

内因系凝固反応活性化機序と遺伝性血管性浮腫

宮田敏行¹⁾、内田裕美子²⁾、武田壮一³⁾

国立循環器病研究センター 脳血管内科¹⁾、分子病態部²⁾、心臓生理機能部³⁾

Mechanisms of intrinsic blood coagulation reaction and hereditary angioedema

Toshiyuki Miyata¹⁾, Yumiko Uchida²⁾, Soichi Takeda³⁾

¹⁾Department of Cerebrovascular Medicine, ²⁾Department of Pathophysiology, ³⁾Department of Cardiac Physiology, National Cerebral and Cardiovascular Center

1. はじめに

凝固系と補体系はそれぞれに関与する因子の数が極めて多く、また幾つかの因子は両経路に関わっており、大変複雑に絡み合っている。凝固系は組織因子で始まる外因系と、第 XII 因子 (XII) が陰電荷物質 (負電荷物質) に接することで始まる内因系からなる。組織因子がクローニングされ 2017 年で 30 年が経った¹⁾。この間、組織因子および外因系凝固反応に関して、血栓・止血の観点から極めて多くの研究が進められてきた。一方、内因系凝固 (接触相) 反応に関しては、これに関わる因子の先天性欠乏症が出血症を示さないこと、および惹起因子である生体内の陰電荷物質が永らく不明であったことから、研究に停滞感がみられた。しかし、XII や第 XI 因子 (XI) の遺伝子欠損マウスの解析^{2,3)}や、生体内の陰電荷物質としてのポリリン酸の同定⁴⁾などの粘り強い一連の研究の結果、再びこの領域が研究者の注目

を集めている。最近では、XI が次世代の抗凝固の標的因子として脚光を浴び、従来のヘパリン療法に勝る結果を示す XI 抑制剤が発表されている⁵⁾。

凝固系と補体系のクロストークはこれまで多数報告されているが⁶⁾、重要と思われるのは表 1 に示す 6 点であろう。C1 インヒビターは補体反応と凝固反応を開始する酵素群を阻害する能力を有するので、補体系だけでなく内因系凝固系とカリクレイン-キニン系の制御に関わる。C5a は受容体を介して組織因子を誘導することが知られている⁷⁾。sublytic C5b-9 は血管内皮細胞にフォンビルブランド因子の分泌と細胞上への係留、および P-セレクトインの提示を行い、血小板や白血球を局所に集積させる⁸⁾。また、ホスファチジルセリンの露出による第 Va 因子の結合 (プロトロンビナーゼ複合体形成) に繋がる⁹⁾。残りの 3 つは凝固反応および線溶反応の制御に関わる。

本稿では、最近めざましい進展が見られる内因系凝固 (接触相) 反応に関して紹介し、C1 インヒビターの欠乏によるカリクレイン-キニン系の過度な活性化とそれに続く血管性浮腫を接触相の内因系凝固反応の観点から考察したい。遺伝性血管性浮腫 (Hereditary angioedema, HAE) の概要、病態、検査、診断、治療、予防などに関しては、既に本誌に総説として解説されているので¹⁰⁾、本稿では重複はなるべく避けるようにした。また、最近 HAE の成書も

略号一覧

略号	英語	日本語
XII	factor XII	第 XII 因子
XI	factor XI	第 XI 因子
HAE	hereditary angioedema	遺伝性血管性浮腫
PPK	plasma prekallikrein	血漿プレカリクレイン
PK	plasma kallikrein	血漿カリクレイン
HK	high-molecular weight kininogen	高分子キニンノーゲン
BK	bradykinin	ブラジキニン
LK	low-molecular weight kininogen	低分子キニンノーゲン
RCL	reactive center loop	反応中心ループ
ExAC	the Exome Aggregation Consortium	
ANGPT1	angiopoietin-1	

表1. 凝固機能と補体機能を有する凝固・補体・線溶因子

因子	凝固機能	補体機能
C1インヒビター	XIIaと血漿カリクレインを阻害	C1s, C1r, MASPを阻害
C5a, C3a	血管内皮細胞や単球・好中球に発現する受容体を介して、組織因子やPセレクトリンを発現誘導	炎症細胞をリクルートするアナフィラトキシン
sublytic C5b-9	ホスファチジルセリンの細胞表面への表出(プロトロンビナーゼ形成促進)、組織因子の露出	細胞溶解閾値以下(sublytic)の膜侵襲複合体
C4結合タンパク質	プロテインSに結合し、抗凝固能を低下させる	C3転換酵素(C4b2a)の失活化の促進(解離促進)、CFIIによるC4bとC3bの不活化の液性補助因子
Thrombin-activatable fibrinolytic inhibitor (TAFI, 別名CBP2)	塩基性アミノ酸に特異性を有するカルボキシペプチダーゼで、フィブリンのC末端Lysを遊離させる作用により線溶系を阻害	C5aとC3aのC末端Argを遊離させ、それぞれの機能を消失させる
トロンボモジュリン	トロンビンによるプロテインCとTAFI活性化のコファクター、その結果としてトロンビン生成の阻害と線溶系の阻害	C5aとC3aを不活化するTAFIa生成に必須、CFIIによるC3bの不活化を促進

刊行されたので、そちらもご覧いただきたい¹¹⁾。本稿では開始 Met をアミノ酸 1 残基目として数えることとするが、C1 インヒビターのアミノ酸残基番号は、登録されている立体構造および引用原著論文と同様に、シグナル配列 22 アミノ酸を除いた番号を用いることとする。

2. 血液凝固接触相の活性化機序

2-1. 血液凝固接触相の構成要素

接触相の内因系凝固反応の構成要素は、XII、XI、血漿プレカリクレイン (Plasma prekallikrein: PPK)、高分子キヌノーゲン (High-molecular weight kininogen: HK)、陰電荷物質である¹²⁾(図1、2)。表2にこれらの因子の性質を示した。XIIは陰電荷物質の表面に結合すると、コンフォメーションを変化させ XIIa 活性を示す(自己活性化とよぶ)。PPKとXIは血漿中でHKと1:1の複合体を形成している。自己活性化した XIIaは陰電荷物質の表面に結合した PPK-HK複合体の PPKを血漿カリクレイン (Plasma kallikrein: PK)に活性化させる(図1、2)。生成した PKは陰電荷物質の表面で効率良く XIIを活性化し、さらに XIIaは PPKを効率良く活性化するので、陰電荷物質の表面で相互に XIIと

PPKの活性化反応が進行する。これが接触相での凝固開始反応である。PKはHKから9アミノ酸残基のブラジキニン(BK)を生成し、BKはBK B2受容体を介して血管透過性亢進や血管拡張を行う(図1)。XIIaはXI-HK複合体のXIを活性化し、XIIaはトロンビン産生に繋がる。

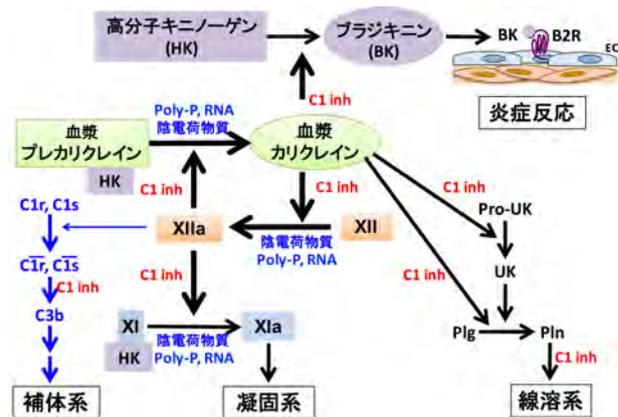


図1 内因系凝固反応・炎症反応・補体系・線溶系におけるC1インヒビターの阻害作用点

C1-inh: C1インヒビター, Pro-UK: プロウロキナーゼ, Pli: プラスミノゲン, Pln: プラスミン, B2R: ブラジキニン B2 受容体

表2. 凝固接触相タンパク質の性質

タンパク質	分子量 Da	血漿濃度 nM	血漿半減期 日	機能
XII	80,000	500	2-3	プロテアーゼ前駆体
血漿プレカリクレイン	85/88,000	486		プロテアーゼ前駆体
高分子キニノーゲン	120,000	670		コファクター
低分子キニノーゲン	66,000	1,300		コファクター
XI*	160,000	30	2.5-3.3	プロテアーゼ前駆体
C1インヒビター	104,000	962	0.07	プロテアーゼインヒビター

文献75を改変した。*ホモ2量体

XII は多種類のドメインを持つ血漿タンパク質である (図 2、3)。XII は PK を主とするプロテアーゼにより α XIIa (分子量 80 kDa) に活性化され、さらに PK により切断され、ほぼプロテアーゼドメインだけから成る β XIIa に変換される (図 2、3)。 β XIIa は陰電荷物質に結合できないが、PKK 活性化能を持ち、XI 活性化能はない¹³⁾。XII の大きな特徴は、陰電荷物質の表面で自己活性化する点である。XII の陰電荷物質に結合する領域は N 末端側重鎖 353 残基中にあるが、その結合する領域は正確には同定できていない。この事実から、XII は幾つかの結合部位を通して異なった陰電荷物質の表面に結合するとも考えられる¹⁴⁾。

XI は PPK と相同のドメイン構造、すなわち N 末端よりアップルドメインと呼ばれる 4 つのドメインに続き C 末端にプロテアーゼドメインを持つが、PPK とは異なりホモ 2 量体のタンパク質である (図 2)。結晶構造解析から、XI はカップとソーサー様構造が示されている¹⁵⁾。すなわち、4 つのアップルドメインがソーサーにあたり、プロテアーゼドメインがカップに相当する (図 4)。XI は HK と複合体を形成して血中を循環している。HK は XI のアップルドメイン 1 に結合する。

ヒト血漿中には 2 種類のキニノーゲン、すなわち高分子キニノーゲン (HK) と低分子キニノーゲン (Low-molecular weight kininogen: LK) が存在する。両キニノーゲンは 1 つの遺伝子から alternative

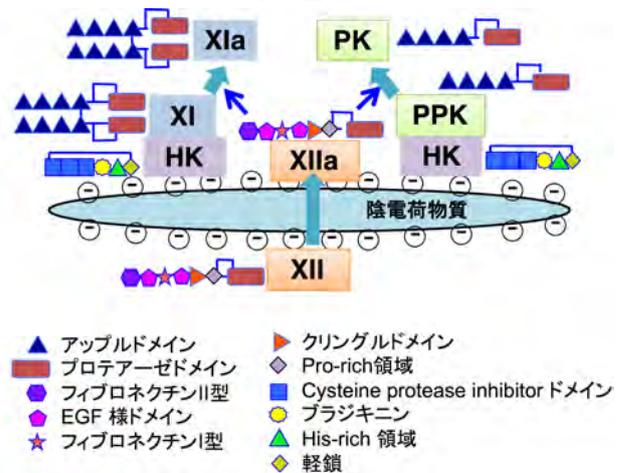


図 2 陰電荷物質に集合する XII、XI-HK 複合体、PPK-HK 複合体とそれぞれのドメイン構造

XII は陰電荷物質に結合し XIIa 活性を示し (自己活性化)、XIIa 活性が血漿プレカリクレイン (PPK) を血漿カリクレインへ (PK) と活性化することで接触相の反応が始まる。HK:高分子キニノーゲン

splicing により生成する^{16,17)}。HK と LK は、H 鎖 (362 残基)、BK (9 残基)、L 鎖 12 残基までが同一のアミノ酸配列を持つ (図 5)。エクソン 10 内でスプライシングが生じると LK となり、スプライシングが生じないと HK となる。HK と LK の L 鎖は、255 残基と 38 残基である。HK の L 鎖には、陰電荷物質に結合する His に富んだ領域 (His-rich region) と、PPK および XI が結合する部位が存在する。HK は接触相の活性化に大きな役割を果たす。

HK は PK で切断を受け BK を遊離する (図 1)。一方、LK と HK は組織カリクレインで切断を受けカリジン (Lys-BK, 10 アミノ酸残基) を遊離する。BK

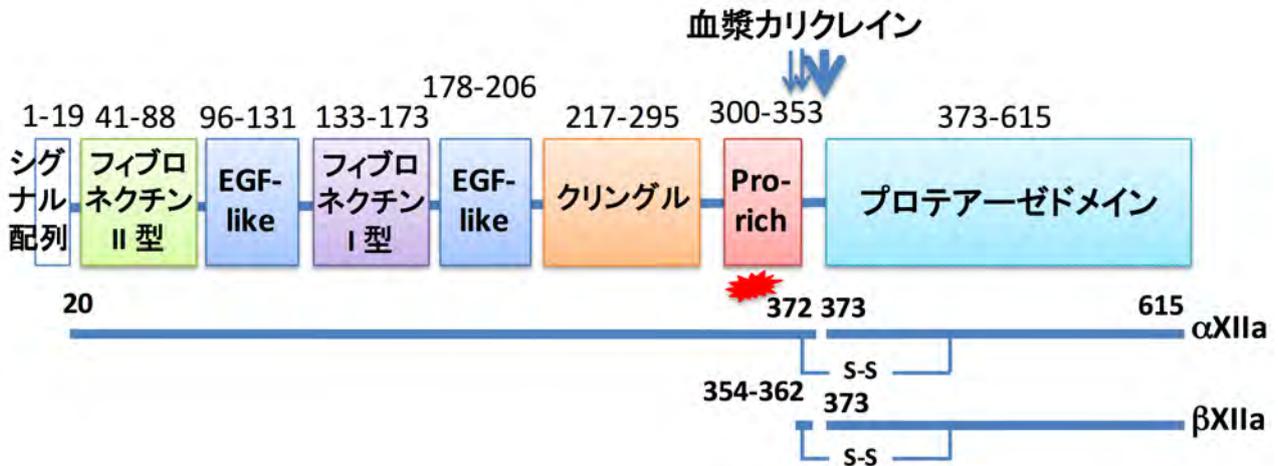


図3 XIIのドメイン構造

XIIはモザイク状のドメイン構造をもちC末端にプロテアーゼドメインがある。XIIは血漿カリクレインによりArg372-Val373が切断され2本鎖の活性型αXIIa(分子量80kDa)に変換され、さらにPKによりArg353-Asn354とArg362-Leu363が切断され、ほぼプロテアーゼドメインだけから成るβXIIaに変換される。プラスミンはXIIのArg372-Val373とLys365-Ser366を切断し活性化する⁶⁴⁾。XIIの陰電荷表面に結合する領域はN末端側372残基中にあるが、結合する領域は正確には同定できていない。XIIaのプロテアーゼドメイン⁷³⁾およびフィブロネクチンI型ドメインと二番目のEGF様ドメイン⁷⁴⁾の立体構造はそれぞれ決定されているが、他の領域の立体構造は決定されていない。FXII-HAE患者にThr328Lys変異、Thr328Arg変異、324-340残基(17残基)欠失/新規27残基挿入変異、Pro298-Pro303重複変異が同定されているが、これらはいずれもPro-rich領域に存在する(本文参照)。

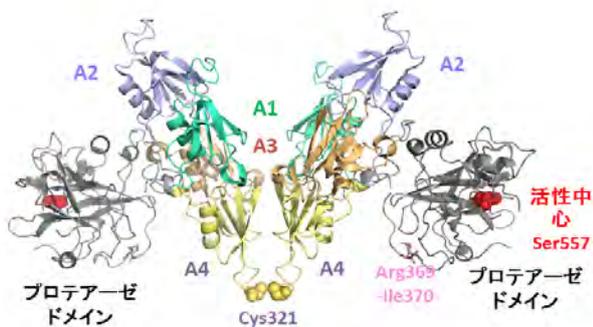


図4 XIの立体構造

XIはN末端よりアップル(A)ドメインと呼ばれる4つのドメインに続きC末端にプロテアーゼドメインを持つ(図2)。XIの構造上の特徴はホモ二量体構造を持つことである(表2)。プロテアーゼドメインがカップで、4つのAドメインがソーサー様構造と呼ばれる¹⁵⁾。XIはAドメインを介してHKと結合し、複合体として血中を循環している(図1, 2)。Ser557:活性中心残基、Arg369-Ile370:活性化に伴い切断される部位、Cys321:二量体を繋ぐジスルフィド結合。

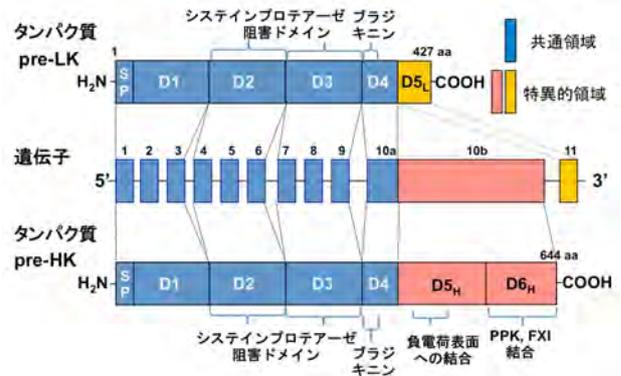


図5 高分子および低分子キノーゲンのドメイン模式図

ヒト血漿中には alternative splicing により生成する高分子キノーゲン(HK)と低分子キノーゲン(LK)が存在する(表2)。キノーゲンのドメインは、BK以外にも多彩な機能が報告されている。特に、HKには、陰電荷表面に結合するHisに富んだ領域(D5_H)と、PPKおよびXIが結合する領域(D6_H)が存在し、接触相の活性化に大きな役割を果たす。SP: シグナル配列

とカリジンは BK B2 受容体を介して細胞に作用し、血管内皮細胞を収縮（血管透過性亢進）し、NO を発生し平滑筋の弛緩（血管拡張）を行う。

XII, PPK, HK の各欠乏症患者は出血症状を示さない。一方、XI 欠乏症患者では半数程度に出血症状を示すことから、止血反応ではトロンビンによる XI のフィードバック活性化が重要であると考えられている。このように、XI 欠乏症患者の多くは無症状で出血症状は比較的軽度であるため、XIa を薬剤で阻害しても重大な出血事象は起こりにくいと考えられ、抗血栓症の標的因子として精力的に研究されている。ウサギモデルやノックアウトマウスを使った研究で、XI は病的血栓形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった^{18,19}。XI を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、肝細胞内の XI mRNA を分解し、循環血中の XI 量を減少させ、内因系凝固反応を抑制する。2015 年、膝関節置換術患者に XI のアンチセンスオリゴヌクレオチドを術前に皮下注射し、術後の静脈血栓症発症を調べた結果が報告された⁵。XI 活性を約 38%にまで低下させた患者群では、標準抗凝固療法の患者群と比較し静脈血栓症発症は非劣性だったが、約 20%にまで低下させた患者群では優れた血栓抑制能を示した。

2-2. 生体内の陰電荷物質

陰電荷物質は XII 因子を自己活性化させ、かつ PPK-HK 複合体および XI-HK 複合体に濃縮する表面を提供する重要な因子である。すなわち、陰電荷物質に酵素である XIIa と基質である PPK および XI が濃縮される。接触相反応を開始する陰電荷表面として働く物質を表 3 にまとめた²⁰。

これらの陰電荷物質は 2 つに分けて考えることができる¹⁴。1 つは 'real' surface で、採血管や細胞膜（サルファチド）、カオリンやガラス玉で、これらは可溶性物質ではない。もう 1 つは陰電荷ポリマーで、デキストラン硫酸、過硫酸化コンドロイチン硫酸²¹、マスト細胞からのヘパリン²²、細胞外 RNA²³、

血小板や微生物から放出されるポリリン酸²⁴で、これらは可溶性物質である。エラジン酸は非生理的物質で、活性化部分トロンボプラスチン時間

(activated partial thromboplastin time: APTT) の活性化試薬として臨床検査現場で広く用いられる。エラジン酸は分子量 302 の低分子量物質だが、Ca²⁺ のような 2 価イオンにより不溶性粒子になる性質を持ち、この性質が接触相の活性化能に重要である¹⁴。

表3. XII活性化物質と凝固と炎症における効果²⁰⁾

化合物	in vitro 効果		in vivo 効果	
	内因系凝固経路	カリクレイン-キニン系	凝固促進能	炎症能
非生理的物質				
ガラス	+	+	+	+
カオリン	+	+	+	+
エラジン酸	+	+	-	+
デキストラン硫酸	+	+	-	+
過硫酸化コンドロイチン硫酸	+	+	-	+
ポリ:C	+	+	+	不明
生体適合物質				
透析膜*	+	+	+	+
血管移植片**	+	+	不明	不明
金属***	+	+	不明	不明
治療用化合物				
アブタマー	+	+	不明	不明
酸化鉄ナノ粒子	不明	+	不明	+
内在性因子				
グリコサミノグリカン	-	+	不明	不明
リボ多糖	-	+	不明	不明
核酸(DNA, RNA)	+	+	不明	不明
スルファチド	+	+	+	+
尿酸結晶	+	+	不明	+
タンパク質凝集体	-	+	-	+
ポリリン酸	+	+	+	+
アミロイドβペプチド	-	+	-	+

*Cuprophane/ Polyacrylonite/ AN69, **Dacron/PTFE/PDMS,

***鋼鉄/チタン/アルミニウム

2-2-1. ポリリン酸による XII の活性化

微生物や血小板などの細胞が放出するポリリン酸は、血栓形成を促進する²⁴。ポリリン酸はリン酸が直鎖状につながった陰電荷物質であり、血小板の濃染顆粒や微生物の細胞内顆粒中に蓄えられている。

血小板ではトロンビンなどの刺激で放出される。最近ではある種のがん細胞から放出され、がんによる血栓形成を促進する可能性が報告されている²⁵⁾。ポリリン酸はXIIを活性化させるだけでなく、トロンビンがXIをフィードバック活性化する際の補助因子としても働く。また、ポリリン酸存在下で生じたフィブリン塊は強い強度を示すなど、多彩な血栓能を示す。微生物中から放出される数百以上のリン酸が繋がっている長鎖ポリリン酸は強い接触相活性化能(XII活性化能)を持つが、血小板は60-100程度のリン酸長をもつ中鎖ポリリン酸しか放出せずその接触相活性化能は弱いといわれていた。しかし最近、血小板も長鎖ポリリン酸を放出し、2価イオンと結合し不溶性ナノ粒子として血小板に付着し、接触相の活性化に働くことが示された²⁶⁾。血小板ポリリン酸が生体内で炎症と凝固を惹起する因子であることは、マウスを用いた研究でも明らかになっている²⁷⁾。

ポリリン酸やRNAなどに結合しその血栓作用を中和する低分子化合物は、新規の抗血栓薬に繋がる可能性が考えられる。ポリリン酸の凝固促進能を中和する物質を探索した研究が発表されている^{28,29)}。これらの化合物はXIIの活性化を抑制するので、BKによる浮腫を抑える効果があるかもしれない。

2-2-2. ヘパリン中に混入した不純物のXII活性化による有害事象

2007年から2008年にかけて、米国とドイツで血液透析の患者に血圧低下などの有害事象が多発し、不幸にも患者が死に至ったと報告された。この有害事象は、ヘパリン製剤に混入した過硫酸化コンドロイチン硫酸(Oversulfated chondroitin sulfate)が原因であり、過硫酸化コンドロイチン硫酸によりXIIが活性化され、XIIaによりPKを通してBKが産生することにより有害事象が生じたと推定されている²¹⁾。

3. C1インヒビター

C1インヒビター(成熟型)は478アミノ酸残基(分子量104kDa、等電点2.7-2.8)の血漿糖タンパク質で、血漿濃度は962nmol/L(100µg/mL)である³⁰⁾(表2)。凝固系プロテアーゼであるXIIa, XIa、カリクレイン-キニン系の血漿カリクレイン(PK)、補体系プロテアーゼであるC1r, C1s, MASP1, MASP2、線溶系プロテアーゼであるプラスミン、組織プラスミノゲン活性化因子を阻害するプロテアーゼインヒビターである³¹⁾。特に、C1rとC1sはC1インヒビターしか血漿中の阻害剤は知られていない。C1インヒビターは、N末端側約100アミノ酸残基の高度に糖鎖修飾を受けた(全体で糖鎖含量が35%と極めて高い)立体構造未知のドメインと、C末端側のセルピン(serpin)と呼ばれる一群のタンパク質スーパーファミリーに共通した構造ドメインからなる。N末端側の糖鎖修飾を受けた領域は、プロテアーゼ阻害活性に影響しないことが知られている³¹⁾。セルピンは最初に同定されたセルピンがキモトリプシン様のセリンプロテアーゼに対して働くことから名付けられた造語(SERine Protease INhibitor)であり、ほとんどのセルピンはプロテアーゼ阻害活性を持つが³²⁾、アンギオテンシノーゲンのようにプロテアーゼ活性をもたないセルピンもある³³⁾。他の一般的なプロテアーゼ阻害剤が酵素の活性中心に結合し塞ぐことで働く競合阻害剤であるのに対して、セルピンは立体構造の大きな変化によりプロテアーゼの活性中心を破壊し、標的を不可逆的に阻害する点でユニークである。

3-1. C1インヒビターの欠損マウスとC1インヒビターを用いたトランスレーショナルリサーチ

C1インヒビター遺伝子欠損ホモ体マウスおよびヘテロ体マウスは、正常に成長し繁殖も正常である³⁴⁾。これらのマウスは血管性浮腫を起こさなかったが、エバンスブルーを静注すると血管透過性の亢進が観察された。この血管透過性の亢進は、C1イン

ヒビター、PK 阻害剤、BK B2 受容体アンタゴニストで抑制された。また、血管透過性はアンジオテンシン転換酵素（すなわち BK 分解酵素）阻害剤で増悪し、BK B2 受容体欠損マウスとの掛け合わせると抑制された。これらの結果は、C1 インヒビター欠乏による HAE と酷似し、HAE が凝固接触相の活性化を通して発症することを強く支持した。

マウスを用いた研究で、C1 インヒビターは虚血再灌流障害に保護的に働くという結果が報告されている³⁵⁻³⁷。術前に C1 インヒビターを静注すると、好中球の障害部位への浸潤の減少が観察される。幾つかの研究では反応部位が切断された C1 インヒビターでも同様の保護的な効果が観察されている。これより、C1 インヒビターのプロテアーゼ阻害活性に加えて、Sialyl Lewis^x 構造をもつ一部の N 結合型糖鎖が血管内皮細胞に表出した P-セレクトインや E-セレクトインに結合し、血管内皮細胞と白血球の結合を抑制し、虚血再灌流障害に保護的に働くのではないかと議論されている^{35,36,38}。

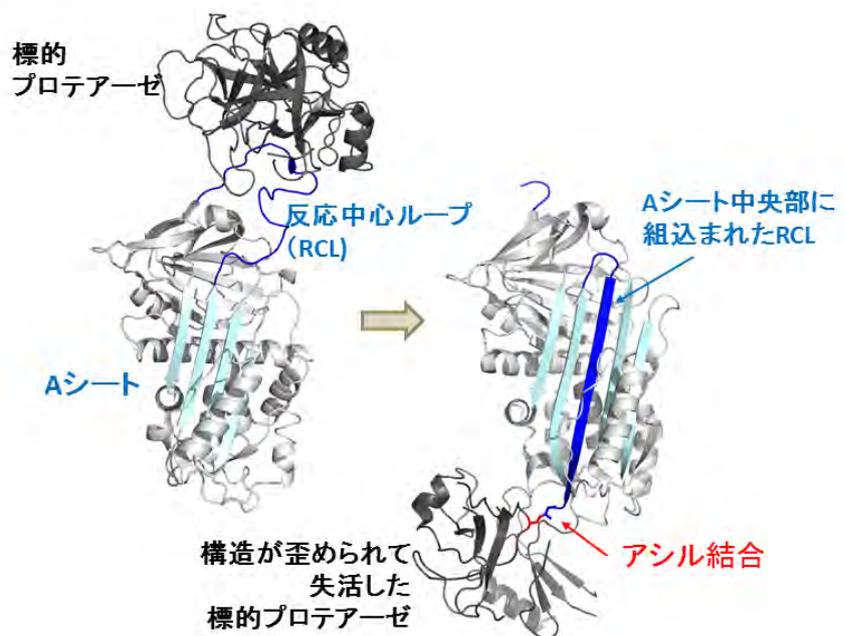
3-2. セルピンのプロテアーゼの阻害機構

図 6 にセルピンによるプロテアーゼの阻害機構を

簡略に示す。セルピンの作用で重要な部位は青色で示す約 20 アミノ酸残基の反応中心ループ (RCL, Reactive Center Loop)と水色で示す複数のβ鎖からなる A シートである。RCL は標的となるプロテアーゼによる切断部位を含み、柔軟性が高く、溶媒に露出して標的プロテアーゼの結合、すなわち Michaelis 複合体の形成 (図 6 左)を待つ³⁹。結合したプロテアーゼは RCL 中の反応部位を切断し、新たに N 末端を形成するとともに、プロテアーゼの触媒 Ser 残基の間に共有結合(アシル結合)を持つアシル-酵素中間体を生じる³²。通常の基質であれば、アシル結合は加水分解され、新たに C 末端が露出し、プロテアーゼは乖離して触媒反応は終了する。しかし、セルピンはプロテアーゼがアシル結合を加水分解するより早くに RCL を A シート中央部へ取り込む大がかりな立体構造変化を引き起こし、プロテアーゼの触媒反応に関わるアミノ酸残基の立体配置を引きはがして切断反応の進行を止める (図 6 右)。複合体の X 線結晶構造解析の結果から、捕捉されたプロテアーゼは分子全体の約 40%の電子密度が消失して分子構造が不安定な状態にあることが示されている⁴⁰。セルピンの反応は不可逆であり、自殺型阻

図 6 セルピンのプロテアーゼ阻害反応に伴う構造変化

セルピンは、露出し疑似餌として働く反応中心ループ (RCL, 青色)を使って標的プロテアーゼ (濃いグレー)を捕足する (Michaelis 複合体、図左、PDB 1K90)。これにより切断端のカルボキシル基とプロテアーゼの触媒セリン残基の間に共有結合 (アシル結合)が形成される。アシル結合の加水分解が起こる前に RCL は A シート (水色)に組込まれ、捕捉されたプロテアーゼは大きく位置を変えると同時に、触媒部位は引き伸ばされ、酵素活性が失われる (図右、PDB 1EZX)。



害剤あるいは仕組みは異なるが $\alpha 2$ マクログロブリンと同様に分子ネズミ捕りと称される。このような大きな構造変化を引き起こせる理由は、セルピンが切断を受ける前(図6左)より切断を受けた後(図6右)の立体構造の方がエネルギー的に安定な状態であるためである。

3-3. C1 インヒビターの立体構造

これまで C1 インヒビターと標的プロテアーゼとの複合体の立体構造は解明されていないが、セルピンドメイン単体(プロテアーゼ阻害活性に影響しない N 末端領域 96 アミノ酸残基の欠損体)について、付加された精製用タグ以外はほぼ同じアミノ酸配列を持つにもかかわらず、二つの大きく異なる立体構造が決定されている。

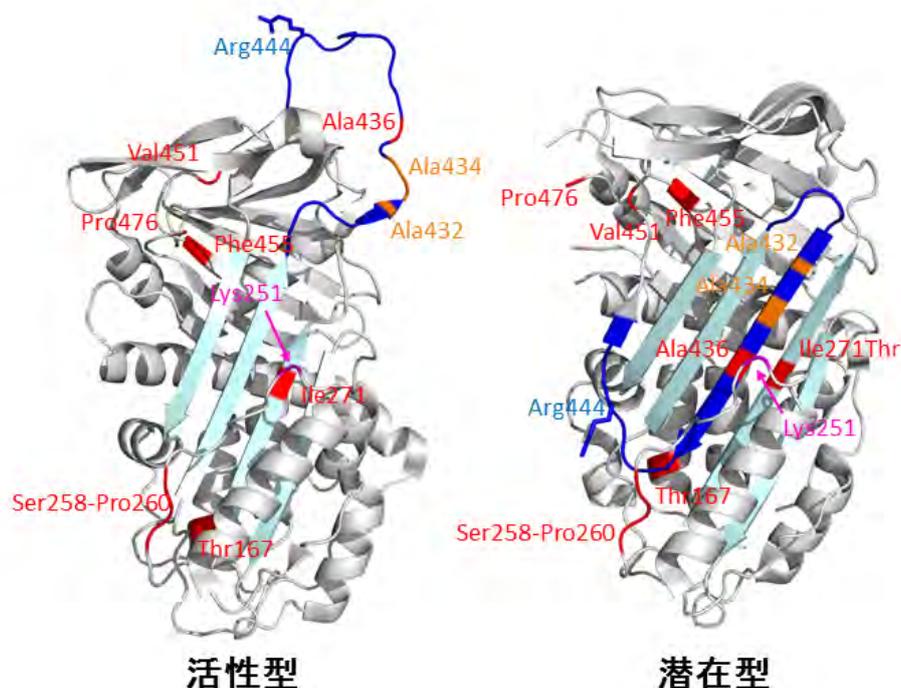
図7左は2016年に報告された、遺伝子改変ウサギ母乳に発現させたヒト C1 インヒビター(残基番号 97-478)の結晶構造である⁴¹⁾。先に示した図6左と同様に、溶媒に露出した RCL と分子中央部の A シートを含むセルピンファミリーに共通した「活性型」の立体構造を示す。C1 インヒビターは RCL 中

の Arg444-Thr445 間で切断を受け標的プロテアーゼを捕捉するが、図では Arg444(P1 残基とも呼ぶ)は分子最上部に位置する。

それに対して図7右は2007年に報告された酵母で発現させた「潜在型」(残基番号 97-478、N 末端 6x His タグの付加と Val458Met 変異あり)と呼ばれる結晶構造である⁴²⁾。潜在型では、切断を受けていない RCL が A シートに挿入されており、図6右で示したプロテアーゼを補足した後の構造に部分的に非常に似た立体構造を示す。実際、この潜在型は、活性型を認識せず、切断型あるいはプロテアーゼを補足した C1 インヒビターのみを認識するモノクローナル抗体に反応する。潜在型では反応部位である Arg444 の側鎖は溶媒に露出するものの、主鎖は構造に組み込まれておりプロテアーゼによる切断を受けない。上述の原著によると、酵母を用いて分泌発現させたヒト C1 インヒビターには、活性型に混ざり全体の約 30%が潜在型として存在し、その潜在型を単離、精製、結晶化して構造解析を行ったとある⁴²⁾。ヒトの約 30%に Val458Met 変異が見られる。彼らはこの変異を持つ C1 インヒビターの結晶構造

図7 C1 インヒビターのセルピンドメインの2つの立体構造、活性型と潜在型

阻害活性のある活性型(左、PDB 5DU3)は露出した RCL(青色)を持つものに対し、潜在型(右、PDB 2OAY)では RCL の切断なしに A シート(水色)に挿入された構造を取る。反応部位 P1 位の Arg444 の側鎖と、本文で取り上げた変異残基の位置を示す。



解析を行ったが、この残基はタンパク質内部の余裕のある隙間に存在しているので、変異によって潜在型の構造が誘導されたのではない。このことは、ヒト C1 インヒビターは産生環境によっては潜在型の立体構造を取りうることを示しており、HAE 患者に見られる変異体によっては、活性型より低エネルギーで安定な潜在型として血中に存在し得る可能性が示唆される。また、セルピンは多量化し不活化されやすいタンパク質として知られているが、C1 インヒビターは 65°C で 35 分間処理するだけで多量化することが知られている⁴³⁾。

3-4. C1 インヒビターの遺伝子変異と構造・機能相関から見た分類

C1 インヒビター(遺伝子名 *SERPING1*)欠乏による HAE は、常染色体優性遺伝形式のまれな疾患で、C1 インヒビター-HAE(C1-INH-HAE)と呼ばれる(表 4)⁴⁴⁾。その約 85%は C1 インヒビター抗原量が低下する I 型で、残りの約 15%は正常な抗原量を示すものの活性が低下する II 型である¹⁰⁾。HAE 患者の C1 インヒビター遺伝子異常は遺伝子全長にわたり 450 種類以上異なるものが見つかった⁴⁵⁾。従来の I 型、II 型の HAE の分類と比較しながら、ここではタンパク質の立体構造から見た機能不全の原因という視点で、変異を大きく 4 種類に分類してみる。立体構造未知の N 末端ドメイン内およびイントロンなど非翻訳領域にも HAE 変異は見つかっているが、ここでは割愛する。

表 4. 遺伝性血管浮腫の分類

C1 インヒビター欠損症	C1-INH-HAE
C1 インヒビター正常量	
XII 変異	FXII-HAE
原因不明	U-HAE

文献 44 を改変した

① 折り畳み不全や分泌障害により濃度低下を生じる変異：HAE I 型

塩基の欠損や挿入、その結果生じるフレームシフト、またナンセンス変異などタンパク質の立体構造を大きく壊す変異は、血漿中の C1 インヒビターの濃度および活性をともに低下する HAE I 型の原因となる。また同様に、ミスセンス変異によりタンパク質分子内部の疎水性残基のコア領域に親水性のアミノ酸残基への置換などが生じると、立体構造の折り畳みができなくなり分泌されない(小胞体におけるタンパク質の品質管理機構で排除される)。このようなミスセンス変異は C1 インヒビター分子全体に散在し、局所性が見られる後述の HAE II 型で見つかる変異群とは対照的である。

② Michaelis 複合体が形成されない変異：HAE II 型

抗原量は正常域を示すが活性が低下する HAE II 型において見出されたミスセンス変異の多くは RCL 領域に集中している。中でも標的プロテアーゼが認識の要とする反応部位 Arg444 の変異は、約 7 割の HAE II 型の症例に同定されている⁴⁶⁾。Arg444 に変異が生じると、C1 インヒビターは標的プロテアーゼから認識されず Michaelis 複合体が生成されないため、C1 インヒビター活性を示さない。Arg444 は一塩基置換のホットスポットである CpG ジヌクレオチド配列を含む。CpG 配列では C→T あるいは G→A への塩基置換が起こりやすく、高頻度で見いだされる Arg444Cys 変異および Arg444His 変異は C→T 置換で説明される。Arg444 について、頻度は低いが、Ser、Leu、Pro および Gly への変異も見つかっている⁴⁷⁾。理由は明らかでないが、Arg444Leu 変異は血漿 C1 インヒビター濃度が健常人の 70%と I 型と II 型の中間的な値を示す。

③ 標的プロテアーゼによる分解を受ける変異 :

HAE II 型

切断後に A シートに組み込まれる RCL には、多くの HAE II 型変異が見出されている。Val432Glu 変異および Ala434Glu 変異は A シートに組み込まれる際に側鎖がタンパク質の内部を向く位置の変異である。これらの変異では Michaelis 複合体は形成されるものの、RCL の A シートへの組み込みが阻害されるためにプロテアーゼの構造破壊を引き起こすことができず、その結果アシル結合の切断反応が進行すると予想される。実際に Val432Glu 変異体および Ala434Glu 変異体は、C1 インヒビターの標的プロテアーゼの阻害剤ではなく基質となることが示されている^{48,49)}

④ 潜在型あるいは多量体を形成する変異 : HAE II 型 (後述のように I 型として報告される例有り)

HAE II 型変異として見つかった Ala436Thr 変異も Val432Glu 変異および Ala434Glu 変異と同様に A シートに組込まれる領域で側鎖がタンパク質内部を向く位置の変異である。しかし、基質として分解反応を受けず、またモノクローナル抗体との反応性や熱安定性などから、Ala436Thr 変異体は潜在型と多量体構造が共存し、それにより阻害活性が消失していると考えられる⁵⁰⁾。潜在型の結晶構造を見ると Ala436 が Thr に変異することで側鎖のヒドロキシル基が周辺のアミノ酸残基と水素結合を形成することが可能となり、Ala436Thr 変異はより潜在型構造を取りやすい変異と考えられる⁴²⁾。

上記分類の 2 つにまたがる変異も見出されている。HAE II 型として見つかった Lys251 欠損 (AAG, 3 塩基欠損) 変異では、Asn-Lys-Ile-Ser が Asn-Ile-Ser

となることで Asn250 へ新たに糖鎖が付加される⁵¹⁾。Lys251 欠損組み換え C1 インヒビター変異体には、基質として分解を受ける分子群と潜在型およびダイマーを形成する分子群とが共存していることが示されている⁵²⁾。

他の多くのセルピンでは、隣接した分子同士が RCL あるいは他のドメインの一部を交換し、潜在型が繋がったような多量体構造を取ることが証明されており、セルピンの多量体形成は様々な病態へ関与するといわれている^{32,53,54)}。多量体形成により単にプロテアーゼ阻害活性を失うだけでなく、安定な凝集体自体が細胞障害を引き起こす。即ち、本来異常タンパク質は分泌されず小胞体で徐々に代謝されるが、セルピン多量体は非常に高い安定性を持つため、細胞内に蓄積し細胞死による組織破壊を引き起こすことにより様々な病態の原因となる。Ile271Thr 変異、Thr167Asn 変異および Ser258-Pro260 欠損 (3 アミノ酸残基欠損) 変異を持つ患者血清中では、C1 インヒビターのモノマー以外に、ダイマー、トリマー、それ以上の非共有結合で形成された多量体が観察されている⁴³⁾。潜在型の立体構造と照らし合わせると、Ile271Thr 変異および Ser258-Pro260 欠損変異は挿入された RCL と直接相互作用する部位の変異であり、Thr167Asn 変異は RCL とは直接相互作用はないが、新たな N 型糖鎖修飾部位を生む変異である。これらの変異は全て初期診断で HAE I 型と診断された患者から見つかったものである⁴³⁾。他にも HAE I 型として見つかった Val451Met 変異、Phe455Ser 変異および Pro476Ser 変異は分子の C 末端領域に位置し RCL 挿入部から離れているものの、組み換えタンパク質の解析から潜在型および多量体型を形成することが示された⁵⁵⁾。これらの変異が多量体化を引き起こす可能性を立体構造から予想するのは難しい。別のセルピンでは RCL ではなく分子 C 末端部のドメイン交換により潜在型が多量体化することも知られるが⁵⁴⁾、C1 インヒビターについては未知である。I 型と II 型の HAE の分類は C1

インヒビターの血中抗原量を基に行われているが、その測定に使用される抗 C1 インヒビター抗体あるいは測定法自体が必ずしも多量体型や立体構造が正常型と異なる C1 インヒビター変異体を正しく検出するとは限らず、このことも厳密な I 型と II 型の分類を困難にする原因の一つと考えられる。

4. HAE 発症機序

4-1. C1 インヒビターの先天性欠乏症がなぜブラジキニン (BK) の過剰産生に繋がるか

C1 インヒビターは、補体系プロテアーゼ C1r、C1s、凝固系プロテアーゼ XIIa、カリクレイン-キニン系プロテアーゼ PK を阻害する。その速度定数は、 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ から $10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 程度であり、これらのプロテアーゼに対して同程度の阻害能を示す³⁰⁾。

全長型 α XIIa、ほぼプロテアーゼドメインだけの β XIIa、XIa、PK が、各種血漿インヒビターで阻害される割合を表 5 に示した。XIIa 活性は C1 インヒビターで阻害されるので、C1 インヒビター欠乏症では XIIa の抑制は十分ではない可能性がある。PK 活性は C1 インヒビターで 50%-60%が阻害され、 α 2-マクログロブリンで 35%-38%が阻害される。 α 2-マクログロブリンは酵素トラップ型インヒビターと呼ばれ、C1 インヒビターが属するセルピン型プロテアーゼインヒビターよりもプロテアーゼ活性阻害の迅速性に欠ける (プロテアーゼ活性の抑制は緩慢に進行する)。したがって、XIIa が局所に大量に生成した場合には、C1 インヒビター欠乏症では XIIa により生成した PK は迅速にその活性が抑制さ

れず、その結果局所で BK 産生が進み BK B2 受容体が活性化され血管性浮腫を示すと考えられる。この機序解明に至るまでの紆余曲折の歴史は Kaplan の回想に述べられている⁵⁶⁾。

一方、C1 インヒビター欠乏症患者には、補体系の亢進による各種の生体反応や、凝固系の亢進による血栓症や播種性血管内凝固症候群が起こるとは言われていない。C1 インヒビター欠乏により、補体系や凝固系が一部作動したとしても、下流の制御系、たとえば補体系では CFH や MCP の存在下での CFI による C3b の分解や、凝固系ではアンチトロンビンによる凝固プロテアーゼの不活性化により、病的な表現型にまでは至らないと考えられる。また、XI の血漿濃度は PPK より 15 倍以上低いので、XIIa による XI の活性化は PPK 活性化より低いと考えられる。

4-2. FXII-HAE : XII Pro-rich 領域中の変異

HAE には C1 インヒビターの量と活性が正常値を示す例 (HAE with normal C1 inhibitor, HAE_nC1) が報告されている^{57,58)}。本症は女性に多く見られ妊娠中や経口避妊薬服用中に発症するといわれる。接触相に関わるタンパク質の異常を想定し、XII の遺伝子解析が行われた。その結果、5 家系 20 例 (全員女性) の HAE_nC1 患者に、XII の Pro-rich 領域に Thr328Lys 変異 (シグナル配列を除いた残基番号では Thr309Lys 変異) または Thr328Arg (Thr309Arg) 変異が同定された⁵⁹⁾。その後、HAE_nC1 患者に XII 変異が次々に報告され、'HAE with mutations in the F12 gene' もしくは 'FXII-HAE' と

表5. 内因系凝固(接触相)反応のプロテアーゼに対する血漿プロテアーゼインヒビターの効果

標的酵素	C1インヒビター	α 2-マクログロブリン	他のインヒビター	文献
α XIIa	91%	4%	α 2AP 3%, AT 2%	76)
β XIIa	74%		α 2AP+AT 26%	77)
XIa	8%		α 1PI 68%, AT 16%, α 2AP 8%	78)
血漿カリクレイン	52%	35%	13%	79)
血漿カリクレイン	58%	38%	4%	80)

α 2AP: α 2-antiplasmin, AT: antithrombin, α 1PI: α 1-protease inhibitor

呼ばれるようになった (表 4)。Thr328Lys 変異に比して Thr328Arg 変異は限局した地域 (ドイツ Mainz 市) に 2 家系見いだされているだけである⁵⁷⁾。比較的多くの HAEnC1 患者に XII Thr328Lys 変異が同定されているものの、まだ少数例であり、多くの HAEnC1 症例は遺伝子レベルで解明されたとはいえない⁵⁷⁾。XII の Pro-rich 領域はクリングルドメインとプロテアーゼドメインの間にあり、他の凝固因子には見られず XII に特異的な領域である (図 3)。FXII-HAE 患者の遺伝子変異はこれまでのところ次に述べるように、XII の Pro-rich 領域に限定して同定されている。

4-2-1. FXII-HAE : XII Thr328Lys 変異

XII の Thr328Lys 変異を持つ FXII-HAE 患者の血中の XII 量は正常者と変わらないが、XIIa のアミド水解活性は 4 倍以上増加しており機能獲得変異であると報告された⁶⁰⁾。一方、Thr328Lys 変異保有者の XII 凝固活性は 90% (4.1 ng/ml) であり、健常人と違わないという報告がある⁶¹⁾。このように、変異保有者の血漿 XII 活性は一致した結果が得られていない。

XII の Pro-rich 領域の Thr328 はムチン型の糖鎖 (O-グリコシル化) が結合している⁶²⁾。Thr328Lys 変異と Thr328Arg 変異は Thr が Lys もしくは Arg に置換するので、Thr328 への糖鎖の付加が起らない。糖付加がないということは、末端のシアル酸がなくなり陰電荷が減ることになり、陰電荷物質への結合能が亢進する可能性がある。事実、Thr328Lys 変異を持つ患者血漿や、組み換え XII-Thr328Lys 変異体や XII-Thr328Arg 変異体を添加した XII 欠乏血漿では、正常血漿に比べ、低濃度のデキストラン硫酸やポリリン酸で XII が活性化され HK が消費 (BK を放出) した⁶²⁾。しかし、2 つの変異体の凝固能および C1 インヒビターでの阻害は正常であった。2 つの変異体を静注した XII 欠損マウスおよび XII-Thr328Lys 変異体を肝で発現する FXII-HAE

マウスでは、接触相依存性の血管透過性の亢進が観察された。Thr328Lys 変異体マウスに XII 活性中和抗体を静注すると BK 産生が見られなくなり浮腫が弱まった。FXII-HAE マウスの動脈血栓形成能は野生型と同様であった。本研究から、FXII-HAE は XIIa の活性を阻害することで抑制できる可能性が示された⁶²⁾。

Thr328Lys 変異、Thr328Arg 変異、c.971_1018+24del72 変異 (後述) の 3 種の XII 変異体を発現させ過剰な BK 産生の機序を解析した⁶³⁾。その結果、3 種類の XII 変異体はいずれもプラスミンで別の部位 (たぶん Lys365-Ser366 と Arg372-Val373⁶⁴⁾) が切断され、C1 インヒビターによる阻害を免れて迅速に活性化型 XIIa に変換され、過剰な BK 産生を行うという。PK は XII の Arg372, Arg353, Arg362 を限定分解し、Arg372 の切断により活性化 (図 3)。これらの PK による切断部位は、3 種類の XII 変異部位の近傍に位置するが、PK による XII 変異体の活性化に差を認めなかった。しかし、XII はプラスミンでは切断されないが、XII 変異体は切断・活性化され、その結果 PK が産生され、HK は消費 (BK 産生を示唆) された。FXII-HAE 患者はプラスミンでの活性化に感受性が高い状態 (HAE 発症時) やそうでない状態があるという。また、プラスミノゲンの活性化を抑制する Lys 誘導体は、この機序を抑制した。これらの結果から、3 種類の変異のいずれかを保有する FXII-HAE 患者での BK の過剰な産生は、プラスミンによる XII の切断・活性化が契機となり、一時的に C1 インヒビターの働きが悪い状態になり BK の過剰産生に繋がるという。この機序が働くとすると、この機序は HAE 患者にトナネキサム酸を予防投与する根拠となろう。血栓溶解剤 tPA で治療された患者の 0.2%-5% に見られる血管性浮腫⁶⁵⁾は、プラスミンによる XII の活性化を通じた過剰な BK 産生で説明されるかもしれない。日本人を含む東アジア人にはプラスミン活性の低下を伴うプラスミノゲン Ala620Thr 変異が見られ、

日本人の約 4%は本変異の保有者である⁶⁶⁾。プラスミノーゼンの変異は血管性浮腫に保護的に働くかもしれない。

約 6 万人の遺伝子情報を公開している the Exome Aggregation Consortium (ExAC)⁶⁷⁾で XII の変異を調べると、Thr328Lys 変異は 95,882 アレル中 1 アレル (すなわち約 48,000 人に 1 人) に同定されていた。Thr328Lys 変異はドイツ、スペイン、フランスなどヨーロッパ諸国で同定されているので、いわゆる創始者効果が考えられている⁶⁰⁾。

4-2-2. FXII-HAE : XII c.971_1018 + 24del72 変異^{68,69)}

C1 インヒビター正常量を示す 1 家系 3 人のトルコ人 HAE 患者に、新規の XII の 72 塩基の欠損 c.971_1018 + 24del72 が同定された。これはエクソン 9 の 48 塩基とイントロン 9 の 24 塩基の欠損に相当する⁶⁹⁾。エクソン 9 の 48 塩基の欠失のため、16 アミノ酸 (Lys324-Gly339) が欠損する。エクソン-イントロン部分の欠失のため正しいプライスは起こらず、イントロン 9 の残りの 81 塩基が転写され新たに 27 アミノ酸が挿入される。その結果、リンカー領域のアミノ酸長では 11 残基が延長する変異体が翻訳されることになる。本 XII 変異体は活性化の際に切断される Arg372-Val373 やプロテアーゼドメインは残存するので、正常なプロテアーゼ活性を発現すると考えられるので、本遺伝子欠失の詳しい解析が待たれる。

4-2-3. FXII-HAE : XII c.892_909dup 変異⁷⁰⁾

C1 インヒビター正常量を示す HAE 患者に、新規の XII の 18 塩基の重複 c.892_909dup が同定された。この塩基の重複は Pro-rich 領域中の 6 アミノ酸 (p.Pro298-Pro303) の重複を起こす。発端者を入れて 5 人が本変異保有者である。1 人に一度のエピソードがあるものの、発端者以外は変異と浮腫との関連は明らかではない。

4-2-4. FXII-HAE : XII c.1681-1G>A 変異 および Ala343Pro 変異⁷¹⁾

XII c.1681-1G>A 変異 および Ala343Pro 変異が血管性浮腫を再発する患者各 1 人にそれぞれ同定された。c.1681-1G>A 変異は両親が遺伝子解析に同意しなかったため遺伝形式は明らかでない。本変異はスプライス異常を示すので、XII 欠損症を引き起こす変異であり、XII の機能獲得変異とは考えにくい。Ala343Pro 変異は家系構成員に同定されなかったため、de novo 変異の可能性がある。Ala343Pro 変異は Gly550Glu 変異との複合ヘテロ体として日本人 XII 欠損症に同定されている。XII 欠損症の原因となる遺伝子変異が HAE を引き起こすことは考えにくいと思われる。Ala343Pro 変異は ExAC では 91,490 アレル中に 314 アレル、すなわち約 300 人に 1 人に同定されていた⁶⁷⁾。

4-3. U-HAE の遺伝子変異⁷²⁾

C1 インヒビター量と活性が正常値を示すが原因不明 (unknown) の症例は U-HAE と呼ばれる (表 4)。最近、U-HAE に新規の遺伝子変異が報告された⁷²⁾。

10 家系の 25 人の U-HAE 患者のうち、U-HAE 患者 1 家系 2 人の全エキソーム解析を行ったところ、angiopoietin-1 (ANGPT1) 遺伝子にヘテロ接合性の Ala19Ser 変異が同定された⁷²⁾。この変異は同じ家系内の U-HAE 症状を示す 4 人にヘテロ接合性で同定され、U-HAE 症状を示さない 7 人の家系構成員には同定されなかった。本変異は頻度が極めて低く、ExAC データベースにはアレル頻度 0.0000082 (約 6 万人中 1 人) であった⁶⁷⁾。患者血漿中の ANGPT1 と ANGPT2 の濃度は健常人より低い値を示したものの有意差は見られなかった。ANGPT1 は multimer で内皮細胞上のリガンド Tie2 に結合する。変異ヘテロ保有者血漿の ANGPT1 の multimer/monomer 比は正常血漿と比べると低下していた。また、変異ヘテロ保有者中の ANGPT1 はリガンドである可溶性 Tie2-Fc キメラタンパク質

への結合が低下していた。組換え体の実験でも、本変異 ANGPT1 は multimer が減少し可溶性 Tie2-Fc キメラタンパク質への結合が低下していた。HAE を起こす遺伝子として新しく ANGPT1 が報告された。今後、他の U-HAE 患者に本遺伝子変異が同定されるかどうか、研究の進展が待たれる。

5. おわりに

この 10 年ほどの間に、接触系凝固反応の研究が大きく進展し、基礎医学上の多くの知識が蓄積した。ここでは C1 インヒビターを中心に HAE の発症機序を解説した。本稿が HAE の病態の理解の助けになれば幸いである。

6. 謝辞

本稿の執筆にあたり、原稿にご助言いただきました埼玉草加病院院長大澤勲先生、CSL ベーリング株式会社メディカルアフェアーズ部長桑原光弘博士、執筆の機会を与えていただき原稿にご助言いただきました九州大学教授堀内孝雄先生に感謝申し上げます。

[利益相反]

筆者は本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。

[文献]

- 1) Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell*. 50: 129-135 (1987)
- 2) Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med*. 202: 271-281 (2005)
- 3) Rosen ED, Gailani D, Castellino FJ. FXI is essential for thrombus formation following FeCl₃-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost*. 87: 774-776 (2002)
- 4) Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 903-908 (2006)
- 5) Buller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, Segers A, Verhamme P, Weitz JI, FXI-ASO TKA Investigators. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med*. 372: 232-240 (2015)
- 6) Conway EM. Reincarnation of ancient links between coagulation and complement. *J Thromb Haemost*. 13 Suppl 1: S121-132 (2015)
- 7) Redecha P, Tilley R, Tencati M, Salmon JE, Kirchhofer D, Mackman N, Girardi G. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood*. 110: 2423-2431 (2007)
- 8) Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem*. 264: 9053-9060 (1989)
- 9) Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for

- assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem.* 265: 3809-3814 (1990)
- 10) 大澤勲. 遺伝性血管性浮腫とその問題点. *補体.* 53: 20-30 (2016)
- 11) 大澤勲. 難病 遺伝性血管性浮腫(HAE). *医薬ジャーナル社.* (2016)
- 12) Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood.* 90: 3819-3843 (1997)
- 13) Revak SD, Cochrane CG, Bouma BN, Griffin JH. Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma. *J Exp Med.* 147: 719-729 (1978)
- 14) de Maat S, Maas C. Factor XII: form determines function. *J Thromb Haemost.* 14: 1498-1506 (2016)
- 15) Papagrigoriou E, McEwan PA, Walsh PN, Emsley J. Crystal structure of the factor XI zymogen reveals a pathway for transactivation. *Nat Struct Mol Biol.* 13: 557-558 (2006)
- 16) Takagaki Y, Kitamura N, Nakanishi S. Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens. *J Biol Chem.* 260: 8601-8609 (1985)
- 17) Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, Nakanishi S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem.* 260: 8610-8617 (1985)
- 18) Yamashita A, Nishihira K, Kitazawa T, Yoshihashi K, Soeda T, Esaki K, Imamura T, Hattori K, Asada Y. Factor XI contributes to thrombus propagation on injured neointima of the rabbit iliac artery. *J Thromb Haemost.* 4: 1496-1501 (2006)
- 19) Lowenberg EC, Meijers JC, Monia BP, Levi M. Coagulation factor XI as a novel target for antithrombotic treatment. *J Thromb Haemost.* 8: 2349-2357 (2010)
- 20) Maas C, Oschatz C, Renne T. The plasma contact system 2.0. *Semin Thromb Hemost.* 37: 375-381 (2011)
- 21) Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, Elankumaran S, Smith S, Pelzer K, Lansing JC, Sriranganathan N, Zhao G, Galcheva-Gargova Z, Al-Hakim A, Bailey GS, Fraser B, Roy S, Rogers-Cotrone T, Buhse L, Whary M, Fox J, Nasr M, Dal Pan GJ, Shriver Z, Langer RS, Venkataraman G, Austen KF, Woodcock J, Sasisekharan R. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med.* 358: 2457-2467 (2008)
- 22) Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Bjorkqvist J, Tradler T, Sedlmeier R, Burfeind P, Cichon S, Hammerschmidt S, Muller-Esterl W, Wuillemin WA, Nilsson G, Renne T. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity.* 34: 258-268 (2011)
- 23) 中澤文恵. 血液凝固・炎症における RNA. *日本血栓止血学会誌.* 27: 301-307 (2016)
- 24) Morrissey JH. Polyphosphate: a link between platelets, coagulation and inflammation. *Int J Hematol.* 95: 346-352 (2012)
- 25) Nickel KF, Ronquist G, Langer F, Labberton

- L, Fuchs TA, Bokemeyer C, Sauter G, Graefen M, Mackman N, Stavrou EX, Ronquist G, Renne T. The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. *Blood*. 126: 1379-1389 (2015)
- 26) Verhoef JJ, Barendrecht AD, Nickel KF, Dijkxhoorn K, Kenne E, Labberton L, McCarty OJ, Schiffelers R, Heijnen HF, Hendrickx AP, Schellekens H, Fens MH, de Maat S, Renne T, Maas C. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood*. 129: 1707-1717 (2017)
- 27) Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renne T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 139: 1143-1156 (2009)
- 28) Jain S, Pitoc GA, Holl EK, Zhang Y, Borst L, Leong KW, Lee J, Sullenger BA. Nucleic acid scavengers inhibit thrombosis without increasing bleeding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 12938-12943 (2012)
- 29) Travers RJ, Shenoi RA, Kalathottukaren MT, Kizhakkedathu JN, Morrissey JH. Nontoxic polyphosphate inhibitors reduce thrombosis while sparing hemostasis. *Blood*. 124: 3183-3190 (2014)
- 30) Davis AE, 3rd. C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol* 6:595-628 (1988)
- 31) Davis AE, 3rd, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost*. 104: 886-893 (2010)
- 32) Huntington JA. Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost*. 9 Suppl 1: 26-34 (2011)
- 33) 中山大輔、宮田敏行. アンギオテンシノーゲン-レニン複合体の立体構造：酸化還元によるアンギオテンシン放出の調節. *日本血栓止血学会誌*. 22: 49-52 (2011)
- 34) Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE, 3rd. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest*. 109: 1057-1063 (2002)
- 35) Lu F, Chauhan AK, Fernandes SM, Walsh MT, Wagner DD, Davis AE, 3rd. The effect of C1 inhibitor on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 295: G1042-1049 (2008)
- 36) Lu F, Fernandes SM, Davis AE, 3rd. The effect of C1 inhibitor on myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 22: 75-80 (2013)
- 37) Heydenreich N, Nolte MW, Gob E, Langhauser F, Hofmeister M, Kraft P, Albert-Weissenberger C, Brede M, Varallyay C, Gobel K, Meuth SG, Nieswandt B, Dickneite G, Stoll G, Kleinschnitz C. C1-inhibitor protects from brain ischemia-reperfusion injury by combined antiinflammatory and antithrombotic mechanisms. *Stroke*. 43: 2457-2467 (2012)
- 38) Cai S, Dole VS, Bergmeier W, Scafidi J, Feng H, Wagner DD, Davis AE, 3rd. A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. *J Immunol*. 174: 6462-6466 (2005)
- 39) Ye S, Cech AL, Belmares R, Bergstrom RC, Tong Y, Corey DR, Kanost MR, Goldsmith EJ. The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nat Struct Biol*. 8: 979-983 (2001)

- 40) Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. 407: 923-926 (2000)
- 41) Dijk M, Holkers J, Voskamp P, Giannetti BM, Waterreus WJ, van Veen HA, Pannu NS. How Dextran Sulfate Affects C1-inhibitor Activity: A Model for Polysaccharide Potentiation. *Structure*. 24: 2182-2189 (2016)
- 42) Beinrohr L, Harmat V, Dobo J, Lorincz Z, Gal P, Zavodszky P. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem*. 282: 21100-21109 (2007)
- 43) Madsen DE, Hansen S, Gram J, Bygum A, Drouet C, Sidemann JJ. Presence of C1-inhibitor polymers in a subset of patients suffering from hereditary angioedema. *PLoS One*. 9: e112051 (2014)
- 44) Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, Caballero T, Farkas H, Grumach A, Kaplan AP, Riedl MA, Triggiani M, Zanichelli A, Zuraw B, on behalf of HAWK, under the patronage of EAACI. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*. 69: 602-616 (2014)
- 45) Germenis AE, Speletas M. Genetics of Hereditary Angioedema Revisited. *Clin Rev Allergy Immunol*. 51: 170-182 (2016)
- 46) Bafunno V, Bova M, Loffredo S, Divella C, Petraroli A, Marone G, Montinaro V, Margaglione M, Triggiani M. Mutational spectrum of the C1 inhibitor gene in a cohort of Italian patients with hereditary angioedema: description of nine novel mutations. *Ann Hum Genet*. 78: 73-82 (2014)
- 47) Gößwein T, Kocot A, Emmert G, Kreuz W, Martinez-Saguer I, Aygören-Pürsün E, Rusicke E, Bork K, Oldenburg J, Müller CR. Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema. *Cytogenet Genome Res*. 121: 181-188 (2008)
- 48) Skriver K, Wikoff WR, Patston PA, Tausk F, Schapira M, Kaplan AP, Bock SC. Substrate properties of C1 inhibitor Ma (Alanine 434->Glutamic acid). Genetic and structural evidence suggesting that the P12-region contains critical determinants of serine protease inhibitor/substrate status. *J Biol Chem*. 266: 9216-9221 (1991)
- 49) Davis AE, 3rd, Aulak K, Parad RB, Stecklein HP, Eldering E, Hack CE, Kramer J, Strunk RC, Bissler J, Rosen FS. C1 inhibitor hinge region mutations produce dysfunction by different mechanisms. *Nat Genet*. 1: 354-358 (1992)
- 50) Aulak KS, Eldering E, Hack CE, Lubbers YP, Harrison RA, Mast A, Cicardi M, Davis AE, 3rd. A hinge region mutation in C1-inhibitor (Ala436->Thr) results in nonsubstrate-like behavior and in polymerization of the molecule. *J Biol Chem*. 268: 18088-18094 (1993)
- 51) Parad RB, Kramer J, Strunk RC, Rosen FS, Davis AE, 3rd. Dysfunctional C1 inhibitor Ta: deletion of Lys-251 results in acquisition of an N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 6786-6790 (1990)
- 52) Zahedi R, Aulak KS, Eldering E, Davis AE,

- 3rd. Characterization of C1 inhibitor-Ta. A dysfunctional C1INH with deletion of lysine 251. *J Biol Chem.* 271: 24307-24312 (1996)
- 53) Yamasaki M, Li W, Johnson DJ, Huntington JA. Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. *Nature.* 455: 1255-1258 (2008)
- 54) Yamasaki M, Sendall TJ, Pearce MC, Whisstock JC, Huntington JA. Molecular basis of alpha1-antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer. *EMBO Rep.* 12: 1011-1017 (2011)
- 55) Eldering E, Verpy E, Roem D, Meo T, Tosi M. COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J Biol Chem.* 270: 2579-2587 (1995)
- 56) Kaplan AP. Bradykinin and the pathogenesis of hereditary angioedema. *World Allergy Organ J.* 4: 73-75 (2011)
- 57) Bork K. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Immunol Allergy Clin North Am.* 33: 457-470 (2013)
- 58) Riedl MA. Hereditary angioedema with normal C1-INH (HAE type III). *J Allergy Clin Immunol Pract.* 1: 427-432 (2013)
- 59) Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 343: 1286-1289 (2006)
- 60) Cichon S, Martin L, Hennies HC, Muller F, Van Driessche K, Karpushova A, Stevens W, Colombo R, Renne T, Drouet C, Bork K, Nothen MM. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet.* 79: 1098-1104 (2006)
- 61) Bork K, Kleist R, Hardt J, Witzke G. Kallikrein-kinin system and fibrinolysis in hereditary angioedema due to factor XII gene mutation Thr309Lys. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 20: 325-332 (2009)
- 62) Bjorkqvist J, de Maat S, Lewandrowski U, Di Gennaro A, Oschatz C, Schonig K, Nothen MM, Drouet C, Braley H, Nolte MW, Sickmann A, Panousis C, Maas C, Renne T. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *J Clin Invest.* 125: 3132-3146 (2015)
- 63) de Maat S, Bjorkqvist J, Suffritti C, Wiesenekker CP, Nagtegaal W, Koekman A, van Dooremalen S, Pasterkamp G, de Groot PG, Cicardi M, Renne T, Maas C. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 138: 1414-1423 e9 (2016)
- 64) Ewald GA, Eisenberg PR. Plasmin-mediated activation of contact system in response to pharmacological thrombolysis. *Circulation.* 91: 28-36 (1995)
- 65) Correia AS, Matias G, Calado S, Lourenco A, Viana-Baptista M. Orolingual angiodema associated with alteplase treatment of acute stroke: a reappraisal. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 24: 31-40 (2015)
- 66) Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T. Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol.* 83: 217-223 (2006)

- 67) <http://exac.broadinstitute.org/about>.
- 68) Bork K, Wulff K, Meinke P, Wagner N, Hardt J, Witzke G. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clin Immunol.* 141: 31-35 (2011)
- 69) Bork K, Wulff K, Hardt J, Witzke G, Lohse P. Characterization of a partial exon 9/intron 9 deletion in the coagulation factor XII gene (F12) detected in two Turkish families with hereditary angioedema and normal C1 inhibitor. *Haemophilia.* 20: e372-375 (2014)
- 70) Kiss N, Barabas E, Varnai K, Halasz A, Varga LA, Prohaszka Z, Farkas H, Szilagyi A. Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. *Clin Immunol.* 149: 142-145 (2013)
- 71) Gelincik A, Demir S, Olgac M, Karaman V, Toksoy G, Colakoglu B, Buyukozturk S, Uyguner ZO. Idiopathic angioedema with F12 mutation: is it a new entity? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 114: 154-156 (2015)
- 72) Bafunno V, Firinu D, D'Apolito M, Cordisco G, Loffredo S, Leccese A, Bova M, Barca MP, Santacroce R, Cicardi M, Del Giacco S, Margaglione M. Mutation of the angiotensin-converting enzyme 1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* in press (2017)
- 73) Pathak M, Wilmann P, Awford J, Li C, Hamad BK, Fischer PM, Dreveny I, Dekker LV, Emsley J. Coagulation factor XII protease domain crystal structure. *J Thromb Haemost.* 13: 580-591 (2015)
- 74) Beringer DX, Kroon-Batenburg LM. The structure of the FnI-EGF-like tandem domain of coagulation factor XII solved using SIRAS. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 69: 94-102 (2013)
- 75) Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Jenny NS, Everse SJ, Mann KG. Blood coagulation and fibrinolysis. *Wintrobe's Clinical Hematology 12th edition*, Eds Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means Jr RT, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 528-619 (2009)
- 76) Pixley RA, Schapira M, Colman RW. Effect of heparin on the inactivation rate of human activated factor XII by antithrombin III. *Blood.* 66: 198-203 (1985)
- 77) de Agostini A, Lijnen HR, Pixley RA, Colman RW, Schapira M. Inactivation of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C-1-inhibitor. *J Clin Invest.* 73: 1542-1549 (1984)
- 78) Scott CF, Schapira M, James HL, Cohen AB, Colman RW. Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors: predominant role of α 1-protease inhibitor and protective effect of high molecular weight kininogen. *J Clin Invest.* 69: 844-852 (1982)
- 79) van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN. Inactivation of kallikrein in human plasma. *J Clin Invest.* 71: 149-158 (1983)
- 80) Schapira M, Scott CF, Colman RW. Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma. *J Clin Invest.* 69: 462-468 (1982)