

- 8) Fujioka M *et al* : ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuro-inflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci* **33** : 1107-1115, 2012
- 9) Chauhan AK *et al* : ADAMTS13 : a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med* **205** : 2065-2074, 2008
- 10) Koizumi J *et al* : Experimental studies of ischemic brain edema. I : a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* **8** : 1-8, 1986
- 11) De Meyer SF *et al* : Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* **120** : 5217-5223, 2012
- 12) Gandhi C *et al* : ADAMTS13 deficiency exacerbates VWF-dependent acute myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* **120** : 5224-5230, 2012
- 13) Doi M *et al* : ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* **108** : 1236-1238, 2012
- 14) Banno F *et al* : Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem* **279** : 30896-30903, 2004
- 15) Banno F *et al* : The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of *in vivo* thrombus formation. *Blood* **113** : 5323-5329, 2009

# ADAMTS13と血栓性血小板減少性紫斑病

小亀浩市

### はじめに

難病(厚生労働省が難治性疾患克服研究事業の対象としている疾患)の一つに血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP)がある。血小板減少症と溶血性貧血を呈し、時に腎障害や精神神経障害、発熱を併発する疾患で、長いあいだ原因不明とされてきた。その病態はO157等の病原性大腸菌感染による溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome : HUS)と類似しており、両者とも血栓性微小血管障害症(thrombotic microangiopathy : TMA)に属する。von Willebrand factor (VWF)切断酵素ADAMTS13の存在が明らかになって以来、TTPに関する研究は飛躍的に進展した。本稿では、ADAMTS13研究に初期から携わってきた筆者らの成果を中心に、TTP研究の進歩を紹介する。

#### Key word

ADAMTS13  
von Willebrand factor  
血小板  
血栓  
血栓性血小板減少性紫斑病

ADAMTS13 and thrombotic thrombocytopenic purpura  
Koichi Kokame :  
Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute  
国立循環器病研究センター研究所 分子病態部

### I. TTPの初報告からADAMTS13の発見まで

16歳の少女が突然に全身性の症状に襲われ、数日で死に至った経過が1924年に報告された<sup>1)</sup>。病理検査で諸臓器の細小動脈に硝子様血栓が観察されたことなどを踏まえ、TTPの最初の報告とされている。その約60年後、TTP患者の血漿に異常に高分子量化したVWFが存在すること<sup>2)</sup>や、TTPの血栓はVWFを多く含むこと<sup>3)</sup>が示された。

なぜ患者血漿に異常高分子量VWFが存在するのかという疑問は、血漿のVWF切断活性を測定する方法の発明<sup>4)</sup>で解決に向かい、VWF切断酵素の活性低下がTTP発症の原因となると予想された。そして数年後、VWF切断酵素の精製とcDNAクローニングが報告された<sup>5)</sup>。一方、先天性TTP患者家系の遺伝子連鎖解析が行われ、責任遺伝子としてADAMTS13が同定された<sup>6)</sup>。VWF切断酵素とADAMTS13の一次構造が完全に一致したことで、TTP = ADAMTS13欠損症という概念が生まれ、TTPの分子病態研究が本格化した。

### II. VWFとADAMTS13とTTPの関係

止血反応の初期には、血小板凝集が起こる。VWFは、血小板同士の結合を橋渡しする重要なタンパク質である。主に血管内皮細胞や骨髄巨核球で合成され、ポリペプチド鎖(モノマー)が数十個、直鎖状に共有結合した巨大マルチマー(>20,000kDa)として分泌され

る。分子量が大きいほど、血小板凝集能は高い。通常、ADAMTS13で適度に切断されて500~15,000kDaという分子量分布で存在するが、何らかの理由でADAMTS13の活性が失われると異常高分子量VWFマルチマーが残存する。異常高分子量VWFマルチマーは血小板を過剰に凝集させるため、細小血管に血栓が生じる(図1)。TTPの病態は、以下のように説明できる。過剰凝集により血小板が消費されると循環血液中の血小板数は減少し(血小板減少症)、血栓で生じた血管狭窄部位を通過することで赤血球は破碎される(溶血

性貧血)。多数の血栓で腎臓の細小血管が閉塞すると腎機能が障害され、大脳の細小血管が閉塞すると精神神経障害が起こる。

TTPは、先天性と後天性に分類される。先天性TTPはUpshaw-Schulman syndrome (USS)とも呼ばれ、ADAMTS13遺伝子異常を原因とする劣性遺伝様式の疾患である。一方、後天性TTPではADAMTS13活性に対する阻害性抗体が生じていることが多く、そのため、自己免疫疾患の一種とすることができる。

### Ⅲ. ADAMTS13の構造

ADAMTS13は、その名が示す通りADAMTSファミリー(ヒトの場合19遺伝子)に属する亜鉛型メタロプロテアーゼである。主に肝臓の星細胞で合成され、1,427アミノ酸残基、分子量約190kDaで、多くの構造単位を持つ(図2)。VWFを切断するにはMドメインからSドメインまでが必須であり、それよりC末端側部分は*in vitro*の反応系では必要ない。我々は、VWF認識に重要なDドメインからSドメインまでの立体構造をX線解析で決定した<sup>9)</sup>。その結果、予想外にもDドメインはディスインテグリン様の構造ではないこと、CドメインとDドメインの骨格構

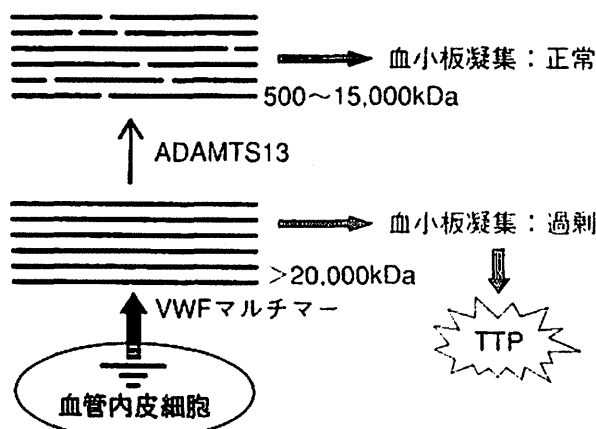


図1. TTPの発症メカニズム

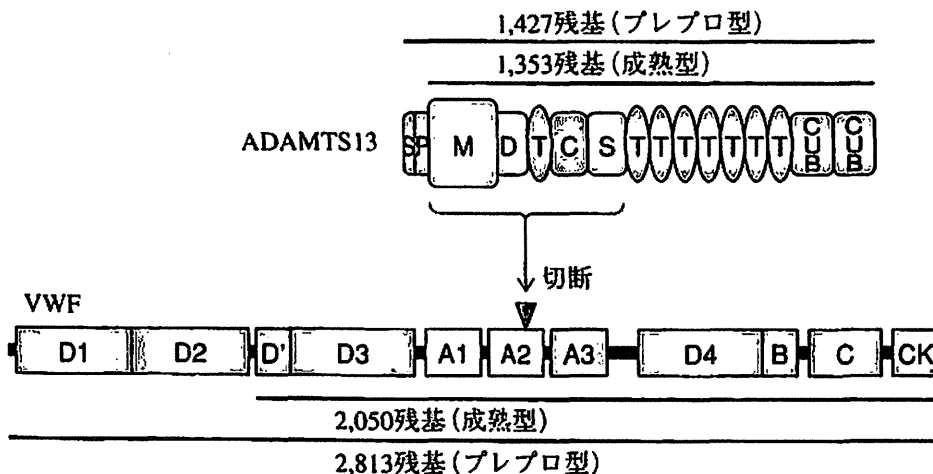


図2. ADAMTS13およびVWFのドメイン構成

造は相同であること、Sドメインは球状構造であること、空間的に離れた3カ所のVWF結合エキソサイトが直線状に並んでいることなど、様々な特徴を明らかにした。基本構造はADAMTSファミリー内で保存されていると考えられるので、複数のエキソサイトを介した基質認識機構はADAMTS分子に共通の特性であると予想された。事実、ADAMTS5でも類似の基質認識機構が示唆された<sup>10)</sup>。

#### Ⅳ. ADAMTS13によるVWFの切断

VWFも、複数のドメイン構造からなる(図2)。血管損傷部位の内皮下組織(コラーゲン)と血小板の結合あるいは血小板同士の結合には、主にA1およびA3ドメインが直接関与する。ADAMTS13が切断するのはA2ドメインであるが、その切断部位は分子内部に埋もれており、そのままではADAMTS13は接近できない。VWFが血小板に結合し、血流によって発生するずり応力が加わると、VWFは部分的に伸展し、切断部位が表面に現れる

(図3)。これでADAMTS13が、A2ドメインを切断できるようになる。このことは、ADAMTS13によってVWFを*in vitro*で切断させる際、タンパク質変性剤の共存、あるいはボルテックス等による強い攪拌を必要とすることと一致する。ずり応力でA2ドメインがほぐれ、新たに露出した領域がADAMTS13の複数のエキソサイトと広範囲で相互作用することで、VWFの切断が生理的条件下で特異的かつ調節的に起こると考えられる。つまり、生理的には、VWFにかかるずり応力の強さが切断反応を調節し、血小板凝集の程度をうまく制御するのかもしれない。

#### Ⅴ. VWF73を用いたADAMTS13活性測定

ADAMTS13はVWFのTyr<sup>605</sup>~Met<sup>606</sup>間を切断するが、その反応においてADAMTS13とVWFは互いの分子構造を広範囲で認識する。ADAMTS13が活性を発揮するにはMドメインからSドメインまでが必須であり、一方、

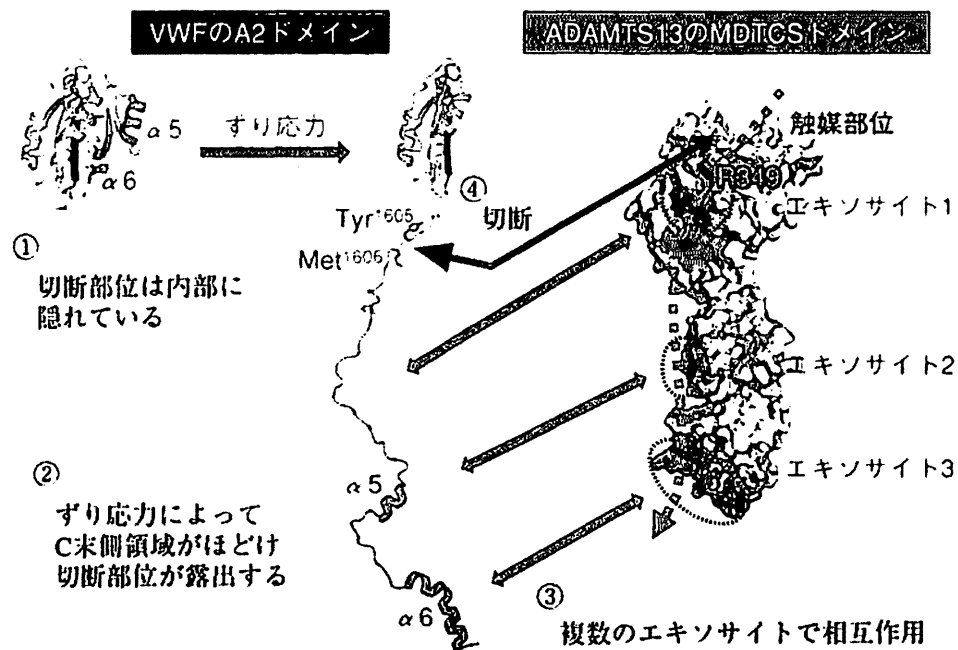


図3. ADAMTS13によるVWFの切断

VWF側ではA2ドメインに含まれる73アミノ酸残基(Asp<sup>1596</sup>~Arg<sup>1668</sup>:VWF73と呼ぶ)が必要十分であることを明らかにした(特許取得)<sup>11)</sup>。VWF全長を基質として利用する従来の活性測定法は、いずれも操作が煩雑などの理由で臨床検査として普及しなかったが、VWF73を利用した測定法はいくつも開発され、なかでも我々が開発したFRET法<sup>12)</sup>とAct-ELISA法<sup>13)</sup>は研究および臨床の場に普及している。

FRET法では、化学合成ペプチドFRETS-VWF73を基質として用いる。ADAMTS13で切断される前は、切断部位の両側に付加された蛍光基と消光基の間で蛍光共鳴エネルギー転移(fluorescence resonance energy transfer:FRET)が起こるため、基質溶液に励起光を照射しても蛍光は弱い。ADAMTS13によって切断されると、FRET効果が緩和されて蛍光が強くなる(図4)。したがって、蛍光強度の増大を観察することでADAMTS13の活性を検出することができる。Act-ELISA法では、VWF73がADAMTS13で切断されて生じる末端部分のみに結合するモノクローナル抗体を利用する。96ウェルプレートにGST-VWF73融合タンパク質を結合させ、ここに血漿を添加して切断反応を行う。HRP標識した上述の抗体を添加するとウェル上のGST-VWF73断片に定量的に結合するので、発色基質で検出する(図4)。

## Ⅵ. 先天性TTP患者の遺伝子解析

先天性TTP(=USS)はADAMTS13欠損症であり、患者はADAMTS13遺伝子異常の複合ヘテロあるいはホモ接合体である。我々は奈良県立医科大学と共同で、日本人USS患者の遺伝子解析を行っている<sup>14-16)</sup>。これまでUSS患者47名(41家系)を解析し、44名(38家系)に複合ヘテロあるいはホモの原因変異を同定した。世界的には130を超える原因変

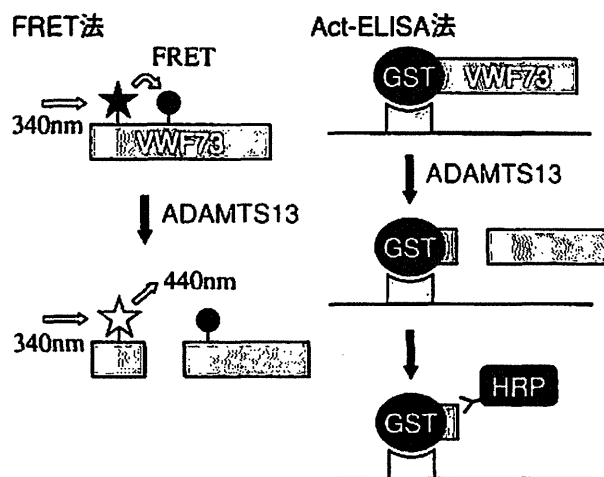


図4. FRET法およびAct-ELISA法によるADAMTS13活性測定

異が報告されているが、我々の報告は、その4割近くを占める。全例において、ダイレクトシーケンシング法が用いられている。変異の種類としてはミスセンス変異が最も多いが、ナンセンス変異やフレームシフト変異、スプライシング異常なども同定されている。エクソン全体の欠失や、遺伝子全体の欠失あるいは転座といった大きな領域の異常はまだ報告されていない。我々は最近、原因変異を特定できていなかった患者に対し、プライマーデザインを工夫した定量PCRによるコピー数解析を行い、729塩基および1,782塩基の欠失を見つけた(Eura et al, 論文投稿中)。ADAMTS13だけでなく全ての遺伝子に適用可能な方法なので、普及(宣伝)に努めたい。

## Ⅶ. 日本人のADAMTS13遺伝子多型と活性

我々は日本人一般住民のADAMTS13遺伝子解析を行い、健常者にも見出されるミスセンス多型として、T339R, Q448E, P475S, P618A, S903L, G1181Rを同定した<sup>14,17)</sup>。これらがUSS患者に見つかっても原因変異とは考えない。ただし、P475SはADAMTS13

の活性を少し低下させる<sup>14, 18, 19)</sup>。韓国人および中国人にも存在するが、欧米人には見られない多型である。現在のところ、ADAMTS13遺伝子多型と疾患との関連は見出されていない。

国立循環器病研究センターで1989年から実施されている一般住民を対象とした吹田研究の一部として、3,616人の血漿ADAMTS13活性を測定した<sup>20)</sup>。男性のADAMTS13活性平均値は女性に比べて有意に低く、男女とも60歳台以上で徐々に低下した。一方、VWF量は加齢によって増加するため、血拴傾向の指標となるVWF量/ADAMTS13活性比では加齢に伴う増加傾向が顕著に現れた。ABO血液型がO型の人には他に比べてVWF量が低い、ADAMTS13活性は血液型と有意な相関を示さなかった。

## VIII. 先天性TTP患者数の推定

日本に、先天性TTP患者は何人いるのか。類似疾患の多い、希少な遺伝性疾患の患者数を明らかにすることは意外に難しい。浸透率(遺伝子異常を持っている場合に発症する率)が不明なので、先天性ADAMTS13欠損者数=先天性TTP患者数とは言えないが、吹田研究の活性データと遺伝子解析データを組み合わせ、先天性ADAMTS13欠損者数の推定を試みた<sup>17)</sup>。その結果、いくつかの前提条件を仮定すれば、日本人の先天性ADAMTS13欠損症者(複合ヘテロあるいはホモ接合体)の頻度は約100万人に1人と推定された。これがどのくらい正確か分からないが、これまでに日本で同定されたUSS患者が50人程であることを考えると妥当な数である。

## IX. マウスのADAMTS13

我々はマウスADAMTS13のcDNAをクローニングし、遺伝子構造を明らかにした<sup>21)</sup>。

さらに、ADAMTS13欠損マウスを作製し表現型を解析した<sup>22)</sup>。先天性ADAMTS13欠損患者と同様、マウスでも血中に異常高分子量VWFマルチマーが存在した。しかし、先天性TTPモデルとして作製したにもかかわらず、予想した血小板減少や溶血性貧血は見られなかった。つまり、マウスにおいてはADAMTS13完全欠損以外の要因がTTP発症に必要であった。その後、ヒトにおいてもADAMTS13欠損だけではTTPを発症せず、内皮障害や妊娠など他の要因が加わって症状が顕在化する場合もあることが分かった。ADAMTS13欠損マウスは自然にTTPを発症しないとは言え、潜在的な血拴形成傾向は示した。同時期に米国のグループも欠損マウスを作製しており、通常飼育下でTTP症状は見られないが、血中VWF量が高い系統への戻し交配により一部の個体にTTP様症状が出現することを報告した<sup>23)</sup>。我々が作製したADAMTS13欠損マウスは、脳虚血再還流障害モデル<sup>24)</sup>や急性心筋梗塞モデル<sup>25)</sup>などに利用されている。

マウスでは、系統特異的に2種類のADAMTS13が発現する<sup>21)</sup>。129/Sv系統のADAMTS13遺伝子は、ヒトと同様、29個のエクソンからなり、ドメイン構成もヒトと同じである。一方、BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2系統では、イントロン23にレトロトランスポゾン配列が挿入しており、7番目のドメイン以降を欠失したADAMTS13が発現する。これを利用して、ADAMTS13のC末端領域は高ずり応力下での血小板血拴形成を抑制するために機能することを証明した<sup>26)</sup>。

## おわりに

ここに述べたように、ADAMTS13やVWFの解析を通じてTTPの研究がかなり進んだ。ADAMTS13活性測定法の進歩で診断が正確

になったことは、基礎研究が実用化に結びついた好例と言える。TTPの治療には、ADAMTS13補充を目的として新鮮凍結血漿が使用されているが、現在、組換えADAMTS13製剤の開発が進んでおり、治療法の改善も期待できる。反面、ADAMTS13活性の低下が顕著でないTTP症例や、ADAMTS13活性低下が目立つHUSなど、発症機序を明確に説明できない病態も存在する。非典型溶血性尿毒症症候群 (atypical HUS : aHUS) や深部静脈血栓症 (deep vein thrombosis : DVT) とADAMTS13の関連も詳しく調べる価値があろう。ADAMTS13によるVWF切断機構にもまだ不明の部分があり、興味深い知見も得られつつある。これからの研究の進展が楽しみである。

本稿で紹介した成果は、国立循環器病研究センター分子病態部の宮田敏行部長をはじめとした研究室構成員、病院の小久保喜弘医長や宮田茂樹医長、奈良県立医科大学の藤村吉博教授、松本雅則准教授、化血研の副島見事博士など、多くの方々との共同研究で得られたものであり、ここに感謝の意を表します。

## § 文献

- 1) Moschcowitz E : Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries ; a hitherto undescribed disease. Proc NY Pathol Soc 1924;24:21-4.
- 2) Moake JL, Rudy CK, Troll JH et al : Unusually large plasma factor VIII : von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1982;307(23):1432-5.
- 3) Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, et al : Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. Thromb Res 1985;38(5): 469-79.
- 4) Furlan M, Robles R, Lämmle B : Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. Blood 1996;87(10): 4223-34.
- 5) Tsai HM : Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. Blood 1996; 87(10):4235-44.
- 6) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, et al : A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood : possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease?. J Biochem 2001;130 (4):475-80.
- 7) Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al : Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. J Biol Chem 2001; 276(44):41059-63.
- 8) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al : Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature 2001;413 (6855):488-94.
- 9) Akiyama M, Takeda S, Kokame K, et al : Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(46):19274-9.
- 10) Gao W, Zhu J, Westfield LA, et al : Rearranging exosites in noncatalytic domains can redirect the substrate specificity of ADAMTS proteases. J Biol Chem 2012;287(32):26944-52.
- 11) Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, et al : VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. Blood 2004;103(2):607-12.
- 12) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, et al : FRET-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. Br J Haematol 2005;129(1):93-100.
- 13) Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, et al : Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. Transfusion 2006;46(8):1444-52.
- 14) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al : Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(18):11902-7.
- 15) Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, et al : Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. J

- Thromb Haemost 2011;9(Suppl 1):283-301.
- 16) Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, et al : Inherited and de novo mutations of ADAMTS13 in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost* 2008;6(1):213-5.
  - 17) Kokame K, Kokubo Y, Miyata T : Polymorphisms and mutations of ADAMTS13 in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost* 2011;9(8):1654-6.
  - 18) Akiyama M, Kokame K, Miyata T : ADAMTS13 P475S polymorphism causes a lowered enzymatic activity and urea lability in vitro. *J Thromb Haemost* 2008;6(10):1830-2.
  - 19) Akiyama M, Nakayama D, Takeda S, et al : Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS-13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism. *J Thromb Haemost* 2013;11(7):1399-406.
  - 20) Kokame K, Sakata T, Kokubo Y, et al : von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Thromb Haemost* 2011;9(7):1426-8.
  - 21) Banno F, Kaminaka K, Soejima K, et al : Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem* 2004;279(29):30896-903.
  - 22) Banno F, Kokame K, Okuda T, et al : Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2006;107(8):3161-6.
  - 23) Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, et al : Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest* 2005;115(10):2752-61.
  - 24) Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, et al : ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage : a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* 2010;115(8):1650-3.
  - 25) Doi M, Matsui H, Takeda H, et al : ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2012;108(6):1236-8.
  - 26) Banno F, Chauhan AK, Kokame K, et al : The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood* 2009;113(21):5323-9.



# プロテイン C/ プロテイン S の基礎

宮田敏行<sup>1\*</sup>, 水口 純<sup>2</sup>, 鈴木敦夫<sup>3</sup>, 小嶋哲人<sup>4</sup>

## Basics of protein C and protein S

Toshiyuki MIYATA<sup>1\*</sup>, Jun MIZUGUCHI<sup>2</sup>, Atsuo SUZUKI<sup>3</sup>, Tetsuhito KOJIMA<sup>4</sup>

**要約：**プロテイン C, プロテイン S, トロンボモジュリン, endothelial cell protein C receptor, (EPCR)は, プロテイン C 抗凝固系を構成する. 活性化プロテイン C (APC)は, プロテイン S の存在下で, 凝固反応の補助因子である活性化 V 因子 (Va) と活性化 VIII 因子 (VIIIa) を限定分解し不活化することにより凝固系を抑制する. EPCR に結合した APC (APC-EPCR 複合体)は, PAR1 依存性に抗炎症能, 抗アポトーシス活性, 内皮バリアー機能の保護といった細胞保護作用を示す. APC は細胞障害能を持つヒストンを特異的に切断し細胞保護作用を示す. プロテイン S は TFPI の Xa 阻害活性を促進する働きを持つ. プロテイン S は類似のドメイン構造をもつ Gas6 とともに, 受容体チロシキナーゼである TAM レセプターファミリー (Tyro3, Axl, Mer) の活性化リガンドとして働くと考えられる.

昭和58年  
九州大学大学院理学研究科生  
物学専攻終了  
昭和61年  
九州大学理学部生物学科助手  
平成3年  
国立循環器病センター研究所  
脈管生理部室長  
平成13年  
国立循環器病センター研究所  
病因部部長  
平成22年  
(独) 国立循環器病研究セン  
ター分子病態部部長

**Key words:** anticoagulant, endothelial cell protein C receptor, protein C, protein S, TAM receptors

## はじめに

本稿では, 抗凝固タンパク質であるプロテイン C とプロテイン S の基礎を述べる. 両タンパク質に関しては, これまで本誌で幾度も紹介されているので, 過去の総説なども参考にしていきたい<sup>1-7)</sup>.

## 1. プロテイン C 抗凝固機能

プロテイン C, プロテイン S, 1 回膜貫通タンパク質であるトロンボモジュリンと血管内皮細胞プロテイン C 受容体 (endothelial cell protein C receptor; EPCR) は, プロテイン C 抗凝固系を構成する (図 1).

表 1 にプロテイン C とプロテイン S の性質を示した. プロテイン C は血管内皮細胞上で EPCR<sup>3,4)</sup> に結合し, トロンビン-トロンボモジュリン複合体により限定分解を受けて, 活性化プロテイン C (activated protein C; APC) となる. プロテイン C はトロンボモジュリンの第 4 EGF 様ドメインに結合する. トロンビンはエクソサイト 1 を介してトロンボモジュリンの第 5 と第 6 EGF 様ドメインに結合し, エクソサイト 2 を介して Ser/Thr rich 領域に結合しているコンドロイチン硫酸に結合する. コンドロイチン硫酸を持つトロンボモジュリンは, 持たないトロンボモジュリンより抗凝固活性が強い. トロンビンのエクソサイト 1 はフィブリノペプチド内の酸性残基との結合部位であるため, トロンボモジュリンに結合したトロンビンはフィブリノーゲンに結合できずその水解活性が著減しプロテイン C 活性化能を獲得する. 生体内では, プロテイン C が血管内皮細胞上の EPCR に結合すると, トロンビン-トロンボモジュリン複合体によるプロテイン C 活性化が約 20 倍亢

<sup>1</sup> 国立循環器病センター研究所 分子病態部

<sup>2</sup> 一般財団法人 化学及血清療法研究所 経営企画課

<sup>3</sup> 名古屋大学医学部附属病院 医療技術部 臨床検査部門

<sup>4</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻病態解析学講座

\* 責任者連絡先: miyata@ri.ncvc.go.jp

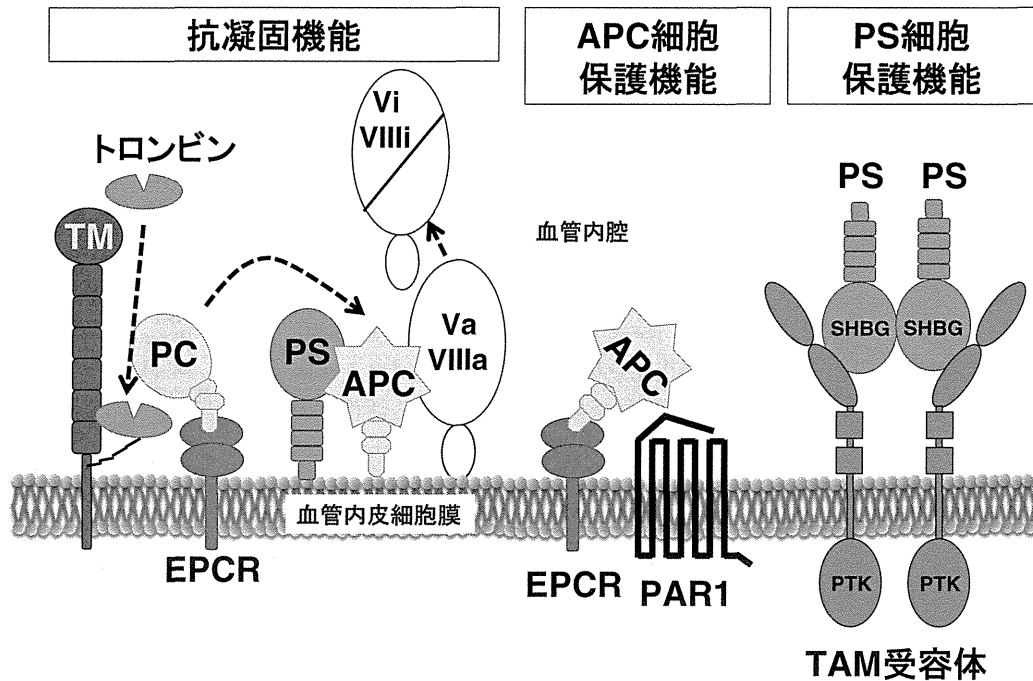


図1 プロテインCとプロテインSの3つの機能

プロテインCとプロテインSには、抗凝固機能、APC細胞保護機能、プロテインS細胞保護機能が知られている。抗凝固機能では、血管内皮細胞上のトロンボモジュリンに結合したトロンビンは、EPCRに結合したプロテインCを効率良く活性化し活性化プロテインC(APC)を形成する。APCはプロテインSの存在下で、凝固補助因子であるVaとVIIIaを分解して不活化する。APC細胞保護機能では、EPCRに結合したAPCはトロンビン受容体PAR1のArg46を限定分解し細胞保護的なシグナルを伝達する。最近、ヒトPAR1の結晶構造解析が報告された<sup>30)</sup>。プロテインS細胞保護機能では、親和性は低いもののプロテインSは、受容体チロシンキナーゼのTAMレセプターファミリー(Tyro3, Axl, Mer)に結合して細胞内にシグナルを伝達すると考えられている。一方、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食では、アポトーシス細胞にプロテインSが結合し酸化的オリゴマー化によりMerを発現するマクロファージによる貪食を促す。

表1 プロテインC抗凝固系に関わるタンパク質の生化学的性質

タンパク質	分子量 (Da)	血漿中濃度		血漿半減期 (日)
		nmol/L	μg/mL	
プロテインC	62,000	65	4	0.33
プロテインS	69,000	300	20	1.75
プロテインCインヒビター	57,000	90	5	1
VIII因子	280,000	0.7	0.2	0.3-0.5
V因子	330,000	20	6.6	0.5

進することが判明している。電子顕微鏡像から、トロンボモジュリンは伸張した構造が観察されている。

生成したAPCは、タンパク性補助因子であるプ

ロテインSの存在下で、凝固反応の補助因子である活性化V因子(Va)と活性化VIII因子(VIIIa)を限定分解し不活化する(図1)。表1にV因子とVIII因子の性質を示した。APCによる不活化により、

プロトロンビン活性化速度およびX活性化速度は、約 1/1,000 および約 1/10,000 に低下する。APC は Va と VIIIa の不活化反応を通してトロンビンの過剰形成を抑制し、その結果凝固反応を負に制御することになる。APC は Va の複数の部位を特異的に切断するが、Arg306 での切断が Va の完全な失活に必須である。VIIIa は不安定でサブユニットが自発的に乖離して凝固能を失うので、APC の VIIIa 切断による凝固能の消失が、どの程度抗凝固として働いているかについては議論がある。酸性リン脂質であるホスファチジルセリンとカルジオリピンは APC の抗凝固活性を亢進する。スフィンゴ脂質、特にグルコシルセラミドも APC の抗凝固活性を亢進する。HDL はプロテイン S 依存性に APC による Va の Arg306 の切断を促進する。APC による VIIIa の不活化は、プロテイン S だけでなく V の存在下でも促進されることがわかっている<sup>8)</sup>。

APC は protein C inhibitor (PCI) で阻害される(表 1)。ヒトでは血中 PCI は主に肝実質細胞で合成されるが、T 細胞、セルトリ細胞、樹状細胞、マクロファージでも発現する。マウスでは精巣でのみ発現する。

## 2. プロテイン C, APC

### 2.1 APC の細胞保護効果

EPCR に結合した APC (APC-EPCR 複合体) は、炎症能、抗アポトーシス活性、内皮バリアー機能の保護といった細胞保護作用を示す<sup>8-10)</sup>。APC は血管内皮細胞の遺伝子発現を変化させ、抗炎症因子と細胞生存因子の発現を増強させる<sup>11)</sup>。動物モデルでは、APC は敗血症、脳虚血、tPA による神経毒性と出血、炎症性肺傷害などを軽減する活性を示した。また、細胞保護作用は低下するが抗凝固活性は 4 倍亢進する変異体 APC (E149A-APC) や、抗凝固活性は低下するが細胞保護作用は正常を示す変異体 APC (5A-APC) が作製され、これらの変異体を病態モデルに応用したところ、5A-APC は敗血症モデルや脳虚血モデルの病態を改善したが、E149A-APC は病態を改善しなかったことから、APC の細胞保護作用が病態の改善に働くことが示された。

APC の細胞保護効果は、7 回膜貫通領域を持つ

GPCR の一つである PAR1 (別名、トロンビン受容体) が関与し、APC が PAR1 を切断することにより細胞内にシグナルが伝達される<sup>8-10)</sup> (図 1)。トロンビンと APC が同じ PAR1 受容体を介して、細胞内に正反対のシグナル(炎症性と細胞保護的なシグナル)を伝達するという現象は、研究者の興味を惹くこととなり、そのメカニズムに関して多数の研究がなされた。例えば、EPCR, APC, PAR1 は caveolin 脂質ラフトに存在し細胞保護シグナルを入れるとか、PAR3, インテグリン, Mac1 などの他の受容体の有無によりシグナルが異なるなどである<sup>8-10)</sup>。ごく最近、トロンビンと APC の PAR1 切断部位が異なり、別の部位が切断を受けることにより細胞内のシグナル伝達系が異なると報告された<sup>10)</sup>。

トロンビンは PAR1 の N 末端領域の Arg41 を切断すると、細胞内で ERK1/2 のリン酸化が起こり炎症性のシグナルが入る。この時 PAR1 の N 末端に新しく Ser42 が露出する。Ser42 を N 末端にもつ TRAP ペプチドは、細胞に添加するだけで PAR1 シグナルが細胞内に伝達されることは広く知られている。最近の研究によると、APC は PAR1 のトロンビン切断部位 Arg41 に加えて、Arg46 を切断すると報告された<sup>10)</sup>。この時に新しく露出した Asn47 を N 末端にもつ TR47 ペプチド(残基番号 47-66)は、驚いたことに、細胞内で Akt のリン酸化というトロンビンとは異なるシグナルを伝達し、内皮細胞のバリアー機能を安定化した。更に、この TR47 ペプチドによる血管保護効果がマウスを用いた VEGF 依存性の血管透過性モデルで示された。すなわち、TR47 ペプチドは VEGF によるエバンスブルーの血管外への漏出を減少させた。生体内での APC の細胞保護効果は PAR1 に加え PAR3 も必要といわれている。PAR3 もトロンビン受容体であり、トロンビンは Lys38 を切断する。一方、APC は Arg41 を切断する<sup>12)</sup>。この切断部位の情報をもとに、新しい N 末端である Lys38 からのペプチドと Arg41 からのペプチドを合成し、VEGF 依存性の血管透過性モデルでその効果を調べたところ、Arg41 からのペプチドが血管透過性を抑制する効果を示すという報告もなされた<sup>12)</sup>。

APC は PAR1 非依存性に細胞保護作用を示すとの報告もある。すなわち、APC は細胞傷害能を持

つヒストンを特異的に切断し、生体に対して保護的に働くと報告された<sup>13)</sup>。多臓器不全の後期メディエーターを研究する過程で、エンドトキシンと $\gamma$ インターフェロンで処理したマクロファージの上清に細胞傷害活性があり、この傷害活性の主因は細胞外のヒストンであり、ヒストンがAPCで切断を受けると細胞毒性が消失することが明らかとなった<sup>13)</sup>。APC存在下・非存在下で致死量の大腸菌が静注されたヒヒの血漿分析では、ヒストンH3はAPCで切断され、腎機能が保護された。APC治療を受けた敗血症患者ではヒストンH3の分解物が観察された。致死量のヒストンをAPC存在下・非存在下でマウスに静注すると、APCなしでは死亡するが、APCを同時に静注したマウスは生存した。ヒストンH4に対する抗体もAPCと同様に生体保護作用を示した。これらの研究から、細胞外の主にヒストンH3、H4は敗血症や炎症性疾患の進行のバイオマーカーであり、かつ治療標的となる可能性が示されている。今後の更なる研究が待たれる。

重症小児マラリアを引き起こす熱帯性マラリア原虫の感染では、原虫が感染した赤血球の宿主の血管への結合が重要なイベントである。この結合には原虫の赤血球膜タンパク質1(*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1)と血管内皮細胞上の受容体との結合が必要とされる。最近、この内皮細胞受容体としてEPCRが同定された<sup>14)</sup>。原虫の赤血球膜タンパク質1のEPCRへの結合はAPCとの結合と競合するので、原虫感染によりEPCR依存性のAPCの細胞保護機能が障害され、マラリア感染が重症化することが考えられる。

## 2.2 プロテインC 遺伝子欠損マウス

プロテインC 遺伝子欠損(*Proc*<sup>-/-</sup>)マウスは、胎齢17.5日までは正常に発生するものの、その後DIC様の症状を呈し約70%は胎性致死となり、残りの30%も死産か出生後24時間以内に死亡する。その際プロテインC欠損マウスの血栓形成は脳から始まるという。これは脳循環系におけるプロテインCの抗凝固能の重要性、および脳特異的なプロテインC/APCの受容体の存在を示唆しているのかもしれない。一方、遺伝子欠損ヘテロ接合体マウスは正常に出生するが、血栓を誘引するような種々の刺激を与えた時に、重篤な血管内フィブリン沈着を引き起

こす<sup>1,15)</sup>。

このようにプロテインCの重要性はマウスでも確認されたが、全く発現しないと致死となるが、50%の発現がみられると野生型との比較が難しい。プロテインC欠損の程度による種々の病態や、それによって生じるDIC等の過凝固状態の解析、ならびに効果的な治療法を開発するためには、低濃度プロテインC発現マウスが必要となる。そこで、<1%、1%、3%、18%のプロテインCを発現する4系統のトランスジェニックマウスが作出された<sup>16)</sup>。これらの低レベルプロテインC発現マウスの解析から、プロテインCの発現レベルが3%以下になると、そのレベルの低下に応じて、出生後の生存、凝固・出血、炎症、繁殖などに重大な影響がみられることが判明した。

また、プロテインC欠損によるDIC様症状を伴う致死に対し、外因系と内因系それぞれの関与を調べるために、プロテインCとVIIの二重欠損マウスと、プロテインCとXIの二重欠損マウスが作出された<sup>2,17,18)</sup>。驚くべきことに、プロテインCとVIIの二重欠損マウスは全て胎性致死であったのに比べ、プロテインCとXIの二重欠損マウスは、PC欠損新生仔マウスでみられる周産期の致死性のDICを回避し、最長3カ月生存した。このマウスの多くは動きが極端に弱く、育ちも著しく悪く、最終的には血栓症で死亡したが、プロテインCがマウスの胎仔期のXIを介した血液凝固反応の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 3. プロテインS

### 3.1 プロテインSの受容体を介した保護効果

プロテインSは類似のドメイン構造を持つGas6とともに、受容体チロシンキナーゼのTAMレセプターファミリー(Tyro3, Axl, Mer)の活性化リガンドとして働くと考えられている(図1)。TAMレセプターは、2つのIg-様ドメインと2つのフィブロネクチンIII型ドメインを細胞外に持ち、チロシンキナーゼドメインを細胞内に持つ。2つの球状のlaminin G様(LG)ドメインから成るプロテインSやGas6のsex hormone-binding globulin(SHBG)様ドメインは、TAMレセプターのIg-様ドメインに結合す

る<sup>19)</sup>。Gas6のSHBG様ドメインは2つのLGドメインがV状の配置をとり、Axlの2つのIgドメインが両側から1つのLGドメインをはさむ立体構造が解明されている<sup>20)</sup>。

Gas6の血中濃度はnM以下であり遊離プロテインSの濃度よりずっと低濃度であるにもかかわらず、Gas6とTAMレセプターの研究は良く進んでいるが、プロテインSとTAMレセプターの研究は少ない。その理由は、プロテインSの受容体への親和性がGas6より低いため、生化学的な解析法に限界があるようである。例えば、ヒトGas6のヒトAxlに対する解離定数は0.05–4 nMという報告が5つ以上あるが、ヒトプロテインSのヒトAxlに対する解離定数の報告はなく、ヒトTyro3、ヒトMerに対する報告もない<sup>21)</sup>。ヒトのプロテインSとMerは結合しないという報告までである。しかし、これまでなされた*in vivo*での実験は、プロテインSのTAMレセプターファミリーを介した生物学的な役割を示している(図1)。

ヒト血漿由来およびリコンビナントのヒトプロテインSは、マウス虚血性脳梗塞傷害を軽減すると報告され、次いで、プロテインSの脳保護作用は、Tyro3とスフィンゴシン1リン酸受容体に依存性であり、虚血による血液脳関門の破壊を保護すると報告された<sup>22)</sup>。マウス皮質ニューロンへのNMDA刺激による細胞死を誘導する実験では、プロテインSはそのSHBG様ドメインを介してTyro3依存性に保護作用を示し、神経細胞のアポトーシスを有意に低下させた<sup>23)</sup>。

細胞保護作用とは別に、プロテインSはマクロファージの貪食作用に重要であるとの報告がある<sup>7)</sup>。プロテインSはビタミンK依存性凝固因子の中で、酸性リン脂質膜への結合力が最も強い。したがって、アポトーシス細胞のように膜上に酸性リン脂質であるホスファチジルセリンが露出すると、プロテインSが結合することになる。このアポトーシス細胞に結合したプロテインSは酸化的にオリゴマー化し、マクロファージ上に発現するMer受容体に結合して、マクロファージによるアポトーシス細胞のクリアランスに働くことが報告された<sup>24)</sup>。これまで、プロテインSは精製法によっては、オリゴマー化しやすいと報告されており、亜鉛イオンが結

合するといった報告もあり、プロテインS単独でのXa因子活性阻害能と絡んで議論的となっている。プロテインSがオリゴマー化してMerに結合するというメカニズムは大変魅力的である。というのは、プロテインSが単独でTAM受容体に結合すると、細胞内へ恒常的にシグナルが入り続けることになるからである。TAM受容体を介したシグナル伝達にもプロテインSのオリゴマー化が必要かどうかは、今後の研究を待ちたい。

### 3.2 プロテインS遺伝子欠損マウス

プロテインS遺伝子(*Pros*)欠損マウスは2つのグループから報告された<sup>5, 25, 26)</sup>。胎齢17.5日以降DIC様を呈するなどプロテインC遺伝子欠損マウスと似た症状を示すが、プロテインC遺伝子欠損マウスが僅かではあるものの出生し24時間以内に死亡するのに比べ、プロテインS遺伝子欠損マウスは全て胎性致死であった。*Pros*<sup>+/-</sup>マウスのプロテインS量は野生型より低く、APC依存性の凝固時間の延長も、野生型に比べて延長の程度が少なかった。このことから、*Pros*<sup>+/-</sup>マウスはAPC依存性抗凝固能の低下が認められ、易血栓性を示すと考えられた。組織因子を血中に投与する静脈血栓塞栓症モデルでは、*Pros*<sup>+/-</sup>マウスは野生型マウスより明らかに早く死亡した。死亡したマウスでは、肺に多数の血栓が見られたことから、肺機能の不全による呼吸停止が死因と考えられた。また、APC非依存性の抗凝固活性も低下した。

*Pros*ヘテロ接合体マウスの血管構造が、エバンスブルーの静注で調べられた<sup>25)</sup>。エバンスブルーは血中でアルブミンと結合する。エバンスブルーが組織へ漏出することは、アルブミンが血管外へ漏出したことを示し、血管構造の異常を示す。*Pros*<sup>+/-</sup>マウスでは、胃腸、耳、鼻などにエバンスブルーの漏出が観察され、ヘテロ接合体マウスでの血管傷害が明らかとなった。エバンスブルーの漏出を肝臓で調べると、*Gas6*遺伝子欠損マウス、プロテインSと*Gas6*の受容体であるAxlの遺伝子欠損マウス、血管平滑筋細胞でプロテインSを発現しない*Sm22Cre/Pros*<sup>fl/fl</sup>マウスでも観察されたが、血管内皮細胞でプロテインSを発現しない*Tie2-Cre/Pros*<sup>fl/fl</sup>マウスでは観察されなかった。このことから、ヘテロ接合体マウスの血管傷害はプロテインS依存性に

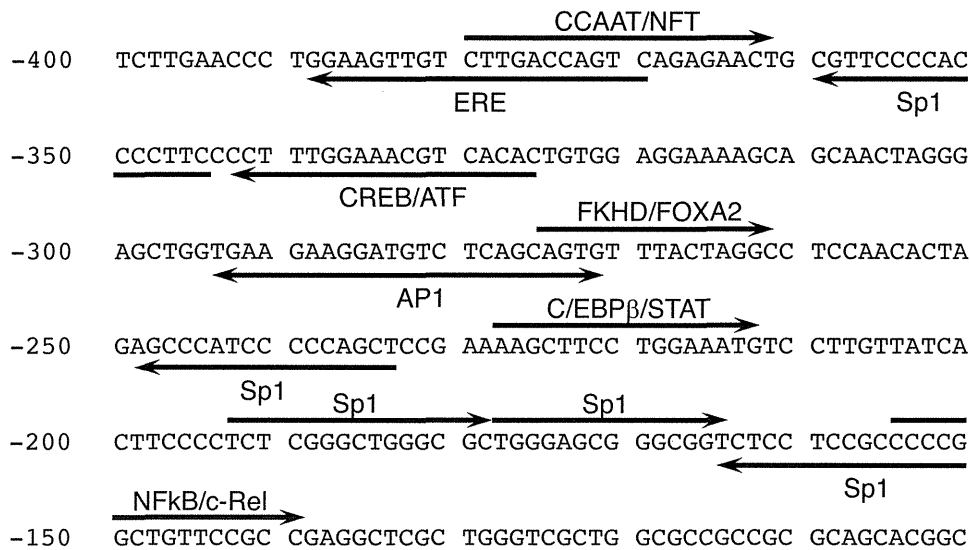


図2 プロテイン S 遺伝子プロモーター領域と転写因子結合予想部位<sup>27)</sup>

プロテイン S 遺伝子の基礎転写に直接関与しているのは-175~-193 までに位置する 2 つの隣接する GC-rich motif (Sp 結合部位) であり, E2 による転写抑制にもこの領域が強く関与する。

Ax1 受容体シグナルが減弱したためと考えられた。

血中のプロテイン S は主に肝実質細胞で合成されている。そこでアルブミン (Alb)-Cre マウスと掛け合わせ, 肝細胞でプロテイン S を発現しない *Alb-Cre/Pros<sup>fl/fl</sup>* マウスを作製しその表現型が解析された<sup>25)</sup>。本マウスの胚は出血などの凝固異常を示さなかったものの, 15.5 日胚の血管には野生型胚にはみられないフィブリン沈着が観察された。血管内のフィブリン沈着は血管内皮細胞でプロテイン S を発現しないマウスにもみられた。肝もしくは内皮細胞でのプロテイン S の発現が失われたマウスは出生して成長する。これらのマウスの血漿中のプロテイン S 抗原量は, 肝細胞でプロテイン S を発現しないマウスは 45%, 血管内皮細胞でプロテイン S を発現しないマウスは 57% であった。この時, 野生型マウスのプロテイン S 抗原量は 111%, ヘテロ接合体マウスの抗原量は 56% であった。肝もしくは内皮細胞でのプロテイン S の発現を失ったマウスは, このように血中プロテイン S が低下していた。これらのマウスはどのような血栓傾向を示すかについての実験はされていない。

### 3.3 プロテイン S 発現調節機構

ヒトプロテイン S 遺伝子 (*PROSI*) は, 3 番染色体長腕 11.2 に位置する。一方で, *PROSI* には 95% 以上の相同性を有する偽遺伝子 (pseudogene: *PROSP*) が存在し, 同じく 3 番染色体の短腕 11.1 に位置しているが, プロモーター配列とエクソン 1 を欠くため転写産物はないとされている。

2006 年に *PROSI* のプロモーター解析研究が報告され<sup>27)</sup>, 肝細胞における *PROSI* の基礎転写活性は, 基本転写因子である Sp1 および Sp3 により調節されており, *PROSI* の翻訳開始 ATG より上流約 170 bp の位置に, これら Sp 群が結合する GC-rich motif が存在することが判明した<sup>6)</sup> (図 2)。Sp 群以外にも肝細胞特異的転写因子である FOXA2 や NFY, CREB/ATF family の結合 motif も存在することがわかっているが, 直接的な結合はないと報告されている。

一方で, *PROSI* の転写活性は, estrogen の一種である estradiol (E2) により調節を受け, 50-60% に抑制されることがわかっており, 妊娠や経口避妊薬の服用による後天的プロテイン S 欠乏症の原因であることが示唆されている。この E2 によるプロテ

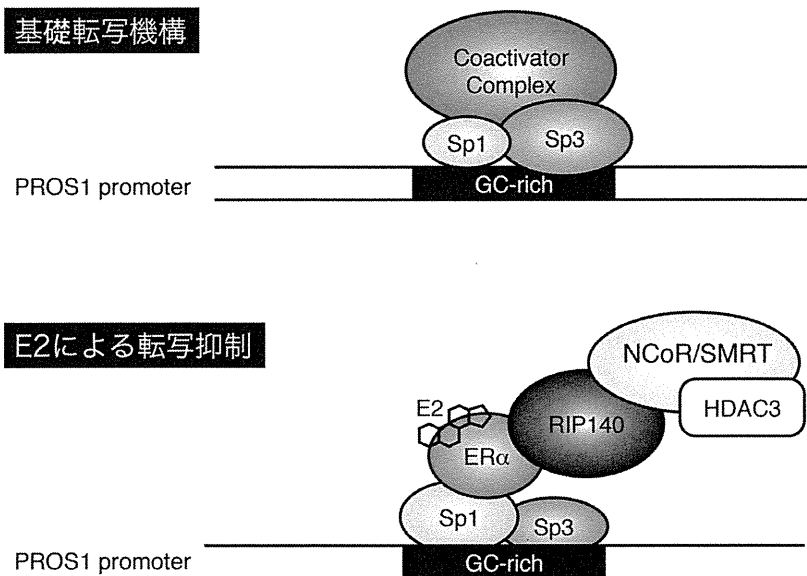


図3 プロテイン S 遺伝子の基礎転写と estradiol (E2) による転写抑制  
Wolf らの報告にもあるように<sup>27)</sup>, Sp1 および Sp3 あるいは他の転写活性化補因子との相互作用によりプロテイン S の基礎発現が調節されていると考えられる。この状態ではヒストンはアセチル化されており、転写因子のアクセスが可能な状態である。一方で E2 の存在下では, Sp1-ER $\alpha$  の相互作用により RIP140 さらには NCoR/SMRT-HDAC3 複合体のリクルートが起こり, HDAC3 により誘導されたヒストンの脱アセチル化により, 転写活性化因子のアクセスが阻害され, 基礎転写が抑制されると考えられる。

イン S 転写活性の抑制は, 基礎転写活性を担っている Sp 群の結合 motif と同じ領域が関与し, またそれら Sp 群が, E2 刺激により誘導された estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) と相互作用していることがわかっている<sup>28)</sup>。とくに Sp1-ER $\alpha$  の相互作用は *PROS1* 以外の転写調節にも関与していることが報告されており, それらと同様, *PROS1* においても Sp1-ER $\alpha$  の相互作用により転写抑制補助因子がリクルートされ, 最終的にヒストン脱アセチル化酵素を誘導することで遺伝子発現を抑制していることが明らかとなった。すなわち, E2 の刺激により *PROS1* 領域のヒストン脱アセチル化が誘導され, 転写活性化因子のアクセスが阻害された結果, 遺伝子発現が抑制されるということが明らかとなった(図 3)。

さらに最近, この抑制機構のほかに, estradiol によって誘導された microRNA が *in vitro* で post-transcriptional に *PROS1* の発現を抑制することが報告された<sup>29)</sup>。Tay らによると, E2 の刺激により miR-494 とよばれる microRNA レベルが上昇し, この miR-

494 が PS 遺伝子の 3' 非翻訳領域を標的にすることで, プロテイン S mRNA レベルを低下させるという。実際に妊娠中ではプロテイン S 活性が 30% 程度にまで抑制されることが報告されているが, 転写活性自体は半分ほどにしか抑制されないことから, 転写抑制のみでは説明のつかなかった部分がこれにより解明され, すなわち, これら 2 つの研究成果により, E2 による *PROS1* の発現抑制は転写調節と転写後調節により制御されていることが明らかとなった。

著者の利益相反 (COI) の開示 :

水口純 : 化学及血清療法研究所所員

その他著者全員の利益相反 (COI) の開示 :

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

1) 下瀬克郎, 濱本高義, 水口純 : プロテイン C の欠損マ

- ウス. 血栓止血誌 **10**: 219–222, 1999.
- 2) 上村晃一郎, 濱本高義: VII 因子とプロテイン C の二重欠損マウス. 血栓止血誌 **11**: 578–583, 2000.
  - 3) 中武博, 中垣智弘: ヒト EPCR の立体構造と機能に関する最近の話題. 血栓止血誌 **13**: 504–512, 2002.
  - 4) 福留健司: EPCR 最近の話題. 血栓止血誌 **14**: 511–513, 2003.
  - 5) 羽室強: プロテイン S: 最近の話題とその欠損マウス. 血栓止血誌 **21**: 337–342, 2010.
  - 6) 鈴木敦夫: エストラジオールによるプロテイン S 遺伝子の発現抑制機構. 血栓止血誌 **23**: 407–414, 2012.
  - 7) 關谷暁子, 森下英理子: プロテイン S/TAM レセプターを介したアポトーシス細胞のクリアランス. 血栓止血誌 **23**: 585–587, 2012.
  - 8) Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO: Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol* **95**: 333–345, 2012.
  - 9) Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino FJ: The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* **115**: 1121–1130, 2010.
  - 10) Bouwens EA, Stavenuiter F, Mosnier LO: Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost* **11**(Suppl 1): 242–253, 2013.
  - 11) Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW: Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 11199–11203, 2001.
  - 12) Burnier L, Mosnier LO: Novel mechanisms for activated protein C cytoprotective activities involving noncanonical activation of protease-activated receptor 3. *Blood* **122**: 807–816, 2013.
  - 13) Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmo NL, Lupu F, Esmo CT: Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* **15**: 1318–1321, 2009.
  - 14) Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JE, Avril M, Brazier AJ, Freeth J, Jespersen JS, Nielsen MA, Magistrado P, Lusingu J, Smith JD, Higgins MK, Theander TG: Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* **498**: 502–505, 2013.
  - 15) Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, Chan JC, Carmeliet P, Collen D, Castellino FJ: Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **102**: 1481–1488, 1998.
  - 16) Lay AJ, Liang Z, Rosen ED, Castellino FJ: Mice with a severe deficiency in protein C display prothrombotic and proinflammatory phenotypes and compromised maternal reproductive capabilities. *J Clin Invest* **115**: 1552–1561, 2005.
  - 17) Chan JC, Cornelissen I, Collen D, Ploplis VA, Castellino FJ: Combined factor VII/protein C deficiency results in intrauterine coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **105**: 897–903, 2000.
  - 18) Chan JC, Ganopolsky JG, Cornelissen I, Suckow MA, Sandoval-Cooper MJ, Brown EC, Noria F, Gailani D, Rosen ED, Ploplis VA, Castellino FJ: The characterization of mice with a targeted combined deficiency of protein c and factor XI. *Am J Pathol* **158**: 469–479, 2001.
  - 19) Lemke G, Rothlin CV: Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* **8**: 327–336, 2008.
  - 20) Sasaki T, Knyazev PG, Cheburkin Y, Göhring W, Tisi D, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E: Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains. *J Biol Chem* **277**: 44164–44170, 2002.
  - 21) Hafizi S, Dahlbäck B: Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J* **273**: 5231–5244, 2006.
  - 22) Zhu D, Wang Y, Singh I, Bell RD, Deane R, Zhong Z, Sagare A, Winkler EA, Zlokovic BV: Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood* **115**: 4963–4972, 2010.
  - 23) Zhong Z, Wang Y, Guo H, Sagare A, Fernández JA, Bell RD, Barrett TM, Griffin JH, Zlokovic BV: Protein S protects neurons from excitotoxic injury by activating the TAM receptor Tyro3-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway through its sex hormone-binding globulin-like region. *J Neurosci* **30**: 15521–15534, 2010.
  - 24) Uehara H, Shacter E: Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* **180**: 2522–2530, 2008.
  - 25) Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G: Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest* **119**: 2942–2953, 2009.
  - 26) Saller F, Brisset AC, Tchaikovski SN, Azevedo M, Chrast R, Fernández JA, Schapira M, Hackeng TM, Griffin JH, Angelillo-Scherrer A: Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood* **114**: 2307–2314, 2009.
  - 27) de Wolf CJ, Cupers RM, Bertina RM, Vos HL: The constitutive expression of anticoagulant protein S is regulated through multiple binding sites for Sp1 and Sp3 transcription factors in the protein S gene promoter. *J Biol Chem* **281**: 17635–17643, 2006.
  - 28) Suzuki A, Sanda N, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, Takagi A, Murate T, Saito H, Kojima T: Down-regulation of PROS1 gene expression by 17beta-estradiol via estrogen receptor alpha (ER alpha)-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein 140 and the corepressor-HDAC3 complex. *J Biol Chem* **285**: 13444–13453, 2010.
  - 29) Tay JW, Romeo G, Hughes QW, Baker RI: Micro-ribonucleic acid 494 regulation of protein S expression. *J Thromb Haemost* **11**: 1547–1555, 2013.
  - 30) Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, Green HF, Pandey A, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Coughlin SR, Kobilka BK: High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* **492**: 387–392, 2012.



