

創薬の新たな標的分子としての G 蛋白共役型プロテアーゼ受容体 PAR (protease-activated receptor)

川畑 篤 史

近畿大学薬学部, 〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1

The G Protein-Coupled Protease Receptor PAR (Protease-Activated Receptor) as a Novel Target for Drug Development

Atsufumi KAWABATA

Department of Pathophysiology & Therapeutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

(Received August 2, 2000)

The protease-activated receptor (PAR) is the family of G protein-coupled, seven transmembrane domain receptors, currently consisting of four members, PARs 1-4. The activation of PARs occurs by proteolytic unmasking of the N-terminal cryptic receptor-activating tethered ligand. In the past decade since the cloning of PAR-1, physiological roles that PARs play have been gradually understood and are now considered extremely extensive and important. This review describes physiological and/or pathophysiological roles of PARs in the circulatory, digestive, respiratory and central nervous systems, on the basis of our works and of those achieved by other research groups. The future perspective of studies on PARs is also discussed, focusing on the possibility of clinical application of PAR-targeted drugs.

Key words—protease-activated receptor (PAR); G protein-coupled receptor; thrombin; trypsin; tryptase

はじめに

プロテアーゼ受容体 PAR (protease-activated receptor) は、G 蛋白共役 7 回膜貫通型受容体の一種であり、トロンビン、トリプシンなどのセリンプロテアーゼの細胞作用を媒介する受容体ファミリーである。現在までに 4 つの PAR (PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4)¹⁻⁵⁾ がクローニングされており、今後さらに新たなファミリーメンバーが発見される可能性が高い。4 つの PAR のうち、PAR-1, PAR-3, PAR-4 はいずれもトロンビンによる血小板凝集を媒介する受容体としてクローニングされた。^{1,3-5)} 一方、マウス PAR-2 のアミノ酸配列は、ヒトあるいはマウス PAR-1 と 30% 程度の類似性があり、²⁾ 機能的にも PAR-2 は PAR-1 と多くの共通点を有しているが、トロンビンでは活性化されず、トリプシンや肥満細胞中に存在するトリプターゼで活性化される。^{2,6)} Fig. 1 はヒト PAR-1 の活性化メカニズムを示したものである。生体内において、トロンビンは、PAR-1 分子の N 末側のペプチド鎖を特定部位で切断することにより、受容体活性化配列 SFLLR... を露出させ、これが tethered ligand となって受容体自身の別の部位に結合し、受容体の活性化が起こる。同様の機序でトロンビンは PAR-3 及び

PAR-4 を、またトリプシンやトリプターゼは PAR-2 を活性化させる。前述のように、PAR-1, PAR-3, PAR-4 はいずれもトロンビンの受容体であるが、トリプシンは比較的低濃度で PAR-4 を、また高濃度側では PAR-1 をも活性化する^{4,5)} (Table 1)。さらに、cathepsin G は PAR-4 を、⁷⁾ 第 VIIa, Xa 因子はいずれも PAR-2 を⁸⁾ 活性化することが示唆されており、各受容体の内因性アゴニスト酵素は必ずしも 1 つではないと最近は考えられつつある

Table 1. Agonist Enzymes and N-Terminal Cryptic Receptor-Activating Sequences for PARs

Receptor	Agonist enzymes	Receptor-activating sequences (species)
PAR-1	Thrombin, trypsin (at high conc.)	SFLLRN... (human) TFRIFD... (frog)
PAR-2	Trypsin, tryptase, factor VIIa/tissue factor, factor Xa	SLIGKV... (human) SLIGRL... (mouse, rat)
PAR-3	Thrombin	TFRGAP... (human) SFNGGP... (mouse)
PAR-4	Thrombin, trypsin, cathepsin G	GYPGQV... (human) GYPGKF... (mouse)

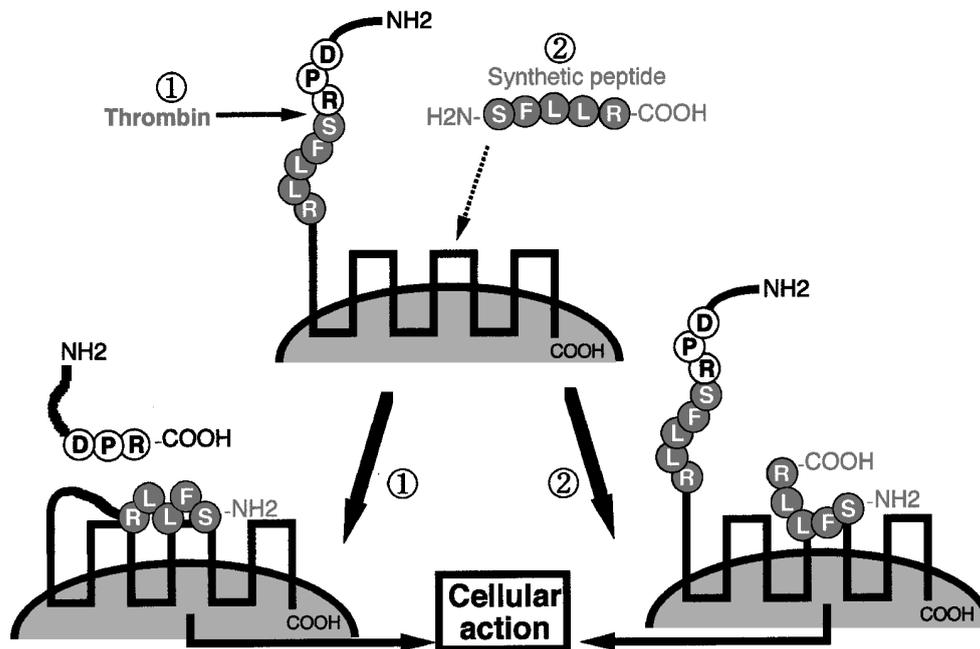


Fig. 1. Mechanisms of Activation of PAR-1 Caused by the Agonist Enzyme Thrombin (1) and by the Synthetic Receptor-Activating Peptide Based on the N-Terminal Amino Acid Sequence of the Tethered Ligand of PAR-1 (2)

The tethered ligand and synthetic peptide bind to the extracellular second loop of the PAR-1 molecule, resulting in cellular responses.

(Table 1).

興味あることに、これまでにクローニングされている4つのPARのうち、PAR-1、PAR-2及びPAR-4はtethered ligandの受容体活性化配列に基づくアミノ酸5-6個からなる合成ペプチドを外来性に与えることによって非酵素的に活性化される(Fig. 1)。これらのペプチドの誘導体がアゴニスト、アンタゴニスト候補として既にいくつか合成されており、将来PARを標的とする医薬品の開発に発展する可能性も十分に考えられる。ただし、現時点ではアンタゴニストに関しては、PAR-1アンタゴニストはいくつか有望なものが合成されているが、⁹⁾他のPARのアンタゴニストは未だ見出されていない。一方、PAR-3は合成ペプチドでは活性化させることができない。ごく最近、少なくともマウスのPAR-3はそれ自身では細胞シグナルを引き起こすことはできず、PAR-4との共存下においてPAR-4のco-factorとして働くことによりPAR-4のトロンビンに対する感受性を高めることが証明された。¹⁰⁾ヒトPAR-3が同様の機能を有するか否かは未だ分かっていない。

1. 抗血小板薬開発のための標的としてのPAR

血小板に存在するPARは、主としてトロンビンに対する血小板反応を媒介しているが、Table 2に示すように、非常に大きな種差がある。¹¹⁻¹³⁾ヒト血小板のトロンビン凝集はPAR-1及びPAR-4を介して起こるので、¹⁴⁾これらのアンタゴニストが抗血小板薬として応用できる可能性が考えられる。PAR-1とPAR-4を比較すると、前者の方がより低

Table 2. Species Difference of Functional PARs Present in Platelets

Species	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Human	+	-	-	+
Non-human primates	+	unknown	unknown	unknown
Mouse	-	-	+	+
Rat	-	-	+	+
Guinea pig	+	-	unknown	-
Hamster	-	unknown	unknown	unknown
Rabbit	-	unknown	unknown	unknown
Dog	-	unknown	unknown	unknown
Pig	±	unknown	unknown	unknown

The presence of each PAR was evaluated in terms of ability to produce platelet aggregation. +: marked aggregation, ±: slight aggregation, -: no aggregation.

濃度のトロンビンで活性化し、^{4,5,14)}また活性化の程度も大きい。¹⁵⁾このことから、トロンビン誘発ヒト血小板活性化においては、PAR-4はPAR-1の機能を補助しているに過ぎないと当初は考えられた。^{4,5,14)}しかし、最近になって、トロンビンによるPAR-1の活性化は一過性の細胞内カルシウムシグナルを惹起するのに対し、PAR-4の活性化はより持続的なシグナルを誘発することが明らかとなり、両受容体がそれぞれ異なった機能的特徴を有することが示唆されている。¹⁶⁾ラットやマウスの血小板は機能的PAR-1を発現していないが、モルモット血小板はヒト血小板と多くの類似した性質を有してお

り、また PAR-1 を発現していることから、^{11,12)} 抗血小板薬、特に PAR-1 アンタゴニストの *in vivo* あるいは *ex vivo* での効果を調べるのに有用である。しかし、モルモット血小板は PAR-4 アゴニストでは凝集しないので、¹³⁾ PAR-4 アンタゴニストの効果を調べるためには用いることができず、この場合はむしろラットやマウスが利用できるかもしれない。このように血小板のトロンビン受容体 (PAR-1, PAR-3, PAR-4) の種差 (Table 2) を十分に考慮して PAR アンタゴニストの抗血小板作用を検討する必要がある。PAR-1 あるいは PAR-4 のアンタゴニストは、トロンビンによる血漿凝固などには影響しないので、ヘパリンやヒルジンなどとは異なりトロンビンの血小板活性化作用を特異的に抑制することが期待できる。

2. PAR と急性炎症

カラゲニン誘発足浮腫が抗トロンビン作用を有するヒルジン類似物質により抑制されることが知られている。¹⁷⁾ またトロンビンは PAR-1 を介して炎症を誘発する。^{17,18)} これは主として末梢局所に存在する肥満細胞の脱顆粒に起因すると考えられるが、^{17,18)} 肥満細胞非依存性の部分もあるようである。¹⁹⁾ 我々の実験においては、ラット腹腔由来肥満細胞では PAR-1 mRNA の発現は認められたものの、トロンビンあるいは PAR-1 アゴニストでの刺激によって脱顆粒 (ヒスタミン遊離) は誘発されなかった。²⁰⁾ このことより、*in vivo* でのトロンビンの作用は肥満細胞以外に存在する PAR-1 の活性化を介する二次的な肥満細胞脱顆粒を反映したものであるかもしれない。しかし、マウス骨髄由来の肥満細胞ではトロンビンによる脱顆粒が起こることが報告されているので、²¹⁾ 肥満細胞の性質が存在部位によって異なる可能性も否定できない。一方、トロンビンは PAR-1 非依存性に抗炎症的にも作用することが示唆されており、¹⁹⁾ 炎症とトロンビンの関係は複雑である。

PAR-2 アゴニストである SLIGRL-NH₂ を低用量でラットの足底内に投与すると一過性の血管透過性亢進が見られ、この効果は compound 48/80 の反復前処置により肥満細胞を枯渇させておくと部分的に抑制される。²²⁾ すなわち、PAR-2 アゴニストにより肥満細胞の脱顆粒が起こり一過性の炎症反応が誘発されることが示唆された。²²⁾ しかし、*in vitro* においてラット腹腔由来肥満細胞では、PAR-2 mRNA は RT-PCR 法によっては検出されず、PAR-2 アゴニストによる脱顆粒も起こらなかった。²⁰⁾ 驚くべきことに、不活性型ペプチドである L¹SLIGRL-NH₂ によってラット腹腔肥満細胞の脱顆粒が誘発された。²⁰⁾ これらのことより、低濃度の SLIGRL-NH₂ によって *in vivo* において惹起される肥満細胞依存性の一過性炎症は、肥満細胞以外の細胞・組織に対する作用を介する 2 次的なものである可能性が高

く、また PAR-2 を介さない非特異的な効果である可能性も否定できない。

一方、非常に高濃度の SLIGRL-NH₂ をラットの足底内に投与すると、長時間 (5 時間程度) 持続する浮腫が誘発される。²³⁾ これは、compound 48/80 では阻害されないことより、肥満細胞非依存性である。²³⁾ 最近、知覚神経の C-fiber に PAR-2 が発現していることが見出され、PAR-2 活性化により substance P 及び CGRP の遊離が起こることが証明された。²⁴⁾ さらに、高濃度の SLIGRL-NH₂ により誘発される持続性浮腫が、カプサイシン前処置、CGRP₁ 受容体拮抗薬、NK₁ 受容体拮抗薬により抑制されることが示され、PAR-2 アゴニストが C-fiber を刺激することにより炎症を誘発することが示唆された。²⁴⁾ このように、PAR-2 は神経性炎症の発現において重要な役割を演じている可能性が考えられ、将来、PAR-2 の特異的アンタゴニストが見出されれば新しいタイプの抗炎症薬として応用することも可能かもしれない。

3. 消化器系における PAR の多様な役割と PAR を標的とした消化機能調節薬の開発の可能性

PAR、特に PAR-1 及び PAR-2 は消化器系全般に亘って豊富に分布しており、種々の消化器系機能に深く関わっていることが次第に明らかになってきた (Table 3)。3 つの大唾液腺 (耳下腺、顎下腺、舌下腺) では、PAR-1 及び PAR-2 の mRNA がいずれも発現しているが、^{25,26)} PAR-2 アゴニストのみが *in vivo* において唾液分泌を誘発する。²⁵⁾ また *in vitro* において PAR-2 活性化酵素であるトリプシン及び PAR-2 アゴニストペプチドは、耳下腺スライスからのアミラーゼ分泌²⁵⁾ 及び摘出舌下腺組織からのムチン分泌²⁶⁾ を惹起する。PAR-2 を介する唾液腺分泌反応は、アトロピン、フェントラミン、プロプラノロール、インドメタシンでは抑制されないことより、ムスカリン受容体、 α 及び β 受容体、プロスタグランジンの関与はないと考えられる。²⁵⁾ また、PAR-2 活性化後の細胞内シグナルトランスダクション機構はまだよく分かっていないが、PAR-2 を介する舌下腺からのムチン分泌はチロシンキナーゼ阻害薬である genistein によって部分的に抑制される。²⁶⁾ 一方、PAR-2 は膵臓にも多く存在し、^{25,27,28)} *in vivo* において膵液分泌を制御し、²⁵⁾ また *in vitro* においては腺房細胞からのアミラーゼ分泌²⁷⁾ 並びに膵管細胞におけるイオンチャネルの活性化を刺激する。²⁸⁾ PAR-2 を介する膵外分泌反応に関与する細胞内シグナルトランスダクション機構は現在検討中である。このように、PAR-2 は消化性外分泌の調節に深く関わっているが、その生理的意義はまだよく分かっていない。例えば、炎症時に肥満細胞の脱顆粒に伴って分泌されるトリプターゼが唾液腺や膵臓の PAR-2 を活性化し両組織中の毒素を排泄するように働く可能性も考えられ、病態時の防御機構の一

Table 3. Physiological Roles of PARs in the Alimentary Systems

Organ	PAR-1	PAR-2	PAR-4	Ref, No.
Salivary gland		Salivation		25)
		Amylase secretion		25)
		Mucin secretion		26)
Esophagus	SM contraction		SM relaxation	29)
Stomach	SM contraction & relaxation	SM contraction & relaxation	SM contraction	32-35)
		Mucus secretion		37)
Small intestine	SM contraction & relaxation	SM contraction		30, 36)
		Regulation of ion transport		38)
		Formation of prostaglandins		39)
Colon		SM relaxation		31)
Pancreas		Regulation of juice secretion		25)
		Amylase secretion		27)
		Regulation of ion transport		28)

SM: smooth muscle.

端を PAR-2 が担っているとの仮説も成り立つ。

食道では、PAR は粘膜筋板の運動調節を行っている。²⁹⁾ トロンピンは低濃度側では PAR-1 を活性化することにより食道粘膜筋板を収縮させ、また高濃度になると PAR-1 に加えて PAR-4 が活性化され弛緩反応が誘起される。一方、PAR-2 はこの平滑筋の運動性の制御には関与していない。PAR-4 はこれまで PAR-1 の機能を補助しているにすぎないとの考え方もあったが、食道粘膜筋板において PAR-4 が PAR-1 とは全く逆の機能を有することが見出されたことは、PAR-4 の生理的役割の重要性を示唆するものとも言える。例えば、体内出血時や炎症時に筋組織に到達したトロンピンを PAR-1 がセンサーとして感知し筋を収縮させ、ある程度以上にトロンピンの濃度が上昇すると PAR-4 が活性化されて過度の収縮を抑制する方向に働くのではないかと考えられる。PAR-1 を介する収縮反応は、主として「Na⁺ イオン透過性亢進→細胞膜脱分極→電位依存性 Ca²⁺ チャンネルの開口→細胞外からの Ca²⁺ 流入」という経路を介して起こる。²⁹⁾ 一方、PAR-4 を介する弛緩反応はテトロドトキシン抵抗性であり、K⁺ チャンネル、プロスタグランジン、NO などにも非依存性である。²⁹⁾

胃・腸の平滑筋運動も PAR により強く制御されている。ラット摘出十二指腸の縦走筋は、PAR-1 活性化により、一過性の弛緩反応とそれに続く強い収縮反応を示す。³⁰⁾ 一方、この標本は PAR-2 活性化により収縮反応のみを示し、PAR-4 アゴニストには反応しない。³⁰⁾ PAR-1 を介する 2 相性反応のうち最初の弛緩反応は、K⁺ チャンネル阻害薬の 1 つであるアパミン存在下では完全に消失し、収縮反応は著しく増強される。一方、カリブドトキシンではそのような作用は見られない。このことから、PAR-1 を介する弛緩反応は Ca-activated, small con-

ductance K⁺ チャンネルの活性化によって誘発されるものと考えられる。摘出結腸の自発性収縮が PAR-2 アゴニストによって抑制されることも報告されているが、³¹⁾ これが K⁺ チャンネルの活性化を介したものであるか否かは未だ分かっていない。一方、胃縦走筋では、PAR-1 及び PAR-2 いずれの活性化によっても収縮及び弛緩反応が惹起され、³²⁻³⁴⁾ この弛緩反応はやはりアパミンによって完全に阻害される。³⁴⁾ また PAR-4 の活性化によっても胃縦走筋は収縮する。³⁵⁾ このように胃・腸平滑筋運動は PAR により強く制御されている。PAR-1 あるいは PAR-2 を介する胃・腸の平滑筋収縮反応に関与する細胞内シグナルトランスダクション機構に関しては、先述の「Na⁺ イオン透過性亢進→細胞膜脱分極→電位依存性 Ca²⁺ チャンネルの開口→細胞外からの Ca²⁺ 流入」という経路に加え、ホスホリパーゼ C、蛋白キナーゼ C、チロシンキナーゼ、フォスファチジルイノシトール 3'-キナーゼなどの関与も示唆されている。^{30,32,36)} 以上のような PAR による多様な胃腸運動の制御の生理的意義は、組織損傷・体内出血時や炎症下での単純なセンサーとしての機能のみで説明し難い。我々は、*in vivo* において PAR-1 及び PAR-2 のアゴニストが小腸炭末輸送能を強く促進することを見出しており (未発表)、少なくともこれらの受容体の活性化により胃腸管内容物の除去が促進される。

胃・腸系において、PAR-2 は平滑筋運動以外の機能の調節にも関与している。我々は、*in vivo* において PAR-2 アゴニストが胃粘膜粘液の分泌を促進し、実験的胃潰瘍モデルにおいて強い胃粘膜保護作用を示すことを最近見出しており、³⁷⁾ PAR-2 アゴニストが今までにない新しい胃潰瘍治療薬として応用できる可能性を示唆している。また、小腸では PAR-2 がイオン輸送³⁸⁾やプロスタグランジンの産

生³⁹⁾に關与することも報告されている。

4. 呼吸器系領域における PAR アゴニストの作用

気道平滑筋の運動性も PAR によって制御されている。PAR-1 及び PAR-2 のアゴニストは気道平滑筋に直接作用することにより収縮反応を誘起するが、気道上皮に存在する PAR-1 及び PAR-2 の活性化を介してプロスタグランジンの産生を刺激し、これにより気道平滑筋を強く弛緩させる。⁴⁰⁾そこで、PAR-2 アゴニストのエアロゾル剤を作成し、*in vivo* においてモルモットに吸入させると、気道内腔上皮の PAR-2 のみが活性化され、セロトニンによる気道抵抗の増加が半分以下に抑制されることが報告された。⁴⁰⁾直接作用による平滑筋収縮作用は、PAR-1 アゴニストに比べて PAR-2 アゴニストの方がはるかに小さいので、実用面では後者の方がより有用である。⁴⁰⁾ PAR-4 も気道においては本質的に PAR-1 及び PAR-2 と同様の機能を有しているようである。⁴¹⁾気道上皮に存在する PAR-2 の内因性アゴニストとしては、まず、肥満細胞のトリプターゼが考えられるが、気道上皮にトリプシン・トリプシノーゲンが存在することも見出されている。⁴⁰⁾以上より、PAR 関連薬は閉塞性肺疾患治療薬への応用が可能であるかもしれない。

5. 脳保護薬としての PAR アゴニストあるいはアンタゴニストの応用

PAR-1 は脳内にも多く発現している。⁴²⁾一方、プロトロンビンの mRNA も脳内に認められているが、⁴²⁾トロンビン以外の内因性アゴニスト酵素が脳内に存在する可能性も考えられる。また、炎症や脳内出血時には血液中のトロンビンによって脳内の PAR-1 が活性化されうる。トロンビン及び PAR-1 アゴニストペプチドは低濃度側では神経細胞及びアストロサイトに対して保護的に作用し、高濃度になると逆に細胞死を誘発する。⁴³⁾ラットの脳実質にトロンビンを微量注入すると、血液・脳関門の損傷及び脳浮腫が誘発されることから、脳内出血後に見られる脳浮腫の形成にトロンビンが関与する可能性が指摘されている。⁴⁴⁾また、*in vivo* での虚血脳傷害モデルでは、トロンビンは低濃度側ではやはり神経細胞に対して保護的に作用するが、高濃度側ではむしろ神経細胞傷害を悪化させる。⁴⁵⁾一方、PAR-2 mRNA はノーザンプロットなどでは脳では検出されないことより、²⁾当初、PAR-2 は脳には存在しないと考えられていたが、現在は PAR-2 も脳内神経細胞やグリアに存在し細胞死に關与すると考えられている。⁴⁶⁾ PAR-2 の脳内における内因性アゴニスト酵素が何であるかは未解明であるが、最近、ラット脳より精製されたトリプシン様のセリンプロテアーゼが PAR-2 を活性化させることが報告されている。⁴⁷⁾以上のように、脳神経細胞の保護及び細胞死のいずれにも PAR-1 あるいは PAR-2 が深く関わっていることより、これらの受容体のアゴニストあ

るいはアンタゴニストが脳出血や脳虚血時の脳神経細胞保護薬として応用できる可能性が考えられる。

6. 心血管系疾患と PAR

PAR-1, PAR-2 及び PAR-4 はいずれも血管内皮細胞に存在し、アゴニスト刺激により NO を遊離し血管を拡張させる。^{35,48,49)} PAR-1 は血管平滑筋にも存在し、これが活性化されると血管収縮が誘起される。⁴⁸⁾ *In vivo* においても、PAR-1 アゴニストあるいは PAR-2 アゴニストを投与すると一過性の血圧低下が認められる。⁵⁰⁾血管内での血液凝固性が高まりトロンビンが過剰に産生された場合に、血管内皮の PAR-1 が活性化されて NO 依存性に血管が拡張することは血栓の形成を防止し、血流を確保する上で都合がよい。一方、血管が損傷されて、トロンビンが平滑筋にまで到達して血管の収縮が起こることは、過度の出血を防ぐ上で有用である。このように考えると、トロンビン受容体である PAR-1 及び PAR-4 の血管系における生理的役割は理解しやすい。一方、血管内皮に存在する PAR-2 は、肥満細胞由来のトリプターゼ⁶⁾や第 VIIa, Xa 凝固因子によって活性化されうるが、⁸⁾その生理的意義を理解することは容易ではない。興味あることに、高血圧自然発症ラット (SHR) では脳血管の内皮由来 NO 依存性弛緩反応が傷害されているが、PAR-2 を介する内皮依存性弛緩反応は逆に著しく増強されていることから、慢性高血圧下において PAR-2 は脳血流を保持する方向に機能する可能性が考えられている。⁵¹⁾培養ヒト臍帯静脈内皮細胞において、TNF- α 、インターロイキン 1 α あるいはエンドトキシンなどの炎症性刺激により PAR-2 の発現が強く誘導されることが報告されている。⁵²⁾ *In vivo* においても、エンドトキシンの投与により血管内皮 PAR-2 が誘導され、敗血症下での低血圧に PAR-2 が関与することが示唆されている。⁵³⁾また、ラットの頸動脈をバルーンカテーテルで損傷させた場合にも PAR-2 の誘導が認められる。⁵⁴⁾一方、PAR-2 アゴニストは心臓の虚血-再灌流傷害を抑制する。⁵⁵⁾以上のように PAR-2 は炎症や組織損傷時に重要な役割を演じていると考えられ、PAR-2 アゴニストあるいはアンタゴニストが将来心血管系疾患の治療薬として応用できるかもしれない。

おわりに

PAR は上記以外にも多様な生理的・病態生理学的役割を有する。例えば、PAR が癌細胞の増殖に關与すること、⁵⁶⁾さらに血管新生^{57,58)}や細胞浸潤⁵⁹⁾を促進し癌転移にも關与することが報告されている。また、PAR-1 及び PAR-2 の発現は腎臓にも強く認められ、^{2,60)} PAR-1 が腎炎の発症に關与することも示唆されている。⁶⁰⁾このように、1991 年に PAR-1 がクローニング¹⁾されてから約 10 年の間に PAR の多様な生理的役割が次々に明らかとなり、最近、その重要性が認識されるようになってきた。

今後は、これまでの研究成果が創薬にどのように生かされるかが多いに期待されるところである。

謝辞 本総説で紹介した著者の研究成果は、近畿大学薬学部病態生理学研究室において得られたものであり、ご支援とご助言を賜りました黒田良太郎教授並びに実験にご協力を頂きました同研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。また、一部共同研究をさせて頂いた近畿大学薬学部医薬品情報学研究室、掛樋一晃教授及び同研究室の方々、さらに扶桑薬品工業株式会社研究開発センターの皆様に心より感謝いたします。なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって行われたものであり、併せて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Vu T.-K. H., Hung D. T., Wheaton V. I., Coughlin S. R., *Cell*, **64**, 1057-1068 (1991).
- 2) Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9208-9212 (1994).
- 3) Ishihara H., Connolly A. J., Zeng D., Kahn M. L., Zheng Y. W., Timmons C., Tram T., Coughlin S. R., *Nature*, **386**, 502-506 (1997).
- 4) Xu W.-F., Andersen H., Whitmore T. E., Presnell S. R., Yee D. P., Ching A., Gilbert T., Davie E. W., Goster D. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6642-6646 (1998).
- 5) Kahn M. L., Zheng Y. W., Huang W., Bigornia V., Zeng D., Moff S., Farese R. V. Jr, Tam C., Coughlin S. R., *Nature*, **394**, 690-694 (1998).
- 6) Kawabata A., Kuroda R., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 171-174 (2000).
- 7) Sambrano G. R., Huang W., Faruqi T., Mahrus S., Craik C., Coughlin S. R., *J. Biol. Chem.*, **275**, 6819-6823 (2000).
- 8) Camerer E., Huang W., Coughlin S. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 5255-5260 (2000).
- 9) Andrade-Gordon P., Maryanoff B. E., Derian C. K., Zhang H.-C., Addo M. F., Darrow A. L., Eckardt A. J., Hoekstra W. J., McComsey D. F., Oksenberg D., Reynolds E. E., Santulli R. J., Scarborough R. M., Smith C. E., White K. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 12257-12262 (1999).
- 10) Nakanishi-Matsui M., Zheng Y.-W., Sulciner D. J., Weiss E. J., Ludeman M. J., Coughlin S. R., *Nature*, **404**, 609-613 (2000).
- 11) Connolly T. M., Condra C., Feng D.-M., Cook J. J., Stranieri M. T., Reilly C. F., Nutt R. F., Gould R. J., *Thromb. Haemost.*, **72**, 627-633 (1994).
- 12) Derian C. K., Santulli R. J., Tomko K. A., Haerlein B. J., Andrade-Gordon P., *Thromb. Res.*, **78**, 505-519 (1995).
- 13) Nishikawa H., Kawabata A., Kawai K., Kuroda R., *Blood Coag. Fibrinol.*, **11**, 111-113 (2000).
- 14) Kahn M. L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M. J., Ishihara H., Coughlin S. R., *J. Clin. Invest.*, **103**, 879-887 (1999).
- 15) Andersen H., Greenberg D. L., Fujikawa K., Xu W., Chung D. W., Davie E. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 11189-11193 (1999).
- 16) Shapiro M. J., Weiss E. J., Faruqi T. R., Coughlin S. R., *J. Biol. Chem.*, (2000), in press.
- 17) Cirino G., Cicala C., Bucci M. R., Sorrentino L., Maraganore J. M., Stone S. R., *J. Exp. Med.*, **183**, 821-827 (1996).
- 18) Kawabata A., Kuroda R., Nishikawa H., Asai T., Kataoka K., Taneda M., *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1856-1862 (1999).
- 19) Vergnolle N., Hollenberg M. D., Sharkey K. A., Wallace J. W., *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1262-1268 (1999).
- 20) Nishikawa H., Kawabata A., Kuroda R., Nishida M., Kawai K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 74-77 (2000).
- 21) Razin E., Marx G., *J. Immunol.*, **133**, 3282-3285 (1984).
- 22) Kawabata A., Kuroda R., Minami T., Kataoka K., Taneda M., *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 419-422 (1998).
- 23) Vergnolle N., Hollenberg M. D., Sharkey K. A., Wallace J. W., *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 1083-1090 (1999).
- 24) Steinhoff M., Vergnolle N., Young S. H., Tognetto M., Amadesi S., Ennes H. S., Trevisani M., Hollenberg M. D., Wallace J. L., Caughey G. H., Mitchell S. E., Williams L. M., Gepetti P., Mayer E. A., Bunnett N. W., *Nat. Med.*, **6**, 151-158 (2000).
- 25) Kawabata A., Nishikawa H., Kuroda R., Kawai K., Hollenberg M. D., *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 1808-1814 (2000).
- 26) Kawabata A., Morimoto N., Nishikawa H., Kuroda R., Oda Y., Kakehi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 298-302 (2000).
- 27) Bohm S. K., Kong W., Bromme D., Smeekens S. P., Anderson D. C., Connolly A., Kahn M., Nelken M. A., Coughlin S. R., Payan D. G.,

- Bunnett N. W., *Biochem. J.*, **314**, 1009–1016 (1996).
- 28) Nguyen T. D., Moody N. W., Steinhoff M., Okolo C., Koh D.-S., Bunnett N. W., *J. Clin. Invest.*, **103**, 261–269 (1999).
- 29) Kawabata A., Kuroda R., Kuroki N., Nishikawa H., Kawai K., *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 578–584 (2000).
- 30) Kawabata A., Kuroda R., Nishikawa H., Kawai K., *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 865–872 (1999).
- 31) Corvera C. U., Dery O., McConalogue K., Bohm S. K., Khitin L. M., Caughey G.-H., Payan D. G., Bunnett N. W., *J. Clin. Invest.*, **100**, 1383–1393 (1997).
- 32) Zheng X.-L., Renaux B., Hollenberg M. D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 325–334 (1998).
- 33) Hollenberg M. D., Saifeddine M., Al-Ani B., Kawabata A., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**, 832–841 (1997).
- 34) Cocks T. M., Sozzi B., Moffatt J. D., Selemidis S., *Gastroenterology*, **116**, 586–592 (1999).
- 35) Hollenberg M. D., Saifeddine M., Al-Ani B., Gui Y., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **77**, 458–464 (1999).
- 36) Kawabata A., Kuroda R., Kuroki N., Nishikawa H., Kawai K., Araki H., *Life Sci.*, **67**, 2521–2530 (2000).
- 37) Kawabata A., Kinoshita M., Inagake K., Kuroda R., Oda Y., Kakehi K., Nishikawa H., Araki H., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 67 (2000).
- 38) Vergnolle N., Macnaughton W. K., Al-Ani B., Saifeddine M., Wallace J. L., Hollenberg M. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 7766–7771 (1997).
- 39) Kong W., McConalogue K., Khitin L. M., Hollenberg M. D., Payan D. G., Bohm S. K., Bunnett N. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 8884–8889 (1997).
- 40) Cocks T. M., Fong B., Chow J. M., Anderson G. P., Frauman A. G., Goldie R. G., Henry P. J., Carr M. J., Hamilton J. R., Moffatt J. D., *Nature*, **398**, 156–160 (1999).
- 41) Lan R. S., Stewart G. A., Henry P. J., *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 63–67 (2000).
- 42) Weinstein J. R., Gold S. J., Cunningham D. D., Gall C. M., *J. Neurosci.*, **15**, 2906–2919 (1995).
- 43) Vaughan P. J., Pike C. J., Cotman C. W., Cunningham D. D., *J. Neurosci.*, **15**, 5389–5401 (1995).
- 44) Lee K. R., Kawai N., Kim S., Sagher O., Hoff J. T., *J. Neurosurg.*, **86**, 272–278 (1997).
- 45) Striggow F., Riek M., Breder J., Henrich-Noack, Reymann K. G., Reiser G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 2264–2269 (2000).
- 46) Smith-Swintosky V. L., Cheo-Isaacs C. T., D’Andrea M. R., Santulli R. J., Darrow A. L., Andrade-Gordon P., *J. Neurochem.*, **69**, 1890–1896 (1997).
- 47) Sawada K., Nishibori M., Nakaya N., Wang Z., Saeki K., *J. Neurochem.*, **74**, 1731–1738 (2000).
- 48) Laniyonu A. A., Hollenberg M. D., *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 1680–1686 (1995).
- 49) Saifeddine M., Al-Ani B., Cheng C.-H., Wang L., Hollenberg M. D., *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 521–530 (1996).
- 50) Damiano B. J., Cheung W.-M., Santulli R. J., Fung-Leung W.-P., Ngo K., Ye R. D., Darrow A. L., Derian C. K., de Garavilla L., Andrade-Gordon P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 671–678 (1999).
- 51) Sobey C. G., Moffatt J. D., Cocks T. M., *Stroke*, **30**, 1933–1941 (1999).
- 52) Nystedt S., Ramakrishnan V., Sundelin J., *J. Biol. Chem.*, **271**, 14910–14915 (1996).
- 53) Cicala C., Pinto A., Bucci M., Sorrentino R., Walker B., Harriot P., Cruchley A., Kapas S., Howells G. L., Cirino G., *Circulation*, **99**, 2590–2597 (1999).
- 54) Damiano B. P., D’Andrea M. R., de Garavilla L., Cheung W.-M., Andrade-Gordon P., *Thromb. Haemost.*, **81**, 808–814 (1999).
- 55) Napoli C., Cicala C., Wallace J. L., de Nigris F., Santagada V., Caliendo G., Franconi F., Ignarro L. J., Cirino G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 3678–3683 (2000).
- 56) Miyata S., Koshikawa N., Yasumitsu H., Miyazaki K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 4592–4598 (2000).
- 57) Haralabopoulos G. C., Grant D. S., Kleinman H. K., Maragoudakis M. E., *Am. J. Physiol.*, **273**, C239–C245 (1997).
- 58) Mirza H., Yatsula V., Bahou W. F., *J. Clin. Invest.*, **97**, 1705–1714 (1996).
- 59) Even-Ram S., Uziely B., Cohen P., Grisaru-Granovsky S., Maoz M., Ginzburg Y., Reich R., Vlodaysky I., Bar-Shavit R., *Nat. Med.*, **4**, 909–914 (1998).
- 60) Cunningham M. A., Rondeau E., Chen E., Coughlin S. R., Holdsworth S. R., Tipping P. G., *J. Exp. Med.*, **191**, 455–461 (2000).