

## ◆トピックス◆

## プロテイン C 活性化機構におけるプロテイン C レセプターの役割

福 留 健 司\*

A Role of the Endothelial Cell Protein C Receptor (EPCR)  
for Protein C Activation

Kenji FUKUTOME\*

**Key words** : Protein C, endothelial cells, receptor, thrombomodulin, cancer

### はじめに

血中をセリンプロテアーゼ前駆体として循環しているプロテイン C (PC) は血管内皮上で活性型のプロテアーゼに変換されてはじめて生理機能を発現できるようになる。PC が凝固因子であるトロンビンによって活性化されることが見出され<sup>1)</sup>, ついでこの活性化反応が血管内皮上で促進することが明らかになり<sup>2)</sup>, トロンボモジュリン (TM) がクローニングされた<sup>3,4)</sup>。TM と複合体形成したトロンビンによる PC の活性化反応はトロンビン単独による活性化に比べると遙かに効率的な反応ではあるが、それでもその Km 値は血中 PC 濃度の 65 nM よりも 15 倍も高い約 1  $\mu$ M である。一方、血管内皮細胞上で起こる活性化反応はより高親和性であり、動脈内皮細胞においてその値は 125 nM であった<sup>5)</sup>。この高親和性の反応は血管内皮上に存在するプロテイン C レセプター (endothelial cell protein C/activated protein C receptor; EPCR) の機能によるものである。

### EPCR の構造

EPCR 蛋白はアミノ酸 238 個からなる糖タンパクであり、その N 末端領域にはシグナルペプチド、C 末端にはトランスメンブラン領域を有する 1 型膜貫通蛋白である<sup>6)</sup>。アミノ酸配列の相同性、ゲノム構造からこの蛋白は免疫系の CD1/MHC クラス 1 スーパーファミリーに属するものと思われる。細胞外ドメインは MHC 分子でペプチド結合に関与している  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ドメインに相当すると思われる構造を含んでいるがミクログロブリンとの結合に関与する  $\alpha 3$  ドメインを欠如している。細胞内領域は極端に短く、細胞膜貫通領域のストップシグナルと 1 つのシステイン残基が存在するだけである。ヒト、ウシの EPCR には保持された 4 箇所の N 型糖鎖付加部位が存在し、マウスにおいては加えてもう 1 箇所存在する<sup>7)</sup>。ツニカマイシン存在下でパルスラベルを行った場合と、N グリカナーゼ処理をした場合と同サイズのシグナルが検出されることから、EPCR には O 結合型糖鎖は存在していないと思われる。

\*佐賀医科大学免疫血清学講座 [〒 894-8501 佐賀市鍋島 5-1-1]

Department of Immunology, Saga Medical School [5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501, Japan]

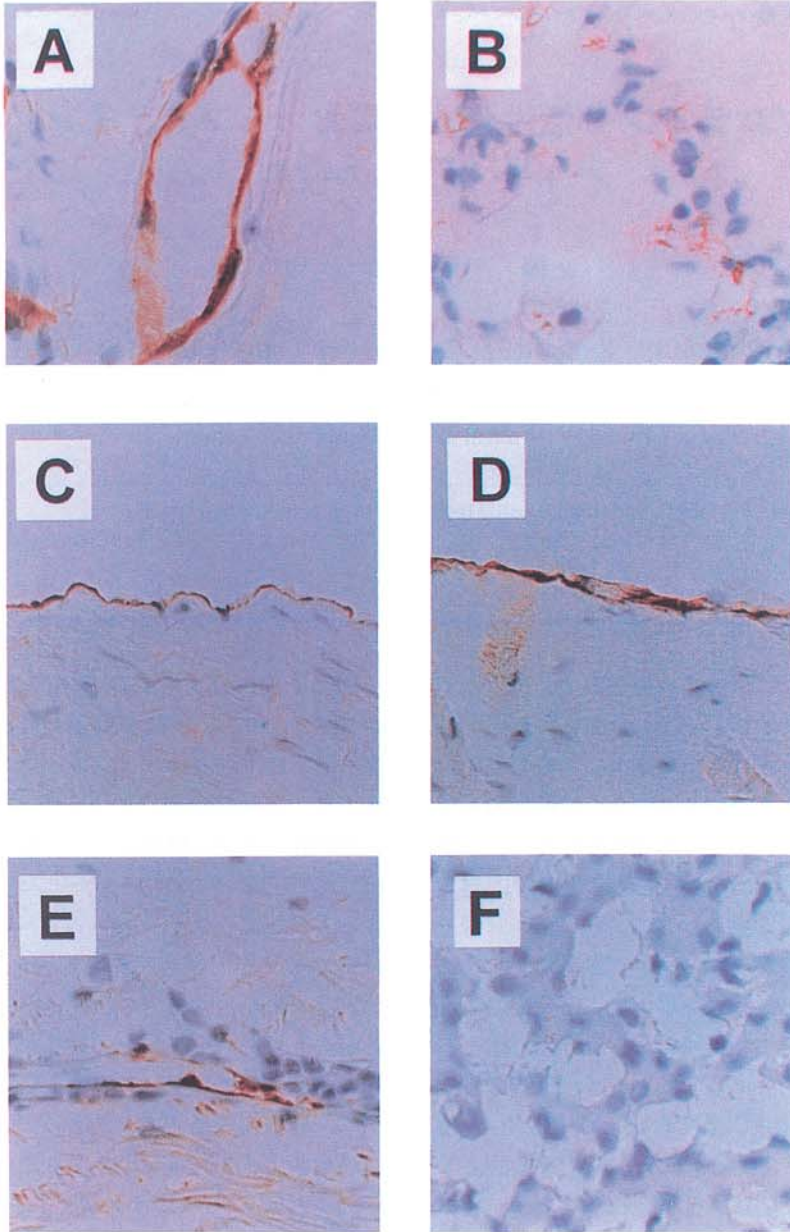


図1 EPCRの免疫組織染色. 肺 (A, B), 下大静脈 (C), 冠動脈 (D), 皮膚 (E), 肝臓 (F) における EPCR の発現を抗 EPCR モノクローナル抗体 (RCR-121) で検出した. EPCR は特に大動脈, 大静脈等の太い血管で特に強く発現しているが, 微細血管にも検出される. 肝臓の洞内皮細胞および腎臓の糸球体内皮細胞では発現は検出されなかった.

### EPCR の機能

EPCR は生理的濃度のカルシウムとマグネ

シウム存在下で PC および活性化 PC を  $K_d = 30 \text{ nM}$  の高親和性で結合する. 血中の PC の濃度がその倍以上であることから, 血流にさら

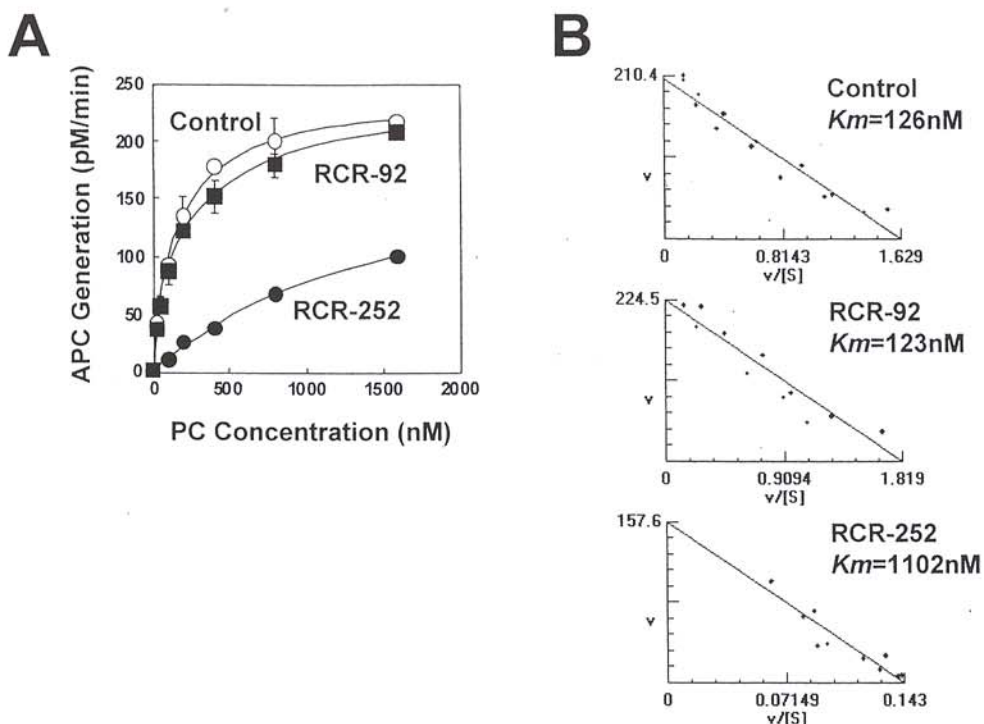


図 2 大動脈内皮細胞上での PC 活性化反応。初代培養大動脈血管内皮細胞上での PC の活性化は  $K_m = 126$  nM の高親和性の反応である。この細胞に抗 EPCR 抗体を作用させると反応の親和性が約  $1 \mu\text{M}$  まで低下した。RCR-252 は PC の結合を阻止する抗体であり、RCR-92 は活性に影響を与えないコントロール抗体である。

されている EPCR には PC が結合した状態で存在するものと考えられる。そこでこの結合が血管内皮上で触媒される PC の活性化反応に対する影響を検討した。ヒト腎由来 293 細胞株に EPCR と TM の cDNA をトランスフェクトした細胞株を作成し、トロンビン依存性の PC の活性化反応を測定した。EPCR の単独発現では PC の活性化反応はまったく認められなかったが、TM を単独発現する細胞上ではトロンビン依存性の活性化反応が認められた。しかし、その反応は非効率的なものであり、血管内皮上で観察される反応とは大きく異なっていた。これに対して EPCR と TM を共発現させた細胞では高親和性の効率的な活性化反応が見られた<sup>5)</sup>。この結果から、効率的な PC の活性化反応にとって EPCR の機能が要求されることが示された。

### EPCR の発現

PC 経路は主に微細血管において機能している制御機構であり、大血管では有効には機能していないとされてきた。その根拠はトロンビン/TM 複合体による PC の活性化反応が低親和性であるために、微細血管のような特殊な条件下でないと活性化が起こらないとされてきたためである。EPCR は図 1 に示すように広くさまざまな血管に発現しているが、興味深いことにその発現は PC 経路が機能していないとされてきた大血管において特に顕著であった。初代培養大動脈血管内皮細胞も EPCR を強く発現しており、この細胞上で触媒される PC 活性化反応は効率的で高親和性のものであった。しかし、この細胞を抗 EPCR 抗体で処理することにより、活性化反応は TM を単独で発現させた時と同様の低親和性のものに変化した(図 2)。肺微

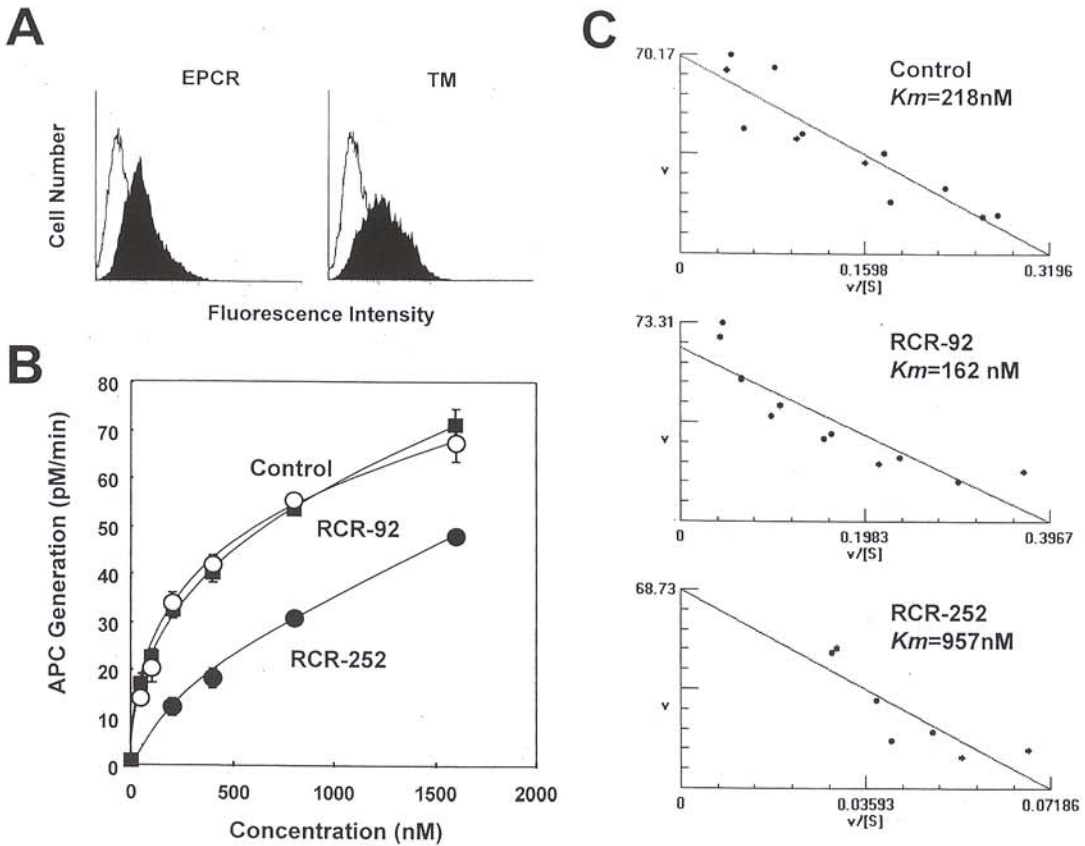


図3 微細静脈細胞上でのPC活性化反応。この内皮細胞においてもEPCRの発現は検出されるが、そのレベルは動脈内皮細胞(文献5)に比べると低い(A)。活性化反応の $K_M$ 値は約220nMである(B, C)。抗EPCR抗体によってこの反応はさらに低親和性の反応になる。

細静脈血管内皮細胞においてもEPCRの発現が検出されたがそのレベルは動脈細胞に比べて低く、この細胞によって触媒されるPCの活性化反応は動脈細胞の場合に比べて低親和性であった。それでもTMのトランスフェクタントに比較するとやはり高親和性の反応であり、動脈細胞と同様に抗EPCR抗体によりその反応は特異的に抑制された。したがって、EPCRは大動脈から微細血管までに広く機能しているものと思われる<sup>9)</sup>。

### 癌細胞におけるEPCRの発現と機能

神経膠芽腫や白血病においてTMの発現が報告されており、凝固抑制活性が注目されてい

る<sup>9)10)</sup>。これらの癌細胞上でのPC活性化に関してもEPCRの機能が関与している。白血病由来の細胞株であるU937とTHP-1を共に同程度のTMを発現していることがNorthern blot解析およびFACS解析で示された。U937に関してはEPCRの発現が認められたが、THP-1に関しては検出されなかった。そこでこれらの細胞によるPCの活性化に関して検討したところU937にはその活性が認められたが、THP-1には検出されなかった。また、U937による活性化反応は抗EPCR抗体によってほぼ完全に阻止された。また、これらの細胞においてall-trans retinoic acidがTMの発現を誘導することが知られているが、この誘導後においてもEPCR陰性のTHP-1では、わずかな活性しか

検出されなかった。これに対して EPCR 陽性の U 937 では TM の発現誘導に従って顕著な活性の上昇が認められた。また、U 937 による活性化反応は抗 EPCR 抗体によって特異的に抑制された。したがって、EPCR の機能は白血病細胞における PC 活性化反応に関与している<sup>11)</sup>。

### おわりに

EPCR は大動脈、静脈、微細血管等のさまざまな血管における PC 活性化反応に重要な働きをしているものと思われる。また、その機能は腫瘍における凝固異常にも関与している可能性がある。

### 文 献

- 1) Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH and Davie EW: Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry*, **16**: 5824-5831, 1977.
- 2) Esmon CT and Owen WG: Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2249-2252, 1981.
- 3) Jackman RW, Beeler DL, VanDeWater L and Rosenberg RD: Characterization of a thrombomodulin cDNA reveals structural similarity to the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8834-8838, 1986.
- 4) Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y, Nishioka J, Maruyama I, Zushi M, Kawahara S, Honda G, Yamamoto S and Horiguchi S: 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.
- 5) Fukudome K, Ye X, Tsuneyoshi N, Tokunaga O, Sugawara K, Mizokami H and Kimoto M: Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor. *J Exp Med* **187**: 1029-1035, 1998.
- 6) Fukudome K and Esmon CT: Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* **269**: 26486-26491, 1994.
- 7) Fukudome K and Esmon CT: Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). *J Biol Chem* **270**: 5571-5577, 1995.
- 8) Ye X, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Satoh T, Tokunaga O, Sugawara K, Mizokami H and Kimoto M: The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 671-677, 1999.
- 9) Maruno M, Yoshimine T, Isaka T, Kuroda R, Ishii H and Hayakawa T: Expression of thrombomodulin in astrocytomas of various malignancy and in gliotic and normal brains. *J Neurooncol* **19**: 155-160, 1994.
- 10) Koyama T, Hirotsawa S, Kawamata N, Tohda S and Aoki N: All-*trans* retinoic acid upregulates thrombomodulin and downregulates tissue-factor expression in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **84**: 3001-3009, 1994.
- 11) Tsuneyoshi N, Fukudome K, Ye X, Horiguchi S, Matsuzaki M, Sano M, Suzuki K and Kimoto M: Expression and anticoagulant activity of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines (投稿中).