

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390292

研究課題名（和文） 生体の恒常性維持に重要なプロテインC凝固制御系因子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 Homeostasis

研究代表者 鈴木 宏治（SUZUKI KOJI）  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：70077808

研究成果の概要（和文）： 生体の恒常性維持に重要なプロテインC凝固制御系について研究を行い、(1) 感染時の血中C4BP $\beta$ の増加がProtein Sの抗凝固作用を制御する、(2) Protein C inhibitorが臓器固有のプロテアーゼを制御し、抗腫瘍作用、血管新生、肝再生、血管透過性など各臓器の機能を調節する、(3)細胞間接着分子Connexin 32の発現が細胞の炎症を制御する新しい細胞機能制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We studied the molecular-cellular mechanism of anticoagulant protein C pathway which is crucial for life homeostasis. The results obtained in the research are as follows. (1) Lipopolysaccharide-Toll-like receptor-mediated signaling regulates expression of protein S and C4b-binding protein in the liver. (2) The multi-functional serine protease inhibitor, protein C inhibitor regulates many organ functions beyond thrombosis and hemostasis. (3) Cellular gap junction molecule, connexin32 protects against vascular inflammation by modulating inflammatory cytokine expression by endothelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

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：プロテインC・プロテインS・トロンボモジュリン・C4b結合タンパク質・  
血管内皮細胞・細胞間ギャップ結合・コネキシン32・血栓症

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・血管新生阻止作用を (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な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解明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、ラットの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. 研究の方法

【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、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  $\beta$  発現を高めることが示された。

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, Suzuki K, et al. Thrombomodulin, a bi-functional modulator of inflammation and coagulation in sepsis, Crit Care Res Pract, 査読有、2011、10pages  
DOI: 10.1155/2012/614545.
- ② Okamoto T, Suzuki K, et al. Connexin32 protects against vascular inflammation by modulating inflammatory cytokine expression by endothelial cells. Exp Cell Res, 査読有、2011、348-355
- ③ Yamanouchi J, Suzuki K, et al. Impairment of protein C secretion in protein C-deficient patients carrying an Asp297 mutation. Int J Hematol, 査読有、94巻、2011、213-215
- ④ Usui M, Suzuki K, et al. Effect of a prostaglandin I(2) analog on the expression of thrombomodulin in liver and spleen endothelial cells after an extensive hepatectomy. Surg Today, 査読有、41 巻、2011、230-236
- ⑤ Kurata T, Suzuki K, et al. Phosphoinositide 3-kinase induced activation and cytoskeletal translocation of protein kinase CK2 in protease activated receptor 1-stimulated platelets. Thromb. Res., 査読有、125 巻、2010、184-191
- ⑥ Kuriyama N, Isaji S, Hamada T, Kishiwada M, Usui M, Sakurai H, Hayashi T, Suzuki K. The cytoprotective effects of addition of activated protein C into preservation solution on small-for-size grafts in rats. Liver Transpl, 査読有、2010、16巻 1-11.
- ⑦ Okamoto T, Hayashi T, Suzuki K. Connexin32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gap junctional intercellular communication. Biochem Biophys Res Commun, 査読有、2009; 382 巻 264-268.
- ⑧ Kuriyama N, Isaji S, Suzuki K, Uemoto S, et al. Activated protein C prevents hepatic ischemia reperfusion injury in rats. Liver Int, 査読有、2009; 29 巻: 299-307.
- ⑨ Ikeda A, Yano Y, Sumida Y, Suzuki K, Taguchi O, Takei Y, et al. Presence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease. Helicobacter, 査読有 2009; 14: 147-155.
- ⑩ Sakamoto N, Suzuki K, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y, et al. Role of LOX-1 in monocyte adhesion-triggered redox, Akt/eNOS and Ca<sup>2+</sup> signaling pathways in endothelial cells. J Cell Physiol, 査読有 2009; 220: 706-715.
- ⑪ Sudo A, Wada H, Nobori T, Suzuki K, Uchida A, et al. Cut-off values of D-dimer and soluble fibrin for prediction of deep vein thrombosis after orthopaedic surgery. Int J Hematol, 査読有 2009; 89: 572-576.
- ⑫ 油井知雄, 鈴木宏治, 他  
血栓症を発症した複合ヘテロ接合体性プロテイン C 欠乏症患者で認められた 2 種の遺伝子変異とそれぞれのプロテイン C 産生に及ぼす影響。  
日本血栓止血学会雑誌、査読有、22 巻、2011、87-99
- ⑬ 鈴木宏治  
私の血栓止血研究—事始め—  
日本血栓止血学会雑誌、査読無、22 巻、2011、202-212
- ⑭ 鈴木宏治  
凝固線溶系—凝固系の最新の進歩—  
Thrombosis Medicine, 査読無、1 巻、2011、13-20
- ⑮ 鈴木宏治  
プロテイン C とプロテイン S  
Thrombosis Medicine, 査読無、1 巻、2011、94-97
- ⑯ 岡本貴行, 鈴木宏治  
トロンボモジュリンを介した凝固炎症反応と敗血症性 DIC  
Thrombosis Medicine, 査読無、1 巻、2011、17-176
- ⑰ 鈴木宏治, 林 辰弥  
血液凝固制御因子プロテイン S の構造と機能  
臨床検査、査読無、55 巻、2011、340-346
- ⑱ 鈴木宏治, 林 辰弥  
Protein S-Tokushima (K155E)  
臨床検査、査読無、55 巻、2011、373-

- ⑱ 鈴木宏治  
血液凝固機序－血栓形成と細胞機能に及ぼす凝固因子の作用機序－、脈管学、査読無、51巻、2011、287-292
- ⑳ 岡本貴行、鈴木宏治  
トロンビン受容体. International Review of Thrombosis、5巻、2010、200-203.

[学会発表] (計7件) 国際学会のみ記載

- ① Ikejiri M, Suzuki K, et al.  
Changes of behavior in C4b-binding protein and protein S in the inflammatory disease. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis  
July 25, 2011, Kyoto
- ② Okamoto T, Suzuki K, et al.  
Gap junction protein, connexin32 regulates expression of tissue factor and inflammatory cytokines in the endothelial cells. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis  
July 26, 2011, Kyoto
- ③ Hayashi T, Suzuki K, et al.  
Effect of endotoxin and inflammatory cytokines on protein S and C4b-binding protein expressions in the liver cells. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis  
July 26, 2011, Kyoto
- ④ Asanuma K, Suzuki K, et al.  
The inhibition of lung metastasis by inactivation of coagulation activity may lead to dissemination of tumor cells. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis  
July 26, 2011, Kyoto
- ⑤ Akita N, Suzuki K, et al.  
Host PCI inhibits tumor growth, but promotes tumor metastasis by its procoagulant nature. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis  
July 27, 2011, Kyoto
- ⑥ Yoshikawa T, Suzuki K, et al.  
Effect of protein C inhibitor on lipopolysaccharide-induced vascular permeability. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis  
July 28, 2011, Kyoto
- ⑦ Yoshida K, Suzuki K, et al.

Anticoagulant activated protein C suppresses osteoclast differentiation via endothelial protein C receptor. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis  
July 28, 2011, Kyoto

[図書] (計6件)

- ① 鈴木宏治、他 (共著) 医歯薬出版、スタンダード検査血液学 第2版 2012、334
- ② 鈴木宏治、他 (共著) 朝倉書店、血管生物医学事典 2011、489
- ③ 鈴木宏治、他 (共著) 南江堂、予防ハンドブック－エキスパートオピニオン－2010; 10-17
- ④ 鈴木宏治、他 (共著) 腫瘍薬学、南山堂、東京、2010; 475-482.
- ⑤ 鈴木宏治、他 (共著) 医学書院、医学大事典、2009; 702
- ⑥ 鈴木宏治、他 (共著) 医学書院、新臨床内科学 第9版、2009; 949-9522

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 宏治 (SUZUKI KOJI)  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：70077808

### (2) 研究分担者

出屋敷 善弘 (DEYASHIKI YOSHIHIRO)  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：00202193

林 辰弥 (HAYASHI TATSUYA)  
三重県立看護大学・教授  
研究者番号：00242959

岡本 貴行 (OKAMOTO TAKAYUKI)  
三重大学・医学系研究科・助教授  
研究者番号：30378286