

Carboxypeptidase R による生体制御

河村 剛至

帝京大学薬学部 臨床薬学講座 病院薬学研究室

Biological Regulation by Carboxypeptidase R

Takeshi Kawamura

Teikyo University Faculty of Hospital Pharmacy

[抄録]

プロカルボキシペプチダーゼ R (proCPR)は別名 TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)として知られている。血液中にある proCPR は、トロンビン、プラスミン等のトリプシン様酵素で活性化され、カルボキシペプチダーゼ R (CPR)が生成される。生じた CPR は、プラスミンの生成を抑えて線溶を抑制する作用 (plasminogen が結合する fibrin 上のリジンを切除して Plasmin への活性化を抑制する) とアナフィラトキシン C5a 等を不活性化して炎症を抑制する作用の両方を働かせることで生体を制御している。補体の過剰な活性化は、血栓を形成し血栓症悪化に関与することが知られ、血栓症、敗血症や播種性血管内凝固症候群などにおいて CPR の働きがカギとなる可能性が考えられる。我々は、活性化好中球から放出されるエラスターゼが proCPR を活性化することを報告しており、過剰炎症時の血栓症悪化にこの活性化機構が関与する可能性について紹介する。

[Abstract]

Procarboxypeptidase R (proCPR), also known as thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, is activated in the blood by trypsin-like enzymes such as thrombin and plasmin to produce carboxypeptidase R (CPR). The CPR thus generated has been shown to: a) inhibit fibrinolysis by suppressing plasmin production from plasminogen which requires lysine residue on fibrin (CPR removes the lysine on fibrin) for its activation to plasmin; and b) suppress inflammation by inactivating anaphylatoxin C5a by removing the C-terminal arginine, which is essential for stimulation. Complement activation is known to be involved in the generation of thrombin and the aggravation of thrombosis, and the function of CPR may be key in thrombosis, sepsis, and disseminated intravascular coagulation syndrome. We have previously reported that elastase released from activated neutrophils activates proCPR, and introduce the possibility that this activation mechanism may be involved in exacerbation of thrombosis during excessive inflammation.

[キーワード] プロカルボキシペプチダーゼ R、アナフィラトキシン、炎症、線溶

はじめに

カルボキシペプチダーゼ R (EC 3.4.17.20; CPR) は、新鮮な血清中に存在する不安定な塩基性カルボキシペプチダーゼで、安定した酵素であるカルボキシペプチダーゼ N (CPN) とは別の酵素である。新鮮な血清中の CPR は、凝固の際にトロンビンやトロンビン/トロンボモジュリン複合体 (T/TM)、プラスミンなどのトリプシン様酵素により前駆体であるプロカルボキシペプチダーゼ R (proCPR) から生成される。proCPR は分子量約 60kDa、401 アミノ酸からなる糖タンパク質で、血液中を 70~275 nmol/L で循環する。proCPR の活性化はトリプシン様酵素により 92 番目アルギニンのカルボキシ側の切断で生じる。生成した CPR は CPN と同様、C3a や C5a の C 末端のアルギニンを除去して、アナフィラトキシン活性を消失あるいは大幅に減弱させ、動物実験でも CPR と CPN は生体内でアナフィラトキシンを不活性化する酵素であることが明らかになってきた。proCPR は通常、炎症抑制と線溶抑制の両面で恒常性を保って働いていると考えられるが、エンドトキシン (LPS) などによって引き起こされる炎症反応の際に proCPR の発現が増強することから、急性期において CPR は炎症の抑制や血流の制御などの生体制御への関与も示唆された。今回 proCPR の発見から CPR の生体内における働き、敗血症性ショック、パンデミックによる患者重篤化への関与について紹介する。また、我々は好中球が放出するエラスターゼが proCPR を活性化することを報告しており、過剰炎症時において好中球エラスターゼによる proCPR の活性化と消費が生体制御に大きく影響する可能性についても紹介する。

proCPR 発見の歴史

カルボキシペプチダーゼ B 様酵素 (CPB) は、ペプチドやタンパク質の C 末端塩基性残基 (リジン、アルギニン) の加水分解を触媒する酵素である。当時、血漿中に存在するアナフィラトキシン、ブラジ

キニンを不活性化する酵素としてカルボキシペプチダーゼ N (CPN) が知られていた。1989 年、ヒトの血液から調製した新鮮な血清中に CPN とは異なる CPB が、2 つの研究室で独自に同定された^{2),3)}

Campbell と Okada²⁾ は、血漿および血清中のブラジキニンの分解に関する文献にある、ブラジキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) の血漿と血清中におけるアンジオテンシン変換酵素による切断片の違いに着目した。CPN に対する抗体を調製して CPN を除去した血清と血漿を作製し、カルボキシペプチダーゼ (CP) 活性の有無を調べた。1989 年、血清に有意な CP 活性が認められたことから、解明されていない CP の存在が見出された。この CP は、合成基質であるヒプリル-アルギニンとヒプリル-リジンから、アルギニンとリジンの両方を除去するが、リジンよりアルギニンを迅速に除去することから、CPR と命名された。

同年、D Hendriks³⁾ はヒプリル-アルギニンを基質とした測定で、ヒト血清中の CP 活性が、ヒト血漿中の約 3 倍であることを見出した。新鮮な血清を 30℃ でインキュベートすると、CP 活性が低下した。この不安定な CP 活性は、pH-最適値、エステラーゼ活性、基質特異性などの特徴が CPN とは異なるため、解明されていない CP の存在が確認された³⁾。室温や 37℃ では不安定であることから、unstable carboxypeptidase (CPU) と命名された。

1991 年には、Eaton⁴⁾ らによって単離された分子量 60,000 のプラスミノゲン結合タンパク質が、新規の CPB の前駆体であることが判明し、pCPB と命名され⁴⁾、1995 年に proCPR は、線維素溶解を調節するトロンビン活性化線溶阻害因子 (TAFI) と同じ分子であることが判明した。その後のアミノ末端配列の決定により、CPU、CPR、血漿 CPB、TAFI は同一であることが明らかになった⁵⁾。従って、CPR は炎症だけでなく、線溶も制御していることが示唆された。

トロンビンによって活性化される線溶を抑制する

働きを表現した、TAFI という用語が広く受け入れられたが、複数の名称は煩雑であるため、血栓症・ヘモスタシスに関する国際社会科学標準化委員会 (SSC ; Subcommittee on Fibrinolysis) は、TAFI に関する出版物には遺伝子名 (CPB2) を記載するよう強く推奨している。今回は、TAFI を proCPR、TAFIa を CPR として統一して記載する。

proCPR の構造と熱安定性

ヒト *CPB2* (proCPR) 遺伝子は第 13 染色体 (13q14.11) に位置し、11 個のエクソンから構成されており、423 個のアミノ酸のプレペプチドとして合成され、22 個のシグナルペプチドが切断されて 401 アミノ酸である proCPR が血中に放出される。proCPR は主に肝臓で発現されるが、血小板からも放出されることが報告されている⁹⁾。proCPR の活性化は、トロンビンやプラスミンなどのトリプシン様酵素によって、Arg92 の C 末側が切断され、触媒ドメインから N 末側の活性化ペプチド (Phe1~Arg92) が除去されることによって起こる⁷⁾。proCPR 活性化の概略図と立体構造を図 1 に示す。トロンビンはトロンボモジュリンと結合し、形成されたトロンビン・トロンボモジュリン複合体 (T/TM) がトロンビンによる proCPR の活性化を約 1250 倍に加速する⁸⁾。一方、プラスミンはグリコサミノグリカンと結合して proCPR の活性化を上昇させる⁹⁾。proCPR はトロンビンによって切断され、35kDa、25kDa、14kDa の生成物が得られる。35kDa の生成物は、溶解時間の延長と CPR 活性の両方に相関し、触媒ドメインと考えられた。60kDa のタンパク質が切断されて最初に 35kDa と 14kDa のバンドが現れ、35kDa のフラグメントはさらに 25kDa と 14kDa に分解される¹⁰⁾。CPR は熱的に不安定な酵素で、体温では半減期が 10 分程度であることが知られている¹¹⁾。CPR の不安定性は、活性化ペプチド (Phe1~Arg92) が放出されると、触媒ドメインのダイナミックフラップ (55 残基のセグメント Phe296~

Trp350) の動きが活発になり、構造変化が生じて触媒部位が破壊される。続いて Arg302 に存在するトロンビン切断部位が露出することになり、再度切断される。温度に依存して CPR の立体構造が崩壊して活性が自己消失することが分かっている¹²⁾。プラスミンも T/TM と同様に proCPR を Arg92 の C 末側で切断して CPR が形成される。その後生成された CPR は、C 末端の Arg302/Lys327/Arg330 におけるタンパク質の切断により分解される。

proCPR の遺伝子多型として、*CPB2* のコード領域に、Ala147Thr をコードする G505A と Thr325Ile をコードする C1040T の 2 か所の SNP が報告されている。2 つのアミノ酸置換を伴う計 4 つの proCPR アイソフォーム^{13),14)}が存在するが、Ile325 CPR は、147 位の残基にかかわらず、37℃での TAFIa の半減期を 8 分から 15 分に延長したため、線溶を阻害する効果が高いとされている。

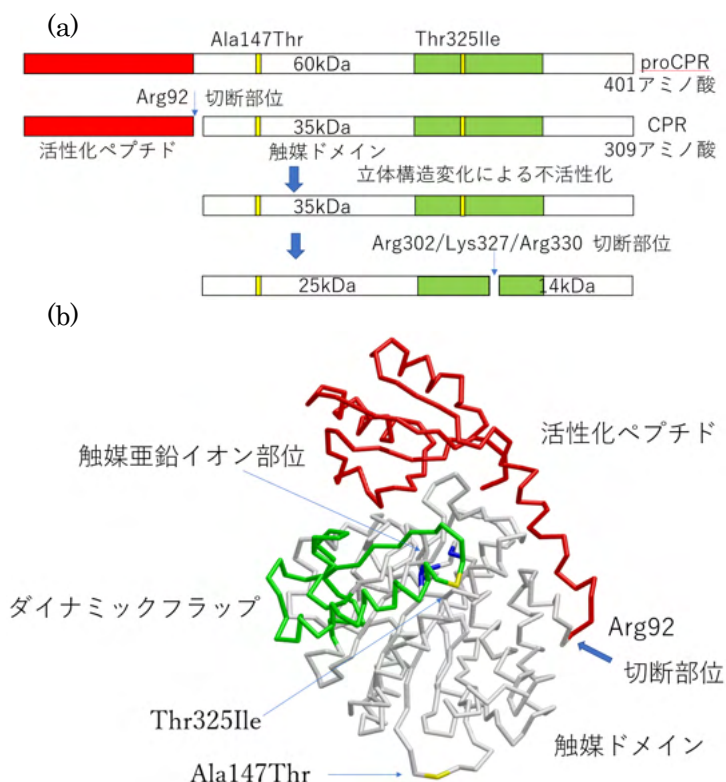


図 1 proCPR の活性化と構造 (a) proCPR のトリプシン様酵素による活性化と安定性: 活性化ドメイン (赤)、遺伝子多型 2 か所 (黄)、ダイナミックフラップ (黄緑: 55 残基のセグメント Phe296~Trp350) が示す。 (b) proCPR の立体構造 (PDB:3D66¹⁰⁾)

CPR の線溶抑制作用と炎症抑制作用

proCPR が活性化されて生じた CPR は線溶抑制と炎症抑制作用の2つの役割を持つことが知られている。血液凝固カスケード反応で生成されたトロンビンが血管内皮細胞のレセプターとされるトロンボモジュリンと結合した T/TM によって proCPR が活性化される。生じた CPR はプラスミノゲンが反応する足場となる血栓フィブリンの C 末端のリジン切断する。よって、プラスミノゲンがフィブリンに結合できなくなり、組織型プラスミノゲンアクチベータ (tPA) が働かないため、プラスミンの生成が抑えられ線溶が抑制される。プラスミンも同様に proCPR を活性化して CPR が生成され、線溶抑制作用を誘導することが知られている。proCPR 濃度が高いと深部静脈血栓症¹⁵⁾、冠動脈疾患¹⁶⁾を発現するリスクが高くなるという報告があることから、血漿中の proCPR 濃度が高いほど CPR が多く生成されると考えられる。また、慢性血栓性肺高血圧症患者では、血漿中の proCPR 濃度が有意に上昇し、CPR の濃度は 10 倍に増加するという報告がある^{17),18)}。

一方、CPR は炎症抑制効果も示唆されている。微生物が生体内に侵入すると、補体活性化で生じるアナフィラトキシン C3a や C5a がその炎症部位で増加する。好中球は C5a 等で集積され活性化される。proCPR が活性化され CPR が生じると、CPR は C5a 等のカルボキシ末端のアルギニンを切断して C5a を不活性化する。これにより炎症が抑制されることが知られている¹⁹⁾。マウスやラットへ LPS を投与すると、誘発される炎症に応じて、肝細胞の *Cpb2* mRNA レベルが増加する。また、ラットへ LPS の致死量を投与すると、血漿で CPR 活性が 2 倍に増加する²⁰⁾。さらに、*Cpb2* 欠損はコンカナバリン A 誘発性肝炎による致死率を雌マウスにおいて増大させた、との報告がある²¹⁾。よって CPR は C5a または他の炎症性ペプチドによって誘発される過剰炎症を抑制する重要な役割があることが示唆さ

れる。

好中球エラスターゼによる proCPR 活性化

CPR は不安定な酵素であることから、炎症反応の抑制効果を十分に発揮するためには、炎症部位で proCPR の活性化が起こる機序が考えられる。我々は炎症部位に集積し活性化した好中球が放出する酵素の中に proCPR を切断 (活性化) する酵素が存在すると考え、ヒト好中球をサイトカラシン B と fMLP で刺激した培養上清を proCPR 画分に添加したところ、CPR 活性が得られた。その活性化を担う酵素は好中球エラスターゼであることを見出した¹⁾。ヒト血漿から粗精製した proCPR 画分に様々な酵素の阻害剤と活性化好中球の培養上清を添加したところ、エラスターゼ特異的阻害剤である N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone (MSAAPVCK) によって CPR の生成活性が阻害された。proCPR 画分に精製した好中球エラスターゼを添加したところ、proCPR は活性化し、MSAAPVCK で阻害された。

proCPR 画分に活性化好中球の上清と MSAAPVCK を添加すると、proCPR 活性化は完全に阻害されたが、トロンビン特異的阻害剤である p-Nitrophenyl-p'-amidinophenyl-methanesulfonate hydrochloride を添加すると、proCPR 活性化は $6.8 \pm 3.9\%$ しか阻害しなかった。したがって、活性化好中球の分泌するエラスターゼが proCPR を活性化し、トロンビンは必須の役割ではないと考えられた。proCPR 活性化に、T/TM と好中球エラスターゼの相乗効果は検出されず、相加的であった。

補体活性化で生じた C5a は、好中球の強力な走化性因子であり、感染部位への好中球の集積と活性化を引き起こす。好中球は、炎症部位における生体防御、創傷治癒などに重要な役割を果たしている。しかし、生体の恒常性を維持するためには、ある程度の段階で炎症を制御する必要がある。炎症部位に集積して活性化した好中球が、proCPR を CPR に変

よって感作した後、補体を活性化させるコブラ毒因子を投与すると *Cpb2*^(+/+)マウスおよび *Cpb2*^(+/+)マウスは耐えられたが、*Cpb2*^(-/-)マウスは致死であることが報告されている²⁴⁾。CPN ノックアウトマウスを用いた実験で、CPN がアナフィラトキシンを介したショックの致死効果を制御するのに必要な役割を果たしていることは明らかになっている²⁵⁾。これらから CPN も生体内で炎症性ペプチドの不活性化に役割を果たしていることが示されている。

proCPR と疾患

敗血症は大きな外傷後に発症し補体を介した凝固系の亢進と密接に関連している。重症外傷患者を対象に、救急部への入院時とその後の proCPR と C5a の血中濃度が測定された報告によると、敗血症で proCPR の低下と白血球と C5a の上昇がみられている。proCPR と C5a は、SOFA (Sequential organ failure assessment) スコアとの相関解析により、早期敗血症の予測因子としての可能性が示された²⁶⁾。また、外傷後の感染症などの炎症に関連した合併症の発症した患者は、非合併症群に比べて proCPR レベルが有意に低いという報告²⁷⁾もあり、炎症に関連した合併症によって proCPR が消費、あるいは分解する可能性が考えられる。

血漿中の proCPR は様々な疾患で測定されている。肺癌^{28,29)}や乳癌³⁰⁾患者の血漿中 proCPR は高値を示し、癌における血栓症病態へ関与が示唆されている。さらに、肺癌細胞、特に小細胞肺癌細胞が proCPR の mRNA およびタンパク質を発現していることが報告されている²⁸⁾。また、乳癌細胞株では siRNA による proCPR の抑制が、乳癌細胞の浸潤と移動を阻害し、proCPR の癌転移への関与も示唆されている³¹⁾。その他、進行した肝細胞性肝疾患³²⁾、播種性血管内凝固症候群 (DIC)^{33),34)}、小児の髄膜炎菌敗血症の敗血症性ショックでは、血漿中の proCPR 濃度が低下したという報告がある³⁵⁾。

しかしながら、DIC や敗血症で有意な差は認めら

れなかったという報告³⁶⁾も存在する。炎症性腸疾患では、proCPR の上昇と低下ともに報告されている^{37),38)}。明確な結論を出すのが難しい原因は proCPR の個体差も大きいことが挙げられる³⁹⁾。急性期には proCPR が生産され、過剰な炎症が生じて proCPR が消費される報告が蓄積されており、患者個人レベルでの proCPR に関連する詳細な解析は、将来、炎症性病態と予後の予測が可能となるかもしれない。

炎症局所における CPR の役割と proCPR 産生

関節炎モデルマウスを用いて、CPR は C5a に作用して自己免疫性関節炎の炎症反応を抑制することが示された¹⁹⁾。*Cpb2*を欠損したマウスに抗コラーゲン抗体を注射した関節炎の動物モデルでは、*Cpb2*^(-/-)マウスは *Cpb2*^(+/+)マウスよりも重度の関節炎を示し、C5 活性化を阻止する抗 C5 抗体は、*Cpb2*^(-/-)マウスの重篤な関節炎の発症を阻止した。また、マウス腹腔に C5a des-Arg を、対照として C5a を注入し、C5a の走化性が消失すること、マウスの膝関節に同様に注射し、C5a des-Arg で滑膜炎の誘発が低下することが調べられた。CPR が C5a に作用することで炎症性関節炎の発症を防ぐことを示している。

関節リウマチ(RA)患者において血漿 proCPR レベルは、炎症マーカーである C 反応性タンパク質 (CRP) レベルが上昇した RA 患者で有意に高かったという報告がある。一方、血漿 proCPR レベルは RA 患者と非 RA 患者対照群で差はないが、滑液において RA 患者は高値を示し、滑膜組織で *CPB2* mRNA が発現されていることが報告されている。肝臓以外の炎症局所において必要に応じて proCPR が発現している可能性が考えられる。

補体活性化と血液凝固

敗血症は、組織因子 (TF) の発現増加を介した凝固異常により、死に至ることがある症候群であるが、その TF の発現増加に補体活性化が関与しているこ

とが報告されている^{41), 42), 43), 44)}。補体活性化で生成した C5a が好中球に作用して、好中球が TF を放出し、TF 依存性の凝固促進作用を引き起こすことが明かになってきた。黄色ブドウ球菌に反応した補体による TF 発現を介した凝固反応は、抗 C5 抗体であるエクリズマブにより減少した⁴⁵⁾。その他、補体の過剰活性化により血栓症を引き起こす疾患がいくつか知られており、髄膜炎菌敗血症⁴⁶⁾、発作性夜間ヘモグロビン尿症⁴⁷⁾、非定型溶血性尿毒症症候群⁴⁸⁾においてもエクリズマブ投与により血栓塞栓症を減少できることが報告されている。C5a を介した好中球の TF 発現あるいは、neutrophil extracellular traps (NETs) 放出に応じた TF 発現に CPR が関与することが考えられるが、CPR が枯渇することにより C5a が不活化されず TF が生成され続け、血液凝固が促進することは明らかになっていない。一方、proCPR の大量消費による CPR の線溶抑制作用により血栓形成が生じて血液凝固が起こることも考えられる。

COVID-19 と proCPR

重症急性呼吸器症候群・コロナウイルス-2 (COVID-19) がパンデミックを起こし、急性呼吸窮迫の病態を引き起こすが、致死の原因は肺障害だけではない。感染が確認された死亡者の剖検において深部静脈血栓症が 40% の症例で認められている⁴⁹⁾。COVID-19 患者において、循環血液中のプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) レベルの上昇に加えて、tPA と CPR と活性化後に不活性化された CPR のレベルが上昇していることが報告された⁵⁰⁾。proCPR が消費されて線溶が抑制され、フィブリン沈着が起こっている可能性が考えられる。

補体による好中球の過剰な活性化が、細菌感染や致死的なウイルス感染症の発症に関与していることが報告されている^{51), 52)}。COVID-19 において、血漿中の補体と NETs のレベルが疾患の重症度と関連し

ていることが報告された。NETs は、活性化好中球が放出する自身の核内 DNA とヒストン、好中球エラスターゼ、ミエロペルオキシダーゼなどの抗菌蛋白が結合した構造物であり、NETs の血小板、血栓形成への関与から、新たな immunothrombosis という概念が提唱されている。

COVID-19 患者の血漿中のアナフィラトキシンが、NETs 形成を強く誘導し、免疫血栓症を引き起こす物質となることが明かとなった⁵³⁾。アナフィラトキシンは炎症と血栓症を橋渡しすると考えられる。CPR は C3a および C5a から活性に不可欠なカルボキシル末端のアルギニンを除去することで、NETs の形成を抑えることが報告された⁵⁴⁾。これらの知見から、CPR がアナフィラトキシン C5a によって好中球から誘導される TF や NETs 産生を抑制し、血栓形成を抑制できることが示唆される。CPR に着目した治療薬を開発することにより、COVID-19 における過剰炎症による患者の重篤化予防に役立つかもしれない。

終わりに

CPR は生体内における炎症の制御と線溶の抑制作用による血栓の制御に関与し、炎症の治癒の過程を含めて、恒常性を維持する生体制御に関わっていると考えられる。炎症部位における過剰な炎症状態では C5a レベル、白血球が上昇しており、proCPR の過剰な活性化が想定されるため、それに伴う proCPR 不足を補うため、発現が増強していることが考えられる。

補体活性化によるアナフィラトキシンが好中球を刺激し、活性化好中球から TF や NETs 形成が放出されて、血栓形成に関与することが明かになってきた。好ましくない血栓形成を抑制するためには、アナフィラトキシンを制御する CPR の役割が重要である可能性がある。

我々が見出した過剰炎症時に集積した活性化好中球が放出するエラスターゼによる proCPR 活性化は、

それが異常をきたすと多臓器不全に見られるような深刻な血栓症や過剰炎症を引き起こす可能性がある。さらに proCPR 活性化による消費は、proCPR の枯渇などを引き起こし、生体制御に大きな影響を与えるかもしれない。生体内で過剰炎症時における proCPR 活性化機構を解明し、生成した CPR がどのように働くかを明らかにすることは、今後起こることが予想されるパンデミックによる過剰炎症に続く血栓症の予防はもとより、様々な病態解明につながることを期待される。特に注目すべきことは、SARS-CoV2 感染で重症化する感染者と不顕性感染で治まる感染者との間で、血漿中の proCPR 濃度の比較解析のデータである。proCPR が低値で重症化した患者には、新鮮凍結血漿(FFP: fresh frozen plasma)の静注投与で proCPR を補給することが有効な治療法になると期待できる。

[利益相反]

著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ない。

[文献]

- 1) Kawamura T, Okada N, Okada H. Elastase from activated human neutrophils activates procarboxypeptidase R. *Microbiol Immunol.* 2002;46(3):225-30.
- 2) Campbell W, Okada H. An arginine specific carboxypeptidase generated in blood during coagulation or inflammation which is unrelated to carboxypeptidase N or its subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;162(3):933-9.
- 3) Hendriks D, Scharpé S, van Sande M, Lommaert MP. Characterisation of a carboxypeptidase in human serum distinct from carboxypeptidase N. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989;27(5):277-85.
- 4) Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem.* 1991;266(32):21833-8.
- 5) Vanhoof G., Wauters J., Schattelman K., Hendriks D., Goossens F., Bossuyt P, et al.. The gene for human carboxypeptidase U (CPU)—A proposed novel regulator of plasminogen activation—maps to 13q14.11. *Genomics.* 1996;38:454–455.
- 6) Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, Meijers JC, Bouma BN. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood.* 2003;101(12):4844-6.
- 7) Marx PF, Dawson PE, Bouma BN, Meijers JCM. Plasmin-mediated activation and inactivation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Biochemistry.* 2002;41(21):6688-96.
- 8) Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem.* 1996;271(28):16603-8.
- 9) Mao SS, Cooper CM, Wood T, Shafer JA, Gardell SJ. Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 1999;274(49):35046-52.
- 10) Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14477-84.
- 11) Boffa M.B., Wang W., Bajzar L., Nesheim M.E. Plasma and recombinant thrombin-activable

- fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 1998;273:2127–2135.
- 12) Marx PF, Brondijk T, Harma C, Plug T, Romijn RA, Hemrika W, et al.. Crystal structures of TAFI elucidate the inactivation mechanism of activated TAFI: a novel mechanism for enzyme autoregulation. *Eric G Huizinga. Blood.* 2008;112(7):2803-9.
 - 13) Brouwers GJ, Vos HL, Leebeek FW, Bulk S, Schneider M, Boffa M, et al. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels. *Blood.* 2001;98(6):1992-3.
 - 14) Schneider M, Boffa M, Stewart R, Rahman M, Koschinsky M, Nesheim M. Two naturally occurring variants of TAFI (Thr-325 and Ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. *J Biol Chem.* 2002;277(2):1021-30.
 - 15) Eichinger S, Schönauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, H Mirko, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood.* 2004;103(10):3773-6.
 - 16) Silveira A, Schattelman K, Goossens F, Moor E, Scharpé S, Strömqvist M, Hendriks D, et al. Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2000; 84(3): 364-8.
 - 17) Yaoita N, Satoh K, Satoh T, Sugimura K, Tatebe S, Yamamoto S, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36(6): 1293-301.
 - 18) Satoh T, Satoh K, Yaoita N, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, et al. Activated TAFI Promotes the Development of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Possible Novel Therapeutic Target. *Circ Res.* 2017; 120(8): 1246-1262.
 - 19) Song JJ, Hwang I, Cho KH, Garcia MA, Kim AJ, Wang TH. Plasma carboxypeptidase B downregulates inflammatory responses in autoimmune arthritis. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3517-27.
 - 20) Sato T, Miwa T, Akatsu H, Matsukawa N, Obata K, Okada N, et al. Procarboxypeptidase R is an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not. *J Immunol.* 2000;165(2):1053-8.
 - 21) Asai S, Kimbara N, Tada T, Imai M, Campbell W, Okada H, et al. Procarboxypeptidase R deficiency causes increased lethality in concanavalin A-induced hepatitis in female mice. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(7):1256-9.
 - 22) Campbell WD, Lazoura E, Okada N, Okada H. Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol Immunol.* 2002;46(2):131-4.
 - 23) Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol*

- Chem. 2003;278(51):51059-67.
- 24) Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, Motoyama N, et al. Absence of procarboxypeptidase R induces complement-mediated lethal inflammation in lipopolysaccharide-primed mice. *J Immunol.* 2004;173(7):4669-74.
 - 25) Mueller-Ortiz S L, Wang D, Morales JE, L Li, 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.* 2009;182(10):6533-9.
 - 26) Vollrath J T, Marzi I, Herminghaus A, Lustenberger T, Relja B. Post-Traumatic Sepsis Is Associated with Increased C5a and Decreased TAFI Levels. *J Clin Med.* 2020;9(4):1230.
 - 27) Relja B, Lustenberger T, Puttkammer B, Jakob H, Morser J, Gabazza EC, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) is enhanced in major trauma patients without infectious complications. *Immunobiology.* 2013 Apr;218(4):470-6.
 - 28) Hataji O, Taguchi O, Gabazza EC, Yuda H, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujimoto H, et al. Increased circulating levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in lung cancer patients. *Am J Hematol.* 2004 Jul;76(3):214-9
 - 29) Koldas M, Gummus M, Seker M, Seval H, Hulya K, Dane F et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2008 Mar;9(2):112-5.
 - 30) Kaftan O, Kasapoglu B, Koroglu M, Kosar A, Yalcin SK. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in breast cancer patients. *Med Princ Pract.* 2011;20(4):332-5.
 - 31) Yu C, Luan Y, Wang Z, Zhao J, Xu C. Suppression of TAFI by siRNA inhibits invasion and migration of breast cancer cells. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):3469-3474.
 - 32) Van Thiel DH, George M, Fareed J. Low levels of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in patients with chronic liver disease. *Thromb Haemost.* 2001;85(4):667-70.
 - 33) Watanabe R, Wada H, Watanabe Y, Sakakura M, Nakasaki T, Mori Y, et al. Activity and antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 2001;104(1):1-6.
 - 34) Wada H, Nobori T, Watanabe R, Shiku H, Sakuragawa N. Plasma Levels of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) and Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) in Patients with Disseminated Intravascular Coagulation (DIC). *Turk J Haematol.* 2002;19(2):235-7.
 - 35) Emonts M, de Bruijne EL, Guimarães AH, Declerck PJ, Leebeek FW, de Maat MP, et.al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor is associated with severity and outcome of severe meningococcal infection in children. *J Thromb Haemost.* 2008;6(2):268-76.
 - 36) Chen CC, Lee K-D, Gau JP, Yu YB, You JY, Lee SC, et al. Plasma antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor did not differ in patients with or without disseminated intravascular coagulation. *Ann Hematol.* 2005;84(10):675-80.
 - 37) Özcan MA, Akarsu M, Demirkan F, Akpınar H, Yüksel F, Özsan GH, et al. Plasma levels

- of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor antigen in active and inactive inflammatory bowel disease. *Turk J Haematol.* 2006;23(2):94-9.
- 38) Koutroubakis IE, Sfiridaki A, Tsiolakidou G, Coucoutsis C, Theodoropoulou A, Kouroumalis EA. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 levels in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20(9):912-6.
 - 39) Gils A, Alessi MC, Brouwers E, Peeters M, Marx P, Leurs J, et al. Development of a genotype 325-specific proCPU/TAFI ELISA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jun 1;23(6):1122-7.
 - 40) Song JJ, Hwang I, Cho KH, Garcia MA, Kim AJ, Wang TH. Plasma carboxypeptidase B downregulates inflammatory responses in autoimmune arthritis. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3517-27.
 - 41) Abe T, Sasaki A, Ueda T, Miyakawa Y, Ochiai H. Complement-mediated thrombotic microangiopathy secondary to sepsis-induced disseminated intravascular coagulation successfully treated with eculizumab: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(6):e6056.
 - 42) Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, Rafail SS, Theodorou V, Konstantonis D, et.al. 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.* 2008;180(11):7368-75.
 - 43) Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, et al. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol.* 2006;177(7):4794-802.
 - 44) Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y. C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb Haemost.* 1997;77(2):394-8.
 - 45) Skjeflo EW, Christiansen D, Fure H, Ludviksen JK, Woodruff TM, Espevik T, et al. Staphylococcus aureus-induced complement activation promotes tissue factor-mediated coagulation. *J Thromb Haemost.* 2018;16(5):905-918.
 - 46) Øvstebø R, Hellum M, Aass HCD, Trøseid AM, Brandtzaeg P, Mollnes TE, et.al. Microparticle-associated tissue factor activity is reduced by inhibition of the complement protein 5 in Neisseria meningitidis-exposed whole blood. *Innate Immun.* 2014;20(5):552-60.
 - 47) Devos T, Meers S, Boeckx N, Gothot A, Deeren D, Chatelain B, et al. Diagnosis and management of PNH: Review and recommendations from a Belgian expert panel. *Eur J Haematol.* 2018;101(6):737-749
 - 48) Zhang K, Lu Y, Harley KT, Tran MH. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Brief Review. *Hematol Rep.* 2017;9(2):7053.
 - 49) Fletcher-Sandersjö A, Bellander BM. Is COVID-19 associated thrombosis caused by overactivation of the complement cascade? A literature review. *Thromb Res.* 2020;194:36-41.
 - 50) Nougier C, Benoit R, Simon M, Desmurs-Clavel H, Marcotte G, Argaud L, et al. Hypofibrinolytic state and high thrombin

generation may play a major role in SARS-COV2 associated thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2020;18(9):2215-2219.

- 51) Garcia CC, Weston-Davies W, Russo RC, Tavares LP, Rachid MA, Alves-Filho JC, et al. Complement C5 activation during influenza A infection in mice contributes to neutrophil recruitment and lung injury. *PLoS One.* 2013;8(5) :e64443.
- 52) Palmer LJ, Damgaard C, Holmstrup P, Nielsen CH. Influence of complement on neutrophil extracellular trap release induced by bacteria. *J Periodontal Res.* 2016;51(1):70-

6.

- 53) Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, Mastellos DC, Simeon M, Rafailidis P, et al. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *Clin Invest.* 2020;130(11):6151-6157.
- 54) Zhang Y, Han K, Du C, Li R, Liu J, Zeng H, et al. Carboxypeptidase B blocks ex vivo activation of the anaphylatoxin-neutrophil extracellular trap axis in neutrophils from COVID-19 patients. *CritCare.* 2021;25(1):51