

## ヒト EPCR の立体構造と機能に関する最近の話題

中 武 博\*, 中 垣 智 弘\*

Current Topics on Three-dimensional Structure and  
Function of Human EPCR

Hiroshi NAKATAKE\*, Tomohiro NAKAGAKI\*

**Key words** : EPCR, Protein C, APC, PAR, Inflammation

### 1. はじめに

血液凝固の主要な制御系であるプロテイン C (PC) 抗凝固系は, 血管内皮細胞 (EC) 上の膜蛋白質のトロンボモジュリン (TM) に結合したトロンビン (Th) が PC を活性化し, 形成された APC (Activated Protein C) が, 凝固系コファクターの FVa や FVIIIa を分解・不活化する系である。液相での Th-TM 複合体による PC の活性化速度は, PC と Gla ドメインが欠失した PC (Gla-less PC) でも差がないのに対して, EC 上での活性化速度は Gla-less PC に比べて PC の方が約 20 倍速いことから, EC 上には PC の Gla ドメインと相互作用し, PC の活性化効率を高めるレセプターの存在が示唆されていた<sup>1)</sup>。

1994 年, 福留と Esmon<sup>2)</sup> は, 各種培養細胞への蛍光標識 APC の結合実験を行い, APC (および PC) は EC 特異的に高親和性 (Kd=30 nM) に結合することを明らかにした。また, 彼らは発現クローニング法により PC/APC レセプターの単離を試み, その遺伝子のクローニン

グに成功し, Endothelial cell Protein C Receptor (EPCR) と命名した。ヒト EPCR は, CD 1/MHC クラススーパーファミリーに属する I 型膜貫通蛋白質で, アミノ酸 193 個の細胞外ドメイン, 25 個の膜貫通ドメインおよび 3 個の細胞質ドメインからなる。EPCR の細胞外ドメインには, CD 1/MHC クラス I 分子の  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ドメインに相当する構造を有しているが,  $\alpha 3$  ドメインは欠如している<sup>2)</sup> (図 1)。

EPCR は, PC 抗凝固系が作動するための重要な 1 成分として機能していることは, 以下の実験から証明されている。i) PC と EPCR の結合を阻害する抗 EPCR モノクロナル抗体 (MoAb) 存在下では, 培養 EC 上での Th-TM 複合体による PC の活性化速度は 5 倍低下する<sup>3)</sup>, ii) この抗 EPCR-MoAb をヒヒに投与し, その後, 低濃度のトロンビンを投与し (2 U/kg/分の速度で 1 時間), 形成される APC 量を測定すると, 抗 EPCR-MoAb を投与しないときに比べ, 循環 APC レベルは 88% 低下する<sup>4)</sup>。EPCR のこうした効果は, PC 活性化反応において Km を低下させるためであるという<sup>3)</sup>。

\* 財団法人 化学及血清療法研究所 菊池研究所 第一研究部 [〒 869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺]  
First Research Department, Kikuchi Research Center, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute,  
KAKETSUKEN [Kyokushi, Kikuchi, Kumamoto, 869-1298, Japan]  
Tel: 0968-37-3100 Fax: 0968-37-3616

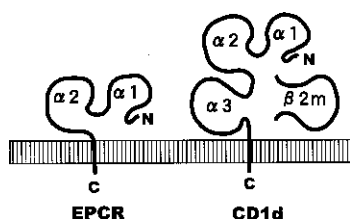


図 1 EPCR と CD1d のドメイン構造: EPCR の細胞外ドメインには CD1d の  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  ドメインに相当する構造を有しているが,  $\alpha 3$  ドメインに相当する構造は欠失しており, CD1d のように  $\alpha 3$  ドメインを介して  $\beta 2$  ミクログロブリン ( $\beta 2m$ ) と会合していない。

PC 抗凝固系の概略を (図 2) に示す。APC は抗凝固作用に加え, 抗炎症作用も有するが, PC 抗凝固系が抗炎症作用を発現するには何らかの調節因子の存在が予想されていたことも, EPCR 発見の契機となった。

なお, 血漿中には可溶性 EPCR (sEPCR) が存在し, 炎症時には増加することが報告されている<sup>5)</sup>。また, sEPCR は, 活性化好中球にウエグナー肉腫の標的抗原である Proteinase 3 を介して結合し<sup>6)</sup>, 核内に移行すると報告もあるが<sup>7)</sup>, その生理的意義は不明である。

最近, EPCR のノックアウトマウスが Gu ら<sup>8)</sup> によって作出されたが, i) EPCR<sup>-/-</sup> 胎仔は胎齢 10.5 日までに死亡するが, ヘテロ接合体の EPCR<sup>+/-</sup> マウスは正常に出生し, 成長し, EPCR<sup>+/+</sup> マウスと何ら差が認められない, ii) EPCR<sup>-/-</sup> 胎仔では栄養胚葉細胞 (胚体外にある細胞層で栄養を供給する組織) 周辺に著しいフィブリン沈着がみられる, iii) EPCR<sup>-/-</sup> の胎仔を妊娠している EPCR<sup>+/-</sup> の雌マウスに低分子ヘパリンの皮内注射を続けると, 胎齢 10.5 日を越えても EPCR<sup>-/-</sup> 胎仔を生存させることができる場合もあるが, 出生までには至らない, iv) このような抗凝固療法下では, 検出できるほどのフィブリン形成は見られなかったが, 大部分の EPCR<sup>-/-</sup> 胎仔は, 胎齢 12.5 日~13.5 日で死

亡していた。なお, 胎齢 12.5 日~13.5 日の EPCR<sup>-/-</sup> 胎仔の組織形成の程度は, 同齡の EPCR<sup>+/+</sup> 胎仔と差が見られなかった, v) 胎齢 7.5 日で胚体外膜および組織から胚を取り除き *in vitro* で培養すると, 10.5 日以降も発育する。

以上のことから Gu らは, EPCR<sup>-/-</sup> 胎仔の死因は, 過剰なフィブリン形成による母体からの栄養補給の不良にあり, 胎仔期の EPCR は母体と胚の境界面での血栓形成を制御するのに重要な役割を果たしていると推察している。

一方, Castellino ら<sup>9)</sup> は, ES 細胞の homologous recombination により EPCR レベルが著しく低下した EPCR<sup>9/9</sup> マウスを作出し, 以下の結果を得た。i) 胎齢 9.5 日以降の EPCR mRNA レベルは野生型の約 1% であったが, EPCR<sup>-/-</sup> マウスとは異なり正常に生まれ成長する, ii) 出生した EPCR<sup>9/9</sup> マウスの各組織の EPCR mRNA レベルは野生型の 10% 以下であったが (表 1), 各組織について, 試験した 10 匹の EPCR<sup>9/9</sup> マウスに一貫して認められる病変はない (ただし, 肝と肺について 3/10 例で軽度の病変, すなわち, 肺胞の鬱血や肝での肉芽腫性の病変が認められ, また, 1/10 例で腎動脈内にクロットが認められた), iii) FeCl<sub>3</sub> 惹起動脈血栓モデルを用いて, 血栓のできやすさを野生型と EPCR<sup>9/9</sup> で比較したが, 両者で差は認められない。なお, EPCR<sup>9/9</sup> の動脈系での mRNA レベルは野生型の 0.8% であり, 抗 EPCR 抗体を用いての組織染色試験では検出されないレベルであった。

以上の如く, ごく微量の EPCR が存在すれば胎仔期の死亡を免れることが示されたが, 同様のことが, 同じ EC 上の膜蛋白質の組織因子 (TF) についても報告されている。すなわち, TF<sup>-/-</sup> マウスは胎齢 9.5 日~11.5 日の間で死亡するのに対して, 低レベルの TF を発現する (mTF<sup>-/-</sup>/hTF<sup>+</sup>) マウス (発現レベル 1%) では正常に出生する<sup>10)</sup>。

また, PC 抗凝固系に関与する 2 つの膜蛋白質 (EPCR および TM) のノックアウトマウス

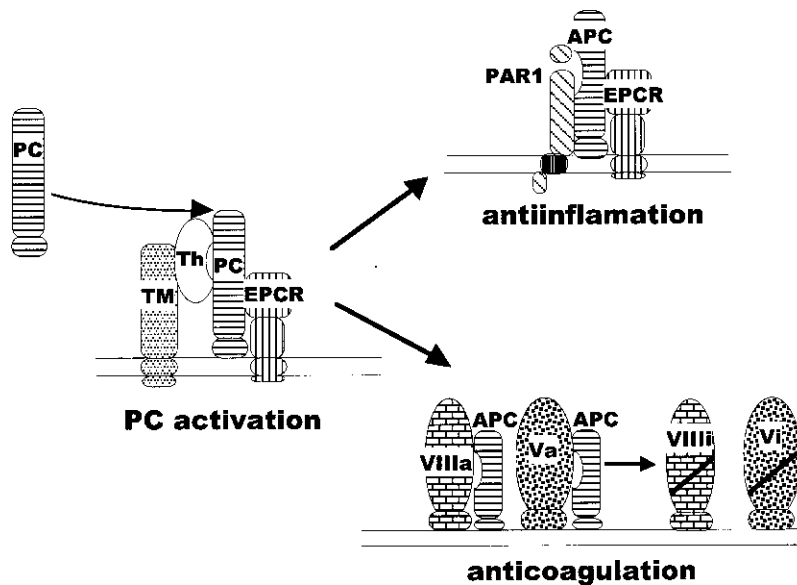


図2 プロテインC抗凝固系：内皮細胞上でトロンボモジュリン (TM) に結合したトロンピン (Th) が、EPCR に結合したプロテインC (PC) を活性化する。EPCR と結合した活性化プロテインC (APC) は抗凝固活性を示さず、PAR1 を活性化しつつ細胞内にシグナル伝達することで、抗炎症性に機能する。EPCR から遊離した APC は凝固系コファクターの FVIIIa や FVa を分解して、抗凝固因子として機能する。

表1 EPCR の mRNA の組織分布に関する genotype の影響<sup>9)</sup> (文献9より引用・改変)

mRNA 含量 (pg EPCR mRNA/μg total RNA)			
組織	WT	EPCR <sup>9/9</sup>	%WT
動脈	0.0620	ND <sup>a</sup>	0.8%
脳	0.0341	0.0016	4.8%
胸腺	0.0575	0.0058	10.1%
心臓	0.2936	0.0027	0.9%
肺	0.0249	0.0008	3.2%
腎臓	0.0649	0.0009	1.4%
肝臓	0.0386	ND <sup>a</sup>	—
卵巣	0.3877	0.0012	0.3%
子宮	0.0471	ND <sup>a</sup>	—
胎齢 7.5 日胚	0.0239	ND <sup>a</sup>	—
胎齢 9.5 日胚	0.0587	0.0006	1.0%
胎齢 12.5 日胚	0.0353	0.0004	1.1%

<sup>a</sup>ND, 検出されず

は、どちらも胎仔期 (胎齢 8.5 日~10.5 日の早期) に死亡するのに対して PC<sup>-/-</sup> マウスは出生できることから、EPCR や TM は PC との相互作用を介さない機構で発生に関与している可能

性が考えられる。この点に関して Castellino らは、PC<sup>-/-</sup> マウスでは母体から胚への微量の PC の移行により出生している可能性を指摘している。

ヒト EPCR の立体構造と機能に関する論文として、最近、Oganesyan ら<sup>11)</sup> により EPCR の結晶構造について、また、Riewald ら<sup>12)</sup> により APC/EPCR が抗炎症作用を発揮する機構について報告されたので、以下に紹介する。

## 2. EPCR の高次構造

Liaw ら<sup>13)</sup> は、i) Ala mutation の実験から、EPCR の PC/APC への結合には 10 個のアミノ酸残基 (Arg 81, Leu 82, Val 83, Glu 86, Arg 87, Phe 146, Tyr 154, hr 157, Arg 158, Glu 160) が特に重要である。なお、4 箇所の N 型糖鎖付加部位 (Asn 30, Asn 47, Asn 119, Asn 155) を Ala に置換しても EPCR の結合能

はほとんど変化しない, ii) マウス MHC クラス I H-2 Kb をテンプレートにしてモデリングすると, EPCR は 8 個の  $\beta$  シート上にある逆平行の 2 個の  $\alpha$  ヘリックスからなる特徴的な groove (溝) を形成しており, 同じような groove は MHC クラス I/CD1 ファミリーにも見られる, ことなどを報告した. なお, CD1 ファミリーでは, groove は一般に抗原提示部位として機能している.

一方, Oganessian ら<sup>11)</sup> は, 2 種類の EPCR (① EPCR 単独, ② EPCR と PC の Gla ドメインとの複合体) の結晶構造を解析し, i) その構造は CD1d\* と非常に類似している, ii) EPCR の groove にはリン脂質が強固に結合しているが, このリン脂質は, EPCR と PC との結合に関与するらしい, iii) EPCR の PC/APC 結合部位は, groove の外側に存在する, iv) 細胞外ドメインには 3 個の Cys 残基が存在するが, Cys 101 と Cys 169 はジスルフィド結合しており, Cys 97 はフリーで存在している, ことなどを明らかにした.

その詳細は以下の通りである. 解析された EPCR は膜貫通ドメインと細胞内ドメインを欠失した sEPCR として, CHO 細胞の糖転位酵素欠損株を用いて調製された. EPCR と PC 複合体との結晶化では, 結晶化の間に夾雑しているプロテアーゼによって PC が分解を受け, PC の Gla ドメインとの複合体として結晶化された.

sEPCR と PC の Gla ドメインとの複合体の構造を図 3 に示す. EPCR 単独と複合体間での EPCR の構造に差はほとんど認められなかったが, 複合体では Arg 156 の側鎖が大きくシフトし, その結果, EPCR の疎水性ポケットが開き, PC 由来の Gla ドメインの Phe 4 を EPCR の groove 内に引き込みやすくしている (図

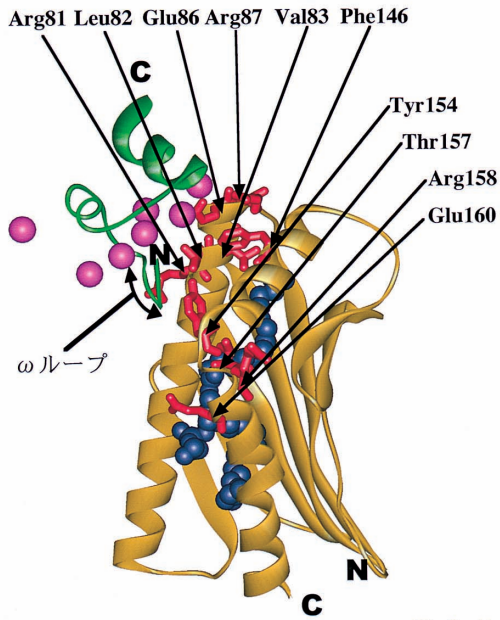
4). PC は主に Gla ドメインで EPCR と結合しており<sup>14)</sup>, PC と EPCR の結合は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性である. 結晶構造解析から明らかになった PC の Gla ドメインと EPCR との相互作用の詳細は, 以下の通りである. i) EPCR の Glu 86 と PC の Gla ドメインは  $\text{Ca}^{2+}$  を介して配位している. また, Glu 86 は, PC の Gla 7, Gla 25, Gla 29 と水素結合が可能な距離内に位置している, ii) PC と EPCR 間で水素結合形成しうる位置関係が, Gla 7-Gln 150, Gla 25-Arg 87, Gla 7-Tyr 154 間でも見られる, iii) PC と EPCR 間の疎水性相互作用のネットワークが Gla 7-Leu 82, Phe 4-Tyr 154, Phe 4-Thr 157 と Leu 8-Leu 82 間でみられる (図 5).

PC の Gla に結合した  $\text{Ca}^{2+}$  の役割は, i) PC の疎水性  $\omega$  ループ (ループ内の Phe 4 と Leu 8 は EPCR との相互作用に主要な役割を果たしている) を形成, 安定化させる, ii) EPCR と水素結合できるように, PC の Gla 残基を EPCR 側に配向させるのに役立っていると推定された. なお, PC と同じ Gla 含有蛋白質のプロスロンビンや FVII においても,  $\text{Ca}^{2+}$  が Gla ドメインへ結合すると, 親水性に富む Gla 残基を内側に折り畳み, 内部を向いていた N 末端の疎水性領域を外部に突出したループ ( $\omega$  ループ) に変化させることが知られている<sup>15)</sup>.

今回の Oganessian らの報告でのトピックは, sEPCR の groove 内にリン脂質が結合しており, そのリン脂質が EPCR の機能発現に寄与していることが示されたことである. 複合体の解析では, EPCR 単独 (2.0 Å) に比べてより高い解像度 (1.55 Å) が得られ, 結合しているリン脂質がフォスファチジルエタノールアミンもしくはフォスファチジルコリンと同定された. そこで, EPCR の groove に結合したリン脂質が PC との結合に必須であるかを明らかにす

\*: CD1d

組織適合抗原の原型蛋白質 CD1 のアイソタイプで, 315 アミノ酸残基からなる I 型膜貫通蛋白質である. そのアミノ酸配列は, MHC とは異なり, すべてのヒトで同じである. 機能的には,  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをリガンドとして NKT 細胞を活性化する.



PC由来Gla domain-sEPCR 複合体

図3

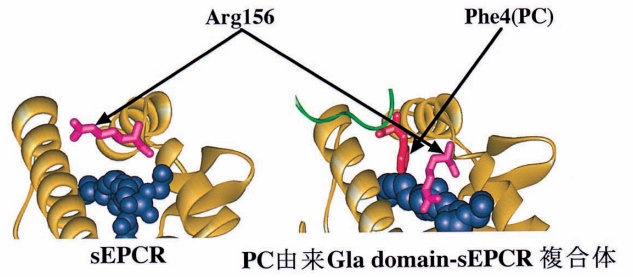


図4

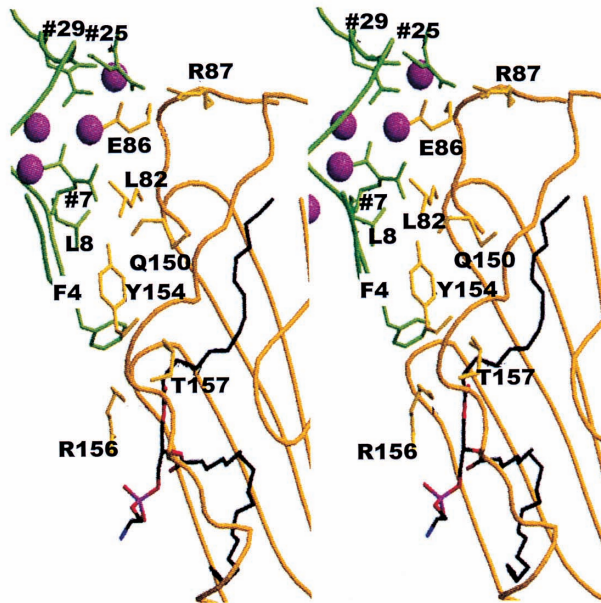


図5

るため、蛍光標識 APC の EC への結合実験を行い、リン脂質の重要性を明らかにした。すなわち、リン脂質を含有する sEPCR は、APC の EC 上の EPCR への結合を濃度依存的に阻害したが、リン脂質を抽出・除去した sEPCR では、APC の EC への結合阻害能が低下した。また、抽出されたリン脂質を sEPCR に再添加すると、結合阻害活性は回復したことから、EPCR に結合しているリン脂質は、EPCR と PC の結合に重要であることが示された。

CD1d の結晶構造は既に解明されており<sup>16)</sup>、その全体的な構造は EPCR と類似しているが、CD1d と脂質 ( $\alpha$ -ガラクトシルセラミド) との相互作用については不明であった。そこで、EPCR と CD1d の脂質が結合する groove を比較するため、両分子をコンピュータ上で重ね合わせた。その結果、EPCR において脂質と相互作用している 18 個のアミノ酸残基の内、7 個が CD1d と同一であり、6 個が類似の特性を持つアミノ酸残基であった。このように EPCR 内で脂質とコンタクトしているアミノ酸残基が CD1d で高度に保存されていることから、CD1d も EPCR と類似の方式で脂質と結合している可能性が示唆された。また、脂質の脂肪酸側鎖は groove 内の疎水性アミノ酸残基と相互作用することによって、groove のヘリックス部分が脂肪酸側鎖を覆う形となり、かつ溶媒分子の接近を制限し、脂肪酸の酸化を防止していると推定される。この EPCR へのリ

ン脂質の結合が生理的にどのような意味をもつかは、今後の研究で明らかになっていくと思われる。

### 3. APC の抗炎症作用発現における EPCR の関与

これまで各種の *in vivo*<sup>17)18)</sup>、*in vitro*<sup>19)20)</sup> の実験より、APC には抗炎症作用のあることが知られている。また、臨床的にも Eli Lilly 社による組換え APC (rAPC) 製剤の重症敗血症患者を対象にした大規模臨床試験において、rAPC 製剤投与により死亡率が低下すること、また、炎症性サイトカインの IL-6 レベルが投与一日目から有意に低下することが示された<sup>21)</sup>。しかし、その作用機序については不明であった。Joyce ら<sup>22)</sup> は、APC の EC に対する転写レベルでの作用を調べるために遺伝子プロファイリングを行ない、APC は炎症性サイトカインの転写調節に関与する NF $\kappa$ B の転写を抑制していることを明らかにした。しかし、どのような機序により APC が EC の転写制御に関わるかは不明であった。一方、Riewald ら<sup>12)</sup> は、シグナル伝達系蛋白質の PAR1 (Protease Activating Receptor-1) および PAR2 を欠失したマウスの線維芽細胞を用い、APC によるシグナリングの必要条件について Egr-1 プロモーター活性を指標に調べた。その結果、PAR1 もしくは PAR2 と EPCR が共発現している場合での

図 3 PC の Gla ドメインおよびリン脂質と結合した sEPCR の主鎖骨格リボンモデル: sEPCR (黄色のリボン) では、2 個の  $\alpha$  ヘリックスと 8 個の  $\beta$  シートが、リン脂質 (中央の青紫色のボール) で満たされた groove を形成している。PC の Gla ドメイン (緑色のリボン) に  $\text{Ca}^{2+}$  (桃色の球) が結合すると、PC アミノ末端の  $\omega$  ループが外側に突出する。EPCR 非存在下の膜表面では、そのループがリン脂質と相互作用する。PC の Gla ドメインと sEPCR の groove 内に位置する脂質分子間の直接的な相互作用はないようである。このモデルでは、sEPCR は 7-177 番目のアミノ酸残基まで、PC は N 末端からの 33 アミノ酸残基までを示している。Ala mutation の実験から PC と EPCR の結合に重要とされた 10 個のアミノ酸残基の側鎖を赤色で示す。

図 4 sEPCR と PC 由来 Gla-domain-sEPCR 複合体の比較: Arg156 (sEPCR) の側鎖を紫色で、Phe4 (PC) の側鎖を赤色で示した。

図 5 PC 由来の Gla ドメインと sEPCR 間の相互作用に関与するアミノ酸残基 (転載許可取得): 黄色は sEPCR、緑色は PC の Gla ドメイン (#は  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸残基を表し、例えば #7 は Gla 7 を示す)、深赤色のボールは  $\text{Ca}^{2+}$ 、リン脂質は黒色で示す。

み, APC によるシグナリングが起きることを見出した。また, APC との結合能を欠如した変異体 EPCR (EPCR A 154; Tyr<sup>154</sup>→Ala) では, PAR の活性化は確認できなかったため, EPCR に結合した APC のみが PAR を活性化できるとした。

上記の EPCR 依存性の APC による PAR の活性化について, さらに培養 EC を用いて試験した。その結果, APC は MAP キナーゼ (MAPK) のリン酸化反応を誘導したが, Phe-Phe-Arg-クロロメチルケトンで不活化した APC は, MAPK のリン酸化を惹起できなかった。したがって, この反応は APC のプロテアーゼ活性に依存するとした。また, 10 倍過剰の不活化 APC 存在下では, トロンビンによるシグナリングは阻害されなかったのに対して, APC によるシグナリングは阻害されたことから, APC によるシグナリングは EPCR 依存性であることが示唆された。さらに, PAR 1 の活性化を阻害する抗体存在下では, PAR 2 アゴニストペプチドに対する反応性に影響することなく, EC 上での APC 依存性の MAPK のリン酸化は阻害されたことから, EC 上での APC シグナリングは PAR 1 のみが担っていることが示された。

PAR 活性化を介しての EC での APC 依存性の gene induction を説明できるかを知るため, APC あるいは, PAR 1 もしくは PAR 2 に対する選択的アゴニストペプチドで刺激後の遺伝子プロファイリングを調べた。PAR 1 アゴニストと PAR 2 アゴニストの遺伝子プロファイリングの違いは, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) 遺伝子が PAR 1 のみで, DSCR 1 (Down Syndrome Critical Region 1)\*\* 遺伝子が PAR 2 のみで増強された点にあった。APC で EC を処理すると, MCP-1 遺伝子の発現を増強させ, DSCR 1 遺伝子には変化が

なかったことから, APC は PAR 1 活性化を介して作用しているといえる。

MCP-1 は単球/マクロファージだけでなく, T リンパ球や好塩基球の走化性を亢進する作用を有するが<sup>23)</sup>, LPS を腹腔内に投与した敗血症マウスモデルにおいては, 抗 MCP-1 抗体投与により TNF- $\alpha$  や IL-12 を高め, 死亡率を上昇させる事が報告された<sup>24)</sup>。したがって, 少なくともこの実験的エンドトキセミアモデルでは, MCP-1 は抗炎症的に機能していると考えられる。

トロンビンレセプターの PAR 1 は微量のトロンビンで容易に活性化され, APC の生成はトロンビン依存性である。トロンビン形成と APC による PAR 1 活性化はどのように関連しているかについて, Riewald らは次のように考察している。i) 低濃度のトロンビンをヒヒに投与すると, PAR 1 依存性の血小板活性化は起こらず APC の形成が進むことから, トロンビンは EC 上の TM に結合し (Th-TM 複合体は PAR を活性化しない<sup>25)</sup>), EC 上の EPCR に結合した PC を活性化する (図 2 参照), ii) 形成された APC は, EPCR との複合体では PAR 1 を活性化し, かつ抗炎症的に作用する, iii) このような生理的な PC 活性化反応により形成された APC は, EC 上での PAR 1 シグナリングの主要なアクチベーターとして機能している。

抗炎症作用における EPCR の重要性は, ヒヒ敗血症モデルでの実験で, APC と EPCR の結合を阻害する MoAb を投与すると, APC の抗炎症作用は消失することから証明されている<sup>26)</sup>。重症敗血症では, 炎症性サイトカインにより TM の発現が抑制され, 生理的な抗凝固能を著しく低下させるが, TM が欠失した EC 上でも EPCR は検出されることから<sup>27)</sup>, APC が治療的に投与されたときは, 残存 EPCR を PAR 1 活性化の coreceptor として使っている

\*\* : DSCR 1 (Down Syndrome Critical Region 1)

ダウン症候群の共通なトリソミー領域である 21 番染色体の q 22.1-q 22.2 に位置する原因候補遺伝子。胎生期の脳や心臓に高発現しており, 配列より転写制御もしくはシグナル伝達に関与する蛋白質と推定されている。

のかもしれない。なお, Oganessian ら<sup>11)</sup> は, 結晶構造解析の結果から考えると, APC は膜表面と直接接している場合に比べて, EPCR と結合した場合, 約 35 Å 上位にあると予測されることから, このような APC の空間的配置が細胞表面蛋白質の切断の特異性を決め, EPCR 依存性のシグナリングに関与している可能性を示唆している。

#### 4. おわりに

EPCR は, PC の抗凝固作用および抗炎症作用の機構を一層解明する目的で, その研究が進められてきた。EPCR が抗原提示分子との構造的相同性を有していることに何らかの意味があるのか, 感染に対する生体防御の観点からも興味を持たれる。また, 癌細胞で EPCR が高率に発現している事が報告されているが<sup>28)29)</sup>, すべての癌細胞に TM が共発現しているわけではない。したがって, EPCR の癌細胞での発現の機作とその役割に関しても注目される。さらに, EPCR の生物学的な機能を追求する上で欠かせないのは, 分子進化的視点からの研究であるが, この点に関しては哺乳類以外では EPCR に関する知見は殆ど無い。他の抗凝固因子とともに EPCR の系統発生的知見を凝固系のそれと比較しつつ俯瞰するのは意義のある事と考えられる。

**謝辞:** 執筆に当たって, 御助言いただいた当研究所の水口純および濱本高義両博士にお礼申し上げます。また, 御校閲戴きました岩永貞昭先生 (財団法人 化学及血清療法研究所・顧問) に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Esmon CT: The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* **83**: 639-643, 2000.
- 2) Fukudome K, Esmon CT: Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* **269**: 26486-26491, 1994.
- 3) Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT: The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10212-10216, 1996.
- 4) Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT: Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation *in vivo*. *Blood* **97**: 1685-1688, 2001.
- 5) Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della Valle P, Esmon CT: Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: Lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood* **91**: 725-727, 1998.
- 6) Kurosawa S, Esmon CT, Stearns-Kurosawa DJ: The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. *J Immunol* **165**: 4697-4703, 2000.
- 7) Xu J, Esmon CT: Endothelial cell protein C receptor (EPCR) constitutively translocates into the nucleus and also mediates activated protein C, but not protein C, nuclear translocation. *Thromb Haemost (Suppl)*: 206 (Abstr), 1999.
- 8) Gu JM, Crawley JT, Ferrell G, Zhang F, Li W, Esmon NL, Esmon CT: Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. *J Biol Chem*. **277**: 43335-43343, 2002.
- 9) Castellino FJ, Liang Z, Volkir SP, Haalboom E, Martin JA, Sandoval-Cooper MJ, Rosen ED: Mice with a severe deficiency of the endothelial protein C receptor gene develop, survive, and reproduce normally, and do not present with enhanced arterial thrombosis after challenge. *Thromb Hemost* **88**: 462-472, 2002.
- 10) Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T, Mackman N: Low level of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest* **101**: 560-569, 1998.
- 11) Oganessian V, Oganessian N, Terzyan S, Qu D, Dauter Z, Esmon NL, Esmon CT: The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J Biol Chem* **277**: 24851-24854, 2002.
- 12) Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W: Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* **296**: 1880-1882, 2002.
- 13) Liaw PCY, Mather T, Oganessian N, Ferrell GL, Esmon CT: Identification of the protein C/activated protein C binding sites on the endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* **276**: 8364-8370, 2001.
- 14) Regan LM, Mollica JS, Rezaie AR, Esmon CT: The interaction between the endothelial cell protein C receptor and protein C is dictated by the gamma-carboxyglutamic acid domain of protein C. *J Biol Chem* **272**: 26279-26284, 1997.
- 15) 森田隆司, 水野 洋: Gla ドメインの立体構造と機能. *血栓止血誌* **11**: 391-396, 2000.
- 16) Zeng Z, Castano AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA: Crystal structure of mouse CD1: an



- MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* **277**: 339-345, 1997.
- 17) Taylor FB Jr, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Viganò-D'Angelo S, Blick KE: Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest* **79**: 918-925, 1987.
  - 18) Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K: Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *Am J Physiol* **272**: L197-202, 1997.
  - 19) Hancock WW, Tsuchida A, Hau H, Thomson NM, Salem HH: The anticoagulants protein C and protein S display potent antiinflammatory and immunosuppressive effects relevant to transplant biology and therapy. *Transplant Proc* **24**: 2302-2303, 1992.
  - 20) White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP, Smith OP: Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* **110**: 130-134, 2000.
  - 21) Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* **344**: 699-709, 2001.
  - 22) 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.
  - 23) Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL: Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol* **157**: 4602-4608, 1996.
  - 24) Zisman DA, Kunkel SL, Strieter RM, Tsai WC, Bucknell K, Wilkowski J, Standiford TJ: MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *J Clin Invest* **99**: 2832-2836, 1997.
  - 25) Grinnell BW, Berg DT: Surface thrombomodulin modulates thrombin receptor responses on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **270**: H603-H609, 1996.
  - 26) Taylor FB Jr, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang ACK, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT: The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* **95**: 1680-1686, 2000.
  - 27) Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS: Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* **345**: 408-416, 2001.
  - 28) Tsuneyoshi N, Fukudome K, Horiguchi S, Ye X, Matsuzaki M, Toi M, Suzuki K, Kimoto M: Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines. *Thromb Haemost* **85**: 356-361, 2001.
  - 29) Scheffer GL, Flens MJ, Hageman S, Izquierdo MA, Shoemaker RH, Scheper RJ: Expression of the vascular endothelial cell protein C receptor in epithelial tumour cells. *Eur J Cancer* **38**: 1535-1542, 2002.