

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09639

研究課題名(和文)GVHDモデルを用いた血管内皮障害に対するトロンボモジュリンの有効性の検討

研究課題名(英文) Study on the effects of thrombomodulin on the vascular endothelial damages in GVHD model

研究代表者

長澤 正之 (NAGASAWA, Masayuki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：90262196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症とトロンボモジュリン(TM)の関連をマウス慢性GvHDモデルで検討した。TM投与群では慢性GvHD皮膚病変や慢性GvHDスコアが改善し、その効果は予防的であった。Dalteparinや活性化プロテインCでは改善効果はみられなかった。TM投与群と非投与群で脾細胞の免疫調節性B細胞、T細胞数やTNF- $\alpha$ 、IL17A産生能には有意差は認めなかった。TMはレクチン様ドメイン(D1)、EGF様ドメイン(D2)、セリン/スレオニンリッチドメイン(D3)より構成される。酵母発現系を用いて、D123、D1、D2、D23の各種変異体を作成した。今後、この変異体を用いて研究を進めてゆく。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of thrombomodulin (TM) in the chronic inflammation by using a mouse chronic GvHD model. TM improved the skin lesion of chronic GvHD and chronic GvHD score significantly. This effect worked well prophylactically but not therapeutically. Dalteparin or activated protein C could not present these effects, which indicated the effect of TM on the chronic inflammation was not dependent on anti-coagulation or activated protein C activity. The number of regulatory B cells and regulatory T cells and the production of TNF- $\alpha$ 、IL17A in the spleen cells were not different between TM-treated and control mice. TM is composed of lectin-like domain (D1), EGF-like domain (D2) and serine/threonine-rich domain (D3). To further study the mechanism of TM function on the chronic inflammation, D123, D1, D2, and D23 mutant TM were successfully constructed by using the yeast expression system. We are planning to study by using these mutants.

研究分野：小児血液

キーワード：トロンボモジュリン 慢性GVHD 炎症

## 1. 研究の背景

本研究者はヒト同種造血細胞移植患者における急性GvHDの臨床解析を通じて、同種免疫反応に起因する移植関連合併症の重症化において、リンパ球やそれから分泌される炎症性サイトカインとともに、凝固や酸化ストレス反応が重要な要因となっていることを示してきた。また、移植関連合併症において、凝固反応を生体内で調整する血管内皮細胞表面に発現するトロンボモジュリンが治療の観点から重要な役割を果たすことを示してきた。

## 2. 研究の目的

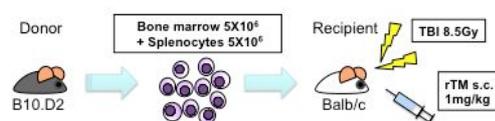
炎症と凝固は従来から密接な関係があることが知られている。血管系の発達していない生物では、外来からの病原体を炎症性細胞から分泌される凝固物質によって閉じ込め、生体を守る機能を担っていた。哺乳類等における古典的な急性炎症は、発熱・発赤・腫脹・疼痛の4徴候を特徴とした病原体(感染)に対する生体反応として理解されていたが、近年、癌を含めた生活習慣病の多くが、慢性炎症と関連があることが示されてきた。しかし、この慢性炎症は、従来の急性炎症の概念では十分説明できないものであり、その病態の解明は未だ十分ではない。今回、慢性炎症のモデルとしてマウス慢性GvHDの系をもちいて、生体内で急性炎症反応に重要な役割を果たすことが示されているトロンボモジュリン(TM)と慢性炎症との関係を研究した。

## 3. 研究の方法

骨髄移植モデル: レシピエントマウス(Balb/c wild type : H2<sup>d</sup>)に全身放射線照射(9Gy)を施行し、ドナーマウス(B10.D2:H2<sup>dm2</sup>)の大腿骨、脛骨から骨髄細胞を採取し、レシピエントマ

ウスに  $5 \times 10^6$  個ずつ輸注する。

慢性 GVHD モデル: ドナーマウス(B10.D2)から脾臓を摘出し、脾臓細胞  $5 \times 10^6$  個を骨髄細胞とともにレシピエントマウス(Balb/c wild type)に輸注する(Figure 1)。



(Figure 1)

rTM(リコンビナント・トロンボモジュリン)

の投与: rTM を週 2 回皮下注射する。

慢性 GVHD の予防効果の評価: 骨髄移植後 25 日目頃から慢性 GVHD が出現する。体重減少率、下痢の程度、皮膚症状を経時的に比較する。また、骨髄移植 8 週目で安楽死させ血液を採取しリンパ球亜群分析を施行、および GVHD の標的臓器である皮膚、肝臓、肺、消化管について、病理学的に GVHD の進展度をスコア化し重症度を比較する。

## 4. 研究成果

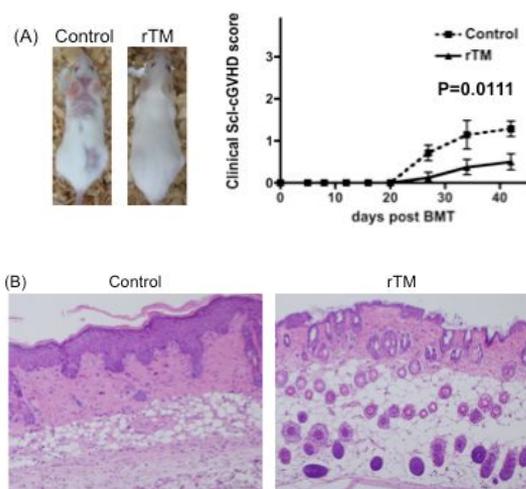
脾臓細胞の投与量を  $15 \times 10^6$ 、 $10 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$  で検討した。前 2 者では急性 GvHD が強く出て観察期間(8 週)までに全てが死亡した。 $5 \times 10^6$  では観察期間での十分な生存が確認できたため、慢性 GVHD モデルとして、脾細胞  $5 \times 10^6$  投与で行うこととした。

次に rTM 投与量を 3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg で検討したところ 3mg/kg 群では死亡例が多く認められ、1mg/kg 投与を至適容量と判断し、実験系で用いることとした。

rTM の慢性 GvHD に対する効果:

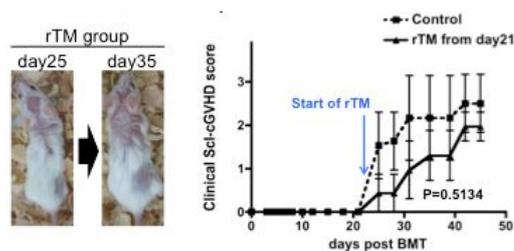
rTM 投与による生存率への影響はなかったが、rTM 投与群は皮膚 GVHD がコントロール群に比

して軽微であった。また、慢性 GvHD スコアによる比較においても、rTM 投与群では症状が軽微であった(Figure 2 A・B)。



(Figure 2 A・B)

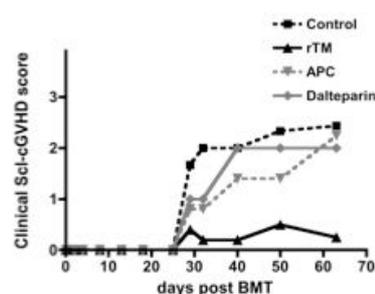
また、投与時期の検討では皮膚慢性 GvHD 症状が顕在化する 3 週目から rTM を投与した場合、その改善効果は弱かった。(Figure 3)



(Figure 3)

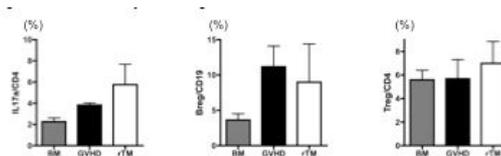
この効果が、rTM の機能として明らかになっている 2 つの生理活性である抗凝固作用によるものか、あるいは APC 活性によるものかを検討するために、ヘパリンおよび APC 投与群で比較した。Figure 4 に示すように、ヘパリン、APC 投与群では rTM 投与群で認められたような改善効果は認められなかった (Figure

4)。



(Figure 4)

次に rTM 投与の影響が免疫機能あるいはサイトカイン産生能に関連しているかどうかを検討するために、脾細胞におけるリンパ球サブセット解析、および GvHD に関連するサイトカインである TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17A 産生を比較した。図に示すように免疫調節性 B 細胞(Breg)、T 細胞(Treg)細胞数に有意差はなく、また TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17A 産生についても有意差は認められなかった。(Figure 5)



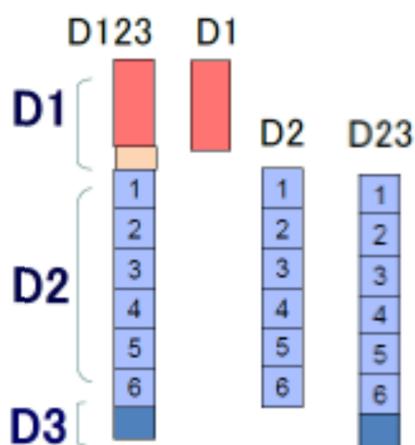
(Figure 5)

以上の結果より、rTM による慢性皮膚 GvHD 予防効果については、今まで明らかになっていない rTM の機能を介している可能性が示唆された。

この問題の解析を進めるために、rTM の変異体作成を試みた。今までの研究により rTM は大きく N 末端のレクチン様ドメイン (D1)、中央部の EGF 様ドメイン (D2)、膜近傍のセリン/スレオニンリッチドメイン (D3) の 3 つの

機能的構造的部分より構成されているといわれる。酵母発現系を用いて、D123,D1,D2,D23の各種変異体を作成した。(Figure 6)

今後は、この変異体をもちいて、rTM による慢性皮膚 GvHD 予防効果の作用機序について解析を進めてゆく予定である。



(Figure 6)

## 5 : 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Mitsuiki N, Tamanuki K, Sei K, Ito J, Kishi A, Kobayashi K, Hatai Y, **Nagasawa M**  
Severe neonatal CMV infection complicated with thrombotic microangiopathy successfully treated with ganciclovir  
*Journal of infection and chemotherapy*  
2017;23:107-110 doi:  
[10.1016/j.jiac.2016.08.007](https://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.08.007)

**Nagasawa M**, Ohkawa T, Takagi M, Imai K, Morio T A stable mixed chimera after SCT with RIC in an infant with IKB $\alpha$

hypermorphic mutation *Journal of Clinical Immunology* 2017;37:413-414 doi:  
[10.1007/s10875-017-0375-9](https://doi.org/10.1007/s10875-017-0375-9)

Hayashi Y, Brun MA, Machida K, Lee S, Murata A, Omori S, Uchiyama H, Inoue Y, Kudo T, Toyofuku T, **Nagasawa M**, Uchimura I, Nakamura T, Muneta T Simultaneous assessments of blood coagulation and hematocrit level in dielectric blood coagulometry *Biorheology* 2017;54:25-35 doi: [10.3233/BIR-16118](https://doi.org/10.3233/BIR-16118).

Mitsuiki N, Kobayashi C, Tamanuki K, Kobayashi K, Hatai Y, Kohyama J, **Nagasawa M** Posterior reversible encephalopathy syndrome after paralytic ileus during B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia induction therapy *Journal of Hematology and Thrombosis* 2017; 3(2): 3 DOI:  
[10.13188/2380-6842.1000020](https://doi.org/10.13188/2380-6842.1000020)

Nagasawa M, Mitsuiki N, Aoki Y, Ono T, Isoda T, Imai K, Takagi M, Kajiwara M, Kanegane H, Morio T Effect of reduced-intensity conditioning and the risk of late-onset non-infectious pulmonary complications in pediatric patients *European Journal of Haematology* 2017;99:525-531 doi: [10.1111/ejh.12967](https://doi.org/10.1111/ejh.12967)

**Nagasawa M**, Mitsuiki N, Endo A, Aoki Y, Ono T, Isoda T, Takagi M, Kajiwara M, Shimizu N, Morio T Sequential virus monitoring of pediatric patients with

hematopoietic stem cell transplantation by multiplex PCR method *Transplantation Open* 2016;1(1):17-24  
[doi:10.15761/JTO.1000105](https://doi.org/10.15761/JTO.1000105)

Kobayashi C, Nagasawa M, Mitsuiki N, Endo A, Aoki Y, Ono T, Imai K, Takagi M, Kajiwara M, Morio T. Recombinant human soluble thrombomodulin is effective for severe childhood EBV-HLH *Journal of Hematology and Thrombosis* 2016; 2(1): 4  
[DOI: 10.13188/2380-6842.1000012](https://doi.org/10.13188/2380-6842.1000012)

Nagasawa M, Ono T, Aoki Y, Isoda T, Takagi M, Imai K, Kajiwara M, Morio T. A pediatric case of very late onset non-infectious pulmonary complication (LONIPC) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Clinical and Experimental Transplantation* 2016; 1: 104 [doi:10.4172/jcet.1000101](https://doi.org/10.4172/jcet.1000101)

Uchimura I, Kaibara M, Nagasawa M, Hayashi Y Effect of circulating tissue factor on the hypercoagulability in type 2 diabetes mellitus studied by rheometry and dielectric blood coagulometry *Biorheology* 2016;53(5-6):209-219.  
[doi: 10.3233/BIR-16107](https://doi.org/10.3233/BIR-16107)

Hayashi Y, Brun MA, Machida K, Nagasawa M. Principles of dielectric blood coagulometry as a comprehensive coagulation test. *Analytical Chemistry* 2015;87(19):10072-9.  
[doi: 10.1021/acs.analchem.5b02723](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02723).

[学会発表](計2件)

Fujiki T, Kuroda R, Maeba H, Noguchi K, Fukuda M, Mase S, Araki R, Ikawa Y, Yachie A, Nagasawa M and Nishimura R. Prophylactic Effects of Recombinant Thrombomodulin Against Sclerodermatous Chronic Graft-Versus-Host Disease in a Rodent Model *59<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition* Atlanta, GA December 9-12, 2017

Masayuki Nagasawa. New blood clotting assay based on the dielectric constant measurement. 2015年10月17日 第77回日本血液学会学術集会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長澤 正之 (NAGASAWA, Masayuki)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号 : 90262196

### (2) 研究分担者

松本 雅則 (MATSUMOTO, Masanori)  
奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 60316081

矢部 普正 (YABE, Hiromasa)

東海大学・医学部・教授

研究者番号 : 70220217

西村 良成 (NISHIMURA, Ryousei)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号 : 50324116