

平成21年 5月 8日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390262  
 研究課題名（和文）生命維持機構としてのプロテインC凝固制御系の分子細胞学的研究  
 研究課題名（英文）Studies on Molecular-Cellular Mechanisms of Protein C Anticoagulant Pathway Crucial for Life Maintenance  
 研究代表者 鈴木 宏治 (Suzuki Koji)  
 三重大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：70077808

研究成果の概要：本研究では、生命維持に重要なプロテインC凝固制御系のうち、(1) 血中 Protein S (PS) の抗凝固作用発現機構、(2) Protein C inhibitor (PCI) による臓器細胞の機能制御機構、および(3) 炎症性内皮障害を制御する細胞間接着分子の同定、に関する研究を行い、感染時の血中 C4BP  $\beta$  の増加が PS の抗凝固作用を低下させ、PCI が臓器固有の機能を制御し、さらに、Cx32 が血管内皮の炎症を制御することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：血栓止血学、分子病態学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液凝固制御、血管内皮細胞、プロテインC、プロテインS、C4b 結合蛋白質、プロテインCインヒビター、トロンボモジュリン、コネキシン

## 1. 研究開始当初の背景

プロテインC(PC)凝固制御系は血管内皮に備わった最も重要な抗血栓機構である。通常、傷害部位では、血液凝固系の活性化で生成されたトロンビンによりフィブリン血栓が形

成されて止血する。しかし、傷害部位以外の場所では、トロンビンは凝固阻害因子として機能する。すなわち、トロンビンは血管内皮上のトロンボモジュリン(TM)に結合して機能変換され、PC受容体(EPCR)に結合した

PC を特異的に活性化する。活性化 PC (APC) はプロテイン S (PS) を補助因子として、凝固系第 Va 因子と第 VIIIa 因子を失活化し、凝固カスケード反応を制御する。他方、トロンビン・TM 複合体及び APC は PC インヒビター (PCI) によって阻害される。臨床的には、PC 凝固制御系因子の PC、TM、EPCR、PS の先天性欠損症は著しい凝固亢進状態を来とし、これらの因子のノックアウト (KO) マウスは播種性血管内凝固症候群 (DIC) や胎生致死を来とし、また、PCI 欠損雄性マウスは不妊となる。これらに加えて、最近、APC が重症感染症 (敗血症) に著功を示すことが証明され、この作用機序の解析から、APC には抗凝固作用と共に抗炎症作用や抗アポトーシス作用を有することが明らかになった。また、ベルギーの Conway らは TM に抗炎症作用を、米国の Zlokovic らは PS に神経保護作用を、さらに我々は、PCI に抗腫瘍作用・血管新生抑制作用を (Int J Cancer 2006) 見出した。これらの結果は、PC 凝固制御系の因子は単に血液凝固の制御だけでなく、受精や胎児の成長から多様な生体防御まで生命の維持に極めて重要であることを示唆している。また、PC 凝固制御系は血管内皮細胞に対して抗炎症作用を示すが、血管内皮の炎症制御に関わる新たな蛋白質を明らかにすることも重要である。

こうした背景の下、本研究では、生命の維持に重要な PC 凝固制御系に関与する PS の活性発現制御機構と PCI の病態生理機能を明らかにすると共に、炎症性血管内皮障害を制御する蛋白質として内皮細胞に発現する新たな細胞間接着分子を同定し、その機能を解析した。

## 2. 研究の目的

### 【課題 1】血中 PS の抗凝固作用発現機構の

**解析：** 敗血症患者では血中 PS 濃度が低下し、この血中 PS 濃度の低下が血栓症発症の一因になることが示唆されているが、その分子機序は明らかでない。本研究では、エンドトキシン (リポポリサッカライド: LPS) を腹腔内投与して作成した敗血症モデルラットにおける血漿 PS、及び PS の活性制御因子である補体系制御因子の C4b 結合蛋白質 (C4BP) の発現変動を検討すると共に、ラットから単離した肝実質細胞及び肝類洞内皮細胞を用いて、PS 及び C4BP の発現変動を解析した。

### 【課題 2】PCI による臓器細胞の機能制御機構

**の解析：** 我々はこれまでに、PCI が APC、トロンビン・TM 複合体の他にも u-PA や血漿カリクレインなど多くのプロテアーゼを阻害するなど多機能セルピンであることを明らかにしてきた。また、PCI による血管新生阻害は、in vitro では u-PA 依存性であるが、in vivo では u-PA 非依存的に起こることを報告してきた。そこで、本研究では、u-PA 非依存的に起こる血管新生阻害の分子機構を明らかにするため、PCI 分子に存在するヘパリン結合部位の変異体を作成し、PCI の血管新生阻害機構を検討した。また、ヒト PCI を全身の臓器で発現するヒト PCI 遺伝子導入 (hPCI-TG) マウスを用いて、PCI の肝再生や血管透過性に及ぼす影響を明らかにする研究を行った。

### 【課題 3】炎症性血管内皮障害を制御する細胞間接着分子の同定

**：** 血管の炎症と関連して内皮細胞の機能を制御する新規な分子を探索するため、我々はこれまでの研究で、独自に開発したファージディスプレイ法を用いて、内皮細胞に発現する新しい蛋白質として、細胞間接着分子の一つ Connexin32 (Cx32) を同定した。

そこで、本研究では、Cx32 の血管内皮細胞における炎症時の発現動態と血管内皮機能

に及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究方法

#### 【課題1】血中 PS の抗凝固作用発現機構の

**解析：** 敗血症モデルラットは、LPS をラット腹腔内に投与して作成した。初代培養肝細胞及び類洞内皮細胞は、ラット肝臓にコラゲナーゼを還流して得られた細胞浮遊液からエルトリエーションローターを用いてそれぞれ単離した。ラット血漿及び細胞培養上清中の PS 及び C4BP 抗原値は、各々に特異的な ELISA 法を用いて、また、PS 及び C4BP  $\beta$  の mRNA は Real-time PCR 法を用いて測定した。

#### 【課題2】PCI による臓器細胞の機能制御機構の

**解析：** PCI のヘパリン結合部位変異体をコードする cDNA は野生型 PCI cDNA を鋳型として site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。ヘパリン結合部位変異 PCI 発現乳癌細胞は、ヘパリン結合部位変異 PCI cDNA を含む発現ベクターを乳癌細胞に導入して作成した。組換え PCI の in vivo 血管新生に及ぼす影響は、重症免疫不全症マウスの皮内に各種 PCI 発現乳癌細胞を移植後、腫瘍容積を測定して評価した。

PCI の肝再生に及ぼす影響は、野生型マウス及び hPCI-TG マウスに 70% 肝切除を施行し、その後の肝重量の変化を測定して評価した。

PCI の血管透過性に及ぼす影響は、野生型マウス及び hPCI-TG マウスを用いて、LPS 依存性の血管透過性亢進に及ぼす各種 PCI の影響をマイルズアッセイにより測定した。

#### 【課題3】炎症性血管内皮障害を制御する細胞間接着分子の同定：

ファージディスプレイ法を用いて、内皮細胞に発現する新たな蛋白質として同定した Cx32 について、ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAECs)、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) などの動脈系・静脈系由来の血管内皮細胞での発現と細胞内にお

ける Cx32 の局在を免疫蛍光染色で解析した。

また、炎症と凝固亢進時における血管内皮細胞での Cx32 の発現量及び機能変化を解析するとともに、Cx32 が血管内皮機能(サイトカイン分泌、凝固活性化など)に及ぼす影響を解析した。

### 4. 研究成果

#### 【課題1】血中 PS の抗凝固作用発現機構の

**解析：** (1) LPS 投与ラットでは、血漿全 PS 抗原値は LPS 投与 12 時間後まで低下し、投与 24 時間後にはわずかに増加した。一方、血漿 PS-C4BP  $\beta$  複合体の濃度は 12 時間までは変化しなかったが、遊離型 PS 濃度は著しく低下していた。他方、血漿 C4BP 濃度は、LPS 投与 12 時間後までは一過性に低下したが、その後は 24 時間後まで有意に著しく増加した。ラット肝臓から単離した肝細胞及び肝類洞内皮細胞における PS の発現は、投与した LPS 濃度依存性に低下し、その低下は、NF- $\kappa$ B インヒビターにより阻害された。また、p38MAP キナーゼとプロテインキナーゼ C (PKC) のインヒビターの影響は受けなかったが、MEK インヒビターにより著しく有意に阻害された。肝細胞における C4BP の発現動態は、LPS 濃度依存性に低下し、その低下は NF- $\kappa$ B インヒビターで阻害された。また、JUN キナーゼ、p38MAP キナーゼ、及びプロテインキナーゼ C (PKC) のインヒビターでは影響されなかったが、MEK インヒビターにより著しく阻害された。

(2) 血漿中の遊離型 PS 濃度は PS-C4BP  $\beta$  複合体濃度と反比例し、PS の抗凝固作用 (APC 補因子活性) は C4BP  $\beta$  濃度の影響を受けることから、LPS 投与後の肝細胞における C4BP  $\beta$  の発現動態を解析した。その結果、C4BP  $\beta$  mRNA は LPS 刺激により MEK/ERK 経路を介する NF- $\kappa$ B の活性化により発現増加す

るとともに、LPS 刺激によって単球から産生される IL-6 が IL-6 受容体と STAT 系を介して C4BP  $\beta$  の発現を高めることが明らかになった。

以上の結果から、肝実質細胞では LPS により、MEK/ERK 経路と NF- $\kappa$ B の活性化により PS の発現低下と C4BP  $\beta$  の発現増加が起こること、また、肝類洞内皮細胞では LPS 刺激により、MEK/ERK 経路と NF- $\kappa$ B の活性化により PS の発現低下が起き、こうした現象の総体として血中の PS-C4BP  $\beta$  複合体の増加と遊離型 PS の低下により、PC 凝固制御系の機能低下が起きる分子細胞機構が明らかになった。

**【課題 2】PCI による臓器細胞の機能制御機構の解析：** (1) PCI の腫瘍に及ぼす影響について、野生型 PCI 発現乳癌細胞 及び ヘパリン結合部位変異 PCI 発現乳癌細胞の *in vivo* における増殖変化を検討した結果、野生型 PCI 発現乳癌細胞は、PCI 非発現乳癌細胞に比較して著しく増殖能が低下していた。一方、ヘパリン結合部位変異 PCI 発現乳癌細胞は、PCI 非発現乳癌細胞と同程度であった。

(2) PCI の肝再生に及ぼす影響について、野生型及び hPCI-TG マウスに 70% 肝切除を施行後、肝重量の経時変化を測定し行った結果、野生型マウスに比較して、hPCI-TG マウスで肝重量の増加が遅延することが明らかになった。また、この遅延は、肝細胞増殖因子アクチベータ (HGFA) による肝細胞増殖因子 (HGF) の活性化が PCI により阻害されたことに起因することが明らかになった。

(3) PCI の血管透過性に及ぼす影響について、マイルズアッセイにより、野生型及び hPCI-TG マウスにおける LPS 依存性の血管透過性の亢進を指標に検討した。その結果、LPS 依存性の血管透過性の亢進は、野生型に比較して、hPCI-TG マウスで有意に抑制され、その抑制は、抗ヒト PCI 抗体の投与により阻止

された。また、LPS 投与後の血中のカリクレイン-PCI 複合体は、野生型マウスに比較して PCI-TG マウスで高値を示した。

以上の結果から、PCI の腫瘍内血管新生抑制活性の発現には、PCI のヘパリン結合部位が重要であることが明らかになった。また、PCI は肝再生を制御し、その制御機構は、PCI が HGFA による HGF 前駆体の活性化を阻害するためであることを明らかにした。さらに、PCI はカリクレインを阻害することにより血管透過性の亢進を抑制していることが示唆された。

**【課題 3】炎症性血管内皮障害を制御する細胞間接着分子の同定：** HAECs、HUVECs、ヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAECs)、微小血管内皮細胞 (HMVECs) で Cx32 mRNA と蛋白質が発現しており、Cx32 蛋白質は細胞膜だけでなく、細胞質や核周囲にも局在することが明らかになった。

炎症・凝固亢進時における血管内皮細胞での Cx32 発現動態を観察した結果、HUVECs を TNF- $\alpha$ 、LPS、IL-1 $\beta$ 、トロンビンで刺激すると、Cx32 mRNA と蛋白質の発現量は TNF- $\alpha$  刺激では減少したが、他の刺激では顕著な変化をみられなかった。

Cx32 が血管内皮機能(サイトカイン分泌、凝固活性化など)に及ぼす影響をみるため、Cx32 発現遺伝子を導入して Cx32 強制発現 HUVECs を作製し、検討した。その結果、TNF- $\alpha$  で誘導される IL-6、ヒト単球走化活性因子 (MCP-1) の発現が対照遺伝子導入 HUVECs と比較して有意に抑制された。一方、ギャップ結合阻害剤で処理した HUVECs では未処理 HUVECs と比較して TNF- $\alpha$  誘導性の IL-6、MCP-1 の発現が亢進し、また組織因子 (TF) の発現も亢進することを明らかにした。

以上の結果より、細胞間接着分子 Cx32 は血管内皮細胞の炎症を制御調節しているこ

とが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Okamoto T, Akiyama M, Takeda M, Gabazza EC, Hayashi T, Suzuki K. Connexin32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gap-junction intercellular communication. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 264-268, 2009. (査読有)
2. Kuriyama N, Isaji S, Hamada T, Kishiwada M, Ohsawa I, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Suzuki K, Uemoto S. Activated proteinC prevents hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. *Liver Int* 29: 299-307, 2009. (査読有)
3. Suzuki K. The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 6: 2017-2026. 2008. (査読有)
4. Kishiwada M, Hayashi T, Yuasa H, Fujii K, Nishioka J, Akita N, Tanaka H, Ido M, Okamoto T, Gabazza EC, Isaji S, Suzuki K. Regulatory mechanisms of C4b-binding protein (C4BP) $\alpha$  and  $\beta$  expression in rat hepatocytes by lipopoly saccharide and interleukin-6-specific increase of C4BP $\beta$  expression influences the plasma level of protein S-C4BP complex and anticoagulant activity of protein S. *J Thromb Haemost* 6: 1858-1867, 2008. (査読有)
5. Hamada T, Kamada H, Hayashi T, Nishioka J, Gabazza EC, Isaji S, Uemoto S, Suzuki K. Protein C inhibitor regulates hepatocyte growth factor activator-mediated liver regeneration in mice model. *Gut* 57: 365-373, 2008. (査読有)
6. Suzuki K, Hayashi T. Protein C and its inhibitor in malignancy. *Semin Thromb Hemost* 33: 667-672, 2007. (査読有)

7. Song Z, Ma N, Hayashi T, Gabazza EC, Sugimura Y, Suzuki K. Intracellular localization of protein C inhibitor (PCI) and urinary plasminogen activator in renal tubular epithelial cells from humans and human PCI gene transgenic mice. *Histochem Cell Biol* 128: 293-300, 2007. (査読有)
8. Asanuma K, Yoshikawa T, Hayashi T, Akita N, Nakagawa N, Hamada Y, Nishioka J, Kamada H, Gabazza EC, Ido M, Uchida A, Suzuki K. Protein C inhibitor inhibits breast cancer cell growth, metastasis and angiogenesis independently of its protease inhibitory activity. *Int J Cancer* 121: 955-965, 2007. (査読有)
9. Hayashi T, Nishioka J, Kamada H, Hamada K, Fujii K, Naka D, Nagaike K, Uemoto S, Kobayashi T, Hattori A, Suzuki K. Protein C inhibitor directly and potently inhibits activated hepatocyte growth factor activator. *J Thromb Haemost* 5: 1477-1485, 2007. (査読有)
10. Suzuki K, Kise H, Nishioka J, Hayashi T. The interactions among protein C inhibitor, prostate-specific antigen, and the semenogelin system. *Semin Thromb Hemost* 33: 46-52, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

1. Yoshida K, Asanuma K, Hayashi T, Okamoto T, Suzuki K, Uchida A.: Activated protein C suppresses osteoclast differentiation. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Las Vegas, (USA), Feb.22-25, 2009.
2. Suzuki K.: Protein C inhibitor regulates breast cancer cell growth, metastasis and angiogenesis. The 1st International Congress on Drug Design and Discovery, Dubai (UAE), Feb. 4-7, 2008.

3. 鈴木宏治: 抗凝固薬の開発状況. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3/26-28. 横浜.
4. 鈴木宏治, 林 辰弥, 岡本貴行, ガバザ エステバン, 武谷浩之: メタボリックシンドロームにおける内皮機能障害-内皮機能障害による凝固亢進の分子的背景. -第 39 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2007, 7/13-14, 大阪.

[図書] (計 10 件)

1. 鈴木宏治. 血栓性素因 (Thrombophilia), 新臨床内科学 第9版 (高久史麿, 尾形悦郎, 黒川清, 矢崎義雄監修), 医学書院(東京), 949-952, 2008.
2. 鈴木宏治. Von Willebrand病, 血栓性血小板減少性紫斑病, 血液凝固制御系の異常, 図説分子病態学 4版 (一瀬白帝, 鈴木宏治 編), 中外医学社(東京), 250-253, 262-270, 2008.
3. 鈴木宏治. 血栓症の分子病態, 小動物の血液凝固機能, 血栓症・動脈硬化モデル動物作製法(鈴木宏治 編), 金芳堂(京都), 1-11, 39-53, 2007.

[その他]

第 45 回ベルツ賞 (ベーリンガーインゲルハイム社 主催) 受賞:

「鈴木・三重大教授らにベルツ賞-血管内血液凝固防止薬開発に貢献」

—平成 20 年 11 月 20 日, 読売新聞

「ベルツ賞に鈴木教授-抗血栓物質を解明」

—平成 20 年 11 月 20 日, 中日新聞

「丸山・鈴木教授の論文「血栓制御」がベルツ賞」—平成 20 年 12 月 19 日, 科学新聞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 宏治 (Suzuki Koji)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70077808

(2) 研究分担者

林 辰弥 (Hayashi Tatsuya)  
三重県立看護大学・看護学科・教授  
研究者番号: 00242959

岡本 貴行 (Okamoto Takayuki)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 30378286

Gabazza Esteban (Gabazza Esteban)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 00293770

(3) 連携研究者

なし