

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09251

研究課題名(和文) トロンボモジュリン構成ドメインによる抗凝固能・抗炎症作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of anticoagulant and anti-inflammatory effects of each domain in Recombinant Human Soluble Thrombomodulin

研究代表者

池田 司 (Ikeda, Tsukasa)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：10768170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス心臓移植モデルに対するリコモジュリン(rTM)とその構成ドメイン(D1, D2, D3)による生着延長期間を測定すると、無治療群が平均8日で移植心の拍動が停止するのに対して、rTM群では平均50日以上が生着延長効果認め、各ドメインではD1群が22日と構成ドメインでは最も生着延長効果を示した。また、移植心の病理評価を行い、D1投与群で心筋構造が保護されており、FACSでは脾臓内制御性T細胞の誘導が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当検討によって、トロンボモジュリンを構成するD1が制御性T細胞の誘導や、IFN-gamma産生抑制能を持ち、微小循環障害抑制による慢性拒絶反応の制御に寄与する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Untreated and D2-exposed CBA recipients acutely rejected C57BL/6 cardiac allografts within 9 days. Administration of D3 resulted in modest prolongation of allograft survival, and administration of D1 significantly prolonged allograft survival. Histologic studies showed that myocardial damage of allografts from D1- and D3-exposed CBA recipients was controlled compared with that of untreated recipients. In particular, the CD4+CD25+Foxp3+ cell population in the splenocytes of D1-exposed CBA recipients was increased.

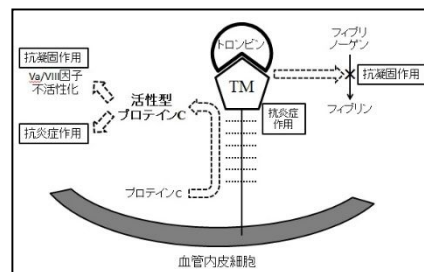
研究分野：移植免疫学

キーワード：トロンボモジュリン 心臓移植 制御性T細胞 血管内皮 生着延長 リコモジュリン

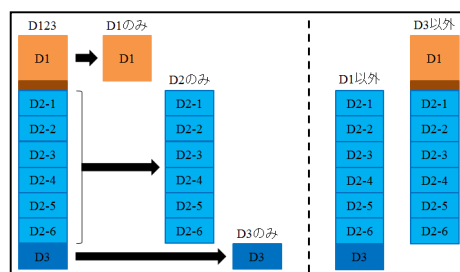
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの血管内には血液の無秩序な凝固を防ぐために、以下の抗凝固(抗血栓)作用が備わっている。ヘパラン硫酸、組織プラスミノゲンアクチベーター、プロスタサイクリン、NO、トロンボモジュリン(以下、TM)である。特にTMは1984年頃より注目され、鈴木宏治(鈴鹿医療科学大学教授)により血液中の抗凝固能を示す血管内皮タンパクとして研究されてきた。TMは体内のすべての血管内皮に存在するが、敗血症等の重症感染症や解離性大動脈瘤等の血管病変により減少し、血栓が形成されやすい状態となる。その作用機序は血中トロンピンと結合し直接的に抗凝固能を示すと同時に、TMトロンピン複合体がプロテインCを活性化し、第V・VIII凝固因子を阻害することで抗凝固能を示す2つの機序があると考えられている(右図)。この複合体によるプロテインCの活性化が重症感染症に伴う播種性血管内凝固症候群(以下、DIC)に対して有効であるとの報告[N Engl J Med. 2001;344:699-709]や、TMのレクチン様ドメインに抗炎症効果があることも明らかになっている[J Clin Invest. 2005;115:1267-74.]。しかし、TMの抗凝固能や抗炎症作用を直接観察した研究は全く無く、またTMを構成するどのドメインがどのように作用したのかは証明されていない。



また、現在、血管内皮に元々存在するTMは炎症や物理的損傷によって部分的に剥離されると血液凝固を抑制する機能は果たさなくなると考えられている。構造が変化したTMは抗凝固作用を持たないことと、静脈投与したリコモジュリン(以下、rTM)がDIC急性期スコアや凝固系マーカーを改善させた[日心外会誌2013;42:267-73]等の報告から、外から補充されたTMが炎症や損傷を受けた血管内皮や血栓等に生着すること(固相化)で効果を発現している可能性が高いと考えられ、高濃度で血液に投与されることによる効果も否定できない。しかし、その生着部位やどのドメインが効果発現の中心となっているか不明のままである。



### 2. 研究の目的

臓器移植における最大の課題である拒絶反応の内、急性拒絶反応の制御法の開発により移植成績は良好な傾向となった。一方で、慢性拒絶反応に関しては依然制御できない状態であり、移植臓器不全の大きな要因となっている。微小血管の内膜肥厚や微小血管炎が一因となる慢性拒絶反応に対して、血管内皮TMの減少が慢性拒絶反応の基盤となるのではと考えた。今回、TMの心臓移植片に対する冠動脈内皮肥厚抑制効果と抗炎症効果を検討するとともに、TMを構成する各ドメイン(D1~D3)投与によるTMの作用機序の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

実験モデルはマウスの異所性心臓移植モデルである。方法は原著論文(Niimi M. J Heart Lung Transplant 2001;20:1123-8.)で詳細に記載されている。マウス心臓移植モデルを用いて、TMとTM構成ドメインによる抗炎症作用の評価とTM生着部位やその作用機序を解明することで、慢性拒絶反応の治療法の確立を目的とする。

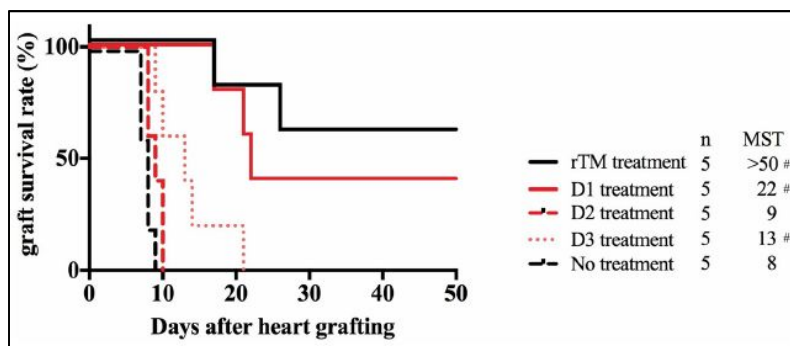
1年目はTMによるマウス移植心モデルの生着延長期間測定と血管内皮TM染色を行う

た。無治療群の術後血中 TM 濃度を測定したところ、術後 3 日目に最低となり、その後徐々に回復し術後 10 日目には術前まで回復していたデータを基に、TM を 1 週間 1 日 1 回（ヒト通常量 380U/kg/day[マウス換算 8.5~9.5U/mouse]）移植モデルに投与し、生着延長期間を測定した。また、免疫組織染色（TM 染色：CD141 染色）や HE 染色で冠動脈内膜や血管周囲組織を評価した。

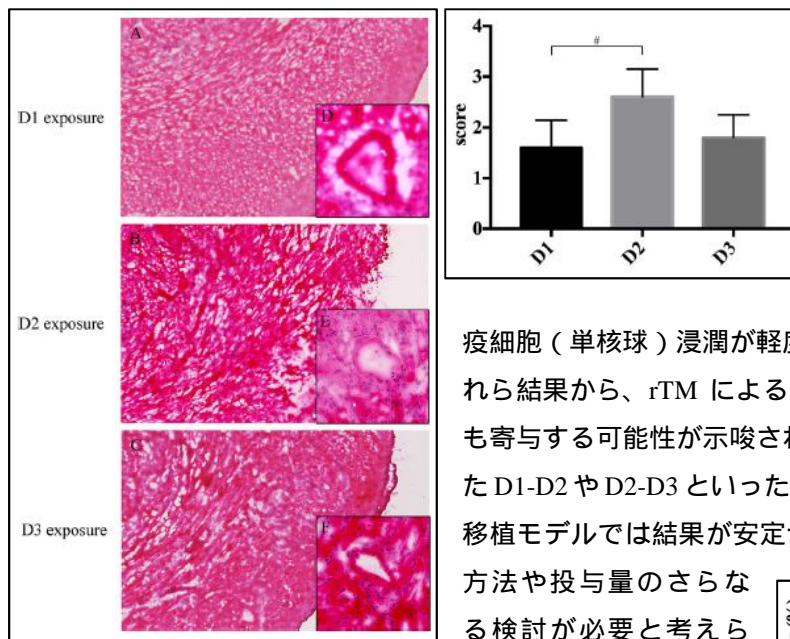
2年目はTM構成ドメインによる生着延長期間測定と生着延長群の細胞分析を行った。TM を構成する各ドメイン（D1、D2、D3）をマウスモデルに投与し、生着延長期間を測定した。また、各群の生着期間が7日間を超えた場合、細胞内サイトカイン測定（IFN- $\gamma$ 染色）や免疫細胞分析（CD4・CD8・CD25・CD127・Foxp3染色など）を行った。

3年目は上行大動脈病理モデルを用いた TM 生着部位の特定を行った。心移植マウスと naïve マウスから大動脈を採取し凍結切片を作成し、TM もしくは各ドメインを反応させ、明視野もしくは蛍光染色を用いて評価した。また、ドメイン単独投与ではなく、各ドメインの組み合わせ（D1-D2、D2-D3）による血管保護効果の確認も予定した。

#### 4. 研究成果



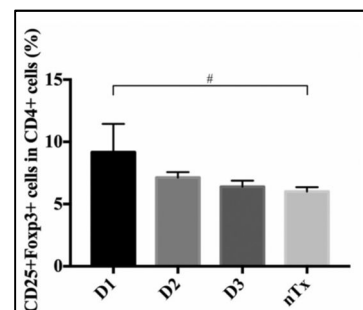
マウス心臓移植モデルに対する rTM とその構成ドメインによる生着延長期間を測定すると、無治療群が平均 8 日で移植心の拍動が停止するのに対して、rTM 群では平均 50 日以上



の生着延長効果を認め、各ドメインでは D1 群が 22 日と構成ドメインでは最も生着延長効果を示した（左図 a）。移植心の病理評価では、D1 投与群が最も心筋構造が維持され、免疫細胞（単核球）浸潤が軽度であった（左図 b、c）。これら結果から、rTM による生着延長効果は主に D1 が最も寄与する可能性が示唆された。しかし、最終年度に行った D1-D2 や D2-D3 といった組み合わせドメイン投与は当移植モデルでは結果が安定せず、今後各ドメインの投与方法や投与量のさらなる検討が必要と考えら

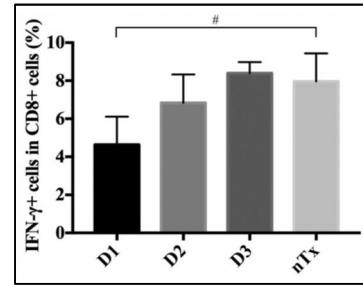
れた。

次に、その生着延長効果の機序として、制御性 T 細胞の誘導を確認した（右図 d）。脾臓内制御性 T 細胞評価では、無治療群（約 5-6%）や他のドメイン群（約 7-8%）よりも、D1 群で最も誘導されていた（約 10%）。我々の以前の研究でも rTM 投与



による制御性 T 細胞の高誘導を報告しており、D1 投与による同様の効果を示すことができたと考えられる。さらに、D1 投与群では、CD8 細胞による IFN- $\gamma$  産生量が抑制されており（右図 e）、制御性 T 細胞による間接的な免疫制御と共に、D1 が直接的な炎症反応抑制に寄与している可能性が示唆された。

以上の内容を総括し、論文として報告し掲載された（Transplant Proc. 2022; 54: 487-91.）。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yasuto Yamamoto, Tsukasa Ikeda, Masateru Uchiyama, Kazuhito Iguchi, Tomohiro Imazuru, Tomoki Shimokawa                    | 4. 巻<br>54            |
| 2. 論文標題<br>Effects of Each Domain in Recombinant Human Soluble Thrombomodulin on Prolongation of Murine Cardiac Allograft Survival. | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Transplantation proceedings   | 6. 最初と最後の頁<br>487-491 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.transproceed.2021.12.024.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Ikeda T, Iida M, Yokoyama N, Shimokawa T.                                | 4. 巻<br>56        |
| 2. 論文標題<br>Mitral valve perforation due to coexisting severe aortic regurgitation. | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>Eur J Cardiothorac Surg.   | 6. 最初と最後の頁<br>815 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/ejcts/ezz109.                                   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-         |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yasuto Yamamoto, Tsukasa Ikeda, Masanori Niimi, Masateru Uchiyama  |
| 2. 発表標題<br>Effects of Each Domain of Recombinant Human Soluble Thrombomodulin on Prolongation of Cardiac Allograft Survival |
| 3. 学会等名<br>アジア移植学会（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号）                          | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号）              | 備考 |
|-------|--|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 内山 雅照<br><br>(Uchiyama Masateru)<br><br>(60713295) | 帝京大学・医学部・講師<br><br><br><br>(32643) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|