

血栓と補体

宮田敏行¹⁾、井上徳光²⁾

国立循環器病研究センター 脳血管内科¹⁾、大阪国際がんセンター 研究所 腫瘍免疫学部²⁾

Thrombosis and complement systems

Toshiyuki Miyata¹⁾, Norimitsu Inoue²⁾

¹⁾Department of Cerebrovascular Medicine, National Cerebral and Cardiovascular Center

²⁾Department of Tumor Immunology, Osaka International Cancer Institute

1. はじめに

生体防御反応である凝固系と補体系は、ともにセリンプロテアーゼによるタンパク質の一連の活性化を伴うことから、進化的な類似性が指摘されてきた。発作性夜間ヘモグロビン尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) や非典型溶血性尿毒症症候群 (atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS) といった補体系の制御異常に基づく疾患は血栓合併症を伴うことが知られており、凝固系と補体系にはクロストークがあると考えられる。これまで、補体系の血栓止血への関わりは、補体活性化で生じるアナフィラトキシン C5a や終末産物である膜侵襲複合体 C5b-9 による白血球や血管内皮細胞での組織因子の遺伝子発現^{1,2)}、および C5b-9 による血小板細胞膜上へのホスファチジルセリンの露出によるプロトロンビナーゼ複合体の形成³⁻⁵⁾が、主だった反応であると説明されてきた。しかし、遺伝子改変マウスやヒト血栓の病因にきわめて類似する動物モデルの導入、高感度で定量的な解析を可能とする生体内イメージング技術の大きな発展により、最近ではそれぞれの研究境界を越えた補体-血栓止血の新しい研究領域が開拓され、きわめて多くの研究が報告されている。

静脈血栓症の側面から眺めると、血栓の発症と進展は血管内皮細胞と血小板の関与に加え、免疫細胞である白血球の関わりが大きくクローズアップされてきており⁶⁾、好中球から放出される neutrophil

extracellular traps (NETs) の重要性が指摘されている^{7,8)}。また、血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy, TMA) のなかでも血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) は、ADAMTS13 欠乏症が引き起こす機序が確立され、ADAMTS13 補充療法も検討されている⁹⁾。補体の側面から眺めると、臨床症状では TMA を示す aHUS は内皮細胞傷害を惹起することは明らかであるものの、どうして血栓症を起こすのかについては不明な点が多い^{10,11)}。

本稿では、まず血栓止血系および補体系の概要を述べ、その後に両経路の関わりについてモデル動物を用いた研究を紹介しつつ解説したい。これまでに優れた総説が多く発表されているので、それらも参照していただきたい¹²⁻¹⁹⁾。本稿では、補体因子は Complement Nomenclature 2014 で推奨されている命名を用いることとする²⁰⁾。

2. 凝固系と血栓症

2-1. 凝固系と血小板活性化

血栓止血反応は凝固系と血小板の活性化を伴う (図1)。外因系凝固の活性化反応は組織因子が血中の活性型凝固 VII 因子 (FVIIa) に結合することで開始する²¹⁾。内因系凝固は細胞内の陰性荷電物質であるポリリン酸や RNA などが血中へ放出されることで始まり、陰性荷電物質上での自己活性化により FXIIa が生じ、これが FXI の活性化を行う²²⁾。

血中 FVIIa は微量(FVII の 0.5%-1%²³⁾)なため、凝固の開始時に形成される FVIIa-組織因子複合体もわずかであり、FXa やトロンビンも少量しか生成されない。しかし、一度トロンビンが形成されると、トロンビンは凝固の補助因子である FVIII と FV を活性化し、活性型の FVIIIa と FVa は、FIXa と FXa の触媒活性を劇的に亢進する。また、トロンビンはポリリン酸の存在下で FXI を活性化する。さらに FXa やトロンビンは FVII を活性化する。これらのフィードバック活性化反応により凝固反応が大きく進み、大量のトロンビンが生成する（凝固増幅反応と呼ぶ²⁴⁾。大量のトロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンに変換し、トランスグルタミナーゼであ

る FXIII を活性化し、FXIIIa により架橋され強度が増強したフィブリンからなる止血栓を形成する。

凝固の増幅反応には、酸性リン脂質であるホスファチジルセリンの細胞膜上への露出が必須である（図 1）。ホスファチジルセリンを提供する細胞は、主に活性化血小板と考えられている。血小板はアゴニスト刺激により、細胞膜の内層に存在しているホスファチジルセリンを外層に露出し、凝固反応の場を提供する。通常、ホスファチジルセリンは細胞膜の脂質二重膜の内層に存在し、血液に接する外層には存在しない。トロンビンやコラーゲン、膜侵襲複合体 (C5b-9) の形成などにより活性化した血小板はホスファチジルセリンを外層に露出する^{4,24)}。この

膜外層の組成の変化により、ビタミン K 依存性の凝固因子であるプロトロンビナーゼ複合体 (FXa-FVa 複合体)、内因系 Xase 複合体 (FIXa-FVIIIa 複合体)、外因系 Xase 複合体 (FVIIa-組織因子複合体) が形成され大量のトロンビンが産生される（トロンビンバーストと呼ぶ）。血小板活性化時のリン脂質輸送酵素であるスクランブラーゼによるホスファチジルセリンの露出の分子機構に関しては総説を参

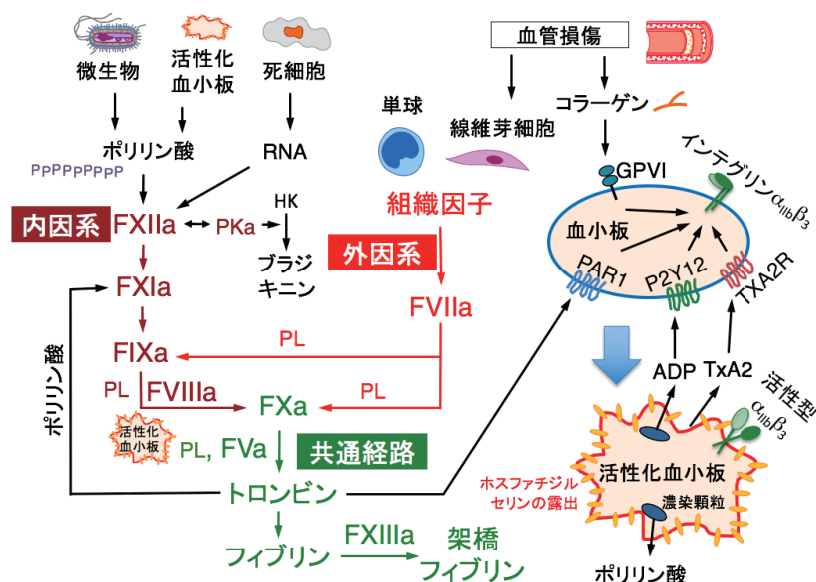


図 1 凝固系と血小板の活性化

凝固系は陰電荷物質で活性化される内因系、組織因子で始まる外因系、両経路が集まる共通経路で構成される。FXII はポリリン酸や RNA などの陰電荷物質で自己活性化し、内因系凝固反応を開始する。組織因子は血管外膜の線維芽細胞に恒常的に発現しており止血反応を担う。一方、単球は刺激依存性に組織因子を発現する。活性化血小板は酸性リン脂質であるホスファチジルセリンをリン脂質膜の外層に提示し、プロトロンビナーゼ複合体 (FXa-FVa 複合体)、内因系 Xase 複合体 (FIXa-FVIIIa 複合体)、外因系 Xase 複合体 (FVIIa-組織因子複合体) の形成の場を提供し、大量のトロンビン形成を進める。血小板はトロンビンと内皮下層のコラーゲンにより活性化される。血小板を活性化する外因性因子はこの 2 つである。これらのアゴニストはそれぞれの受容体を介して ADP やポリリン酸などの顆粒内容物を放出し、血小板凝集と凝固反応をさらに促進する。補体系の C5a は単球に組織因子を発現させ、C5b-9 は血小板と血管内皮細胞の細胞膜の外層にホスファチジルセリンを提示させ、血栓形成を促進する。ADP とトロンボキサン A2 による血小板凝集を抑制する薬剤が、チクロピジンに代表されるチエノピリジン系薬剤とアスピリンである。

PKa: 血漿カリクレイン、HK: 高分子量キニノーゲン、PL: ホスファチジルセリンを含むリン脂質膜、GPVI: 血小板 glycoprotein VI、PAR1: protease-activated receptor 1、P2RY12: ADP 受容体、TBXA2R: トロンボキサン A2 受容体、TxA2: トロンボキサン A2

照されたい^{25,26)}。

血小板の活性化を惹起する外因性因子は、血管内皮細胞の下層にあるコラーゲンと、凝固反応で生成するトロンビンである。コラーゲンは血小板 **glycoprotein VI (GPVI)** が受容体であり、トロンビンは **protease-activated receptor 1 (PAR1)** が受容体である。両アゴニストはこれらの受容体を介して血小板を活性化し、内部の濃染顆粒から強力な血小板活性化アゴニスト **ADP** や凝固内因系惹起物質 **ポリリン酸** などを放出し更に血小板や凝固系を活性化する (図 1)。最近の研究では、血栓の表層と内部ではトロンビン、**ADP**、**トロンボキサン** の濃度に差が認められ、血栓内部では十分に活性化された血小板が密に存在すると報告されている²⁷⁾。外傷時では、血管壁の外膜の繊維芽細胞に恒常的に発現している組織因子と損傷部位に露出するコラーゲンが止血反応に働く²⁴⁾。

2-2. 動脈血栓症

動脈血栓は、主に粥状プラークの破裂によって起こるのでアテローム血栓症とよばれる^{28,29)}。アテローム血栓症では、内皮下層に形成された脂質に富んだプラークに、組織因子を発現する単球や平滑筋細胞、また壊死を起こした細胞が局在する。プラークは薄い単層の血管内皮細胞で血液と隔てられており、これが破綻やびらんによりはがれ下層の細胞外マトリクスのコラーゲンが血流に晒されると、血小板の活性化が進行し血小板粘着が起こる。また、組織因子を起点として凝固系が活性化され、血小板活性化能をもつトロンビンが形成されて血小板凝集が起こるとともにフィブリン塊が形成される。このように動脈血栓は血小板血栓が主体の血栓であるため、再発予防には抗血小板薬が用いられる。

2-3. 静脈血栓症

自然災害が多発する本邦では、災害避難時の深部静脈血栓症および肺塞栓症の予防が喚起されている。

静脈血栓は血液がうっ滞しやすい静脈弁の内側のポケット構造をとる部位に生じやすい³⁰⁾。心房細動患者は左心耳に血栓ができやすい。心耳は血流がうっ滞しやすく、静脈血栓と同様の機序でフィブリンが形成されやすく、脳塞栓症の発症要因となる。

最近、マウスの下大静脈狭窄モデルと生体内イメージング技術を用いて、静脈血栓の形成機序が詳しく解析された³¹⁾ (図 2)。このモデルでは下大静脈の内腔を 80% 程度狭窄させ血流を低下させる。血流低下 48 時間後、静脈内に次のような機序で血栓が観察された。まず、i) 血流の低下による虚血により内皮細胞が活性化され、ii) 内皮細胞内の **Weibel-Palade** 小体より、接着因子である **フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor, VWF)** が血中へ放出され (**exocytosis**)、一部は細胞表面に係留し、接着因子 **P セレクチン** が内皮表面に発現し、iii) 細胞表面に係留した **VWF** には血小板 **glycoprotein Ib (GPIb)** を介して血小板が結合し³²⁾、活性化した血小板と内皮細胞に現れた **P セレクチン** には **P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)** を介して単球と好中球が結合し³³⁾、iv-v) 単球は刺激依存性に組織因子を発現し凝固反応を開始してトロンビンとフィブリンの形成に繋がる。好中球からは **danger-associated molecular patterns (DAMPs)** として知られる **ヒストン H3, H4** や **high-mobility group box 1 (HMGB1)**、染色体 DNA を含む **NETs** が放出される。血小板の活性化によりポリリン酸や **ADP**、還元型 **HMGB1** などの血栓惹起物質が放出される³⁴⁾。**NETs** に含まれる各種の物質により血栓が拡大し、血小板は **GPIb** を介して白血球をつなぎ止め **HMGB1** を放出し血栓の拡大に働く。ヒト静脈血栓症では内皮の剥離などが観察され、より複雑な過程を伴う。

下大静脈狭窄による静脈血栓の発症では、内皮細胞内の **Weibel-Palade** 小体の **exocytosis** による接着因子の表出が極めて重要な役割を果たす³¹⁾。**Weibel-Palade** 小体は **VWF**、**P セレクチン**、組織プラスミ

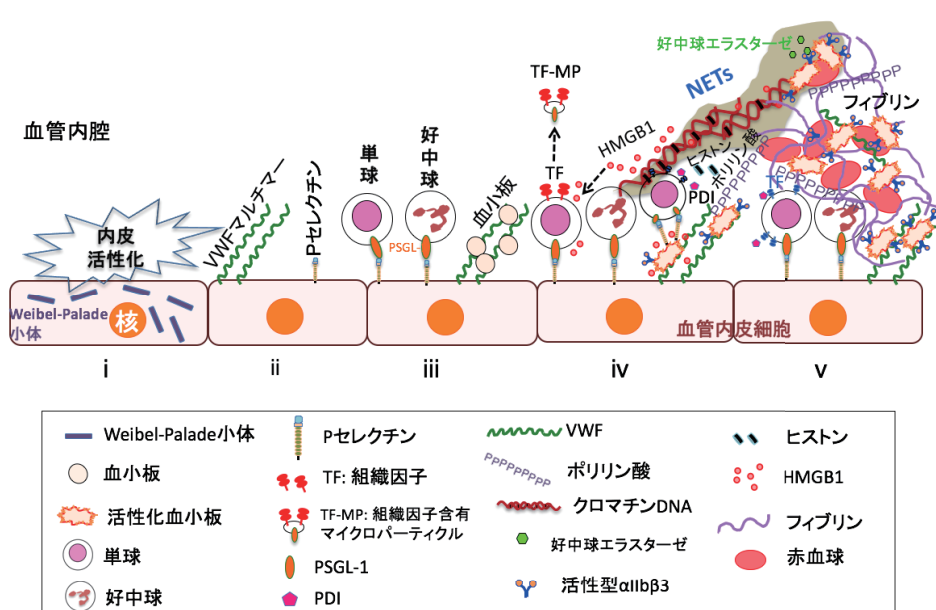


図2 静脈血栓の形成機序

マウスの下大静脈狭窄モデルと生体内イメージング技術から明らかになった静脈血栓モデル。実際の血栓形成の段階は明瞭に区別できないが、ここでは複雑な過程を簡略化した。このモデルでは血管内皮細胞は剥離しないので、内皮下層の細胞外マトリクスに存在するコラーゲンは血小板と接することはない。虚血などの刺激により血管内皮細胞内のWeibel-Palade小体の内容物であるVWFマルチマーとPセレクトリンが分泌もしくは細胞表面に露出する。活性化血小板はPセレクトリンとホスファチジルセリンを露出し、インテグリン $\alpha\text{IIb}\beta 3$ は活性型のコンフォメーションをとる。

VWF：フォンビルブランド因子、NETs：neutrophil extracellular traps、PDI：protein disulfide isomerase、PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1、HMGB1: high-mobility group box 1

ノーゲン活性化因子(tissue plasminogen activator, tPA)などを含む分泌小胞である。中でもVWFが主要な構成成分であり、VWF欠損マウスの内皮細胞はWeibel-Palade小体を保持せず、VWFを強制発現させた細胞にはWeibel-Palade小体様のオルガネラが観察される³⁵⁾。Weibel-Palade小体のexocytosisは、炎症性サイトカイン、志賀毒素、カルシウムイオノフォア、高濃度のヒスタミン、虚血、DAMPsであるヒストンなど多くの刺激により起こる^{35,36)}。Weibel-Palade小体の分泌促進は細胞内カルシウム濃度とcAMPの上昇により惹起され、前者はトロンビン、ヒスタミン、C5b-9であり、後者はエピネフリンとバソプレシンが誘因因子である。

生体内で組織因子を発現・誘導する白血球は主に

単球と考えられる^{31,33)}

(図2)。組織因子を発現する単球は組織因子をもつマイクロパーティクル(microparticle, MP)を放出し、このMPはPSGL-1を介してPセレクトリンを発現する活性化血小板や血管内皮細胞に結合できる³³⁾。したがって、血管内皮細胞は一見組織因子を発現しているように見えるが、実のところは組織因子を含むMPを補足しているだけとも考えられる³⁷⁾。NETsはヒストン、プロテアーゼ、顆粒タンパク質、細胞質タンパク質で覆われたクロマチン線維を有する構造物であり、血栓形成を促進する⁸⁾。このよう

に、静脈血栓は単球や好中球といった自然免疫系に関わる細胞が関与するのでImmunothrombosisとよばれ、これらの細胞が活性化される際に放出する無菌性炎症(sterile inflammation)に関わるHMGB1などの因子群が静脈血栓を増大させる^{7,18)}。最近では、組織因子が含まれるNETsが心筋梗塞患者から回収された血栓に確認されている³⁸⁾。脳梗塞患者から回収された血栓にもNETsが確認され、回収血栓はtPAにDNA分解酵素を加えるとより解けやすいことが観察されている³⁹⁾。

2-4. 血栓性血小板減少性紫斑病(Thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)

TTPは溶血性貧血、血小板減少、血栓による臓器

障害を特徴とする血栓性微小血管症（thrombotic microangiopathy, TMA）に分類される（表1）。TTPの機序は次のように説明される^{9,40,41}（図3）。VWFはジスルフィド結合で繋がった超高分子量マルチマーとして主に血管内皮細胞で合成され血中に放出さ

れ、ひも状に自己集合し⁴²、一部はPセ렉チンもしくはインテグリン $\alpha V\beta 3$ を介して血管内皮細胞上に係留する^{43,44}。i) 低ずり応力下では、VWFマルチマーは緩く結合した凝集した形をとるが、ii) 強い

いずり応力下ではVWFマルチマーは血流方向に伸展した構造をとる。iii) 鎖長が長いとかかるずり応力も強くなり、VWFのA2ドメインが変性し Tyr1605-Met1606結合が露出し、プロテアーゼであるADAMTS13によりこの部位が切断されマルチマーが低分子化する。VWFマルチマーはA1ドメインを介して内皮細胞上もしくは血管損傷部位で血小板のGPIbに結合する。iv) 血小板に結合したVWFは弱いずり応力でもA2ドメインが容易に変性し、ADAMTS13で切断されVWFマルチマーは低分子化する。しかし、v) 先天性ADAMTS13欠損症や自己抗体によりADAMTS13活性が極端に低下（通常10%以下の低下が診断に使われている）すると、超高分子量VWFマルチマーはずり応力下でも低分子化されず、血小板を結合し凝集塊を形成する。これは塞栓として下流の微小血管を閉塞することがある。このように、TTPの血栓形成の機序は動脈血栓症や静脈血栓症とは異なる。

表1. 血栓性微小血管症（thrombotic microangiopathy: TMA）の分類

分 類	原 因
血栓性血小板減少性紫斑病(Thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)	ADAMTS13活性が10%未満
Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> -associated hemolytic uremic syndrome (STEC-HUS)	志賀毒素関連
非典型溶血性尿毒症症候群（atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS、補体関連TMA）	FH, FI, MCP, C3, FB, トロンボモジュリン, DGKE, INF2の遺伝子異常、抗FH抗体陽性、TMAを呈し STEC-HUS, TTP, 二次性TMAが否定的で既知の原因遺伝子異常は認められないが臨床的にaHUSが疑われる例
二次性TMA	代謝異常症、感染症、薬剤性、自己免疫性疾患、悪性腫瘍、HELLP症候群、移植後など

文献175より引用

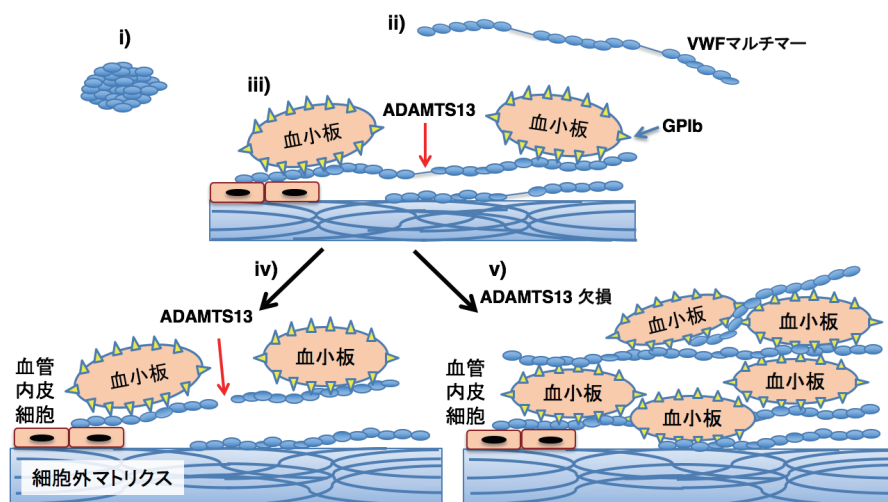


図3 血栓性血小板減少性紫斑病の発症機序

VWFは2050アミノ酸からなる同一のサブユニットがジスルフィド結合で連結したマルチマー構造として血管内皮細胞から分泌され、一部のVWFは内皮細胞上に係留する。高分子量VWFマルチマーは強い血小板凝集能を示すが、低分子化されると凝集能は低下消失する。i) VWFマルチマーは低ずり応力下で緩く結合した形をとる。ii) 強いずり応力下ではVWFマルチマーは血流方向に伸展した構造を取り、VWFのA2ドメインが変性しTyr1605-Met1606結合が露出する。iii) 内皮細胞に係留した高分子量VWFマルチマーにGPIbを介して血小板が結合すると、弱いずり応力でもA2ドメインが容易に変性し、iv) ADAMTS13によりTyr1605-Met1606結合が切断されVWFマルチマーが低分子化する。v) ADAMTS13活性が欠乏すると、血小板が高分子量VWFマルチマーに結合し凝集塊を形成する。

3. 補体系の活性化

3-1. 補体系の活性化

補体は外来から侵入した病原体だけではなく、体内で不要となった物質や傷害を受けた細胞を除去する働きをもつ。補体は3つの経路、古典経路、レクチン経路、第二経路によって活性化される。

古典経路は、抗原抗体複合体や傷害を受けた細胞がC1複合体中のC1qにより認識され、セリンプロテアーゼC1rが活性化され、さらに活性化型のC1rによってC1sが活性化されることで開始される^{13,45-48)}。

レクチン経路はマンノース結合レクチン(mannose-binding lectin, MBL)、フィコリン(Ficolin-1, Ficolin-2, Ficolin-3)、コレクチンファミリーのCL-L1 (collectin liver 1)とCL-K1 (collectin kidney 1)によって形成されるヘテロ複合体CL-LKのようなパターン認識分子が、自己のタンパク質や細胞表面にはまれにしか存在しないが、微生物・ウイルス・死細胞には発現する糖鎖(マンノースやGlcNAcなど)を認識することで惹起される^{49,50)}。MBLやフィコリンなどによりそれらの糖鎖が認識されると、これらの認識分子と複合体を形成しているセリンプロテアーゼMASPs (MBL associated serine proteases)の活性化が引き起こされる。まずMASP-1が活性化され、さらに活性型のMASP-1によってMASP-2が活性化される機序は古典経路のそれに類似する。このように古典経路とレクチン経路はともにセリンプロテアーゼを活性化し、これらの活性型セリンプロテアーゼはC4とC2を切断しC4b2a複合体を形成する。この複合体はC3転換酵素とよばれ、C3をC3bとアナフィラトキシンC3aに分解・活性化する能力を持つ^{13,45-47)}。

MASPsのなかでMASP-1とMASP-3は共通のH鎖を持ち、L鎖(セリンプロテアーゼドメイン)はスプライシングの違いにより構造が異なる⁵¹⁾。MASP-1とMASP-2はともにレクチン経路の活性化に作用するが、MASP-1にはフィブリノーゲン、

凝固XIII因子、プロトロンビン、thrombin activated fibrinolytic inhibitor (TAFI)の切断などのトロンビン様活性が報告されている⁵²⁾。MASP-1のこれらの活性はトロンビンなどの本来の活性化酵素に比べて弱いものの、生体内の局所では意味を持つかもしれない。また、血小板の活性化に伴いMASPsの活性化が検出され、レクチン経路と血栓の関連が示唆されている⁵³⁾。MAp44とsMAPは、それぞれMASP-1およびMASP-2のH鎖の一部のドメインだけから構成されるため酵素活性を持たないが、MASP-1やMASP-2に対してMBLやフィコリンとの複合体の形成を競合するためレクチン経路を阻害する機能をもつ⁵¹⁾。factor D (FD)は、血液中で常に活性化状態で存在するが、MASP1/3欠損マウスの解析から、前駆体FDとして脂肪細胞から分泌された後すぐにアミノ末端部をMASP-1/3が切断し、活性型に変換されることが報告された⁵⁴⁾。最近、MASP-1とMASP-3の単独欠損マウスの解析から、*in vivo*ではMASP-1ではなくMASP-3が前駆体FDのN末端部分を特異的に切断し、活性化することが明らかにされた⁵⁵⁾。

第二経路では、恒常的に液相でC3の分子内チオエステル結合が水分子によって加水分解を受けて、C3b様のC3(H₂O)を生成する^{13,47)}。これにfactor B (FB)が結合し、FBは活性型FDによる切断を受けてC3転換酵素C3(H₂O)Bbを形成する。C3(H₂O)BbはC3を切断し、それによって生じるC3bはチオエステル結合を介して固相(細胞)表面の水酸基もしくはアミノ基と結合し、新たなC3転換酵素C3bBbの形成に寄与する。

これら3つの活性化経路によって形成されたC3転換酵素(C4b2aおよびC3bBb)にC3bが結合すると、C5転換酵素(C3bBb3bまたはC4b2a3b)が形成され、転換酵素の基質特異性がC3からC5へと変化し、C5が分解・活性化されてC5aとC5bが形成される。C5aはその受容体であるC5aR1 (CD88)を介して強力なアナフィラトキシン活性を

示し、ヒスタミンなどの物質を放出させ、血管透過性を亢進する^{56,57)}。また、C5aは、走化因子としても働き、白血球を炎症部位に集積させる。そのため、C5aR1は免疫細胞、内皮細胞、上皮細胞、ある種のがん細胞に発現し、炎症誘導に働く。一方、C5bは膜侵襲複合体の集合形成に繋がり、標的とする病原菌や細胞を融解する。

3-2. 補体活性化制御反応

血管内皮細胞は血管の内腔を覆い、血液中の炎症性メディエーターなどから組織を防御している。補体による細胞傷害からの防御機能もその一つである。特に補体第二経路の活性化は、特異的な自己非自己の識別機構が存在しないため、自己の細胞を攻撃しないよう補体制御因子によって厳密に制御されている。

補体活性化経路の制御として、まずC1インヒビター(C1-INH)による古典経路およびレクチン経路の制御があげられる。先にも述べたように、レクチン経路には、MASPsのスプライスバリエーションであるsMAPやMAp44による制御も知られている⁴⁷⁾。

C3転換酵素(C4b2a, C3bBb)形成の制御は、2つの方法が知られている。C4bとC3bのプロテアーゼでの分解による制御とC3転換酵素の解離による制御である。C4bとC3bはプロテアーゼであるfactor I(FI)によって、それぞれC4cとC4dおよびiC3bとC3fに分解され、C2やBbとの結合性を失い不活性化される。このFIによる分解反応にはfactor H(FH)、C4BP、membrane cofactor protein(MCP,

CD46)、CR1(CD35)といった補因子が必要である。これらすべての補因子は、基本構造としてshort consensus repeat(SCR)とよばれる約60アミノ酸残基からなるタンデムリピートをもつ(表2)。

FHは20個のSCRからなる血漿タンパク質で、ドメイン1-4を通してC3bやC3(H₂O)に結合し、FIの補因子としてC3bの分解による制御とC3転換酵素C3bBbの解離による制御を行う(図4i-a)^{47,58)}。一方、C4bに対してはほとんど働かない。FHのドメイン19-20は、自己細胞上に結合したiC3bのC3dチオエステル含有ドメインやC3dへの結合と、硫酸化グリコサミノグリカンやシアル酸のような自己細胞上の陰性荷電領域に結合する能力をもつ。すなわち、FHはドメイン19-20を介して自己細胞(血管内皮細胞)上の糖鎖の陰性荷電領域に結合し、細胞上でのC3bによる第二経路の活性化を阻止することができる(図4i-a)。一方、FHは陰性に荷電した糖鎖をもたない微生物やウイルスに結合しない。このように、FHは細胞上の硫酸化グリコサミノグリカンやシアル酸などに対する結合性により、自己と非自己を認識する能力を示し、補体の攻撃から血管内皮細胞を防御している。しかし、FHを結合して補体攻撃から身を守る微生物も報告されていることを付け加えたい⁵⁹⁾。血管内皮細胞に発現する一回膜貫通領域を有する抗凝固補因子であるトロンボモジュリンは、FHの存在下でFIによるC3bの分解を促進する機能を有する(図4i-c)⁶⁰⁾。また、低分子のVWFマルチマーはFIによるC3bの分解を促進すると報告されている⁶¹⁾。

表2. C3転換酵素に関わるSCRを有する補体制御因子

	SCR数	局在	発現細胞	補因子機能		C3転換酵素の解離		機能場所	その他の機能
				C3b	C4b	C3bBb	C4b2a		
FH	20	血漿	肝	○	x	○	x	液層、自己の糖鎖	
C4BP	α鎖: 7, β鎖: 1	血漿	肝	○	○	x	○	液層	プロテインSに結合
DAF (CD55)	4	細胞膜	全ての細胞	x	x	○	○	自己細胞	
MCP (CD46)	4	細胞膜	全ての細胞 (赤血球を除く)	○	○	x	x	自己細胞	
CR1 (CD35)	30~44	細胞膜	T細胞、B細胞、食細胞、 濾胞樹状細胞、ボドサイト	○	○	○	○	自己細胞、 非自己細胞	運搬・貪食受容体

SCR: short consensus repeat

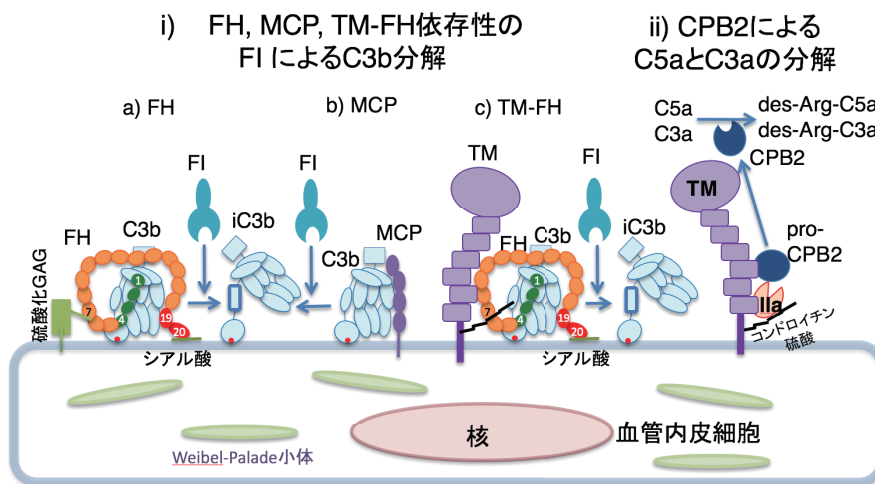


図4 血管内皮細胞上でのC3bの分解とC5a/C3aの分解
 i) FH(a), MCP(b), トロンボモジュリン(TM)-FH(c)依存性のFIによるC3bの分解。先天性もしくは後天性の要因により血管内皮細胞上でFIによるC3bの分解が十分に働かないと、内皮細胞傷害が起こりaHUSを発症する。ii) pre-CPB2の活性化とCPB2によるC5aとC3aの不活化。

最近、FH に関して極めて興味深い報告が続いて発表されている。多価不飽和脂肪酸は活性酸素種により非酵素的に酸化されマロンジアルデヒド (malondialdehyde, MDA) が生成する。FH はMDA が付加したタンパク質に強く結合し、MDA が誘導する炎症効果を阻害するという⁶²⁾。また、FH の p.Tyr402His 多型 (rs1061170) は網羅的ゲノム解析で加齢黄斑変性症との関連が指摘されているが⁶³⁻⁶⁵⁾、His402 をもつ FH は MDA への結合能が顕著に低下し炎症を抑制できず、加齢黄斑変性症に繋がると指摘されている⁶²⁾。ちなみに、ヨーロッパ人の His402 のアレル頻度は 0.38 であるが⁶⁶⁾、東アジア人のアレル頻度は低く日本人では 0.07 である⁶⁷⁾。加齢黄斑変性症との関連では、CD47 は炎症を抑制するが、FH はそれを阻害するので抗炎症抑制作用をもつと指摘されている⁶⁸⁾。炎症の抑制では、旺盛な食作用をもつ神経系ミクログリア細胞などの単核食細胞は CD47 依存性に排除される。FH はインテグリン CD11b (Mac-1 の α M 鎖) に結合し、インテグリンに結合する CD47 の TSP-1 による活性化を制限することにより、網膜下の単核食細胞を増加させた。網膜下の単核食細胞は FH-Tyr402 より FH-His402 で増加した。血栓への関連では、FH は VWF に結合し FI による C3b の分解を促進し、かつ ADAMTS13 による分解を阻害して血小板凝集を促進する⁶⁹⁾。また、FH は還元酵素として VWF マル

チマーを低分子化すると報告されている⁷⁰⁾。

C4 結合タンパク質 (C4b-binding protein, C4BP) は、7 本の α 鎖 (8 個の SCR と C 末端ペプチド) と 1 本の β 鎖 (3 個の SCR と C 末端ペプチド) からなる血漿タンパク質である。名前が示す通り、C4BP は C4b に結合し、液層中で FI による C4b の分解を促進し C3 転換酵素 C4b2a の解離に働く (表 2)。また、C4BP は C3b に結合し FI による C3b 分解の補因子として働くが、C3bBb の解離は促進しない。C4BP は β 鎖を介して抗凝固因子プロテイン S に結合する。プロテイン S は活性化プロテイン C の補因子として FVIIIa と FVa の切断・不活性化を促進するが、プロテイン S-C4BP 複合体形成によって、この補因子活性が極端に低下し、プロテイン S の抗凝固機能が失われる。

decay-accelerating factor (DAF, CD55) は、ヒトではほとんどの細胞の膜表面に発現する補体制御因子で、C4b2a と C3bBb の両方の C3 転換酵素の解離を促進する。一方、MCP も赤血球を除くほとんどの細胞に発現し、FI による C4b や C3b の分解の補因子として働く (図 4 i-b)。DAF と MCP は膜タンパク質で、それらが発現する自己細胞上での補体の活性化しか制御することができず、液層中や非自己細胞上での活性化を制御できない。

CR1 は、補因子として C3b や C4b の分解 (MCP と FH は C3b の iC3b への分解に関わるのに対し、

CR1 は iC3b をさらに C3dg と C3c への分解にも関わる)、C3 転換酵素 (C4b2a, C3bBb) や C5 転換酵素 (C4b2a3b, C3bBbC3b) の解離を促進することもできる。また、CR1 は、自己細胞上での補体活性化を制御するだけでなく、外来異物上で活性化した C4b や C3b を分解し、CR2、CR3、CR4 などの他の補体受容体が認識できるよう変換する働きを持つ。CR1 単独による C3b の結合では貪食を促進することはできず、CR1 は外来異物上の C3b を認識し、FI により iC3b へ分解することによって、貪食細胞上の CR3 に認識されるようになり、その外来異物の貪食が促進される。このため、CR1 は主に血液系の細胞に発現し、内皮細胞にはほとんど発現していない^{45,47)}。

4. 補体因子から生じる C3a, C4a, C5a と血栓

C3a, C4a, C5a は、C3, C4, C5 のサブユニットの中で分子量の最も大きい鎖である α 鎖のアミノ末端から、プロテアーゼにより切り出される分子量約 9kDa の 74-77 残基からなる 3 つのジスルフィド結合をもつタンパク質である。相互のアミノ酸の同一性は低く、ヒトでは C3a と C4a は 29%、C3a と C5a は 34% の同一性しか示さない⁷¹⁾。

4-1. C5a による組織因子の発現誘導

C5a は肥満細胞からヒスタミンの分泌を刺激するアナフィラトキシンとして同定された。C5a は血管透過性亢進作用、平滑筋収縮作用、白血球走化因子活性をもつ^{56,57)}。C5a は免疫系に限らず多面的な生物学的な作用を発揮し、血栓形成にも大きく関わる⁵⁷⁾。C5a の多彩な機能はその受容体である C5aR1 および C5aR2 を介して行われる⁵⁷⁾。C5aR1 は G タンパク質共役型受容体であり多くの研究が蓄積されている。ごく最近、アンタゴニストが結合した C5aR1 の結晶

構造解析が報告された⁷²⁾。

C5a は血管内皮細胞に作用し Weibel-Palade 小体の exocytosis を惹起し、VWF を放出し P セレクチンを細胞表面に提示する (図 5)⁷³⁾。C5a が白血球に組織因子の遺伝子発現を誘導することは古くから報告されている¹⁾。C5a は好中球で組織因子発現を誘導し、生体内の局所で多彩な病態に関わる。抗リン脂質抗体症候群は、動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産などの妊娠合併症を示す。マウスモデルでは、抗リン脂質抗体は補体を活性化し C5a を産生し、C5a 受容体を介して好中球にシグナルが入り、組織因子を発現させる。発現した組織因子には FVIIa が結合する。好中球には protease-activated receptor 2 (PAR2) が発現しており、組織因子-FVIIa 複合体は PAR2 を活性化し oxidative burst を惹起して trophoblast に傷害を与え流産に繋がると報告されている⁷⁴⁾。

急性呼吸促迫症候群では、C5a 依存性に好中球に組織因子が発現し、フィブリンの沈着を引き起こし、病態の悪化を導いているとの報告がある⁷⁵⁾。血液透析に使用する生体適合材料表面では、補体の活性化によって C5a が産生され、好中球に組織因子が発現し、血栓を惹起することが報告された⁷⁶⁾。

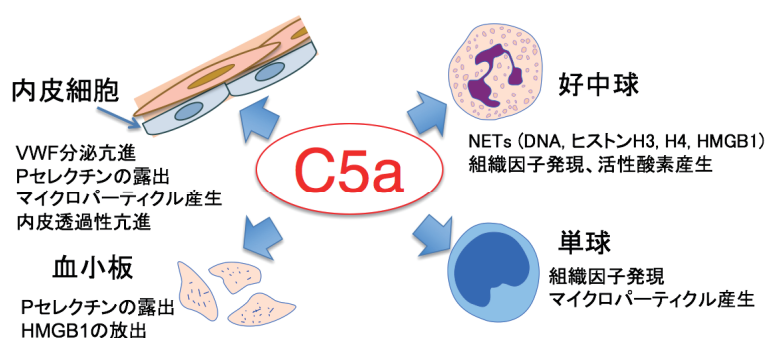


図 5 C5a の多彩な血栓促進作用

C5a は細胞上の受容体 C5aR1 を介して各種の反応を惹起する。血管内皮細胞では Weibel-Palade 小体の exocytosis により接着因子 (VWF と P-セレクチン) が細胞膜上に発現する。血小板には P-セレクチンが発現する。VWF には血小板が、P-セレクチンには白血球 (単球と好中球) が結合する。白血球は組織因子を発現し凝固反応を活性化する。組織因子を含むマイクロパーティクルが放出され凝固反応が進む。VWF:フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor)、HMGB1: high-mobility group box 1

C3 欠損マウスは野生型マウスと同様に IgG 免疫複合体による C5a を介した肺の急性炎症障害が認められるが、この際 C3 欠損マウスではトロンビンが C5 転換酵素として働くことが明らかになっている⁷⁷⁾。しかし、トロンビンは C5a の遊離に必要な Arg751 の切断活性は低く、別の部位の Arg947 を好んで切断し C5T という中間体を生じる⁷⁸⁾。C5T は低濃度のトロンビンで生成し、さらに C5 転換酵素で切断されると膜侵襲複合体として働く C5bT-9 を形成し、より溶血活性の強い複合体となる。すなわち、ある種の病態下でトロンビンと C5 転換酵素が形成されると、C5T を通して C5bT-9 が形成される可能性が示されている。

4-2. C5a の分解・不活化

C5a と C3a は血漿カルボキシペプチダーゼにより C 末端の塩基性アミノ酸 Arg 残基が切断除去される。この C5a-desArg は C5aR1 に対して C5a より 10-100 倍結合能が低い。血漿中にはほぼ同じ濃度の 2 種の塩基性カルボキシペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ N (CPN) とプロカルボキシペプチダーゼ B2 (pro-CPB2, 別名 CPU, CPR, TAFI) が存在し、これらが C5a と C3a の C 末端 Arg 残基の除去を行う⁷⁹⁾。CPB2 には歴史的に幾つかの名前があるが、ここでは国際血栓止血学会の Scientific Standardization Committee の Subcommittee on Fibrinolysis の提案にしたがい CPB2 とする⁸⁰⁾。

CPN は活性型で血中に存在する。一方、pro-CPB2 は血管内皮細胞に発現するトロンボモジュリンに結合したトロンビンにより活性化される (図 4 ii)。トロンボモジュリンは凝固反応を抑制する因子として広く知られている。凝固反応で生成したトロンビンがトロンボモジュリンに結合するとフィブリノーゲンのフィブリンへの切断活性は激減し、翻って凝固制御プロテアーゼであるプロテイン C 活性化能を獲得し、活性化プロテイン C を生成する。この活性化プロテイン C はプロテイン S の存在下、FVIIIa と

FVa を分解・不活化することにより凝固系を抑制する⁸¹⁾。

これら 2 種の酵素による C5a の不活化における使い分けが遺伝子欠損マウスを用いて明らかになった^{79,82)}。すなわち、常に活性型で血中に存在している CPN は C3a と C5a の不活化で中心的な役割を果たしている。一方、トロンビン-トロンボモジュリン複合体による限定分解を受けて活性を発現する pro-CPB2 は血管壁近傍で活性化し、局所で生成する過剰な C5a を不活化するオンデマンド型の補足的なインヒビターとして機能する。

CPN 欠損マウスは、C5a の投与や cobra venom factor による補体系の急激な活性化によりアナフィラキシーショックを示し、主に C5a によりヒスタミン放出を介して死亡する⁸³⁾。一方、CPB2 欠損マウスは同じ量の cobra venom factor 投与では死亡せず、リポ多糖で感作後に cobra venom factor を投与して始めて死亡が見られた⁸⁴⁾。これはリポ多糖の前投与により C5a 受容体が増加したことによると考えられる。このことは、CPB2 欠損マウスでは、CPN が補体系の急激な活性化による致死的な状態からマウスを保護していることを示している。

pro-CPB2 は血栓止血領域では別名の TAFI として広く知られている⁸⁵⁾。フィブリンを溶かす線溶反応は、その過程でプラスミンによって C 末端に Lys 残基をもつフィブリンが形成される。この C 末端 Lys 残基に、プラスミノーゲンと tPA がもつ Lys 結合部位が結合し、両因子がフィブリン上に集合しプラスミノーゲンの活性化反応が促進される。tPA はフィブリン親和性を持つので、脳梗塞溶解療法では全身投与で血栓溶解効果を発揮する。抗線溶薬であるトラネキサム酸は Lys アナログであり、フィブリンの C 末端 Lys 残基へのプラスミノーゲンと tPA の結合を抑制することで抗線溶活性を発揮する。TAFI である CPB2 はフィブリン上に現れた C 末端 Lys 残基を酵素的に切断除去し、プラスミノーゲンと tPA のフィブリンへの結合を阻害することにより

フィブリン分解を抑制する。

CPB2 は C5a の C 末端 Arg 残基を切断除去し C5a を不活化することにより免疫細胞のリクルートを抑制する⁸⁶⁾。ヒト CPB2 遺伝子には p.Thr325Ile 多型が存在し、Thr325-CPB2 は Ile325-CPB2 より血中半減期は短く (約 8 分 vs 約 16 分)、C5a 分解能が高く、関節リウマチ患者では重症になるリスクが低いと報告されている⁸⁶⁾。

CPN と CPB2 は、C3a と C5a だけでなくブラジキニンにも作用し C 末端 Arg 残基を切り出して不活化する。両酵素は C4a にも働き C 末端 Arg を遊離すると考えられるが、後述の C4a の PARs 活性化能が消失するかどうかは明らかでない。

4-3. C4a の機能

C4a の生物学的機能や受容体は長らく不明であった^{57,71)}。ごく最近、G タンパク質共役型受容体をスクリーニングする手法を用いて、protease activated receptors の PAR1 および PAR4 が C4a の受容体であると報告された⁸⁷⁾。C4a は nM レベルで PAR1 と PAR4 に直接結合し活性化した。C3a と C5a は PAR1 と PAR4 に対してアゴニスト活性を示さないもので、C4a は C3a と C5a とは全く異なった活性を持つ。血管内皮細胞では、C4a は PAR1 と PAR4 を介してカルシウムを動員し、ストレスファイバー形成を促進し、血管内皮の透過性を亢進した。これらの効果は PAR1 のアンタゴニストの前処理により抑制された。

PAR1 と PAR4 は血小板や血管内皮細胞などの多くの細胞に発現しており、特に PAR1 は血小板でトロンビン受容体として機能し、血小板の活性化に働く^{24,88,89)}。その際のメカニズムとして、プロテアーゼが PARs の N 末端領域を切断し、新しく露出したアミノ末端残基が PAR 本体に結合してアゴニスト活性を発揮することが明らかになっている。新しく露出したアミノ末端残基を含む合成ペプチドは PAR のアゴニスト活性を示す。C4a は PARs を切断

するのではなく直接 PARs に結合しシグナルを伝達する点できわめてユニークである。これまで、血小板と補体・自然免疫の関連が指摘されているが⁹⁰⁾、C4a のリガンドが PARs であったことから、新たな展開が予想される。

PAR1 と PAR4 のアミノ酸配列の相同性はわずか 33% しかない。PAR1 は nM 以下の低濃度のトロンビンで効率良く切断をうけ活性化されるが、PAR4 はそれより 10 倍以上のトロンビンを必要とするので、余剰の受容体と考えられてきた。しかし、PAR1 の活性化は迅速であるものの一次的であり、一方 PAR4 の活性化では継続的なシグナルが入ることから⁹¹⁾、PAR1 は止血反応に関わり、PAR4 は安定な血栓の形成に必要とされる可能性が指摘されていた。ごく最近、PAR4 に選択的で可逆的なアンタゴニストが開発された。この薬剤はカニクイザルを用いた研究で、現在広く臨床で使用されている ADP 受容体アンタゴニストである抗血小板薬クロピドグレルより出血が少ないという結果が報告され⁹²⁾、健常人を対象としたフェーズ 1 の結果が報告され、ex vivo で血小板血栓形成の抑制が観察された⁹³⁾。

5. 膜侵襲複合体と血栓

5-1. 有核細胞での膜侵襲複合体

膜侵襲複合体である C5b-9 は細胞膜にポアを形成し細胞を溶解する。膜侵襲複合体の細胞溶解作用は、赤血球のような無核細胞に強くみられ、好中球のような有核細胞では弱い⁹⁴⁾。有核細胞に対しては、膜侵襲複合体の形成は必ずしも細胞溶解を誘発するというのではなく、細胞刺激因子と考えた方がよいと思える^{95,96)}。細胞膜上の膜侵襲複合体の形成は細胞内へのカルシウムの流入を促し、細胞内カルシウム濃度の上昇により下流のシグナル伝達系が活性化され、細胞の活性化や炎症反応などにつながる。これは必ずしも細胞溶解を伴わないため、この膜侵襲複合体は sublytic C5b-9 とよばれる。

5-2. 膜侵襲複合体の制御

膜侵襲複合体は細胞にポアを形成するので、病原菌だけでなく自己細胞にとっても脅威である。自己細胞上で補体の終末経路の活性化を制限し膜侵襲複合体による細胞傷害から自己細胞を保護するために、幾つかの防御機構が存在する (図 6) ⁹⁴⁻⁹⁶⁾。

膜侵襲複合体形成の中間体 C5b6 は C5 転換酵素と結合して存在し、C7 が結合することによって細胞膜と結合することができるようになる。この C5b-7 の膜結合部位は極度に不安定で、血中タンパク質であるクラステリン(clusterin)やビトロネクチン(vitronectin、S protein ともよばれる)で覆われやすい性質をもつため、膜侵襲複合体形成へと進むために細胞膜と結合できる C5b-7 の数はかなり少ない ^{95,97)}。このように、C5b-7 に結合することによって、クラステリンとビトロネクチンは膜侵襲複合体の形成を制御している ⁴⁷⁾。また、膜侵襲複合体の形成は C5 転換酵素の近傍に局限される。クラステリンとビトロネクチンが結合した C5b-7 は、液層中でさらに C8 や数個の C9 が結合して soluble C5b-9 (sC5b-9) を形成する。

2 つ目の自己細胞の防御は CD59 がおこなう。CD59 は膜侵襲複合体の形成を阻害する能力をもつ glycosylphosphatidylinositol (GPI)-アンカーを有する膜タンパク質である。CD59 は各種の細胞に広く発現する。CD59 は自己細胞上に形成された C5b-8 複合体に結合し、C9 のこの複合体への結合を妨げ

るとともに結合した C9 の解離も促進し、膜侵襲複合体形成を妨害する働きを持つ ^{47,95,98)}。

後天的な GPI の生合成異常によって発症する PNH の異常赤血球は、GPI を介して細胞膜と結合している DAF と CD59 が共に欠損し溶血発作を示す。先天性 CD59 欠損症は単独で PNH 様の溶血発作を示すとともに、末梢神経障害を起こすことが報告されている ^{99,100)}。一方、先天性 DAF 欠損症は CHAPLE 症候群と呼ばれる早期発症の蛋白漏出性胃腸症と血栓症を示すが溶血発作は見られない ¹⁰¹⁾。

CD59 の監視の目をくぐり抜けて形成された膜侵襲複合体に対する細胞の最終防御は、endocytosis として細胞内に取り込むか、膜から膜侵襲複合体を効率良く除去することである。好中球では細胞膜上に形成された膜侵襲複合体の約 65%は迅速にベジクル (小胞) として細胞表面から除去される ^{47,97)}。

5-3. 膜侵襲複合体と血栓

すでに述べたように、膜侵襲複合体 C5b-9 は細胞膜の外層に酸性リン脂質ホスファチジルセリンを露出させ、プロトロンビナーゼ複合体 (FXa-FVa 複合体)、内因系 Xase 複合体(FIXa-FVIIIa 複合体)、外因系 Xase 複合体(FVIIa-組織因子複合体)の形成のための場を提供する ³⁻⁵⁾。aHUS では、血管内皮細胞上で過剰な補体活性化反応が進み、C5b-9 が形成される。培養内皮細胞を用いた研究では、細胞溶解閾値以下の sublytic C5b-9 が内皮細胞に形成されると、

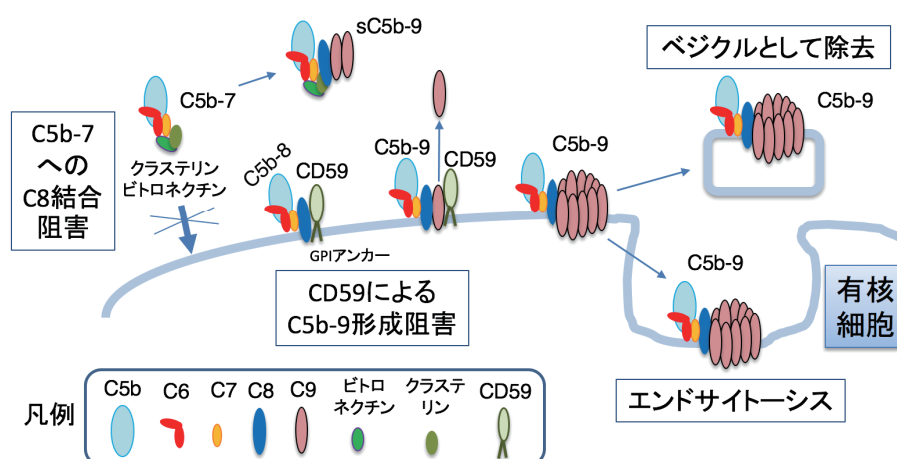


図 6 膜侵襲複合体に対する自己細胞の防御機構

C5b-7 の膜結合部位へのクラステリンとビトロネクチンの結合による soluble C5b-9 (sC5b-9) の形成阻害、CD59 の C5b-8 への結合による C9 結合の阻害、C5b-9 のベジクル (小胞) として細胞表面からの除去、endocytosis による除去がある。

細胞内へ Ca^{2+} の流入が起こり Weibel-Palade 小体から exocytosis による超高分子量 VWF マルチマーの分泌と細胞上への係留、および P セレクチンの提示が起こる¹⁰²⁾。また、C5b-9 の形成は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¹⁰³⁾。血小板に sublytic C5b-9 が形成されると、プロトロンビナーゼ複合体の形成と顆粒内容物の放出⁵⁾やベジクルとしての C5b-9 の放出¹⁰⁴⁾が認められている。血小板の活性化の際に濃染顆粒から放出されるポリリン酸は膜侵襲複合体の形成を妨害する¹⁰⁵⁾。

6. 非典型溶血性尿毒症症候群(atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS)

6-1. aHUS

補体関連 TMA として、先天的な補体制御因子の機能喪失型遺伝子バリエーション、補体因子の機能獲得型遺伝子バリエーション、もしくは後天的な抗 FH 抗体などにより補体第二経路が血管内皮細胞上で過剰に活性化されると、内皮細胞傷害による aHUS の発症に繋がる^{10,11,106-111)} (表 1)。aHUS の原因遺伝子として知られる FH、FI、MCP、トロンボモジュリンには機能喪失型バリエーションがみられ、C3 と FB に見られる遺伝子バリエーションは、補因子と結合できないために分解されにくい機能獲得型バリエーションと考えられる。aHUS 患者の遺伝子解析により、補体制御因子および補体因子に多くの遺伝子バリエーションが蓄積されている。トロンボモジュリンは FH の存在下で、FI による C3b の分解を促進するので、トロンボモジュリンのミスセンス変異が aHUS の素因になると報告されたが⁶⁰⁾、最近の報告では aHUS 患者にトロンボモジュリンの機能喪失型バリエーションは同定されていない^{112,113)}。

6-2. aHUS での腎障害

補体第二経路の過剰な活性化で発症する aHUS では、血栓による腎障害が広く見られる^{10,109)}。この

理由ははっきりとわかっているわけではないが、腎臓の解剖学的な構造や機能的な特徴によると考えられている¹¹⁴⁾。血管内皮細胞は、グリコサミノグリカンを持つプロテオグリカン、糖タンパク質、糖脂質によって陰性に荷電したゲル状の glycocalyx と呼ばれる層によって覆われている。glycocalyx の主要な構成成分であるグリコサミノグリカンの 90% はヘパラン硫酸とヒアルロン酸で、特定のコアタンパク質に結合している^{115,116)}。glycocalyx の構造は組織によって異なっており、大量の水を濾過するために 60-80 nm の大きな有窓が存在する腎糸球体の毛細血管では、タンパク質の漏出を防ぐために glycocalyx が重要な役割を果たしている。また、その内皮の大きな有窓のため、内皮下層の糸球体基底膜などの細胞外マトリクスは血液中のタンパク質に常に晒されている。腎糸球体の微小血管内皮細胞は臍帯静脈や脳の微小血管内皮細胞に比べ、MCP, トロンボモジュリン, DAF, CD59 といった補体制御因子の発現量が低い^{117,118)}。これらの理由によって、腎糸球体内皮細胞上や膜結合型補体制御因子が少ない基底膜での補体の活性化の制御は、主に glycocalyx に結合可能な FH が担っている。また、通常においても、尿路からの異物の侵入や免疫複合体、免疫メディエータなどに常に晒されており、局所での補体因子の産生も高く、補体が活性化しやすい状態になっており、C3a と C5a の産生量が高いと報告されている^{117,118)}。腎糸球体の毛細血管では、内皮下層のコラーゲンや VWF を起点として血栓が起こりやすい状態にある。これらに加えて補体の制御が正常に働かず内皮細胞傷害が生じると、腎糸球体では血栓が形成されやすいと考えられる¹⁰⁾。

7. 血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy, TMA) の血栓

臨床的に TMA に分類される TTP と腸管出血性大腸菌による溶血性尿毒症症候群 (Shiga toxin-producing *E. coli*-hemolytic uremic syndrome,

STEC-HUS)では、その血栓像は異なると報告されている⁴⁰⁾。TTPの微小血栓は血小板とVWFからなり、フィブリンはほとんど見られない¹¹⁹⁾。TTPの血小板血栓は血小板のGPIbとVWFの相互作用がメインであるため(図3)、血小板は活性化されず、凝固反応はおこらないためフィブリンは形成されない。ヒヒにADAMTS13抗体を静注しTTPを発症させたモデルでは、腎臓、心臓、脳、脾臓に血小板とVWFが染色される血栓が観察され、肺では血栓を観察しなかった¹²⁰⁾。この臓器特異性はヒトTTPとよく一致した。

一方、STEC-HUSの患者では、糸球体の血栓はフィブリンに富みVWFに乏しいという染色像が得られている^{121,122)}。これらの結果より、TTPは血小板とVWFに富む血栓であり、HUSはフィブリンに富み血小板に乏しい血栓を生じ、TTPとHUSの血栓は異なる機序で発症することを示唆している⁴⁰⁾。

aHUSの診断のために行った皮膚バイオプシーの所見では、局所の内皮剥離とそれに伴いフィブリンが混在する小さい血小板血栓が観察されている¹²³⁾。

ヒトaHUS患者に同定されたFH p.Trp1206Arg変異をもち脳梗塞や虚血性網膜症を示す遺伝子改変マウスでは、腎臓にフィブリン沈着を認める血栓が観察されている¹²⁴⁾。aHUSでは、補体による溶血や内皮細胞傷害に比べ、血小板の活性化はそれほど注目

されていない。しかし、aHUSでも他のTMAと同様に血小板数の減少が観察される。血小板は膜侵襲複合体やC5aにより活性化され微小血管の血栓の形成に関与する¹¹⁾。補体で傷害された内皮細胞は剥がれて細胞外マトリクスが露出し血栓形成に関わるとの記述もある¹⁰⁾。

急性期のTMA患者の血漿では、TTPでもHUSでも同様にDNA-ヒストン複合体であるヌクレオソームやmyeloperoxidaseが増加し、共通

して好中球の関与が示唆される¹²⁵⁾。

8. 動物モデルを用いた補体因子の血栓止血との関わり

8-1. 補体因子の血栓への関わり (マウスモデル)

C3欠損マウスでは、出血時間の延長と、PAR4アゴニストによる血小板凝集の低下が報告されている¹²⁶⁾。最近、C3欠損マウスとC5欠損マウスの血栓形成能の詳細な解析が報告された¹²⁷⁾(表3)。それによると、C3欠損マウスは、出血時間が延長し、血流を一時的に低下させる前述の下大静脈狭窄モデルでは、血栓の大きさと長さが減少した。生体内顕微鏡観察によるC3欠損マウスでは血栓への白血球の粘着に変化を示さなかったが、血小板の粘着は狭窄2時間後から低下し、フィブリン沈着が減少した。すなわち、血流低下による静脈血栓への血小板の沈着は補体活性を必要とすることを示していた。そこで、*in vitro*での血小板活性化による凝固能の変化を調べたところ、C3欠損マウスはわずかに活性化血小板による凝固能の低下が観察された。

C3欠損マウスの下大静脈狭窄モデルでのフィブリン沈着は、白血球に発現した組織因子依存性であった。この組織因子の活性はprotein disulfide isomerase (PDI)の合成阻害剤で大きく抑制された。これまでの研究は、組織因子活性の発現にはPDIに

表3. C3欠損マウスとC5欠損マウスの血栓形成能¹²⁷⁾

	C3欠損マウス	C5欠損マウス
出血時間	延長	延長
下大静脈狭窄モデル		
血栓重量と長さ*	低下	低下
血栓に粘着した白血球数	正常	正常
血栓に粘着した血小板数	低下	正常
フィブリン沈着	低下	低下
<i>in vitro</i> での血小板の活性化による凝固能**	わずかに低下	正常

*狭窄48時間後の血栓、**コラーゲン受容体GPVIアゴニストであるconvulxinで血小板を活性化させ、VWF結合能、Pセレクトインの発現量、ホスファチジルセリン露出量を指標として凝固能を評価

表4. 組織因子の活性に必要とされる因子

活性に必要とされる因子	機序	文献
細胞膜外層のホスファチジルセリン	ホスファチジルセリンを含む膜上にFVIIaとFXが結合し、外因系Xase複合体（FVIIa-組織因子複合体）によるFXの活性化が促進される。	24, 37, 128
組織因子のCys186-Cys209間のジスルフィド結合の形成	Cys186とCys209の還元型組織因子はFVIIaの結合能が低い。protein disulfide isomerase (PDI)によりジスルフィド結合が形成されると活性が高くなる	37, 128, 176
好中球エラスターゼによるTFPIの分解	好中球からNETs形成時に放出される好中球エラスターゼはTFPIを分解してFVIIa阻害活性を消失させる。TFPIの分解によりFVIIa-組織因子複合体は活性阻害を免れる。	177

よる組織因子の Cys186-Cys209 間のジスルフィド結合の形成がきわめて重要であることを示しており^{37,128)} (表4)、今回の結果はこれを支持した。下大静脈狭窄モデルでのフィブリン沈着は、NETs 形成に必須である peptidyl arginine deiminase 4 を欠損したマウスでは低下しなかったため、この血栓は組織因子依存性であるものの NETs を必要としなかった¹²⁷⁾。

C5 欠損マウスは出血時間の延長や狭窄モデルでの血栓量の低下を示した¹²⁷⁾ (表3)。しかし、*in vitro*での血小板活性化による凝固能は正常で、血栓への血小板粘着も正常であった。C5 欠損マウスはアナフィラトキシン C5a を産生しないにもかかわらず、白血球の粘着も正常であった。しかし、注目したい点は狭窄モデルでは接着白血球上のホスファチジルセリンの露出が減少したことである。これによりフィブリンの沈着と凝血塊形成が低下したと考えられた。これらの結果は、C3 は血小板の活性化と組織因子の活性化に必須であり、C3 もしくは C3 分解物が何らかの機序で血小板を活性化することを示している。その際、C3 より下流の補体タンパク質の活性化を必要としない。また、C5 は白血球膜上のホスファチジルセリンの露出に関わり、これがフィブリン形成に繋がることを示した。ホスファチジルセリンは組織因子の単球上での迅速な活性化とフィブリン形成に必須である。

血栓の分野では、抗リン脂質抗体の中でも、 $\beta 2$

glycoprotein I のようなタンパク質コファクターに依存しない抗リン脂質抗体が、患者試料からクローン化され、その血栓促進機序がマウスを用いて報告されている。そのような抗リン脂質抗体が単球で組織因子を活性化するには、C3 と PDI が必要とされ、C5 は必要ではないと報告されている¹²⁹⁾。

DAMPs として知られるヒストンは血管内皮細胞に対して傷害性を示し、ヒストンの静注によりマウスは死亡する¹³⁰⁾。活性化プロテイン C はヒストン H3 と H4 を分解し細胞傷害性を低下させマウスの死亡率も低下する。ヒストンは Toll-like receptors (TLRs) を介して自然免疫系を活性化し、血小板では TLR2 と TLR4 を介して凝固促進作用を示す¹³¹⁾。C5 欠損マウスと野生型マウスに致死量のヒストンを静注すると、C5 欠損マウスでは生存率が高く、血小板減少・消費性凝血異常・塞栓による肝障害・血小板-白血球凝集塊が軽減することから、C5 が C5a を介してヒストンによる細胞傷害を増悪することが明らかになっている¹³²⁾。

8-2. 補体因子の脳虚血再灌流障害への関わり (マウスモデル)

8-2-1. 齧歯類の脳虚血再灌流モデルの手法

マウスの脳虚血再灌流実験には中大脳動脈閉塞 (middle cerebral arterial occlusion, MCAO) モデルが広く用いられている。中大脳動脈閉塞モデルは、頸動脈より末梢にある頭部血管内にナイロン糸を塞

栓子として挿入し左中脳動脈を閉塞し、30分から90分後に糸を引き抜くことで局所の虚血-再灌流を行う¹³³⁻¹³⁵⁾。一方、動脈内へは糸を挿入しない三血管閉塞法も開発されている。三血管閉塞法では、まずマウスの両側の総頸動脈をクリップで一過性に閉塞し、次いで左中脳動脈(middle cerebral artery, MCA)を焼灼して永久閉塞し、それらの連携操作によって前値30%以下(ペナンプラ域へ)の局所脳虚血を誘導する。一定の時間(15分から30分)後にクリップを外すことで局所虚血を終了させる。同虚血手技を終えてもなお、中脳動脈は閉塞したままであるが、脳皮質の豊富な側副血行(collateral blood flow: 吻合動脈が成す“脳血管予備能: vascular reserve”)により、局所脳血流は速やかに前値まで回復する。本法の特徴は再現性よく梗塞巣が新皮質に限定して生じること、生きる上での恒常性維持を担う領域を含む「基底核」に脳梗塞を生じさせないため、致死的な脳虚血とならず(急性期死亡を避けることが可能)、また、血管内に糸を長時間にわたり挿入しないので、虚血時に凝固系が活性化し、それによる2次的な血栓、塞栓(虚血病態の制御不能な増悪)を生じさせるリスクを無視できる点にある^{136,137)}。

8-2-2. 自然 IgM 抗体によって惹起される虚血再灌流後の補体活性化と炎症

虚血後の再灌流で補体が活性化し炎症反応が起こり、これらが再灌流障害を惹起することが知られている。これまで主にマウスとラットを用いて脳虚血再灌流実験が行われ、補体の役割が検討されてきた¹³⁸⁾。

虚血後の再灌流の際に補体が活性化され細胞傷害を惹起するメカニズムが明らかになりつつあり、この細胞傷害を抑制する試みが精力的に研究されている(図7)。虚血再灌流障害の際、細胞内タンパク質が細胞外に放出・露出される。これらのうち、ヒストンやHMGB1はDAMPsとして知られている。放

出された細胞内タンパク質の一部は細胞表面に留まり、虚血再灌流障害に伴うネオエピトープとして自然IgM抗体に認識される^{138,139)}。これまでに non-muscle myosin H chain type II (NMHC-II)とアネキシンIVが虚血再灌流後にネオエピトープを提示する抗原として報告されている^{140,141)}。虚血再灌流の臓器に沈着したIgM抗体は下記に述べるように補体のレクチン経路を活性化する^{142,143)}。

研究当初、IgM抗体は補体古典経路を活性化すると考えられたが¹³⁹⁾、C1q欠損マウスは野生型マウスと同様の虚血再灌流障害を示したので、古典経路は関わらないと考えられている^{142,144)}。一方、MBL欠損マウスは虚血再灌流障害が弱いので、レクチン経路がIgMにより活性化されることの重要性が示された¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾。FB欠損マウスは症状の改善を示したので、レクチン経路だけでなく第二経路も虚血再灌流障害に働くことが判明した¹⁴⁵⁾。C6欠損マウスは障害を示さないという報告と野生型マウスと同様の障害を示すという報告がある^{145,146)}。しかし、虚血

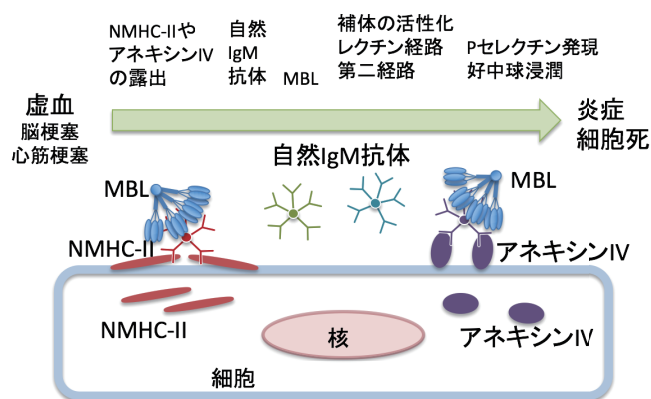


図7 虚血再灌流後にみられる自然IgM抗体によって惹起される補体の活性化と炎症

虚血再灌流障害により細胞内タンパク質が放出・露出され、一部は細胞上に留まりネオエピトープとして自然IgM抗体に認識され、補体第二経路を通して補体の活性化が起こり細胞が障害される。障害を受ける細胞は血管内皮細胞だと考えられるが、肝の虚血再灌流では実質細胞であるとの報告がある¹⁴⁶⁾。NMHC-II: non-muscle myosin H chain type II, MBL: マンノース結合レクチン (mannose-binding lectin)

再灌流した組織抽出物を自然 IgM 抗体で免疫沈降すると、MBLに加えて C1q も検出できたが、FB は検出できなかった¹⁴⁷⁾。これらのことより、虚血再灌流後の補体の活性化経路は対象にする臓器や虚血再灌流の方法により異なる可能性がある指摘されている¹⁴⁸⁾。

虚血再灌流障害によりネオエピトープが形成され、これに IgM 抗体が結合して組織の障害が惹起される機序は、この経路の阻害の重要性を示唆している。

すなわち、この経路を阻害することは脳梗塞や心筋梗塞だけでなく移植臓器の保護にも繋がる可能性があり、たいへん重要な意義がある。モデル動物を用いた幾つかの研究が発表されている。

8-2-3. 補体関連因子による虚血再灌流障害の保護効果

sCR1、sCR1-sLe^x、CR2-Crry、C1-INH の脳虚血再灌流障害の保護効果を表 5 に示した¹³⁸⁾。sCR1 は

表 5. 補体関連タンパク質による脳虚血再灌流傷害の保護効果

動物種	実験モデル	動物の処置	知見	文献
マウス	transient-MCAO (閉塞時間45分)	WT+sCR1、 WT+sCR1-sLe ^x (block selectin)	1) sCR1は虚血直前に投与したところ24時間後の急性傷害を減弱した。2) sCR1-sLe ^x は用量依存的に梗塞巣を顕著に減少させ、sCR1より神経学的症状を改善した。3) 虚血は白血球の遊走を3倍上昇し、これはsCR1-sLe ^x で阻害されたが、sCR1では阻害されなかった。	149
ヒヒ	transient-MCAO (閉塞時間75分)	WT+sCR1	sCR1は血清の補体価を低下させ、sCR1の虚血部位への沈着が観察されたが、梗塞巣と神経症状を改善しなかった。	150
ヒヒ	cerebral artery clips (閉塞時間75分)	WT+sCR1-sLe ^x (block selectin)	1) sCR1-sLe ^x はCH50を有意に低下させたが神経学的症状に有意な影響はなかった。2) sCR1-sLe ^x で処置したヒヒはコントロールに比べて大きい梗塞巣を示した。	151
ラット	transient-MCAO (閉塞時間120分)	WT+sCR1のSCR15-18	sCR1のSCR15-18の前処置により、再灌流後24時間の梗塞巣と神経学的症状が有意に減少した。	152
マウス	transient-MCAO (閉塞時間60分)	WT+CR2-Crry、 C3-/-	C3-/-マウスと再灌流30分後のCR2-Crry投与マウスは再灌流24時間後の生存が改善し、梗塞巣とPセレクトリンが減弱し、神経症状の改善が見られた。	153
マウス	transient-MCAO (閉塞時間120分)	WT+C1インヒビター	虚血開始5分後にC1インヒビターを投与した。48時間後、神経学的症状と虚血領域は減少を示した。	154
マウス	transient-MCAO (閉塞時間30分)	WT+C1インヒビター、 C1q-/-	1) 再灌流前に投与したC1インヒビターは用量依存性に梗塞巣を減少した。2) C1インヒビター投与4日後の神経学的症状に改善を認め、神経細胞のアポトーシスと白血球の浸潤の低下を認めた。3) C1q-/-マウスは梗塞巣の減少を認めたが有意ではなかった。	155
マウス	transient-MCAO (閉塞時間30分) および permanent MCAO	WT+組換えC1インヒビター、 WT+血漿由来 C1インヒビター	1) 組換えC1インヒビターは血漿由来C1インヒビターよりMBLに強く結合し、効果的にレクチン経路を阻害した。2) 組換えC1インヒビターは一時的な虚血の場合、18時間以内に、永久閉塞では6時間以内に投与すると梗塞巣が減少した。	156

文献138のTable 2をもとに作成した。MCAO: 中大脳動脈閉塞、sCR1: 可溶性CR1、sCR1-sLe^x: sialyl Lewis^x糖鎖結合可溶性CR1、CR2-Crry: CR2-complement receptor 2-related gene/protein Y (Crry)融合タンパク質

補体制御因子 CR1 の可溶性細胞外領域、sCR1-sLex は接着因子セレクトリンに結合する能力をもつ糖鎖 sialyl Lewis^x 構造を持つ sCR1、CR2-Crry は CR2 の C3 分解産物を認識する細胞外領域と Crry の C3 活性化制御能を持つ細胞外領域との融合タンパク質である¹⁴⁹⁻¹⁵³。

C1-INH には虚血再灌流障害の保護効果が認められている (表 5)¹⁵⁴⁻¹⁵⁶。C1-INH は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、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、tPA に阻害能を有するプロテアーゼインヒビターである²²。C1-INH はプロテアーゼインヒビターとしての機能を失った分子も C1-INH の細胞保護効果を示すことから、インヒビター活性が重要ということではなく、N 末端領域に集中して結合している糖鎖のなかにセレクトリンに結合能を有する sialyl Lewis^x 糖鎖があり、これが白血球の浸潤を抑制し虚血再灌流に保護的に働くのではないかと議論されている¹⁵⁷。

心臓に関する研究も報告されている。マウスの心移植モデルでは、1 本鎖抗アネキシン IV 抗体(scFv) および scFv-Crry キメラタンパク質を用いると、移植片への IgM の結合および補体活性化が阻害され移植片の炎症が減少した。また、scFv-Crry 投与は感染免疫に影響しなかった¹⁵⁸。non-muscle myosin H chain 抗体を用いて自然 IgM 抗体の作用を抑制するとブタ心筋梗塞モデルで梗塞巣が減少し心機能が保存された¹⁵⁹。

8-2-4. レクチン経路と血栓

マウスモデルを用いて脳梗塞や心筋梗塞への補体レクチン経路の関与が報告され^{160,161}、MBL の脳梗塞での重要性が報告されている¹⁶²。MBL 欠損マウスは中大脳動脈閉塞による梗塞巣が減少し、野生型マウスへの MBL のマンノース認識ドメインに結合する Polyman2 という合成 MBL リガンドの投与も

梗塞巣の形成を抑制した。また、野生型ラットへの MBL 抗体は三血管閉塞法で評価され、抗体投与ラットは梗塞巣を減少した。これらの結果から、MBL は脳虚血障害に重要な役割を果たしており、MBL の阻害は広い治療域をもつ治療標的になる可能性が示された。ヒト脳梗塞患者では、脳梗塞の発症と重症度、予後不良は血清 MBL 濃度の高値と常に関連を示している^{163,164}。

MASP-1/3 欠損マウスの血栓傾向が調べられている¹⁶⁵。野生型マウスと C2/FB 欠損マウスでは 10 分以内に閉塞性血栓ができる条件下の FeCl₃-総頸動脈血栓モデルでは、MBL 欠損マウスや MASP-1/3 欠損マウスでは血管閉塞が抑制された。すなわち、MBL/MASP 複合体が血栓形成に重要な役割を果たしていることが示された。マウスの血栓モデルに、FeCl₃ 血管障害モデルが広く使われている。最近の本モデルの詳細な検討では、i) FeCl₃ は血管内皮下層を露出するのではなく、ii) FeCl₃ 処理内皮細胞表面に最初に粘着する細胞は赤血球であり、iii) 鉄イオンは赤血球を壊し、iv) 壊れた赤血球が迅速に血小板をリクルートし、大きく融合する複合体になり内皮表面を覆う、といわれている¹⁶⁶。すなわち、これまで重要視されてこなかった赤血球が本モデルでは血栓形成に関与すると報告されている。

MASP-2 欠損マウスでは、欠損血漿はマンナンやザイモザンで C4 の活性化を示さず、レクチン経路の欠損を示した¹⁶⁷。心筋虚血再灌流モデルでは、MASP-2 欠損マウスは野生型マウスより梗塞巣の体積が小さく、心筋梗塞から保護されていた。しかし、MASP-2 の下流の C4 を欠損するマウスでは梗塞が小さくならなかった。このことは、レクチン経路依存性であるが C4 を経由しないこれまで知られていない経路が存在することを示唆した。レクチン経路を介した C4 非存在下での C3 活性化は *in vitro* で示され、この未知の経路には MASP-2, C2, MASP-1/3 が必要とされた。MASP-2 欠損は胃腸虚血再灌流モデルで保護的に働き、MASP-2 活性阻害抗体も

同様に保護的に働いた。このように、MASP-2 の障害が虚血再灌流モデルで保護の効果を示したことは、再灌流障害やレクチン経路が介在する他の疾患で抗 MASP-2 抗体の治療の有効性を示唆している¹⁶⁷⁾。

塞栓子を用いる一過性中大脳動脈閉塞法および三血管閉塞法を用いてレクチン経路に関わる MASPs の脳虚血再灌流での機能を評価すると、MASP-2 欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に神経学的欠陥と梗塞巣体積が減少した。抗 MASP-2 抗体で前処理したマウスでも神経学的欠陥と梗塞巣体積が減少した¹⁶⁸⁾。しかし、MASP-1/-3 欠損マウス、C4 欠損マウス、CFB 欠損マウスでは一過性中大脳動脈閉塞法での神経学的障害は野生型マウスと変化がなかった。MASP-1/-3 欠損マウスではわずかながら梗塞巣体積が拡大した。他のマウスでは梗塞巣体積が減少した。MASP-2 欠損マウスでは MASP-1/-3 欠損マウスに比べて C3 の沈着が低減し、虚血脳組織では炎症性マイクログリア・マクロファージが減少した。このように、MASP-2 欠損マウスは保護的な表現型を示した。

レクチン経路を構成する因子の遺伝子多型・血清濃度・疾患リスクの関連、虚血性脳卒中・心筋梗塞との関連解析、他の血栓状態との関連に関して、ごく最近文献調査 (systematic review) の結果が報告された¹⁶⁴⁾。それによると、レクチン経路の因子はヒト血栓状態に明らかな関連を示さなかった。最近の血栓形成の考え方は、thrombo-inflammation と表されるように、炎症の過程で細胞から放出される様々な物質が凝固系に作用して血栓形成を促すとされている。その際、MBL などのパターン認識受容体が結合する糖鎖構造をもつ物質も露出・放出されると考えられる。これらは急性期の反応であるため、単に急性相の反応を観察しているだけかもしれない。また、MASP-2 はトロンビン様活性を示すが⁵²⁾、その能力はトロンビンよりはるかに低い。

8-2-5. tPA と補体系

tPA による脳梗塞治療の問題点として、tPA 投与が脳浮腫や脳出血を悪化させることが挙げられる。現在、tPA の投与は脳梗塞の発症 4.5 時間までしか認められていない。この時間的な制限のため、限られた脳梗塞患者だけに tPA が投与されているのが現状である。脳動脈の閉塞は血液脳関門を破壊し、一連の有害な反応により、神経、グリア細胞、血管に障害を引き起こす。tPA の有害作用機序の解明がマウスを用いて精力的に行われている。tPA はプラスミノゲンを活性化させることから、血液脳関門を破壊する機序として、プラスミン依存性とプラスミン非依存性が考えられている¹⁶⁹⁾。プラスミン依存性の 1 つの経路として、tPA による C3 の活性化を介した血液脳関門の透過性の亢進が報告されている¹⁷⁰⁾。tPA は脳虚血時にプラスミンを介して C3 の切断を促進すると報告された。すなわち、培養細胞モデルにおいて、虚血により C3a 受容体が血管内皮細胞に強く誘導され、C3a が内皮細胞の透過性を強く亢進した。マウス脳虚血モデルでは、tPA 投与は脳浮腫と脳出血を悪化したが、C3a 受容体の低分子アンタゴニストでこれらの悪化は観察されなくなった。tPA は虚血脳で補体カスケードを強く活性化するが、薬理的に補体系を阻害すると tPA による有害事象を低下する可能性が示された¹⁷⁰⁾。

8-3. 補体因子の血栓形成への関わり (ヒヒモデル)

腸管出血性大腸菌が分泌する志賀毒素は、STEC-HUS と急性腎障害を惹起し、感染した患者の中には感染中に補体活性化が見られることがある。そこで、ヒヒに志賀毒素を投与し補体活性化を調べる研究が報告された¹⁷¹⁾。志賀毒素を投与すると、血小板減少症、溶血性貧血、糸球体の血栓性微小血管障害を示す急性腎障害という典型的な溶血性尿毒症症候群を示したが、sC5b-9 の増加を認めなかった。一方、Dダイマーや細胞傷害マーカー (HMGB1、ヒストン) は上昇し、凝血異常や細胞傷害は確認された。これ

より、志賀毒素で誘発される HUS には補体の活性化は関与しないと報告されている。

細菌感染で見られる敗血症は、凝固と補体系が活性化され、補体系の強い活性化とそれに続くアナフィラトキシン C3a, C5a と膜侵襲複合体が産生され、これらにより臓器不全と死に繋がる。そこで、ヒヒを用いた 2 つの凝固異常モデル (FXa/リン脂質投与モデルおよび大腸菌投与モデル) で、凝固プロテアーゼが補体系を活性化するかについての検討が行われた¹⁷²⁾。FXa/リン脂質投与および大腸菌投与は、ともに急激なトロンビンとプラスミンの生成を示した。大腸菌の投与は 2 時間後を最大として補体系を活性化したが、FXa/リン脂質の投与は補体系を活性化しなかった。これらの結果より、ヒヒでは、生体内で生成したトロンビンとプラスミンは補体系を直接活性化しないことを示唆した。

C5 転換酵素を阻害する macrocyclic peptide inhibitor RA101295 の敗血症での効果が、全血を用いた *in vitro* での測定およびヒヒを用いた大腸菌投与敗血症モデルを用いて検討された¹⁷³⁾。RA101295 は *in vitro* および *in vivo* で C5a と sC5b-9 の産生を阻害し補体の活性化を強く阻害した。RA101295 は大腸菌で誘導される oxidative burst および白血球の活性化を減弱した。この際、ホストによる大腸菌の貪食には影響を与えなかった。RA101295 は消費性の凝血異常を改善し内皮細胞の抗凝固と血管バリアー機能を保存した。RA101295 は敗血症で誘導される炎症性サイトカインの急上昇と全身の循環系発熱性反応を減弱させた。これは全身のリボ多糖と C5a の低下を反映していると考えられた。このように、本薬剤の投与は有意な臓器保護と顕著な死亡率の低下に繋がった。これは敗血症の菌が残存する状態での C5 の切断を阻害することは、炎症や消費性凝血異常を阻害し、それに続く組織不全と死亡を予防することを示した。

9. おわりに

補体系と凝固系のクロストークに関しては膨大な研究成果が報告されている。最近では、血栓抑制を標的にした薬剤を想定した研究成果も発表されており、この分野から画期的な薬剤を創成する意欲を感じる。その反面、黄色ブドウ球菌を全血に加えると補体の活性化により C5a が生成し、C5aR1 依存性に単球に組織因子 mRNA が誘導され、組織因子活性が発現することにより凝固が生じるという研究が報告されている¹⁷⁴⁾。こういった研究が国際血栓止血学会の学会誌に掲載されるということは、凝固系と補体系はまだ多くの未解決で臨床にインパクトのある事柄が残されていることを示している。今後ますますの研究の展開に期待したい。

[謝辞]

本稿の執筆にあたり、多くの有益なご助言をいただきました福島県立医科大学医学部・関根英治教授、国立循環器病センター分子病態部・柳本広二博士、執筆の機会を与えていただきました名古屋大学大学院医学系研究科・水野正司編集委員長に感謝申し上げます。

[利益相反]

本研究に関わる著者の COI 開示を以下に行う。1. 宮田敏行 講演料 アレクシオンファーマ合同会社。2. 宮田敏行、ADAMTS13 活性測定、ペプチド研究所、Peptide International、カイノス、3. 井上徳光 委託研究費 日本補体学会としてアレクシオンファーマ合同会社及び CSL ベーリング株式会社。

[文献]

- 1) Muhlfielder TW, Niemetz J, Kreutzer D, Beebe D, Ward PA, Rosenfeld SI. C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity: a link between complement and coagulation. *J Clin*

- Invest.* 63: 147-150 (1979)
- 2) Saadi S, Holzknecht RA, Patte CP, Stern DM, Platt JL. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med.* 182: 1807-1814 (1995)
 - 3) Polley MJ, Nachman RL. Human complement in thrombin-mediated platelet function: uptake of the C5b-9 complex. *J Exp Med.* 150: 633-645 (1979)
 - 4) Wiedmer T, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. *Blood.* 68: 875-880 (1986)
 - 5) Wiedmer T, Esmon CT, Sims PJ. On the mechanism by which complement proteins C5b-9 increase platelet prothrombinase activity. *J Biol Chem.* 261: 14587-14592 (1986)
 - 6) Swystun LL, Liaw PC. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood.* 128: 753-762 (2016)
 - 7) Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 13: 34-45 (2013)
 - 8) Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.* 23: 279-287 (2017)
 - 9) Kremer Hovinga JA, Coppo P, Lammle B, Moake JL, Miyata T, Vanhoorelbeke K. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nat Rev Dis Primers.* 3: 17020 (2017)
 - 10) Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 361: 1676-1687 (2009)
 - 11) Jokiranta TS. HUS and atypical HUS. *Blood.* 129: 2847-2856 (2017)
 - 12) Conway EM. Reincarnation of ancient links between coagulation and complement. *J Thromb Haemost.* 13 Suppl 1: S121-132 (2015)
 - 13) Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol.* 6: 257 (2015)
 - 14) 田嶋優子, 木下タロウ. 凝固系と補体系反応. 新・血栓止血血管学、凝固と炎症、編著、一瀬白帝、丸山征郎、家子正裕、金芳堂. 142-148 (2015)
 - 15) Mathern DR, Heeger PS. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol.* 10: 1636-1650 (2015)
 - 16) Foley JH, Conway EM. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circ Res.* 118: 1392-1408 (2016)
 - 17) Roumenina LT, Rayes J, Frimat M, Fremeaux-Bacchi V. Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators. *Immunol Rev.* 274: 307-329 (2016)
 - 18) Pfeiler S, Stark K, Massberg S, Engelmann B. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica.* 102: 206-213 (2017)
 - 19) Keragala CB, Draxler DF, McQuilten ZK, Medcalf RL. Haemostasis and innate immunity - a complementary relationship: A review of the intricate relationship between coagulation and complement pathways. *Br J Haematol.* 180: 782-798 (2018)
 - 20) Kemper C, Pangburn MK, Fishelson Z. Complement nomenclature 2014. *Mol Immunol.* 61: 56-58 (2014)
 - 21) 宮田敏行, 樋口 (江浦) 由佳, 杉本充彦. 血栓形成機序の新概念と次世代型抗血栓療法. 生化学. 89: 1-10 (2017)

- 22) 宮田敏行, 内田裕美子, 武田壮一. 内因系凝固反応活性化機序と遺伝性血管性浮腫. 補体. 54: 4-22 (2017)
- 23) Kario K, Miyata T, Sakata T, Matsuo T, Kato H. Fluorogenic assay of activated factor VII. Plasma factor VIIa levels in relation to arterial cardiovascular diseases in Japanese. *Arterioscler Thromb*. 14: 265-274 (1994)
- 24) Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 359: 938-949 (2008)
- 25) 鈴木淳. 細胞膜リン脂質のスクランブル機構. 生化学. 87: 422-427 (2015)
- 26) Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ*. 23: 952-961 (2016)
- 27) Brass LF, Diamond SL, Stalker TJ. Platelets and hemostasis: a new perspective on an old subject. *Blood Adv*. 1: 5-9 (2016)
- 28) Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 368: 2004-2013 (2013)
- 29) Crea F, Libby P. Acute Coronary Syndromes: The Way Forward From Mechanisms to Precision Treatment. *Circulation*. 136: 1155-1166 (2017)
- 30) Aird WC. Vascular bed-specific thrombosis. *J Thromb Haemost*. 5 Suppl 1: 283-291 (2007)
- 31) von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Kollnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 209: 819-835 (2012)
- 32) Denis CV, Wagner DD. Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27: 728-739 (2007)
- 33) Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*. 197: 1585-1598 (2003)
- 34) Stark K, Philipp V, Stockhausen S, Busse J, Antonelli A, Miller M, Schubert I, Hoseinpour P, Chandraratne S, von Bruhl ML, Gaertner F, Lorenz M, Agresti A, Coletti R, Antoine DJ, Heermann R, Jung K, Reese S, Laitinen I, Schwaiger M, Walch A, Sperandio M, Nawroth PP, Reinhardt C, Jackel S, Bianchi ME, Massberg S. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood*. 128: 2435-2449 (2016)
- 35) Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*. 117: 5033-5043 (2011)
- 36) Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, Johnson RC, Hynes RO, Heath M, Lawson CA, Stern DM. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest*. 97: 493-500 (1996)
- 37) Langer F, Ruf W. Synergies of

- phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. *Thromb Haemost.* 111: 590-597 (2014)
- 38) Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Tsironidou V, Giatromanolaki A, Skendros P, Konstantinides S, Ritis K. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 36: 1405-1414 (2015)
- 39) Laridan E, Denorme F, Desender L, Francois O, Andersson T, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, De Meyer SF. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann Neurol.* 82: 223-232 (2017)
- 40) Sadler JE. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 130: 1181-1188 (2017)
- 41) 厚生労働科学研究費補助金, 難治性疾患等政策研究事業, 「血液凝固異常症に関する調査研究班」 TTP グループ, 松本雅則, 藤村吉博, 和田英夫, 小亀浩市, 宮川義隆, 上田恭典, 日笠聡, 森木隆典, 八木秀男, 宮田敏行, 村田満. 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)診療ガイド 2017. 臨床血液. 58: 113-119 (2017)
- 42) Chen J, Chung DW. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood.* 132: 141-147 (2018)
- 43) Padilla A, Moake JL, Bernardo A, Ball C, Wang Y, Arya M, Nolasco L, Turner N, Berndt MC, Anvari B, Lopez JA, Dong JF. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood.* 103: 2150-2156 (2004)
- 44) Huang J, Roth R, Heuser JE, Sadler JE. Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress. *Blood.* 113: 1589-1597 (2009)
- 45) Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 11: 785-797 (2010)
- 46) 藤田禎三. 7. 補体活性化と制御、2-1. 補体活性化反応. 補体への招待、編集 大井洋之、木下タロウ、松下操、メジカルビュー社. 16-25 (2011)
- 47) Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 6: 262 (2015)
- 48) Liszewski MK, Java A, Schramm EC, Atkinson JP. Complement Dysregulation and Disease: Insights from Contemporary Genetics. *Annu Rev Pathol.* 12: 25-52 (2017)
- 49) 遠藤雄一. 補体レクチン経路と凝固系の協調作用 補体系研究の新展開. 日本血栓止血学会誌. 22: 164-170 (2011)
- 50) Hansen SW, Ohtani K, Roy N, Wakamiya N. The collectins CL-L1, CL-K1 and CL-P1, and their roles in complement and innate immunity. *Immunobiology.* 221: 1058-1067 (2016)
- 51) Takahashi M, Iwaki D, Endo Y, Fujita T. The study of MASPs knockout mice. *Binding Protein Kotb Abdelmohsen, IntechOpen.* Chapter 7: 165-180 (2012)
- 52) Dobo J, Schroeder V, Jenny L, Cervenak L, Zavodszky P, Gal P. Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. *Mol Immunol.* 61: 69-78 (2014)

- 53) Kozarcanin H, Lood C, Munthe-Fog L, Sandholm K, Hamad OA, Bengtsson AA, Skjoedt MO, Huber-Lang M, Garred P, Ekdahl KN, Nilsson B. The lectin complement pathway serine proteases (MASPs) represent a possible crossroad between the coagulation and complement systems in thromboinflammation. *J Thromb Haemost.* 14: 531-545 (2016)
- 54) Takahashi M, Ishida Y, Iwaki D, Kanno K, Suzuki T, Endo Y, Homma Y, Fujita T. Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J Exp Med.* 207: 29-37 (2010)
- 55) 林学, 石田由美, 町田豪, 尾形裕介, 大森智子, 高住美香, 遠藤雄一, 関亦正幸, 伊川正人, 大平弘正, 藤田禎三, 関根英治. MASP-1、MASP-3 はレクチン経路、第二経路の活性化に独立して寄与する. 補体. 55: 52-53 (2018)
- 56) Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol.* 152: 429-448 (2007)
- 57) Klos A, Wende E, Wareham KJ, Monk PN. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. *Pharmacol Rev.* 65: 500-543 (2013)
- 58) Ferluga J, Kouser L, Murugaiah V, Sim RB, Kishore U. Potential influences of complement factor H in autoimmune inflammatory and thrombotic disorders. *Mol Immunol.* 84: 84-106 (2017)
- 59) Jozsi M. Factor H Family Proteins in Complement Evasion of Microorganisms. *Front Immunol.* 8: 571 (2017)
- 60) Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del-Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zoja C, Remuzzi G, Conway EM. Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 361: 345-357 (2009)
- 61) Feng S, Liang X, Kroll MH, Chung DW, Afshar-Kharghan V. von Willebrand factor is a cofactor in complement regulation. *Blood.* 125: 1034-1037 (2015)
- 62) Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, Bennett KL, Scholl HP, Charbel Issa P, Cano M, Brandstatter H, Tsimikas S, Skerka C, Superti-Furga G, Handa JT, Zipfel PF, Witztum JL, Binder CJ. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature.* 478: 76-81 (2011)
- 63) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 308: 385-389 (2005)
- 64) Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Nouredine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 308: 419-421 (2005)
- 65) Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 308: 421-424 (2005)

- 66) <http://exac.broadinstitute.org/variant/1-196659237-C-T>.
- 67) Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saitsu H, Doi K, Shimizu M, Nakabayashi K, Aoki Y, Tsurusaki Y, Morishita S, Kawaguchi T, Migita O, Nakayama K, Nakashima M, Mitsui J, Narahara M, Hayashi K, Funayama R, Yamaguchi D, Ishiura H, Ko WY, Hata K, Nagashima T, Yamada R, Matsubara Y, Umezawa A, Tsuji S, Matsumoto N, Matsuda F. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet.* 61: 547-553 (2016)
- 68) Calippe B, Augustin S, Beguier F, Charles-Messance H, Poupel L, Conart JB, Hu SJ, Lavalette S, Fauvet A, Rayes J, Levy O, Raoul W, Fitting C, Deneffe T, Pickering MC, Harris C, Jorieux S, Sullivan PM, Sahel JA, Karoyan P, Sapieha P, Guillonneau X, Gautier EL, Sennlaub F. Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity.* 46: 261-272 (2017)
- 69) Rayes J, Roumenina LT, Dimitrov JD, Repesse Y, Ing M, Christophe O, Jokiranta TS, Halbwachs-Mecarelli L, Borel-Derlon A, Kaveri SV, Fremeaux-Bacchi V, Lacroix-Desmazes S. The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood.* 123: 121-125 (2014)
- 70) Nolasco L, Nolasco J, Feng S, Afshar-Kharghan V, Moake J. Human complement factor H is a reductase for large soluble von Willebrand factor multimers--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33: 2524-2528 (2013)
- 71) Barnum SR. C4a: An Anaphylatoxin in Name Only. *J Innate Immun.* 7: 333-339 (2015)
- 72) Robertson N, Rappas M, Dore AS, Brown J, Bottegoni G, Koglin M, Cansfield J, Jazayeri A, Cooke RM, Marshall FH. Structure of the complement C5a receptor bound to the extrahelical antagonist NDT9513727. *Nature.* 553: 111-114 (2018)
- 73) Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glovsky MM, Eddy SM, Ward PA. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest.* 94: 1147-1155 (1994)
- 74) Redecha P, Franzke CW, Ruf W, Mackman N, Girardi G. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 118: 3453-3461 (2008)
- 75) Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, Rafail SS, Theodorou V, Konstantonis D, Kourtzelis I, Doumas MN, Magotti P, Deangelis RA, Lambris JD, Ritis KD. C5a and TNF-alpha up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Immunol.* 180: 7368-7375 (2008)
- 76) Kourtzelis I, Markiewski MM, Doumas M, Rafail S, Kambas K, Mitroulis I, Panagoutsos S, Passadakis P, Vargemezis V, Magotti P, Qu H, Mollnes TE, Ritis K, Lambris JD. Complement anaphylatoxin C5a contributes to hemodialysis-associated thrombosis. *Blood.* 116: 631-639 (2010)
- 77) Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris

- JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 12: 682-687 (2006)
- 78) Krisinger MJ, Goebeler V, Lu Z, Meixner SC, Myles T, Pryzdial EL, Conway EM. Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. *Blood.* 120: 1717-1725 (2012)
- 79) Leung LLK, Morser J. Carboxypeptidase B2 and carboxypeptidase N in the crosstalk between coagulation, thrombosis, inflammation, and innate immunity. *J Thromb Haemost.* (2018)
- 80) Foley JH, Kim PY, Hendriks D, Morser J, Gils A, Mutch NJ, Subcommittee on Fibrinolysis. Evaluation of and recommendation for the nomenclature of the CPB2 gene product (also known as TAFI and proCPU): communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 13: 2277-2278 (2015)
- 81) Esmon CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost.* 32 Suppl 1: 49-60 (2006)
- 82) Morser J, Shao Z, Nishimura T, Zhou Q, Zhao L, Higgins J, Leung LLK. Carboxypeptidase B2 and N play different roles in regulation of activated complements C3a and C5a in mice. *J Thromb Haemost.* 16: 991-1002 (2018)
- 83) Mueller-Ortiz SL, Wang D, Morales JE, Li L, Chang JY, Wetsel RA. Targeted disruption of the gene encoding the murine small subunit of carboxypeptidase N (CPN1) causes susceptibility to C5a anaphylatoxin-mediated shock. *J Immunol.* 182: 6533-6539 (2009)
- 84) Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, Motoyama N, Okada H, Okada N. Absence of procarboxypeptidase R induces complement-mediated lethal inflammation in lipopolysaccharide-primed mice. *J Immunol.* 173: 4669-4674 (2004)
- 85) Plug T, Meijers JC. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost.* 14: 633-644 (2016)
- 86) Song JJ, Hwang I, Cho KH, Garcia MA, Kim AJ, Wang TH, Lindstrom TM, Lee AT, Nishimura T, Zhao L, Morser J, Nesheim M, Goodman SB, Lee DM, Bridges SL, Jr., Consortium for the Longitudinal Evaluation of African Americans with Early Rheumatoid Arthritis (CLEAR) Registry, Gregersen PK, Leung LL, Robinson WH. Plasma carboxypeptidase B downregulates inflammatory responses in autoimmune arthritis. *J Clin Invest.* 121: 3517-3527 (2011)
- 87) Wang H, Ricklin D, Lambris JD. Complement-activation fragment C4a mediates effector functions by binding as untethered agonist to protease-activated receptors 1 and 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: 10948-10953 (2017)
- 88) Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 407: 258-264 (2000)
- 89) Kataoka H, Hamilton JR, McKemy DD, Camerer E, Zheng YW, Cheng A, Griffin C, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood.* 102: 3224-3231 (2003)
- 90) Nording H, Langer HF. Complement links

- platelets to innate immunity. *Semin Immunol.* 37: 43-52 (2018)
- 91) Han X, Nieman MT. PAR4 (Protease-Activated Receptor 4): PARTICULARLY Important 4 Antiplatelet Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38: 287-289 (2018)
 - 92) Wong PC, Seiffert D, Bird JE, Watson CA, Bostwick JS, Giancarli M, Allegretto N, Hua J, Harden D, Guay J, Callejo M, Miller MM, Lawrence RM, Banville J, Guy J, Maxwell BD, Priestley ES, Marinier A, Wexler RR, Bouvier M, Gordon DA, Schumacher WA, Yang J. Blockade of protease-activated receptor-4 (PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding. *Sci Transl Med.* 9: (2017)
 - 93) Wilson SJ, Ismat FA, Wang Z, Cerra M, Narayan H, Raftis J, Gray TJ, Connell S, Garonzik S, Ma X, Yang J, Newby DE. PAR4 (Protease-Activated Receptor 4) Antagonism With BMS-986120 Inhibits Human Ex Vivo Thrombus Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38: 448-456 (2018)
 - 94) Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J.* 264: 1-14 (1989)
 - 95) Morgan BP. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. *Immunobiology.* 221: 747-751 (2016)
 - 96) Morgan BP, Boyd C, Bubeck D. Molecular cell biology of complement membrane attack. *Semin Cell Dev Biol.* 72: 124-132 (2017)
 - 97) Morgan BP, Dankert JR, Esser AF. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. *J Immunol.* 138: 246-253 (1987)
 - 98) Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology.* 71: 1-9 (1990)
 - 99) Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, Takami T, Ojima A, Ono H, Tanaka H, Kondo N, Orii T, Okada N, et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 323: 1184-1189 (1990)
 - 100) Hochsmann B, Dohna-Schwake C, Kyrieleis HA, Pannicke U, Schrezenmeier H. Targeted therapy with eculizumab for inherited CD59 deficiency. *N Engl J Med.* 370: 90-92 (2014)
 - 101) Ozen A, Comrie WA, Ardy RC, Dominguez Conde C, Dalgic B, Beser OF, Morawski AR, Karakoc-Aydiner E, Tutar E, Baris S, Ozcay F, Serwas NK, Zhang Y, Matthews HF, Pittaluga S, Folio LR, Unlusoy Aksu A, McElwee JJ, Krolo A, Kiykim A, Baris Z, Gulsan M, Ogulur I, Snapper SB, Houwen RHJ, Leavis HL, Ertem D, Kain R, Sari S, Erkan T, Su HC, Boztug K, Lenardo MJ. CD55 Deficiency, Early-Onset Protein-Losing Enteropathy, and Thrombosis. *N Engl J Med.* 377: 52-61 (2017)
 - 102) 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)

- 103) 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)
- 104) Sims PJ, Wiedmer T. Repolarization of the membrane potential of blood platelets after complement damage: evidence for a Ca⁺⁺ - dependent exocytotic elimination of C5b-9 pores. *Blood.* 68: 556-561 (1986)
- 105) Wat JM, Foley JH, Krisinger MJ, Ocariza LM, Lei V, Wasney GA, Lameignere E, Strynadka NC, Smith SA, Morrissey JH, Conway EM. Polyphosphate suppresses complement via the terminal pathway. *Blood.* 123: 768-776 (2014)
- 106) George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med.* 371: 654-666 (2014)
- 107) Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirohani-Ikejima H, Uchida Y, Ohya Y, Kokubo T, Fujimura Y. A novel quantitative hemolytic assay coupled with restriction fragment length polymorphisms analysis enabled early diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome and identified unique predisposing mutations in Japan. *PLoS One.* 10: e0124655 (2015)
- 108) Kato H, Nangaku M, Hataya H, Sawai T, Ashida A, Fujimaru R, Hidaka Y, Kaname S, Maruyama S, Yasuda T, Yoshida Y, Ito S, Hattori M, Miyakawa Y, Fujimura Y, Okada H, Kagami S, Joint Committee for the Revision of Clinical Guides of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome in Japan. Clinical guides for atypical hemolytic uremic syndrome in Japan. *Clin Exp Nephrol.* 20: 536-543 (2016)
- 109) Fakhouri F, Zuber J, Fremeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 390: 681-696 (2017)
- 110) Goodship TH, Cook HT, Fakhouri F, Fervenza FC, Fremeaux-Bacchi V, Kavanagh D, Nester CM, Noris M, Pickering MC, Rodriguez de Cordoba S, Roumenina LT, Sethi S, Smith RJ, Conference Participants. Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 91: 539-551 (2017)
- 111) Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. *Clin Exp Nephrol.* 22: 979-980 (2018)
- 112) Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, Bienaime F, Dragon-Durey MA, Ngo S, Moulin B, Servais A, Provot F, Rostaing L, Burtay S, Niaudet P, Deschenes G, Lebranchu Y, Zuber J, Loirat C. Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol.* 8: 554-562 (2013)
- 113) Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Nephrol.* (2018)
- 114) Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. Complement in disease: a defence system turning offensive.

- Nat Rev Nephrol.* 12: 383-401 (2016)
- 115) Dane MJ, van den Berg BM, Lee DH, Boels MG, Tiemeier GL, Avramut MC, van Zonneveld AJ, van der Vlag J, Vink H, Rabelink TJ. A microscopic view on the renal endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Renal Physiol.* 308: F956-966 (2015)
 - 116) Rabelink TJ, de Zeeuw D. The glycocalyx--linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol.* 11: 667-676 (2015)
 - 117) Sartain SE, Turner NA, Moake JL. TNF Regulates Essential Alternative Complement Pathway Components and Impairs Activation of Protein C in Human Glomerular Endothelial Cells. *J Immunol.* 196: 832-845 (2016)
 - 118) Sartain SE, Turner NA, Moake JL. Brain microvascular endothelial cells exhibit lower activation of the alternative complement pathway than glomerular microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* (2018)
 - 119) Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res.* 38: 469-479 (1985)
 - 120) Feys HB, Roodt J, Vandeputte N, Pareyn I, Lamprecht S, van Rensburg WJ, Anderson PJ, Budde U, Louw VJ, Badenhorst PN, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (Papio ursinus). *Blood.* 116: 2005-2010 (2010)
 - 121) Tsai HM, Chandler WL, Sarode R, Hoffman R, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Wong CS, Williams GD, Tarr PI. von Willebrand factor and von Willebrand factor-cleaving metalloprotease activity in Escherichia coli O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res.* 49: 653-659 (2001)
 - 122) Hosler GA, Cusumano AM, Hutchins GM. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities. A review of 56 autopsy cases. *Arch Pathol Lab Med.* 127: 834-839 (2003)
 - 123) Magro CM, Momtahn S, Mulvey JJ, Yassin AH, Kaplan RB, Laurence JC. Role of the skin biopsy in the diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Dermatopathol.* 37: 349-356; quiz 357-349 (2015)
 - 124) Ueda Y, Mohammed I, Song D, Gullipalli D, Zhou L, Sato S, Wang Y, Gupta S, Cheng Z, Wang H, Bao J, Mao Y, Brass L, Zheng XL, Miwa T, Palmer M, Dunaief J, Song WC. Murine systemic thrombophilia and hemolytic uremic syndrome from a factor H point mutation. *Blood.* 129: 1184-1196 (2017)
 - 125) Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lammle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood.* 120: 1157-1164 (2012)
 - 126) Gushiken FC, Han H, Li J, Rumbaut RE, Afshar-Kharghan V. Abnormal platelet function in C3-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 7: 865-870 (2009)
 - 127) Subramaniam S, Jurk K, Hobohm L, Jackel S, Saffarzadeh M, Schwierczek K, Wenzel P, Langer F, Reinhardt C, Ruf W. Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in

- venous thrombus development. *Blood*. 129: 2291-2302 (2017)
- 128) Chen VM, Hogg PJ. Encryption and decryption of tissue factor. *J Thromb Haemost*. 11 Suppl 1: 277-284 (2013)
- 129) Muller-Calleja N, Ritter S, Hollerbach A, Falter T, Lackner KJ, Ruf W. Complement C5 but not C3 is expendable for tissue factor activation by cofactor-independent antiphospholipid antibodies. *Blood Adv*. 2: 979-986 (2018)
- 130) Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 15: 1318-1321 (2009)
- 131) Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*. 118: 1952-1961 (2011)
- 132) Mizuno T, Yoshioka K, Mizuno M, Shimizu M, Nagano F, Okuda T, Tsuboi N, Maruyama S, Nagamatsu T, Imai M. Complement component 5 promotes lethal thrombosis. *Sci Rep*. 7: 42714 (2017)
- 133) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental studies of ischemic brain edema: 1. 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)
- 134) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 20: 84-91 (1989)
- 135) Denorme F, De Meyer SF. The VWF-GPIIb axis in ischaemic stroke: lessons from animal models. *Thromb Haemost*. 116: 597-604 (2016)
- 136) Yang D, Nakajo Y, Iihara K, Kataoka H, Nakagawara J, Zhao Q, Yanamoto H. An integrated stroke model with a consistent penumbra for the assessment of neuroprotective interventions. *Eur Neurol*. 71: 4-18 (2014)
- 137) https://figshare.com/articles/Supplementary_Material_for_An_Integrated_Stroke_Model_with_a_Consistent_Penumbra_for_the_Assessment_of_Neuroprotective_Interventions/5125759.
- 138) Alawieh A, Elvington A, Tomlinson S. Complement in the Homeostatic and Ischemic Brain. *Front Immunol*. 6: 417 (2015)
- 139) Zhang M, Austen WG, Jr., Chiu I, Alicot EM, Hung R, Ma M, Verna N, Xu M, Hechtman HB, Moore FD, Jr., Carroll MC. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 3886-3891 (2004)
- 140) Zhang M, Alicot EM, Chiu I, Li J, Verna N, Vorup-Jensen T, Kessler B, Shimaoka M, Chan R, Friend D, Mahmood U, Weissleder R, Moore FD, Carroll MC. Identification of the target self-antigens in reperfusion injury. *J Exp Med*. 203: 141-152 (2006)
- 141) Kulik L, Fleming SD, Moratz C, Reuter JW, Novikov A, Chen K, Andrews KA, Markaryan A, Quigg RJ, Silverman GJ, Tsokos GC, Holers VM. Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to

- develop intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* 182: 5363-5373 (2009)
- 142) Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, Thiel S, Jensenius JC, Ezekowitz RA, Moore FD, Carroll MC. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol.* 177: 4727-4734 (2006)
- 143) McMullen ME, Hart ML, Walsh MC, Buras J, Takahashi K, Stahl GL. Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. *Immunobiology.* 211: 759-766 (2006)
- 144) Hart ML, Ceonzo KA, Shaffer LA, Takahashi K, Rother RP, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. *J Immunol.* 174: 6373-6380 (2005)
- 145) Elvington A, Atkinson C, Kulik L, Zhu H, Yu J, Kindy MS, Holers VM, Tomlinson S. Pathogenic natural antibodies propagate cerebral injury following ischemic stroke in mice. *J Immunol.* 188: 1460-1468 (2012)
- 146) Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, Stahl GL, Sacks SH. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 105: 1363-1371 (2000)
- 147) Lee H, Green DJ, Lai L, Hou YJ, Jensenius JC, Liu D, Cheong C, Park CG, Zhang M. Early complement factors in the local tissue immunocomplex generated during intestinal ischemia/reperfusion injury. *Mol Immunol.* 47: 972-981 (2010)
- 148) Cernoch M, Viklicky O. Complement in Kidney Transplantation. *Front Med (Lausanne).* 4: 66 (2017)
- 149) Huang J, Kim LJ, Mealey R, Marsh HC, Jr., Zhang Y, Tenner AJ, Connolly ES, Jr., Pinsky DJ. Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Science.* 285: 595-599 (1999)
- 150) Mocco J, Mack WJ, Ducruet AF, King RG, Sughrue ME, Coon AL, Sosunov SA, Sciacca RR, Zhang Y, Marsh HC, Jr., Pinsky DJ, Connolly ES, Jr. Preclinical evaluation of the neuroprotective effect of soluble complement receptor type 1 in a nonhuman primate model of reperfused stroke. *J Neurosurg.* 105: 595-601 (2006)
- 151) Ducruet AF, Mocco J, Mack WJ, Coon AL, Marsh HC, Pinsky DJ, Hickman ZL, Kim GH, Connolly ES, Jr. Pre-clinical evaluation of an sLex-glycosylated complement inhibitory protein in a non-human primate model of reperfused stroke. *J Med Primatol.* 36: 375-380 (2007)
- 152) Li S, Xian J, He L, Luo X, Tan B, Yang Y, Liu G, Wang Z. The protective effect of SCR(15-18) on cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurol Res.* 33: 866-874 (2011)
- 153) Atkinson C, Zhu H, Qiao F, Varela JC, Yu J, Song H, Kindy MS, Tomlinson S. Complement-dependent P-selectin expression and injury following ischemic stroke. *J Immunol.* 177: 7266-7274 (2006)
- 154) De Simoni MG, Storini C, Barba M, Catapano L, Arabia AM, Rossi E, Bergamaschini L. Neuroprotection by complement (C1) inhibitor in mouse transient brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23: 232-239 (2003)
- 155) De Simoni MG, Rossi E, Storini C, Pizzimenti S, Echart C, Bergamaschini L. The powerful

- neuroprotective action of C1-inhibitor on brain ischemia-reperfusion injury does not require C1q. *Am J Pathol.* 164: 1857-1863 (2004)
- 156) Gesuete R, Storini C, Fantin A, Stravalaci M, Zanier ER, Orsini F, Vietsch H, Mannesse ML, Ziere B, Gobbi M, De Simoni MG. Recombinant C1 inhibitor in brain ischemic injury. *Ann Neurol.* 66: 332-342 (2009)
- 157) 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)
- 158) Atkinson C, Qiao F, Yang X, Zhu P, Reaves N, Kulik L, Goddard M, Holers VM, Tomlinson S. Targeting pathogenic postischemic self-recognition by natural IgM to protect against posttransplantation cardiac reperfusion injury. *Circulation.* 131: 1171-1180 (2015)
- 159) Sihag S, Haas MS, Kim KM, Guerrero JL, Beaudoin J, Alicot EM, Schuerpf F, Gottschall JD, Puro RJ, Madsen JC, Sachs DH, Newman W, Carroll MC, Allan JS. Natural IgM Blockade Limits Infarct Expansion and Left Ventricular Dysfunction in a Swine Myocardial Infarct Model. *Circ Cardiovasc Interv.* 9: e002547 (2016)
- 160) Gorsuch WB, Chrysanthou E, Schwaeble WJ, Stahl GL. The complement system in ischemia-reperfusion injuries. *Immunobiology.* 217: 1026-1033 (2012)
- 161) Panagiotou A, Trendelenburg M, Osthoff M. The Lectin Pathway of Complement in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury- Review of Its Significance and the Potential Impact of Therapeutic Interference by C1 Esterase Inhibitor. *Front Immunol.* 9: 1151 (2018)
- 162) Orsini F, Villa P, Parrella S, Zangari R, Zanier ER, Gesuete R, Stravalaci M, Fumagalli S, Ottria R, Reina JJ, Paladini A, Micotti E, Ribeiro-Viana R, Rojo J, Pavlov VI, Stahl GL, Bernardi A, Gobbi M, De Simoni MG. Targeting mannose-binding lectin confers long-lasting protection with a surprisingly wide therapeutic window in cerebral ischemia. *Circulation.* 126: 1484-1494 (2012)
- 163) Osthoff M, Katan M, Fluri F, Schuetz P, Bingisser R, Kappos L, Steck AJ, Engelter ST, Mueller B, Christ-Crain M, Trendelenburg M. Mannose-binding lectin deficiency is associated with smaller infarction size and favorable outcome in ischemic stroke patients. *PLoS One.* 6: e21338 (2011)
- 164) Larsen JB, Hvas CL, Hvas AM. The Lectin Pathway in Thrombotic Conditions-A Systematic Review. *Thromb Haemost.* 118: 1141-1166 (2018)
- 165) La Bonte LR, Pavlov VI, Tan YS, Takahashi K, Takahashi M, Banda NK, Zou C, Fujita T, Stahl GL. Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to coagulation in a murine model of occlusive thrombosis. *J Immunol.* 188: 885-891 (2012)
- 166) Barr JD, Chauhan AK, Schaeffer GV, Hansen JK, Motto DG. Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. *Blood.* 121: 3733-3741 (2013)
- 167) Schwaeble WJ, Lynch NJ, Clark JE, Marber M, Samani NJ, Ali YM, Dudler T, Parent B, Lhotta K, Wallis R, Farrar CA, Sacks S, Lee H, Zhang M, Iwaki D, Takahashi M, Fujita T, Tedford CE, Stover CM. Targeting of

- mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108: 7523-7528 (2011)
- 168) Orsini F, Chrysanthou E, Dudler T, Cummings WJ, Takahashi M, Fujita T, Demopoulos G, De Simoni MG, Schwaeble W. Mannan binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) critically contributes to post-ischemic brain injury independent of MASP-1. *J Neuroinflammation*. 13: 213 (2016)
- 169) Medcalf RL. Fibrinolysis: from blood to the brain. *J Thromb Haemost*. 15: 2089-2098 (2017)
- 170) Zhao XJ, Larkin TM, Lauver MA, Ahmad S, Ducruet AF. Tissue plasminogen activator mediates deleterious complement cascade activation in stroke. *PLoS One*. 12: e0180822 (2017)
- 171) Lee BC, Mayer CL, Leibowitz CS, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Quiescent complement in nonhuman primates during *E coli* Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome and thrombotic microangiopathy. *Blood*. 122: 803-806 (2013)
- 172) Keshari RS, Silasi R, Lupu C, Taylor FB, Jr., Lupu F. In vivo-generated thrombin and plasmin do not activate the complement system in baboons. *Blood*. 130: 2678-2681 (2017)
- 173) Keshari RS, Silasi R, Popescu NI, Patel MM, Chaaban H, Lupu C, Coggeshall KM, Mollnes TE, DeMarco SJ, Lupu F. Inhibition of complement C5 protects against organ failure and reduces mortality in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2017)
- 174) Skjeflo EW, Christiansen D, Fure H, Ludviksen JK, Woodruff TM, Espevik T, Nielsen EW, Brekke OL, Mollnes TE. *Staphylococcus aureus*-induced complement activation promotes tissue factor-mediated coagulation. *J Thromb Haemost*. (2018)
- 175) 香美祥二, 岡田浩一, 南学正臣, 要伸也, 丸山彰一, 安田隆, 加藤秀樹, 吉田瑤子, 服部元史, 芦田明, 幡谷浩史, 日高義彦, 澤井俊宏, 伊藤秀一, 藤丸季可, 藤村吉博, 宮川義隆. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 診療ガイド 2015. <https://www.jsnorjp/guideline/ahus-2016php>. (2016)
- 176) Furie B, Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res*. 114: 1162-1173 (2014)
- 177) Massberg S, Grahnl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhikov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 16: 887-896 (2010)