

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16427

研究課題名（和文）トロンボモジュリンの臨床効果における個体差要因の解明と新規DIC治療戦略の確立

研究課題名（英文）Elucidation of Individual Variance Factors in the Clinical Effectiveness of Thrombomodulin-alpha and Establishment of Novel Therapeutic Strategies for DIC

研究代表者

榎屋 友幸 (Enokiya, Tomoyuki)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：60803260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、トロンボモジュリン（TM）の相互作用と機能を解明し、新規治療戦略開発の可能性を示唆した。TMはPLA2G2Aと直接相互作用し、ITGV₃との相互作用に競合的に影響を及ぼすことで抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。TMはS100A8/S100A9ヘテロダイマーと相互作用するが、その機能的影響は不明であった。一方、TMはLPSと相互作用することが知られているが、LBPやsCD14との相互作用は阻害せず、LPSを介した抗炎症作用はsCD14によるLPSのTLR4へのリクルート阻害による可能性が示された。これらはDIC治療法開発に貢献すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症による播種性凝固血管内症候群（DIC）は死亡率が高い。ヒトトロンボモジュリン（TM）の遺伝子組み換え製剤であるTMは、DICに対して唯一臨床効果が認められている薬物であるが、その詳細な機序は解明されていない。また、TMの臨床効果には個体差がみられ、臨床効果を最大に発揮するために、作用機序の全貌および個体差要因を解明することが急務となっている。本研究は、新たなTMとの相互作用分子とその機能を発見した。本研究の成果は、ヒトTMの生物学的機能の解明に加え、DICの重症化に関連する因子やDICの新規治療戦略開発の可能性に繋がると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study elucidated the interactions and functions of thrombomodulin alpha (TM) and suggested potential new therapeutic strategies. TM was found to interact directly with PLA2G2A, and it was suggested that its anti-inflammatory effect might be exerted by competitively affecting the interaction between ITGV₃ and PLA2G2A. TM also interacts with the S100A8/S100A9 heterodimer, although its functional implications remain unclear. On the other hand, while TM is known to interact with LPS, it does not inhibit the interaction with LBP or sCD14. It has been suggested that the anti-inflammatory effect of LPS may be due to inhibition of LPS recruitment to TLR4 by sCD14. These findings may contribute to the development of new therapies for DIC.

研究分野：臨床薬学

キーワード：トロンボモデュリンアルファ DIC 敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

播種性凝固血管内症候群 (DIC) は、細菌感染などによる炎症により、全身性持続性に著しく炎症および凝固が活性化した状態である。旧厚生省研究班の疫学調査の結果、DIC 治療が改善されることで、年間約 1 万人の救命に繋がると言われている。トロンボモジュリン α (TM α) は、DIC に対して唯一生存期間の延長が認められている薬物であるが、TM α による薬物治療を行った患者群でも、28 日死亡率は約 30%と未だに高い。また、臨床データを統計学的に分析した結果、TM- α の臨床効果には個体差がみられた。これまでの我々の研究成果より、敗血症性 DIC の患者の血漿中で、炎症惹起に關与するタンパク質 (Phospholipase A2 Group IIA (PLA2G2A)、S100A9 およびリポ多糖 (LPS) 結合タンパク質 (LBP)) が TM α と相互作用している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PLA2G2A、S100A8/S100A9 heterodimer、S100A9 homodimer および LBP を介した TM α の抗炎症作用機序を解明し、臨床効果の個体差要因の同定に繋げることである。

3. 研究の方法

(1) Native PAGE による PLA2G2A、S100A8/S100A9 heterodimer、および S100A9 homodimer と TM α との直接的な相互作用の検証

TM α 、TM α の D1 ドメイン (TMD1) 及び D2 ドメイン (TMD2) とそれぞれの候補タンパク質との直接的な相互作用を Native PAGE により検証した。TM α 、TMD1、TMD2、PLA2G2A、S100A8/S100A9 heterodimer 及び S100A9 homodimer を PBS (Ca²⁺添加) に添加し、それぞれのタンパク質の終濃度が、2.0 μ M、6.0 μ M、4.0 μ M、5.5 μ M、5.0 μ M 及び 5.0 μ M になるように氷上で調製し、37、30 分間インキュベートした。インキュベート後、SDS 未添加で、10 mA 定電流、100 V 定電圧にて、210 分間、4 で電気泳動を行った。泳動後、銀染色によりシグナルを確認した。

(2) functional ELISA assay による PLA2G2A に対する TM α の機能的影響の検証

抗 His Tag 抗体が固相化された microplate (His Tag Antibody Plate) に His-tagged PLAS2G2A を添加し、TM α とともに 37 で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、His Tag Antibody Plate のウェルに添加し、室温で 3 時間インキュベートした。各ウェルを洗浄後、TM α に対するビオチン化抗体を添加し、HRP-Streptavidin を添加した。TMB を添加し、450 nm の吸光度を測定することで、PLA2G2A と TM α の相互作用を検証した。

次に Integrin α V β 3 (ITG α V β 3) は PLA2G2A と相互作用することが知られているため、PLA2G2A と ITG α V β 3 の相互作用に対する TM α の影響を検証するために、His-tagged PLAS2G2A、TM α 及び ITG α V β 3 を加え、37 で 30 分間インキュベート後、同様に functional ELISA assay を行った。

(3) PLA₂ assay による PLA2G2A の PLA₂ 活性に対する TM α の機能的影響の検証

Diheptanoyl Thio-PC を PLA₂ の基質として用いた。DTNB 下で反応させ、405 nm の吸光度を 1 分毎に 10 分間測定し、PLA₂ 活性を算出した。TM α 添加の有無による PLA₂ 活性の影響を検証した。

(4) functional ELISA assay による S100A8/S100A9 heterodimer に対する TM α の機能的影響の検証

His Tag Antibody Plate に His-tagged S100A8/S100A9 heterodimer を添加し、TM α とともに 37 で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、His Tag Antibody Plate のウェルに添加し、室温で 3 時間インキュベートした。各ウェルを洗浄後、TM α に対するビオチン化抗体を添加し、HRP-Streptavidin を添加した。TMB を添加し、450 nm の吸光度を測定することで、S100A8/S100A9 heterodimer と TM α の相互作用を検証した。

S100A8/S100A9 heterodimer は、TLR4/MD2 及び AGE 特異的受容体 (RAGE) のリガンドとして知られている。そこで、S100A8/S100A9 heterodimer と TLR4/MD2 または RAGE との相互作用に対する TM α の影響を検証するために、S100A8/S100A9 heterodimer と TM α に加えて、His-tagged TLR4/MD2 または His-tagged RAGE を 37 で 30 分間反応させ、functional ELISA assay を行い、抗 S100A9 抗体を使って定量的に検証した。

(5) LBP または CD14 を介した LPS 活性に対する TM α の影響についての検証

グラム陰性桿菌から放出される LPS は、LBP と結合し、LBP により sCD14 に転送され、リンパ球などの Toll-like receptor (TLR) 4 などにリクルートされることで炎症を惹起する。LAL assay により測定できる LPS のエンドトキシン活性は、LBP との結合により抑制されることが

知られている。TM α の抗炎症作用の機序として、LPS と LBP との相互作用を阻害する仮説を立て、LBP による LAL assay における LPS (E. coli O-111:B4) のエンドトキシン活性の抑制への影響を検証した。

各サンプルに LAL 試薬を添加し、37 °C で 10 分間インキュベーションした。次に、Chromogenic Substrate を添加し、泡立たないように混和させた後、37 °C で 6 分間インキュベーションした。25%酢酸を添加し、反応をストップさせた後、405 nm の波長で吸光度を測定した。

LPS と LBP との相互作用に対する TM α の影響についての検証

50 mM リン酸バッファー中で、以下のとおりサンプル調製し 37 °C で 30 分間インキュベーションした。

- LPS : LPS (0.5 EU/mL)
- LPS+LBP : LPS (0.5 EU/mL) , LBP (40 nM)
- LPS+LBP+ TM α : LPS (0.5 EU/mL) , LBP (40 nM) , rTM (1.0 μ M)

LBP から sCD14 への LPS の転送に対する TM α の影響についての検証

50 mM リン酸バッファー中で、以下のとおりサンプル調製し 37 °C で 30 分間インキュベーションした。

- LPS : LPS (1.0 EU/mL)
- LPS+LBP : LPS (1.0 EU/mL) , LBP (0.16 nM)
- LPS+LBP+sCD14 : LPS (1.0 EU/mL) , LBP (0.16 nM) , sCD14 (100 nM)
- LPS+LBP+sCD14+ TM α : LPS (1.0 EU/mL) , LBP (0.16 nM) , sCD14 (100 nM) , TM α (1.0 μ M)

4 . 研究成果

(1) Native PAGE による PLA2G2A、S100A8/S100A9 heterodimer および S100A9 homodimer と TM α との直接的な相互作用の検証

Native PAGE の結果、TM α と PLA2G2A を混在させたサンプルの泳動像には、それぞれ単独で泳動した時では見られなかったシグナルがみられ、TM α と PLA2G2A が直接的に複合体を形成している可能性が示唆された。また、TMD1 と PLA2G2A を混在させたサンプルの泳動像にもそれぞれ単独で泳動したサンプルには見られなかったシグナルがみられたため、PLA2G2A は、TMD1 を介して、TM α と複合体を形成している可能性が示唆された (図 1 (a))。

次に、TM α と S100A8/S100A9 heterodimer または S100A9 homodimer との相互作用について検証した結果、TM α と S100A8/S100A9 heterodimer を混在させたサンプルの泳動像には、それぞれ単独で泳動した時では見られなかったシグナルがみられ、TM α と PLA2G2A が直接的に複合体を形成している可能性が示唆された。一方、TM α と S100A9 homodimer を混在させたサンプルには、複合体と考えられるシグナルは認められなかった (図 1(b))。TMD1 と S100A8/S100A9 heterodimer を混在させたサンプルの泳動像にもそれぞれ単独で泳動したサンプルには見られなかったシグナルがみられたため、S100A8/S100A9 heterodimer は、TMD1 を介して、TM α と複合体を形成している可能性が示唆された (図 1 (a))。

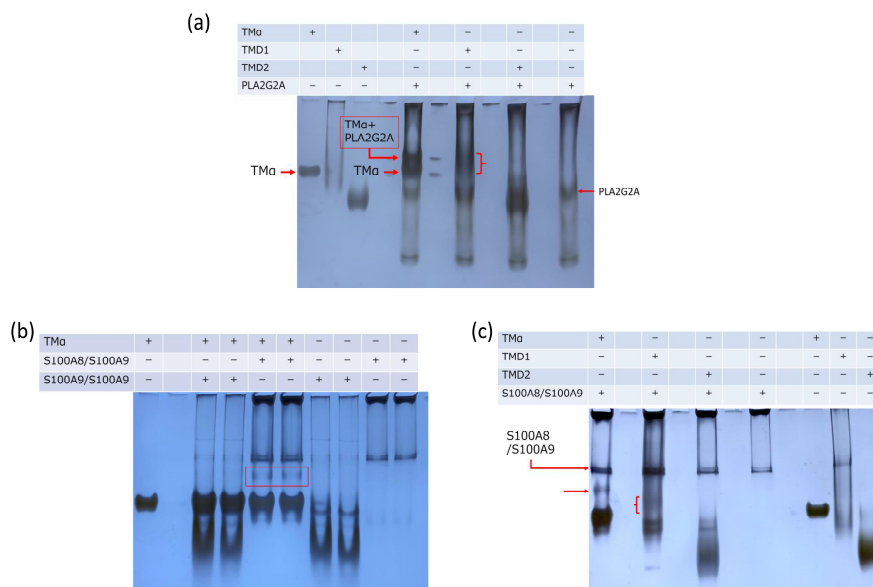


図 1 Native PAGE による TM α と PLA2G2A、S100A8/S100A9 heterodimer または S100A9 homodimer との相互作用の検証

(a) TM α 、TMD1 または TMD2 と PLA2G2A との相互作用 (b) TM α と S100A8/S100A9 heterodimer または S100A9 homodimer との相互作用 (c) TM α 、TMD1 または TMD2 と S100A8/S100A9 heterodimer との相互作用

(2) TM α の PLA₂G₂A に対する機能的影響の検証

functional ELISA assay により、TM α と PLA₂G₂A との相互作用を定量的に検証した。その結果、TM α の濃度依存的なシグナルの増加がみられ、functional ELISA assay においても、TM α と PLA₂G₂A が相互作用していることが示唆された (図 2(a))。次に PLA₂G₂A と ITG α V β 3 との相互作用への TM α の影響を検証した。ITG α V β 3 を添加することで、TM α と PLA₂G₂A との相互作用が低下した。したがって、TM α は、ITG α V β 3 と競合的に PLA₂G₂A と相互作用することが示唆された (図 2 (b))。

PLA₂G₂A の PLA₂ 活性に対する TM α の影響を検証した結果、TM α の添加の有無で、PLA₂G₂A の PLA₂ 活性に変化は見られなかった (図 2 (c))。したがって、TM α は PLA₂G₂A の PLA₂ 活性には影響しないと考えられた。

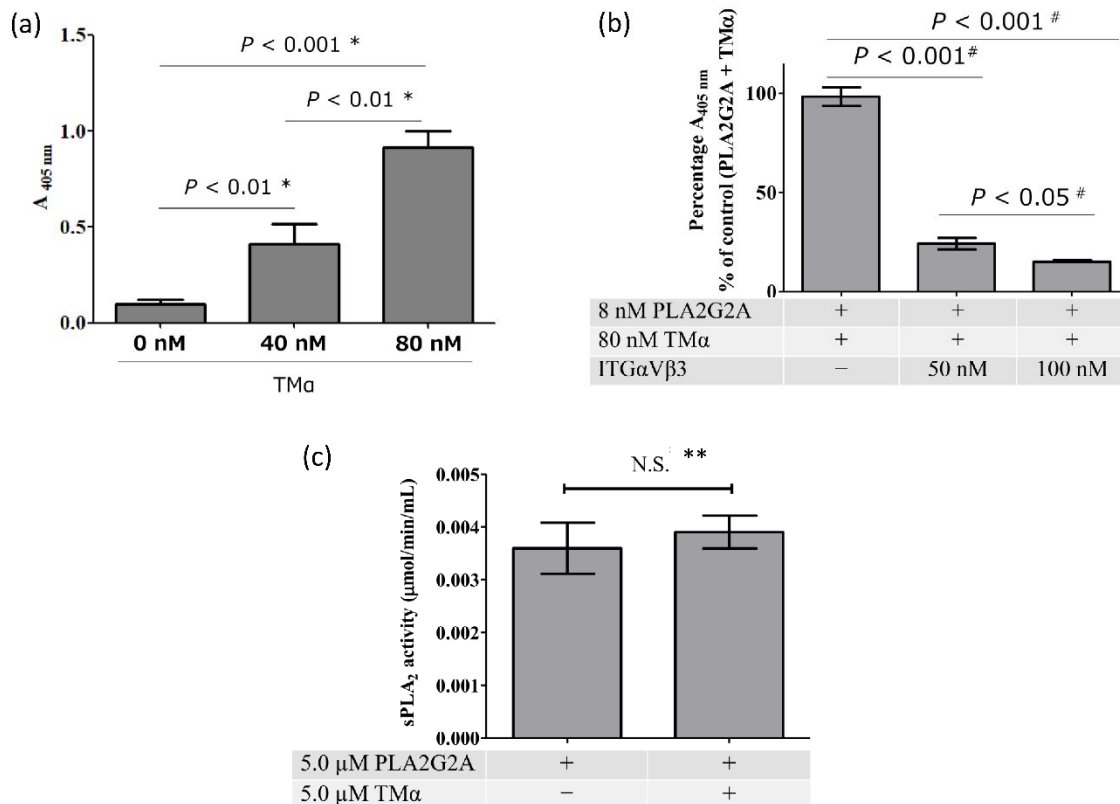


図 2 TM α の PLA₂G₂A に対する機能的影響

(a) functional ELISA assay による TM α と PLA₂G₂A との相互作用。*: One-way ANOVA, post-hoc Tukey's multiple comparison test (b) functional ELISA assay による PLA₂G₂A と ITG α V β 3 との相互作用への TM α の影響の検証。#: One-way ANOVA, post-hoc Tukey's multiple comparison test. (c) PLA₂G₂A の PLA₂ 活性に対する TM α の影響 **: Student's t-test. 各実験は、duplicate で行い、4 回測定した。

(3) functional ELISA assay による TM α の S100A8/S100A9 heterodimer に対する機能的影響の検証

functional ELISA assay により、TM α と S100A8/S100A9 heterodimer との相互作用を定量的に検証した。その結果、TM α の濃度依存的なシグナルの増加がみられ、functional ELISA assay においても、TM α と S100A8/S100A9 heterodimer が相互作用していることが示唆された (図 3(a))。次に S100A8/S100A9 heterodimer と TLR4/MD2 または RAGE との相互作用への TM α の影響を検証した。S100A8/S100A9 heterodimer と TLR4/MD2 または RAGE との相互作用は、TM α の添加の有無による有意な変化は認められず、TM α は S100A8/S100A9 heterodimer と TLR4/MD2 または RAGE との相互作用には影響しない可能性が示唆された (図 3 (b))。

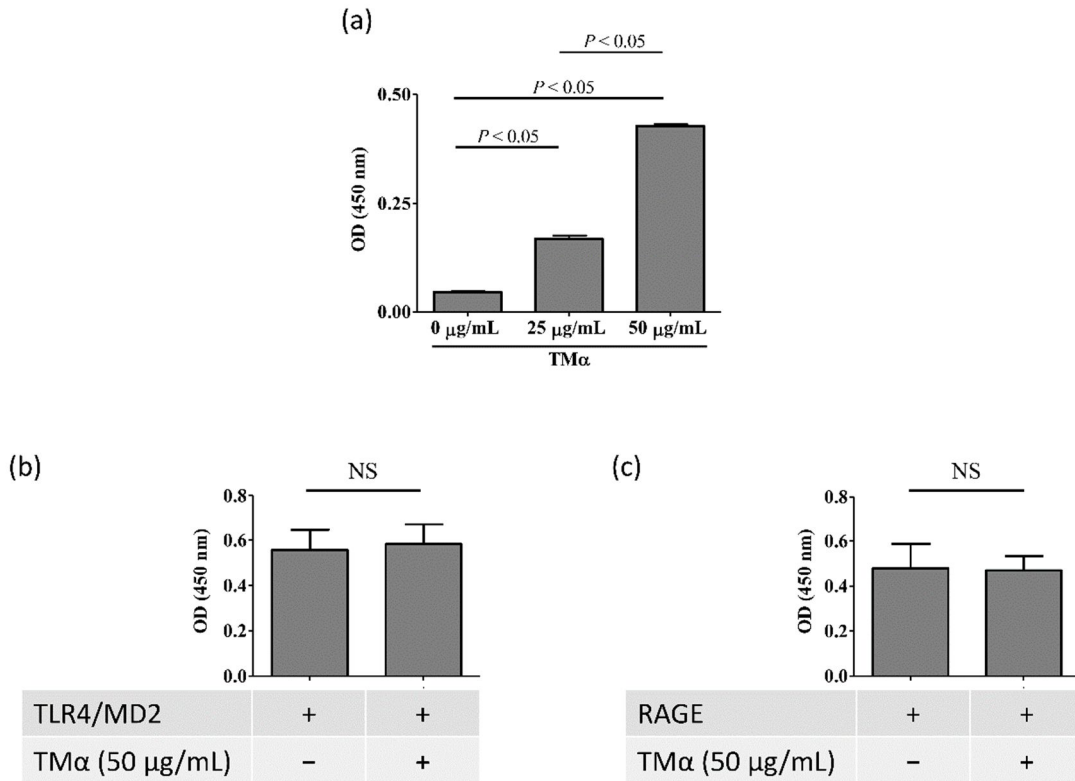


図 3 functional ELISA assay による TMα の S100A8/S100A9 heterodimer に対する機能的影響

(a) functional ELISA assay による TMα と PLA2G2A との相互作用。 $P < 0.05$: One-way ANOVA, post-hoc Tukey's multiple comparison test. (b) functional ELISA assay による S100A8/S100A9 heterodimer と TLR4/MD2 との相互作用への TMα の影響の検証。 (c) functional ELISA assay による S100A8/S100A9 heterodimer と RAGE との相互作用への TMα の影響の検証。 NS (no significance): Student's t-test.

(4) LAL assay による LBP または CD14 を介した LPS の炎症惹起反応に対する TMα の阻害効果の検証

LBP が、LPS のエンドトキシン活性を抑制したが、TMα を添加したサンプルにおいても、この LBP の LPS 活性の抑制効果は影響されなかった (図 4(a))。したがって、TMα は LPS と LBP との相互作用を阻害しないと考えられた。次に、LPS の LBP から sCD14 への転送に対する抑制効果を検証したが、LPS の LBP から sCD14 への転送に対しても TMα は影響しなかった (図 4(b))。これらのことから、LPS に対する TMα の抗炎症作用の機序は、sCD14 による LPS の TLR4 へのリクルートを阻害している可能性が高いと考えられた。

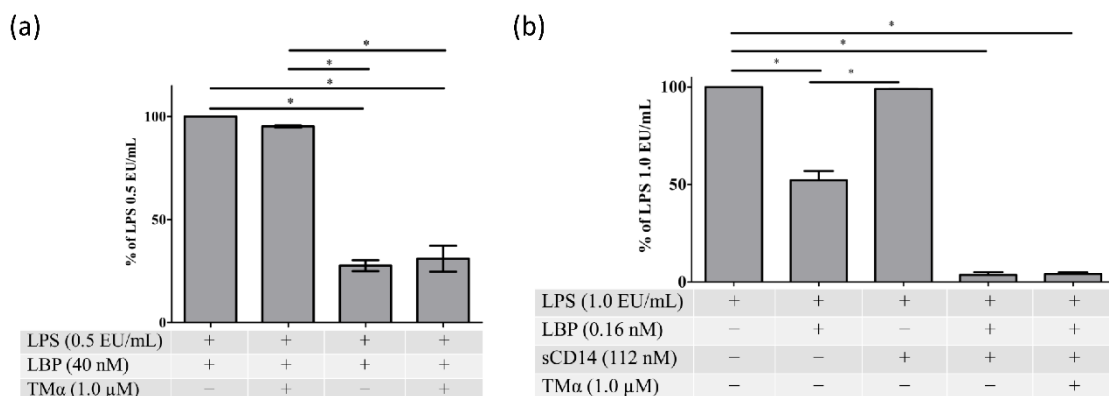


図 4 LAL assay による LBP または CD14 を介した LPS の炎症惹起反応に対する TMα の阻害効果

(a) LPS と LBP と相互作用に対する TMα の影響。 (b) LBP から sCD14 への LPS の転送に対する TMα の影響。 *: $p < 0.05$, One-way ANOVA, post-hoc Tukey's multiple comparison test. 各実験は、duplicate で行い、3 回測定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日比野 萌未、井田 愛梨、大西 亮、今井 寛、榎屋 友幸
2. 発表標題 分泌型カルシウム依存性ホスホリリパーゼA2 (PLA2G2A) との相互作用によるトロンボモジュリン の新規抗炎症作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 榎屋 友幸
2. 発表標題 プロテオーム解析によるトロンボモジュリン の個別化及び適正化治療法の構築
3. 学会等名 第38回日本TDM学会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 榎屋 友幸、今井 寛
2. 発表標題 重症敗血症患者およびDIC患者の生存率向上を目指した大学教員による研究とその課題
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------