; 728~733, 1988.
- 4) Salem, H. H., Maruyama, I., Ishii, H. and Majerus, P. W.: Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta. *J. Biol. Chem.*, **259**; 12246~12251, 1984.
- 5) Kurosawa, S. and Aoki, N.: Preparation of thrombomodulin from human placenta. *Thromb. Res.*, **37**; 353~364, 1985.
- 6) Bourin, M.-C., Ohlin, A.-K., Lane, D. A., et al.: Relationship between anticoagulant properties and polyanionic properties of rabbit thrombomodulin. *J. Biol. Chem.*, **263**; 8044~8052, 1988.
- 7) Baurin, M.-C.: Effect of rabbit thrombomodulin on thrombin inhibition by antithrombin in presence of heparin. *Thromb. Res.*, **54**; 27~39, 1989.
- 8) Suzuki, K., Kusumoto, H., Deyashiki, Y., et al.: Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *EMBO J.*, **6**; 1891~1897, 1987.
- 9) Wen, D., Dittman, W. A., Ye, R. D., et al.: Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry*, **26**; 4350~4357, 1987.
- 10) Jackman, R. W., Beeler, D. L., Van De Water, L. and Rosenberg, R. D.: Characterization of a thrombomodulin cDNA reveals structural similarity of the low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**; 8834~8838, 1986.
- 11) Dittman, W. A., Kumada, T., Sadler, J. E. and Majerus, P. W.: The structure and function of mouse thrombomodulin. phorbol myristate acetate stimulates degradation and synthesis of thrombomodulin without affecting mRNA levels in hemangioma cells. *J. Biol. Chem.*, **263**; 15815~15822, 1988.
- 12) Kurosawa, S., Stears, O., Jackson K. W. and Esmon, C. T.: A 10-KDa cyanogen bromide fragment from the epidermal growth factor homology domain of rabbit thrombomodulin contains the primary thrombin binding site. *J. Biol. Chem.*, **263**; 5993~5996, 1988.
- 13) Suzuki, K., Hayashi, T., Nishioka, J., et al.: A domain composed of epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin is essential for thrombin binding and for protein C activation. *J. Biol. Chem.*, **264**; 4872~4876, 1989.
- 14) Freyssinet, J.-M., Brami, B., Gauchy, J., and Cazeneuve, J.-P.: Coextraction of thrombomodulin and tissue factor from human placenta: Effects of concanavalin A and phospholipid environment on activity. *Thromb. Haemost.*, **55**; 112~118, 1986.
- 15) Esmon, C. -T., Esmon, N. L. and Harris, K. W.: Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J. Biol. Chem.*, **257**; 7944~7947, 1982.
- 16) Esmon, N. L., Carroll, R. C. and Esmon, C. T.: Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets. *J. Biol. Chem.*,

- 258**; 12238~12242, 1983.
- 17) Esmon, C. T., Esmon, N. L., Kurosawa, S. and Johnson, A. E.: "Bioregulatory function of thrombin". ed. by Wals, D. W., Fenton, J. W. and Suman, M. A., Ann. New York Sci. vol. 485, pp. 215, The New York Acad. Sci., New York, 1986.
 - 18) Hofsteenge, J., Taguchi, H. and Stone, S. R.: Effect of thrombomodulin on the kinetics of the interaction of thrombin with substrates and inhibitors. *Biochem. J.*, **237**; 243~251, 1986.
 - 19) Esmon, C. T. and Owen, W. G.: Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2249~2252, 1981.
 - 20) Esmon, N. L., DeBault, L. E. and Esmon, C. T.: Proteolytic formation and properties of γ -carboxyglutamic acid-domainless protein C. *J. Biol. Chem.*, **258**; 5548~5553, 1983.
 - 21) Esmon, N. L.: Thrombomodulin. *Semi. Thromb. Hemost.*, **13**; 454~463, 1987.
 - 22) Kisiel, W., Canfield, W. M., Ericsson, E. H. and Davie, E. W.: Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry*, **16**; 5824~5831, 1977.
 - 23) Walker, F. J., Sexton, P. W. and Esmon, C. T.: The inhibition of blood coagulation by activated protein C through the selective inactivation of activated factor V. *Biochim. Biophys. Acta*, **571**; 333~342, 1979.
 - 24) Vehar, G. and Davie, E.: Preparation and properties of bovine factor VIII. *Biochemistry*, **19**; 410~416, 1980.
 - 25) Sakata, Y., Loskutoff, D. L., Gladson, C. L., et al.: Mechanism of protein C-dependent clot lysis: Role of plasminogen activator inhibitor. *Blood*, **68**; 1218~1223, 1986.
 - 26) Esmon, C. T., Owen, W. G. and Jackson, C. M.: A plausible mechanism for prothrombin activation by factor Xa, factor Va, phospholipid and calcium ions. *J. Biol. Chem.*, **249**; 8045~8047, 1974.
 - 27) Thompson, E. A. and Salem, H. H.: Inhibition by human thrombomodulin of factor Xa-mediated cleavage of prothrombin. *J. Clin. Invest.*, **78**; 13~17, 1986.
 - 28) Preissner, K. T., Delvos, U. and Berghaus, G. M.: Binding of thrombin to thrombomodulin accelerates inhibition of the enzyme by antithrombin III. Evidence for heparin-independent mechanism. *Biochemistry*, **26**; 2521~2528, 1987.
 - 29) Thompson, E. A. and Salem, H. H.: The effects of human thrombomodulin on the inactivation of thrombin by its serum inhibitors. *Thromb. Haemost.*, **58**; 806~810, 1987.
 - 30) Maruyama, I., Salem, H. H., Ishii, H. and Majerus, P. W.: Human thrombomodulin is not an efficient inhibitor of the procoagulant activity of thrombin. *J. Clin. Invest.*, **75**; 987~991, 1985.
 - 31) Maruyama, I. and Majerus, P. W.: The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A-549 lung cancer cells. Endocytosis and degradation of thrombin. *J. Biol. Chem.*, **260**; 15432~15438, 1985.
 - 32) Beretz, A., Freyssinet, J.-M., Gauchy, J., et al.: Stability of thrombin-thrombomodulin complex on the surface of endothelial cells from human saphenous vein or from the cell line EA. hy 926. *Biochem. J.*, **259**; 35~40, 1989.
 - 33) Russell, D. W., Schneider, W. J., Yamamoto, T., et al.: Domain map of the LDL receptor: Sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell*, **37**; 577~585, 1984.
 - 34) Davis, C. G., Goldstein, J. L., Sudhof, T. C., et al.: Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*, **326**; 760~765, 1987.
 - 35) Moore, K. L., Andreoli, S. P., Esmon, N. L., et al.: Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.*, **79**; 124~130, 1987.
 - 36) Nawroth, P. P., Handley, D. A., Esmon, C. T. and Stern, D. M.: Interleukin-1 induces

- endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83** : 3460~3464, 1986.
- 37) Nawroth, P.P. and Stern, D.M. : Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **163** ; 740~745, 1986.
- 38) Moore, K.L., Esmon, C.T. and Esmon, N.L. : Tumor necrosis leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood*, **73** ; 159~165, 1989.
- 39) Maruyama, I., Bell, C.E. and Majerus, P.W. : Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J. Cell. Biol.*, **101** ; 363~371, 1985.
- 40) DeBault, L.L., Esmon, N.L., Olson, J.R. and Esmon, C.T. : Distribution of the thrombomodulin antigen in the rabbit vasculature. *Lab. Invest.*, **54** ; 172~178, 1986.
- 41) DeBault, L.E., Esmon, N.L., Smith, G.P. and Esmon, C.T. : Localization of thrombomodulin antigen in rabbit endothelial cells in culture. An immunofluorescence and immunoelectron microscope study. *Lab. Invest.*, **54** ; 179~187, 1986.
- 42) Ishii, H., Salem, H.H., Bell, C.E., et al. : Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain. *Blood*, **67** ; 362~365, 1986.
- 43) Ishii, H. and Majerus, P.W. : Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J. Clin. Invest.*, **76** ; 2178~2181, 1985.
- 44) Ishii, H., Nakano, M., Tsubouchi, J., et al. : Establishment of enzyme immunoassay of human thrombomodulin in plasma and urine using monoclonal antibodies. *Thromb. Haemost.* in press.
- 45) 石井秀美, 内山浩之, 平石さゆり, 他 : 血中トロンボモジュリン測定の意義. *臨床病理*, **37** ; 266~271, 1989.
- 46) Tanaka, M. and Kato, K. : Determination of antithrombin III by sandwich enzyme immunoassay. *Thromb. Res.*, **22** ; 67~74, 1981.
- 47) Koide, T. : Isolation and characterization of antithrombin III from human, porcine and rabbit plasma, and rat serum. *J. Biochem.*, **86** ; 1841~1850, 1979.
- 48) Ishii, H., Uchiyama, H. and Kazama, M. : Soluble heterogenous thrombomodulin in plasma is derived from injured endothelial cell. Submitting.
- 49) Kazama, M., Wakasugi, K., Tahara, C., et al. : Plasma thrombomodulin, a molecular marker of endothelial injury. Submitting.
- 50) Oida, K., Takai, H., Maeda, H., et al. : Plasma thrombomodulin concentration in diabetes mellitus. Submitting.
- 51) 岩島保法, 渡辺 清, 衛藤雅治, 他 : 細小血管症を合併した糖尿病患者における 血中トロンボモジュリンの上昇. *医学のあゆみ*, **149** ; 161~162, 1989.
- 52) Gomi, K., Zushi, M., Yamamoto, S., et al. : Minimum functional domain of human thrombomodulin for protein C activating cofactor activity and anticoagulant activity. *Thromb. Haemost.*, **62** ; 334, 1989.