◆総説◆

外因系凝固インヒビター TFPI の最近のトピックス

加藤 久雄

Recent Progress on Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

Hisao KATO

Key words: Protease Inhibitor, Blood Coagulation, TFPI.

はじめに

外因系凝固の開始反応である組織因子による VII 因子および X 因子の活性化を特異的に阻害するプロテアーゼインヒビターの存在は古くから指摘されてきたが、その性質は長い間明らかではなかった。その後、Broze らの研究により、そのインヒビターは Xa 因子依存性に VII 因子の活性化を阻害する作用をもつという一見、極めて奇妙なインヒビターであることが明らかになってきた。1988 年に彼らにより、そのアミノ酸配列が決定され、それ以後、いくつかのグループにより、その組換え体が調製されたことにより、その性質や疾患との関係について爆発的に報告がみられるようになった。このインヒビターの命名については、研究の当初は、Broze らにより、Lipoprotein-associated Coagulation Inhibitor (LACI)、Rapaport らにより Extrinsic Pathway Inhibitor (EPI) と、別々によばれていたが、その後、Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) と統一された。本稿に記したように、TFPI は極めて特徴的な性質をもっているが、その生体内における意義については未だ不明の点が多い。ここでは、著者らの結果を含め、最近のトピックスを中心にまとめた。なお、ここで記した TFPI および、関連した因子

についての最近の総説を終わりにまとめて記した (総説 1-9)。

1. TFPI のアミノ酸配列と阻害機構

1. TFPI の構造

TFPI のヒト血漿よりの精製は、その濃度が低いことと、後に記すように、リポ蛋白質結合型と遊離型として存在しているために、非常に困難で、最初の精製品は HepG2 細胞¹⁾、ついで Chang liver および SK hepatoma の細胞の培養上清より得られた²⁾。その抗体を用いてヒト胎盤および胎児の肝臓の cDNA ライブラリーがスクリーニングされ、ヒト TFPI cDNA の構造が決定された³⁾。現在では、cDNA の構造解析からサル⁴⁾、ウサギ⁵⁾⁶⁾、ラット⁷⁾ の TFPI のアミノ酸配列が明らかになっている (図 1)*1。これらの構造をもとにして、後に記すように、哺乳動物細胞や酵母、大腸菌などを用いて、組換え体が大量に調製されるようになった。しかし、ヒト血漿由来の TFPI の構造に関する研究は非常に少なく、正常血漿あるいはヘパリン投与後血漿から精製された TFPI の部分アミノ末端配列が報告されているに過ぎない⁸⁾⁹⁾。

ヒト TFPI は 28 残基のシグナルペプチドが切断されて生じる 276 残基からなる 1 本鎖の糖蛋白質で、3 つの Kunitz 型阻害領域 (K1, K2,

図1 ヒトおよびサル、ウサギ、ラットの TFPI のアミノ酸配列の比較

ヒト TFPI と同じアミノ酸残基を線で囲んだ。アミノ酸残基番号はヒト TFPI の配列に従った。矢印はシグナルペプチダーゼの切断位置。←k1, k2, k3 領域。①: 糖鎖の結合するアスパラギン残基

K3) からなるプロテアーゼインヒビターである。図2に示した-s-s-結合は他のKunitz型インヒビターとの相同性から類推されたものである。これらの3つのKunitz型阻害領域はヒトやサル、ウサギ、ラット TFPI 共に非常に高い相同性を示している。Ikeo らが種々の Kunitz

型インヒビターの構造のコンピューター解析により、その系統樹を作成した結果によると、K1とK2は、比較的早い時期にK3から分かれたことが示されている¹⁰⁾。

TFPI にはいくつかの翻訳後修飾部位がある。その1つは糖鎖結合で、ヒト、サルおよび

図 2 TFPI-1 (A) と TFPI-2 (B) の二次構造

矢印は Kunitz 型阻害領域の阻害部位あるいは、阻害部位に相当するアミノ酸残基

ラット TFPI には 3 つの, ウサギ TFPI には 5 つの Asn 型糖鎖の結合しうる箇所がある。しかし, これら全てに糖鎖が結合しているかどうかは明らかではない。実際に, 中原らは CHO 細胞由来のヒト TFPI 組換え体の構造解析により, Asn 型糖鎖の 3 つの結合部位のうち 2 つしか糖鎖は結合しておらず, また 0-グルコシド型糖鎖の存在も見いだしている¹¹⁾。また, 胎児の腎臓由来の 293 細胞の産生する TFPI の組換え体には硫酸化された糖鎖が存在することが報告されている¹²⁾。さらに HepG2 細胞の産生する TFPI やマウス C127 fibroblast 由来の TFPI 組換え体の 2 番目のセリン残基の一部がリン酸化されていることも明らかにされている¹³⁾。しかし, これら翻訳後修飾の意義については明らかになっていない。

なお、血漿 TFPI や組換え体 TFPI の精製操作中に、C 末端側の塩基性領域が欠損したものが混入し、後に記すようにその阻害活性が低下するので注意を要する¹⁴⁾¹⁵⁾。この分解反応を触媒するプロテアーゼは未だ同定されていないが、すでに血漿中にも C 末端側の欠損した TFPI が存在するという報告もある⁷⁸⁾。

ごく最近、もう1種のTFPIが存在することが明らかにされ¹⁶⁾、TFPIをめぐる問題は一層複雑になってきた。先に発見されたTFPIは

TFPI-1、後から発見された TFPI は TFPI-2 とよばれ、両者の構造を図 2 に比較して示す。両者のアミノ酸配列は似ているが、大きく異なる点がある。TFPI-2 の K2 と K3 の阻害部位に相当するアミノ酸残基は、アルギニンが、それぞれ、グルタミン酸とセリンに変わっており、従って、TFPI-2 には Xa 因子を阻害する作用はほとんどなく、組織因子に結合した VIIa 因子の活性を阻害する作用のみを示す。また、C 末端側の塩基性アミノ酸が集中する領域は TFPI-2 にも存在するので、ヘパリンやリポ蛋白質と結合する性質は TFPI-1 と同じと考えられるが、もう 1 つのヘパリン結合領域である K3 については、TFPI-1 に比べて塩基性アミノ酸が 3 つ少なく、この領域にヘパリン結合能があるかどうかは明らかでない。一方、宮崎らは、ガン細胞の培養液中に含まれるトリプシンインヒビターを精製し、その部分アミノ酸配列に基づいて、その cDNA をクローニングして構造を決定したところ、すでに報告されていた placental protein 5 (PP5)¹⁸⁾ および最近報告された TFPI-2 と同じであることを明らかにした¹⁷⁾。彼らの結果によると、TFPI-1 の主な合成場所が内皮細胞であるのに対し、TFPI-2 は肝臓でも合成され、また、胎盤では極めて多量の mRNA の発現がみられている。TFPI-2 の機能

(1) Xaの阻害 ドメイン
Kunitz 2, C末端側領域 $-Ca^{2+}$

+PL, $+Ca^{2+}$

(2) VIIa-TFの阻害 Kunitz 1 $-Xa, +Ca^{2+}$

+Xa, $+Ca^{2+}$

図3 TFPIの阻害機構

PL: リン脂質

YYY: Xa 因子の Gla 領域

TF: 組織因子

は TFPI-1 とは異なると考えられるが, TFPI-2 については報告が少なく, 不明の点が多い. 以下に記す TFPI の性質や臨床的意義については, 全て, TFPI-1 についての結果である.

2. TFPI の阻害機構と構造との関係

TFPI は K2 領域との結合により Xa 因子活性を, K1 領域との結合により, 組織因子と結合した VIIa 因子活性を阻害する. しかし, TFPI の最も特徴的な阻害活性は, Xa 因子と結合することにより, リン脂質表面上における組織因子と VIIa 因子複合体と図 3 (2) に示すような 4 量体を形成し, 外因系凝固の開始反応を阻害することにある. つまり, 一度, 外因系凝固反応が開始され, VIIa 因子や Xa 因子が生成して初めて TFPI が効率良く阻害反応を発揮することになる. TFPI による阻害反応は Xa 因子活性の阻害については詳しい反応速度論的解析がされており^{19)~21)}, 表 1 に示すように, final Ki の方が initial Ki にくらべてはるかに小さく, Kunitz 型インヒビターの典型的な阻害機構である slow and tight inhibition の反応機構であることが明らかにされている. このような TFPI の阻害作用は, K1 と K2 の阻害領域によるが, それらの領域の間を限定分解すると, それぞれの阻害活性は減少し, 両者が存在する

ことが必要であると考えられている²²⁾. また C 末端側の塩基性部分も, 阻害活性に重要で²³⁾, Xa 因子の Gla 領域と結合することにより, K2 と Xa 因子との結合を補強している (図 3 (1)).

TFPI による阻害機構のもう一つの特徴はヘパリンにより増強されることにあり, TFPI による血漿の凝固時間 (PT) の延長作用はヘパリンや他の多糖硫酸エステルにより増強される²⁴⁾²⁵⁾. この増強作用は, C 末端側の塩基性部分 (HBS-1) にヘパリンが結合することによると考えられた. ヘパリンの効果を TFPI による Xa 因子の阻害活性でみると, 全長 TFPI を用いると, 増強作用は見られないが, TFPI-C の阻害作用は著しく増強され, initial Ki が減少する (表 1). このことは, C 末端側塩基性部分以外にヘパリン結合領域が存在することを示しており, Wesselschmidt らは K3 をもたない TFPI の組換え体を用いて K3 にヘパリン結合部位があることを示唆した⁴⁶⁾. 実際に, われわれは, TFPI 組換え体の各ドメインを限定分解により分離し, また, 種々の合成ペプチドを用いることにより, K3 領域の一部がもう一つのヘパリン結合領域 (HBS-2) であることを明らかにした²¹⁾. また, 蛍光標識したヘパリンを用い

表 1 TFPI による Xa 因子の阻害

	Ki	Ki*	k3	k4
TFPI				
			min ⁻¹	
(1) TFPI のみ	1.24 nM	26.4 pM	0.741	0.0161
(2) Ca ²⁺	42.7	85.2	2.50	0.0050
(3) +ヘパリン, +Ca ²⁺	3.13	30.9	3.077	0.0307
(4) +リン脂質 +Ca ²⁺	14.6	65.2	1.18	0.0053
TFPI-C				
(1) TFPI-C のみ	6.79	110	1.04	0.019
(2) +ヘパリン	1.79	162	0.938	0.075

Ki: initial Ki=k2/k1

Ki*: final Ki= (Ki) (k4)
k3+k4

TFPI の反応速度定数は文献 19 より, TFPI-C の反応速度定数は文献 47 より引用した。前者は 25°C, 後者は 37°C で測定したものである。

て, HBS-2 との解離定数を求め, 830 nM の強い結合であることを明らかにした⁴⁷⁾。図 4 に, これら 2 つのヘパリン結合領域, HBS-1 と HBS-2, と他のヘパリン結合蛋白質のアミノ酸配列を比較して示す。HBS-1 はアミノ酸配列上に塩基性アミノ酸残基が集中して存在する部位であるのに対し, HBS-2 は高次構造が形成されることにより, 塩基性アミノ酸残基の集中した部位が形成される。図 5 に TFPI の K1, K2, K3 の立体構造を示すが, 明らかに, K3 にのみ, そのような領域が見られる。TFPI による Xa 因子活性の阻害活性はカルシウムの存在により大きく減少するが, ヘパリンを加えることにより, その阻害活性はもとに回復する (表 1)。このことはカルシウムが Xa 因子の Gla 領域に結合することにより HBS-1 との結合が妨げられるがヘパリンが HBS-2 と結合することにより TFPI と Xa 因子の相互作用が強くなることを示すと考えている (図 3 (1))。これら 2 つのヘパリン結合領域は内皮細胞表面のヘパラン硫酸との結合においても重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。TFPI と細胞の結合については, 常時, 組織因子を発現しているガン細胞を用いて調べられており²⁶⁾²⁷⁾,

それらの結果によると, 3 つの結合様式が考えられている。1 つは, 細胞膜上の組織因子に VIIa 因子が結合し, その複合体に Xa 因子依存性に結合する機構, もう 1 つは, TFPI と Xa 因子の複合体が Xa 因子のリセプターを介して結合する機構である。3 つ目は TFPI が直接, 細胞表面のヘパラン硫酸などと結合する機構で, この場合のみ, ヘパリンにより TFPI が遊離される。したがって, 1 つ目の結合様式による場合は, TFPI のヘパリン結合領域は必要ではなく, Hamamoto らは, K3 と C 末端側領域をもたない TFPI₁₋₁₆₁ でも全長の TFPI と同じ阻害効果が得られることを報告している²⁸⁾。これらの結合様式は恐らく, 細胞によって異なると考えられ, 未だ明らかでない点が多い。

TFPI の血漿中濃度は低いので, 生体内では血漿中の TFPI そのものが血液凝固の開始反応の制御に関与している可能性は少なく, 細胞表面に結合した TFPI の役割が重要であると考えられる。実際に, 内皮細胞のモノレイヤーに VIIa 因子と X 因子を加えて, X 因子の活性化を flow model で解析した結果によると, TFPI の抗体で処理しないと, X 因子の活性化はほとんど起こらなかった^{48)~50)}。

図 4 TFPI のヘパリン結合領域と他のヘパリン結合蛋白質のヘパリン結合領域との比較

(A) TFPI のヘパリン結合領域 (HBS-2) との比較

(B) TFPI のヘパリン結合領域 (HBS-1) との比較

Fn=fibronectin, TS=thrombospondin, LpL=lipoprotein lipase, HTGL=hepatic triglyceride lipase, ECGF=endothelial cell growth factor, aFGF=acidic fibroblast growth factor, THR=thrombin, NCAM=neural cell adhesion molecule, and GDN=glial-derived nexin.

Vn= vitronectin, γ IP-10=10 kilodalton gamma-interferon inducible protein, HRG=histidine-rich glycoprotein, Pn=purpurin, β TG=beta-thromboglobulin, AT-III=antithrombin III, HC-II=heparin cofactor II, bFGF=basic fibroblast growth factor, LPC=lipocortin, PCI=protein C inhibitor. 文献 77 より引用

TFPI のもう一つの重要な性質であるリポ蛋白質との結合については、LDL と組換え体 TFPI を用いた結果から、ヘパリン結合部位でもある C 末端側の塩基性部位であることが明らかにされている²⁹⁾。しかし、これらの実験では、リポ蛋白質と TFPI の結合は、それほど強くない。それに反し、血漿中のリポ蛋白質に結合した TFPI は容易に遊離せず、どのような機構により結合しているのか明らかでない点が多い。HDL と TFPI との結合については、アポリポ蛋白 AII と -s-s- 結合により架橋されていると報告されているが、詳細は明らかでない。なお、リポ蛋白質に結合した TFPI の K3 領域は直接にはリポ蛋白質とは結合していないが、われわれの調製した K3 領域を認識するモノクローナル抗体はリポ蛋白質結合型 TFPI と反応せず、K3 領域がリポ蛋白質にマスクされていることが示されている³⁰⁾。われわれは、このこ

とを利用し、血漿中の遊離型 TFPI のみを測定する方法を開発した³¹⁾。TFPI の機能領域をまとめて図 6 に示した。

II. TFPI の発現と存在様式

ヒト TFPI は8つのイントロンに分断された9つのエキソンからなる約85 kbの大きな遺伝子から発現する^{32)~34)}。エキソン9にはpolyadenylation siteが2カ所あり、4 kbと1.4 kbの2種類のmRNAが発現する³⁵⁾。その染色体上の位置は、in situ hybridizationによって、2q31-32.1に、連鎖解析によって、多型マーカーD2S43より36 cM、クリスタリン γ 鎖の遺伝子より13 cMに位置することが明らかになっている。TFPIの発現部位は主に、内皮細胞で、肝臓ではほとんど発現しないのが特徴的である。これらの結果は、培養内皮細胞をもちいた実験からも確認されている³⁶⁾。組織染色の結果

図 5 TFPI の K1, K2, K3 領域の立体構造の比較
bovine pancreatic trypsin inhibitor の高次構造をもとに各ドメインの酸性および塩基性アミノ酸残基の分布を示した。
○：酸性アミノ酸，●：塩基性アミノ酸，■：ヘパリン

図 6 TFPI の機能領域

からは、内皮細胞以外に、巨核球やマクロファージにおける存在が認められている³⁷⁾³⁸⁾。内皮細胞については、とくに毛細血管や細静脈に強く認められている。血小板には TFPI が存在することが証明されており、また、TFPI の発現については、培養内皮細胞や単球を用いて研究されている^{39)~41)}。これらの細胞を用いて、組織因子と TFPI の発現の変化について研究した結果によると、組織因子がエンドトキンの刺激により、すみやかに増加後、減少するのに対して、TFPI は、エンドトキンの影響を受けず、直線的に増加する(図 7, 表 2)。TFPI の発現が、エンドトキンや種々のサイトカインにより誘導されないのは、TFPI 遺伝子の 5' 側上流の

塩基配列のなかに、それらの responsible element が存在しないため³²⁾³³⁾⁴²⁾、constitutive に発現する遺伝子と考えられている。TFPI の発現は現在のところ PMA のみによって誘導され、それは AP-1 様エレメントが存在するからであると考えられる。

血漿中における TFPI は VLDL/LDL 結合型、HDL 結合型および遊離型の 3 つの形として分布している。血漿をゲル濾過により分離すると、それらの 3 つの型に分離することができるが、遊離型については、食塩濃度の低い緩衝液中では、回収率が悪いために、従来、遊離型 TFPI は非常に少ないと考えられていた。われわれは 1 M NaCl 中での迅速分離法を確立

し⁴³⁾、患者血漿の分析に用いているが、図 8 に示すように約 40% が遊離型である。これら血漿中の TFPI は内皮細胞で合成され、遊離型として直接、あるいはプロテオグリカン結合型 TFPI から放出され、その一部がリポ蛋白質結

合型になると考えられる。リポ蛋白質と TFPI との結合は非常に強く、また、ヘパリン結合部位がマスクされているので、再び内皮細胞結合型に変化する可能性は少ない。リポ蛋白質結合型 TFPI の意義は明らかではないが、TFPI の代謝の過程とも考えられる。それに反し、遊離型 TFPI は内皮細胞結合型 TFPI と平衡関係にあると考えられ、内皮細胞の抗血栓性機能の変化を知るうえで重要であると考えている。これら、血漿中 TFPI の多様性を図 9 に示した。

リポ蛋白質のどの成分と TFPI が結合しているのかについては、明らかではないが、TFPI の一部がリポプロテイン a と結合して存在している可能性が指摘されている⁴⁴⁾。なお、血漿中 TFPI の分布については動物によってかなり異

図 7 内皮細胞による TFPI の発現
ヒト臍帯培養内皮細胞を LPS で刺激後、細胞結合型の組織因子活性(A)と培養液中に分泌された TFPI 活性 (B) を測定した。写真は、TFmRNA (A) と TFPI mRNA (B) のノーザンブロットを示す。黒丸は LPS 処理、白丸はコントロール。文献 39 より引用

表 2 単球の培養中に発現した組織因子と TFPI の mRNA のレベル

単球の 培養時間	組織因子		TFPI	
	DNA	mRNA	DNA	mRNA
0 h	0.27	22.0	0.35	46.2
3 h	0.63	50.9	0.65	83.6
24 h	0.52	42.5	1.03	133.3
48 h	0.53	42.6	1.70	220.0

DNA (μg): ヒト単球をエンドトキシン存在下で培養し、各時間で RNA を分離し、PCR により増幅した、組織因子および TFPI cDNA の量。mRNA (copies/cell): PCR により増幅した DNA 量より計算式で求めたもの。文献 41 の表 1 を改変

図 8 血漿のゲル濾過によるリポ蛋白質結合型および遊離型 TFPI の分離
ヒト正常血漿を 1 M NaCl (●) あるいは 0.15 M NaCl (○) 中で、Superdex 200 により分離した。文献 43 より引用。

Intravascular Distribution of TFPI

図 9 TFPI の存在様式の多様性

なるので注意を要する。たとえば、サルではヒトと同じゲル濾過のパターンを示すが、ラットでは大きく異なり、ウサギの場合はリポ蛋白質結合型がほとんどない⁴⁵⁾。このような差は、TFPI の性質による可能性もあるが、むしろ、リポ蛋白質の成分の違いによる可能性が高い。

III. TFPI と疾患

TFPI の生体内における役割については、TFPI の抗体により TFPI を除去した動物や、DIC を引き起こした動物における血栓の抑制に TFPI の投与が有効であることや、TFPI の性質から考えると、内皮細胞の抗血栓性機能に関与していると考えられてきた。一方、種々の疾患において TFPI が変動していることが報告されているが (図 10)、血栓症との関係は明確ではない。その原因の一つは測定法に問題があることが挙げられる。TFPI の検出は、最も一般的には希釈した血漿を Xa 因子および組織因子、VIIa 因子と混合して TFPI との複合体を形成させ、残った組織因子・VIIa 因子の活性を X 因子を加え、活性化された Xa 因子の活性を合成基質により測定する方法がとられている。その他に、Xa 因子や組織因子・VIIa 因子複合体の活性を阻害する活性を直接、合成基質を用いて測定する方法もあるが、感度、特異性の面で一般的ではない。しかし、X 因子の活性化反応を利用する測定法でもアンチトロンビン III の影響も考慮する必要がある。初めに Xa 因

(A) TFPI の上昇

- (1) Postoperative/posttraumatic septicemia. (文献 51)
- (2) Acute coronary disease (文献 52)
- (3) Physical exercise (long term run) (文献 53)
- (4) Cancer (文献 54)
- (5) Familial hypercholesterolemia (文献 55)
- (6) Lung disease (文献 56)
- (7) uremic patients on regular hemodialysis (文献 57)

(B) TFPI の減少

- (1) DIC (文献 58)

(2) abetalipoproteinemia

hypobetalipoproteinemia (文献 59)

(C) TFPI の変動なし (文献 58, 60)

hepatocellular disease, chronic warfarin therapy, lupus anticoagulant, deep venous thrombosis

図 10 種々の疾患における TFPI の変動

子を加える上記の測定法は比較的アンチトロンビン III の影響を受けにくい方法であり、精製した因子を組み合わせた実験によると、ヘパリン存在下でも、非存在下でも組織因子・VIIa 因子の阻害活性は TFPI のほうがはるかに強い⁶¹⁾。しかし、アンチトロンビン III の血漿中濃度が TFPI にくらべて 1,000 倍以上高いので、注意する必要がある。一方、TFPI 抗原量については、TFPI 組換え体のポリクローナル抗体やモノクローナル抗体、アミノ末端側あるいはカルボキシル末端側の合成ペプチドに対する抗体などを用いて測定できる⁶²⁾。現在、市販さ

図 11 高脂血症と TFPI 活性

健康人および高脂血症患者の血漿をゲル濾過後、LDL/VLDL 結合型 TFPI (A), HDL 結合型 TFPI (B) および遊離型 TFPI (C) の活性を測定した。(1) 健康人, (2) 高脂血症患者, (3) プラズマフェレーシスを 2 週間毎に受けている高脂血症患者。文献 43 より引用

れている唯一の方法は、ADI 社の K1 および K2 を認識するモノクローナル抗体を組み合わせた EIA 法で、リポ蛋白質結合型と遊離型 TFPI の両方を測定できると思われる*2。そのほかに、プロットング後 TFPI を検出する方法としては、放射標識した Xa や VIIa 因子、あるいは抗体を用いて検出する方法がある⁶²⁾。

いずれにしても、いままでの各疾患と TFPI との関係についての研究は全血漿中の TFPI 濃度を測定したものである。しかし、この方法では、先に記したように、TFPI の存在様式は非常に複雑であり、それぞれの疾患における抗血栓性機能の変化を正確に反映しているのか大いに問題がある。われわれは、先に記したように、ゲル濾過法により血漿中の LDL/VLDL 結合型、HDL 結合型、遊離型の TFPI 活性を分別定量する方法を確立し、高脂血症患者の解析に応用した⁴³⁾。高脂血症患者では、血漿中の全 TFPI 活性とコレステロール濃度とが弱い正の相関をしめすが、それは、LDL 結合型 TFPI の増加によることが明らかとなった⁶⁵⁾。コレステロールの増加に伴い LDL が増加し、そのことが LDL 結合型 TFPI の増加につながる

高コレステロール食を摂取させたサルを用いた実験からも確かめられた⁶³⁾。しかし、高脂血症患者の血漿を先に記したゲル濾過法により詳しく解析すると、逆に遊離型 TFPI が減少していることが明らかとなった(図 11)。その原因は LDL の増加により LDL 結合型 TFPI が増加し、それに伴って遊離型 TFPI が減少したと考えるのが最も考えやすい。同様に、脳梗塞患者についても遊離型 TFPI の減少を見いだした⁶⁴⁾。血漿中の遊離型 TFPI が内皮細胞結合型 TFPI と平衡関係にあると仮定すると、上記の結果は、高脂血症患者では内皮細胞の抗血栓機能の低下を示している可能性がある。しかし、それならば、abetalipoproteinemia の患者に血栓症がみられないことをどう説明するのか問題となる。TFPI の変化だけでなく、他の因子との関係を総合して解析する必要がある。いずれにしても、内皮細胞結合型 TFPI を直接測定すれば良いが、血管内にヘパリンを投与すると、全血管内の内皮細胞結合型 TFPI を測定することになり、相当大的な変化があった場合しか検出できず、現在のところ未だ良い方法はない。なお、血漿のゲル濾過による遊離型 TFPI の活

表 3 血漿中の TFPI レベルの変動要因

(1) 内皮細胞における TFPI の合成速度と分解速度
(2) 内皮細胞表面のプロテオグリカンおよびその他の TFPI レセプターの合成速度と分解速度
(3) 内皮細胞結合型 TFPI と血漿中の遊離型 TFPI との平衡関係
(4) 血漿中におけるリポ蛋白結合型 TFPI と遊離型 TFPI の平衡関係
(5) リポ蛋白質結合型および遊離型 TFPI の代謝速度

性測定法は一度に多くの検体を処理できず、また、リポ蛋白質結合型と遊離型で、比活性が異なる可能性があるなどの欠点があったが、最近われわれは、遊離型 TFPI だけを認識するモノクローナル抗体を調製し³⁰⁾、血漿中の遊離型 TFPI を簡単に測定できる方法を開発し、高脂血症の解析に応用しつつある³¹⁾。このように、TFPI の測定法についてはまだまだ改良の余地があり、今後、さらに種々の疾患との関係を詳細に検討する必要がある。なお、TFPI の測定法を国際的に統一するための Interlaboratory study が国際血栓止血学会の Scientific and Standardization Committee で、進行中であり、9月のベルギーでの会合において、その結果が発表される予定である^{*3)}。いずれにしても、TFPI が種々の疾患で変動する機構は、今まで記してきたように極めて複雑で、その解釈には慎重を要する。その要因を表 3 にまとめて示した。

さて、先に記したように、TFPI の特徴的な性質から、新しい抗血栓性医薬として、研究の初期から TFPI の組換え体を用いようとする試みがなされてきており、ウサギやイヌ、ヒヒなどを用いて、DIC の治療や心筋梗塞の血栓溶解療法後の再閉塞防止などに有効であることが示されてきた。しかし、TFPI 組換え体の調製にあたっては、大腸菌や酵母、種々の動物細胞などが用いられ、それらの細胞により、糖鎖の修飾や C 末端側領域の欠損などに差があることその他、実際に医薬として用いる場合にはコストの低い方法が要求される。当初は動物細胞や酵母に産生させた全長 TFPI を用いて臨床応

図 12 ウサギ (各グループ 8 匹) に起こさせた静脈血栓に対する rTFPI 1-161 の効果。(1) プラセボ, (2) 低分子ヘパリン (60 抗 Xa ユニット), (3) TFPI 1-161 (0.1 mg/kg), (4) TFPI 1-161 (1.0 mg/kg), (5) TFPI 1-161 (10 mg/kg). 縦軸は血栓の重量. 文献 68 より引用.

用が試みられたが、現在では、酵母に産生させた、K3 および C 末端側領域をもたないもの (rTFPI₁₋₁₆₁) がノボ社により使用されてきており⁶⁶⁾、サール社でも大腸菌に変えつつあるようである⁶⁷⁾。わが国では化血研により CHO 細胞に産生させた組換え体を用いた臨床への応用が試みられている。以下に、組換え体 TFPI を用いた動物実験の結果を紹介したい。図 12 はウサギの頸静脈の一部を polidecanol (polyethylene glycol monododecyl ether) で障害することにより生成する血栓が、酵母により産生させた TFPI (rTFPI 1-161) により抑制されるという結果が示されている⁶⁸⁾。表 4 はヒヒに大腸菌を投与した時の生存時間が SK hepatoma cell により産生させた全長 rTFPI の投与により延長することを示したものである⁶⁹⁾。図 13 はウサギの耳動脈を crush-avulsion injury 法により障害させ、その吻合部位の開存率が局所に投与した全長 rTFPI の (大腸菌の産生した) により高くなることを示している⁷⁰⁾。

このように TFPI の組換え体は種々の動物実験で、その有効性が示されているが、血管内投与したものは、いずれも、まだ投与量が多い。rTFPI の半減期が比較的早いことから考えても⁷⁰⁾、少量で効果が期待できるような治療への応用、例えば、図 13 のような外科手術への応

表4 Weight, Sex, *E. coli* Dose and Survival Times of Control and TFPI-treated Baboons at +30 min*

	Weight Sex		Mean dose <i>E. coli</i>	Survival time
	kg		CFU/kg $\times 10^{10}$	h
Control (<i>E. coli</i> +excipient control)				
26	12.1	M	5.71	46.0
27	9.8	F	5.60	52.5
32	6.4	F	5.23	9.7
37	7.7	M	5.26	30.5
41	5.9	M	5.70	60.5
Mean	8.4		5.5	39.9
($\pm$ SE)	± 1.1		± 0.11	± 9.0
Experimental (<i>E. coli</i> +TFPI)				
29	8.0	M	4.84	>168
30	7.5	M	5.22	>168
31	7.3	M	6.05	>168
38	5.2	M	6.21	>168
40	6.1	M	6.15	>168
Mean	6.8		5.69	168
($\pm$ SE)	± 0.5		± 0.28	± 0.0

* TFPI administered 30 min after the onset of a 2-h infusion of *E. coli*.

文献69より引用

用や心筋梗塞の PTCA 術後の局所への投与による再閉塞の防止などへの応用に期待がもてるのではないだろうか。

おわりに

生体内のセリンプロテアーゼインヒビターの多くは serpin 型であり、ここで記した TFPI のような Kunitz 型インヒビターは少ない。basic pancreatic trypsin inhibitor を代表とする Kunitz 型阻害領域は他に Inter- α -trypsin inhibitor (urinary trypsin inhibitor) や Alzheimer's β amyloid precursor protein (Protease Nexin 2) などに存在する。もちろん、この他に存在する可能性もあり、そのような動機から TFPI-2 が発見された。TFPI は組織因子による凝固の開始反応を阻害する作用をもつ極めて特徴的なインヒビターで、ここでまとめたように、その性質が詳しく調べられ、疾患との関係についても多くの知見が得られつつある。しかし、その生体内意義を明らかにするた

図13 ウサギの耳動脈の手術後の吻合部位の開存率
ヘパリン:10 U/ml, TFPI:20 μ /ml
文献70より引用。

めに残された問題も多い。例えば、TFPI と内皮細胞との関係についてはほとんど明らかになっていない。TFPI の細胞のレセプターがどのような性質をもち、また TFPI の分解がどのような機構で起こるのか興味深い。最近、TFPI の肝細胞での分解には LDL receptor-related protein が関与していることが示唆されており⁷¹⁾、注目される。また、最近、組織因子に依存せず、外因系凝固反応が起こることが示されつつあり、直接、X 因子を活性化することができるとプロテアーゼが存在することが明らかにされてきた。このような組織因子非依存性の凝固反応と TFPI との関係についても興味もたれる。

TFPI の測定法の進歩と普及によって、今後、種々の疾患における TFPI の変動に関する報告はますます増加すると思われるが、その変動原因が内皮細胞における合成速度や内皮細胞からの遊離、リポ蛋白質との結合速度など、どのような要因に基づいているのか分子レベルあるいは細胞レベルで明らかにする必要がある。一方、抗血栓性医薬として今まではトロンビンのインヒビターが主役であったが、最近では Ecotin, (serine protease inhibitor from periplasma of *E. coli*)⁷²⁾ や DX-90 65a⁷³⁾、新しいタイプの urinary trypsin inhibitor⁷⁴⁾⁷⁵⁾ など、Xa 因子のインヒビターが注目されつつある。その意味からも TFPI の組換え体の抗血栓性医薬としての確立が期待される。

ここで記した著者らの研究は以下の共同研究

者との共同研究によってなされたものである。
円城寺慶一，宮田敏行，鑑谷武雄，粉川俊則，
斯波真理子，山本 章，都島基夫（国立循環器
病センター）

中村 伸（京都大学霊長類研究所）
神窪勇一，亀井慎太郎，中原 洋，宮本誠二，
中垣智弘，船津昭信（化学及血清療法研究所）

追 記

- *¹ 最近，イヌの TFPI の構造が報告された。Girard, T. J., Gailani, D., Broze, G.J. Jr.: Complementary DNA sequencing of canine tissue factor pathway inhibitor reveals a unique nanomeric repetitive sequence between the second and third Kunitz domains. *Biochem. J.* **303**: 923-928, 1994.
- *² 最近，同社より TFPI 活性測定用キットが発売された。
- *³ 著者らを含む 20 の登録施設に同じ 6 種類の試料が送られ，それらの TFPI 活性および抗原量のデータが集計されつつある。近く，Thromb Haemostas に発表される予定である。

総 説

- 1) 円城寺慶一：外因系血液凝固インヒビター。Biomedical Perspectives **2**: 289-301, 1993, メディカルレビュー社。
- 2) 加藤久雄：組織因子による血栓形成の制御の分子機構。最新医学 **49**: 927-937, 1994, 最新医学社。
- 3) Broze, G.J., Jr., Girard, T.J., Novotny, W.F.: Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry* **29**: 7539-7546, 1990.
- 4) Lindahl, A.K., Sandset, P.M., Abildgaard, U.: The present status of tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **3**: 439-449, 1992.
- 5) Rapaport, S.I., Rao, L.V.M.: Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb*, **12**: 1111-1121, 1992.
- 6) Novotny, W.F.: Tissue factor pathway inhibitor. *Seminars in Thromb Haemostas* **20**: 101-108, 1994.
- 7) 中村 伸：組織因子（Tissue Factor）研究の新展開。日本血栓止血学会誌，**4**: 203-217, 1993.
- 8) 東 昌市，岩永貞昭：凝固 VII 因子の機能と構造。

Annual Review 血液 1992, 243-254, 1992.

- 9) Ruf, W., Edgington, T.S.: Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis *in vivo*. *The FASEB Journal* **8**: 386-390, 1994.

文 献

- 1) Broze, G.J., Jr., Miletich, J.P.: Isolation of the tissue factor inhibitor produced by Hep G 2 hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci, USA* **84**: 1886-1890, 1987.
- 2) Wun, T.-C., Huang, M.D., Kretzmer, K.K., Palmier, M.O., Day, K.C., Bullock, J.W., Fok, K.F., Broze, G.J., Jr.: Immunoaffinity purification and characterization of lipoprotein-associated coagulation inhibitors from Hep G 2 hepatoma, Chang liver and SK hepatoma cells. A comparative study. *J Biol Chem* **265**: 16096-16101, 1990.
- 3) Wun, T.C., Kretzmer, K.K., Girard, T.J., Miletich, J.P., Broze, G.J. Jr.: Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem* **263**: 6001-6004, 1988.
- 4) Kamei, S., Kamikubo, Y., Hamuro, T., Fujimoto, H., Ishihara, M., Yonemura, H., Miyamoto, S., Funatsu, A., Enjyoji, K., Abumiya, T., Miyata, T., Kato, H.: Amino acid sequence and inhibitory activity of Rhesus monkey tissue factor pathway inhibitor (TFPI): Comparison with human TFPI. *J Biochem* **115**: 708-714, 1994.
- 5) Wesselschmidt, R.L., Girard, T.J., Broze, G.J. Jr.: cDNA sequence of rabbit lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nuc Acids Res* **18**: 6440, 1990.
- 6) Warn-Cramer, B.J., Broze, G.J. Jr., Komives, E. A.: cDNA sequence of rabbit tissue factor pathway inhibitor. *Nuc Acids Res* **20**: 3648, 1992.
- 7) Enjyoji, K., Emi, M., Mukai, T., Kato, H.: cDNA cloning and expression of rat tissue factor pathway inhibitor (TFPI) *J Biochem* **111**: 681-687, 1992.
- 8) Novotny, W.F., Girard, T.J., Miletich, J.P., Broze, G.J., Jr.: Purification and characterization of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor from human plasma. *J Biol Chem* **264**:

- 18832-19937, 1989.
- 9) Novotny, W.F., Palmier, M., Wun, T.C., Broze, G.J., Jr., Miletich, J.P.: Purification and properties of heparin-releasable lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood* **78**: 394-400, 1991.
- 10) Ikeo, K., Takahashi, K., Gojobori, T.: Evolutionary origin of a Kunitz-type trypsin inhibitor domain in the Amyloid beta precursor protein of Alzheimer's disease. *J Mol Evolution* **34**: 536-543, 1992.
- 11) 中原 洋, 神窪勇一, 宮田敏行, 加藤久雄: 組換えヒト TFPI の一次構造と糖鎖構造. *生化学* **66**: 1015, 1994.
- 12) Smith, P.L., Skelton, T.P., Fiete, D., Dharmesh, S. M., Beranek, M.C., MacPhail, L., Broze, G. Jr., Baenziger, J.U.: The asparagine-linked oligosaccharides on tissue factor pathway inhibitor terminate with SO 4-GalNAc β 1, 4 GlcNAc β 1, 2 Man α . *J Biol chem* **267**: 19140-19146, 1992.
- 13) Girard, T.J., McCourt, D., Novotny, W.F. MacPhail, L.A., Likert, K.M., Broze, G.J., Jr.: Endogenous phosphorylation of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor at serine-2. *Biochem J* **270**: 621-625, 1990.
- 14) Nordfang, O., Bjorn, S.E., Valentin, S., Nielsen, L.S., Wildgoose, P., Beck, T.C., Hedner U.; The C-terminus of tissue factor pathway inhibitor is essential to its anticoagulant activity. *Biochemistry* **30**: 10371-10376, 1991.
- 15) Wun, T-C., Kretzmer, K.K., Palmier, M.O., Day, K.C., Huang, M.D., Welsch, D.J., Lewis, C., Wolfe, R.A., Zobel, J.F., Lange, G.W., Frazier, R. B., Bild, G.S., Peel, M.A., Shell, R.E., Horn, N.A., Junger, K.D., Foy, B.A., Gustafson, M.E., Leimgruber, R.M., Novotny, W.F., Broze, G.J. Jr., Pyla, Y.E., Hippenmeyer, P.J., Warren, T.G.: Comparison of recombinant tissue factor pathway inhibitors expressed in human SK hepatoma, mouse C127, baby hamster kidney and Chinese hamster ovary cells. *Thromb Haemostas* **68**: 54-59, 1992.
- 16) Sprecher, C.A., Kisiel, W., Mathewes, S., Foster, D.C.: Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3353-3357, 1994.
- 17) Miyagi, Y., Koshikawa, N., Yasumitsu, H., Miyagi, E., Hirahara, F., Misugi, K., Umeda, M., Miyazaki, K.: cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: Identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. *J. Biochem* **116**: 939-942, 1994.
- 18) Blitzow, R., Huhtala, M-L., Bohn, H., Virtanen, I., Sppala, M.: Purification and characterization of placental protein 5. *Biochem Biophys Res Commun* **150**: 483-490, 1988.
- 19) Huang, Z-F., Wun, T-C., Broze, G.J., Jr.: Kinetics of factor Xa inhibition by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* **268**: 26950-26955, 1993.
- 20) Lindhout, T., Willems, G., Blezer, R., Hemker, H. C.: Kinetics of the inhibition of human factor Xa by full-length and truncated recombinant tissue factor pathway inhibitor. *Biochem J* **297**: 131-136, 1994.
- 21) 円城寺慶一, 加藤久雄, 神窪勇一: ヒト・リボ蛋白質結合性外因系血液凝固阻害因子 (TFPI) とヘパリンの結合. *生化学* **65**: 756, 1993.
- 22) Higuchi, D.A., Wun, T-C., Likert, K.M., Broze, G. J., Jr.: The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **79**: 1712-1719, 1992.
- 23) Wesselschmidt, R., Likert, K., Girard, T., Wun, T-C., Broze, G.J. Jr.: Tissue factor pathway inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa. *Blood* **79**: 2004-2010, 1992.
- 24) Wun, T-C.: Lipoprotein-associated coagulation inhibitor (LACI) is a cofactor for heparin: synergistic anticoagulant action between LACI and sulfated polysaccharides. *Blood* **79**: 430-438, 1992.
- 25) Valentin, S., Ostergaard, P., Kristensen, H., O. Nordfang, O.: Synergism between full length TFPI and heparin: evidence for TFPI as an important factor for the antithrombotic activity of heparin. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **3**: 221-222, 1992.
- 26) Pedersen, A.H., Nordfang, O., Norris, F., Wiberg,

- F.C., Christensen, P.M., Moeller, K.B., Meidahl-Pedersen, J., Beck, T.C., Norris, K., Hedner, U., Kisiel, W.: Recombinant human extrinsic pathway coagulation inhibitor. Production, isolation and characterization of its inhibitory activity on tissue factor-initiated coagulation reactions. *J Biol Chem* **265**: 16786-16793, 1990.
- 27) Callander, N.S., Rao, L.V.M., Nordfang, O., Sandset, P.M., Warn-Cramer, B., Rapaport, S.I.: Mechanism of binding of recombinant extrinsic pathway inhibitor to cultured cell surfaces. *J Biol Chem* **267**: 786-882, 1992.
- 28) Hamamoto, T., Yamamoto, M., Nordfang, O., Petersen, J.G.L., Foster, D.C., Kisiel, W.: Inhibitory properties of full-length and truncated recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI). Evidence that the third Kunitz-type domain of TFPI is not essential for the inhibition of factor VIIa-tissue factor complexes on cell surfaces. *J Biol Chem* **268**: 8704-8710, 1993.
- 29) Valentin, S., Nordfang, O., Bregengard C., Wildgoose, P.: Evidence that the C-terminus of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) is essential for its *in vitro* and *in vivo* interaction with lipoproteins. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **4**: 713-720, 1993.
- 30) 鎌谷武雄, 円城寺慶一, 加藤久雄, 神窪勇一: TFPI の第三 Kunitz ドメインとリポ蛋白質との関係: モノクローナル抗体を用いた解析. *生化学* **66**: 675, 1994.
- 31) 加藤久雄, 粉川俊則, 円城寺慶一, 鎌谷武雄, 洪 秀樹, 都島基夫, 神窪勇一: 遊離型 TFPI 抗原量の特異的測定法の開発と高脂血症への応用. *日本血栓止血学会誌* **5**: 368, 1994.
- 32) Girard, T.J., Eddy, R., Wesselschmidt, R.L., MacPhail, L.A., Likert, K.M., Byers, M.G., Shows, T.B., Broze, G.J. Jr.: Structure of the human lipoprotein-associated coagulation inhibitor gene. Intron/exon gene organization and localization of the gene to chromosome 2. *J Biol Chem* **266**: 5036-5041, 1991.
- 33) van der Logt, C.P.E., Reitsma, P.H., Bertina, R. M.: Intron-exon organization of the human gene coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor. The factor Xa dependent inhibitor of the extrinsic pathway of coagulation. *Biochemistry* **30**: 1571-1577, 1991.
- 34) Enjyoji, K., Emi, M., Mukai, T., Imada, M., Leppert, M.L., Lalouel, J.M., Kato, H.: Human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene: complete genomic structure and localization on the genetic map of chromosome 2 q. *Genomics* **17**: 423-428, 1993.
- 35) Girard, T.J., Warren, L.A., Novotny, W.F., Bejcek, B.E., Miletich, J.P., Broze, G.J., Jr.: Identification of the 1.4 kb and 4.0 kb messages for the lipoprotein associated coagulation inhibitor and expression of the encoded protein. *Thromb Res* **55**: 37-50, 1989.
- 36) Bajaj, M.S., Kuppuswamy, M.N., Saito, H., Spitzer, S.G., Bajaj, S.P.: Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: evidence that endothelium is the principal site of its synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8869-8873, 1990.
- 37) Werling, R.W., Zacharski, L.R., Kisiel, W., Bajaj, S.P., Memoli, V.A., Rousseau, S.M.: Distribution of tissue factor pathway inhibitor in normal and malignant human tissues. *Thromb Haemostas* **69**: 366-369, 1993.
- 38) 武井 明, 田代賀比古, 中川和憲, 円城寺慶一, 加藤久雄, 居石克夫: Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) の組織内局在に関する免疫組織化学的検討. *日本血栓止血学会誌* **4**: 319, 1993.
- 39) Ameri, A., Kuppuswamy, M.N., Basu, S., Bajaj, S.P.: Expression of tissue factor pathway inhibitor by cultured endothelial cells in response to inflammatory mediators. *Blood* **79**: 3219-3216, 1992.
- 40) van der Logt, C.P.E., Dirven, R.J., Reitsma, P.H., Bertina, R.M.: Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **5**: 211-220, 1994.
- 41) McGee, M.P., Foster, S., Wang, X.: Simultaneous expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes. A potential mechanism for localized control of blood coagulation. *J Exp Med* **179**: 1847-1854, 1994.

- 42) Tyson, D.R., Kuppuswamy, M.N., Broze, G.J. Jr., Bajaj, S.P.: Revised DNA sequence of exon 1 and 5' flanking region of the human tissue factor pathway inhibitor gene. *Thromb Res* **70**: 269-273, 1993.
- 43) 粉川俊則, 鎧谷武雄, 斯波真理子, 山本章, 加藤久雄, 洪秀樹, 都島基夫: リポ蛋白質結合性凝固インヒビター (Tissue factor pathway inhibitor) の測定法の確立と高脂血症への応用. *動脈硬化* **21**: 111, 1993.
- 44) Lesnik, P., Vonica A, Guerin M, Moreau M, Chapman MJ: Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp (a). *Arterioscler Thromb* **13**: 1066-1075, 1993.
- 45) Warn-Cramer, B.J., Maki, S.L.: Purification of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from rabbit plasma and characterization of its differences from TFPI isolated from human plasma. *Thromb Res* **67**: 367-383, 1992.
- 46) Wesselschmidt, R., Likert, K., Huang, Z., MacPhail, L., Broze, G.J., Jr.: Structural requirements for tissue factor pathway inhibitor interactions with factor Xa and heparin. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **4**: 661-669, 1993.
- 47) Enjyoji, K., Miyata, T., Kamikubo, Y., Kato, H.: Effect of heparin on the inhibition of factor Xa by tissue factor pathway inhibitor (TFPI); A part of the third kunitz domain is a heparin binding site. *Biochemistry*, in press, 1995.
- 48) Gemmell, C.H., Broze, G.J. Jr., Turitto, V.T., Nemerson, Y.: Utilization of a continuous flow reactor to study the lipoprotein-associated coagulation inhibitor (LACI) that inhibits tissue factor. *Blood* **76**: 2266-2271, 1990.
- 49) Lindhout, T., Biezer, R., Schoen, P., Nordfang, O., Reutelingsperger, C., Hemker, H.C.: Activation of factor X and its regulation by tissue factor pathway inhibitor in small-diameter capillaries lined with human endothelial cells. *Blood* **79**: 2909-2916, 1992.
- 50) Grabowski, E.F., Zuckerman, D.B., Nemerson, Y.: The functional expression of tissue factor by fibroblasts and endothelial cells under flow conditions. *Blood* **81**: 3265-3270, 1993.
- 51) Sandset, P.M., Roise, O., Aasen, A.O., Abildgaard, U.: Extrinsic pathway inhibitor in postoperative/posttraumatic septicemia: increased levels in fatal cases. *Haemostasis* **19**: 189-195, 1989.
- 52) Sandset, P.M., Sirnes, P.A., Abildgaard, U.: Factor VII and extrinsic pathway inhibitor in acute coronary disease. *Brit J Haematol* **72**: 391-396, 1989.
- 53) Hansen, J.B., Olsen, J.O., Osterud, B.: Physical exercise enhances plasma levels of extrinsic pathway inhibitor (TFPI). *Thromb Haemostas* **64**: 124-126, 1990.
- 54) Lindahl, A.K., Jacobsen, P.B., Sandset, P.M., Abildgaard, U.: Tissue factor pathway inhibitor with high anticoagulant activity is increased in post-heparin plasma from cancer patients. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **2**: 713-721, 1991.
- 55) Sandset, P.M., Lund, H., Norseth, J., Abildgaard, U., Ose, L.: Treatment with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in hypercholesterolemia induces changes in the components of the extrinsic coagulation system. *Arterioscler Thromb* **11**: 138-145, 1991.
- 56) de Moerloose, P., Benedetti, E.D., Nicod, L., Vifian, C., Reber, G.: Procoagulant activity in bronchoalveolar fluids: no relationship with tissue factor pathway inhibitor activity. *Thromb Res* **65**: 507-518, 1992.
- 57) Kario, K., Matsuo, T., Yamada, T., Matsuo, M.: Increased tissue factor pathway inhibitor levels in uremic patients on regular hemodialysis. *Thromb Haemostas* **71**: 275-279, 1994.
- 58) Bajaj, M.S., Rana, S.V., Wysolmerski, R.B., Bajaj, S.P.: Inhibitor of the factor VIIa-tissue factor complex is reduced in patients with disseminated intravascular coagulation but not in patients with severe hepatocellular disease. *J Clin Invest* **79**: 1874-1878, 1987.
- 59) Novotny, W.F., Brown, S.G., Miletich, J.P., Rader, D.J., Broze, G.J. Jr.: Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood* **78**: 387-393, 1991.
- 60) Warr, T.A., Rao, L.V.M., Rapaport, S.I.: Human

- plasma extrinsic pathway inhibitor activity: II plasma levels in disseminated intravascular coagulation and hepatocellular disease. *Blood* **74**: 994-998, 1989.
- 61) Broze, G.J., Jr., Likert, K., D. Higuchi, D.: Inhibition of factor VIIa/tissue factor by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **82**: 1679-1680, 1993.
 - 62) Girard, T.J., Broze, G.J. Jr.: Tissue factor pathway inhibitor. *Methods in Enzymol* **222**: 195-209, 1993. Ed. by L. Lorand, K.G. Mann, Academic Press, San Diego
 - 63) Abumiya, T., Nakamura, S., Takenaka, A., Takenaka, O., Yoshikuni, Y., Miyamoto, S., Kimura, T., Enjyoji, K., Kato, H.: Response of plasma tissue factor pathway inhibitor to diet-induced hypercholesterolemia in crab-eating monkeys. *Arterioscler Thromb* **14**: 483-488, 1994.
 - 64) 鑑谷武雄, 粉川俊則, 寺崎修司, 山口武典, 苅尾七臣, 加藤久雄: 脳梗塞患者における Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) 活性の検討. *日本血栓止血学会誌* **4**: 282, 1993.
 - 65) Hansen, J.B., Huseby, N.E., Sandset, P.M., Svensson, B., Lyngmo, V., Nordoy, A.S.: Tissue factor pathway inhibitor and lipoproteins. Evidence for association with and regulation by LDL in human plasma. *Arterioscler Thromb* **14**: 223-229, 1994.
 - 66) Petersen, J.G.L., Meyn, G., Rasmussen, J.S., Petersen, J., Bjorn, S.E., Jonassen, I., Christiansen, L., Nordfang, O.: Characterization of human tissue factor pathway inhibitor variants expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol chem* **268**: 13344-13351, 1993.
 - 67) Diaz-Collier, J.A., Palmier, M.O., Kretzmer, K.K., Bishop, B.F., Combs, R.G., Obukowicz, M.G., Frazier, R.B., Bild, G.S., Joy, W.D., Hill, S.R., Duffin, K.L., Gustafson, M.E., Junger, K.D., Grabner, R.W., Galluppi, G.R., Wun, T.-C.: Refold and characterization of recombinant tissue factor pathway inhibitor expressed in *Escherichia coli*. *Thromb Haemostas* **71**: 339-346, 1994.
 - 68) Holst, J., Lindblad, B., Bergqvist, D., Nordfang, O., Ostergaard, P.B., Petersen, J.G.L., Nielsen, G., Hedner, U.: Antithrombotic effect of recombinant truncated tissue factor pathway inhibitor (TFPI 1-161) in experimental venous thrombosis—a comparison with low molecular weight heparin. *Thromb Haemostas* **71**: 214-219, 1994.
 - 69) Creasey, A.A., Chang, A.C.K., Feigen, L., Wun, T.-C. Taylor, F.B., Jr., Hinshaw, L.B.: Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J Clin Invest* **91**: 2850-2860, 1993.
 - 70) Khouri, R.K., Koudsi, B. Kaiding, F., Ornberg, R. L., Wun, T.-C.: Prevention of thrombolysis by topical application of tissue factor pathway inhibitor in a rabbit model of vascular trauma. *Ann Plast Surg* **30**: 398-404, 1993.
 - 71) Warsh, J., Jr., Schwartz, A.L.: The low density lipoprotein receptor-related protein mediates the cellular degradation of tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6664-6668, 1994.
 - 72) Seymour, J.L., Lindquist, R.N., Dennis, M.S., Moffat, B., Yansura, D., Reilly, D., Wessinger, M. E., Lazarus, R.A.: Ecotin is a potent anticoagulant and reversible tight-binding inhibition of factor Xa. *Biochemistry* **33**: 3949-3958, 1994.
 - 73) Hara, T., Yokoyama, A., Ishihara, H., Yokoyama, Y., Nagahara, T., Iwamoto, M.: DX-9065 a, a new synthetic, potent anticoagulant and selective inhibitor for factor Xa. *Thromb Haemostas* **71**: 314-319, 1994.
 - 74) Nii, A., Morishita, H., Yamakawa, T., Matsusue, T., Hirose, J., Miura, T., Isaji, M., Horisawa, Y., Sugihara, K., Kanamori, T., Umeyama, H.: Design of variants of the second domain of urinary trypsin inhibitor (R-020) with increased factor Xa inhibitory activity. *J Biochem* **115**: 1107-1112, 1994.
 - 75) Morishita, H., Tamakawa, T., Matsusue, T., Kusuyama, T., Sameshima-Aruga, R., Hirose, J., Nii, A., Miura, T., Isaji, M., Horisawa-Nakano, R., Nagase, Y., Kanamori, T., Nobuhara, M., Tanaka, R., Koyama, S., Naotsuka, M.: Novel factor Xa and plasma kallikrein inhibitory activities of the second Kunitz-type inhibitory domain of urinary trypsin inhibitor. *Thromb Res* **73**: 193-204, 1994.

-
- 76) Palmier, M.O., Hall, L.J., Reisch, C.M., Baldwin, M.K., Wilson, A.G., Wun, T.-C. : Clearance of recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in rabbits. *Thromb Haemostas* **68** : 33-36, 1992.
- 77) Cardin, A.D., Weintraub, H.J.R. : Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arterioscler* **9** : 21-32, 1989.
- 78) Broze, G.J.Jr., Lange, W., Duffin, K.L., MacPhail, L. : Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul. Fibrinolys* **5** : 551-559, 1994.
-