

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591421

研究課題名(和文) トロンボモジュリンの血管内皮保護薬としての臨床応用に向けた分子基盤の解明

研究課題名(英文) Development of novel treatment strategy with TM to protect vascular endothelium

研究代表者

池添 隆之 (IKEZOE, TAKAYUKI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：80294833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞上に発現し、凝固を負に制御しているトロンボモジュリンが、シグナル伝達経路ERKを介して抗アポトーシス蛋白Mcl-1の発現を誘導して、サイトカインや免疫抑制剤による細胞傷害から血管内皮細胞を保護することを明らかにした。また、その活性部位は上皮細胞増殖因子様領域に局在し、抗凝固作用とは無関係であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Thrombomodulin (TM) is expressed on the cell surface of endothelial cells and regulates coagulation by inhibiting factor Va and VIIIa via activated protein C. This study found that TM increased levels of anti-apoptotic Mcl-1 in association with activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and protected endothelial cells from endothelial cell damage caused by inflammatory cytokines and calcineurin inhibitors. Furthermore, we identified that cytoprotective function was localized in epidermal growth factor-like domain and independent from anti-coagulation.

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：トロンボモジュリン 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

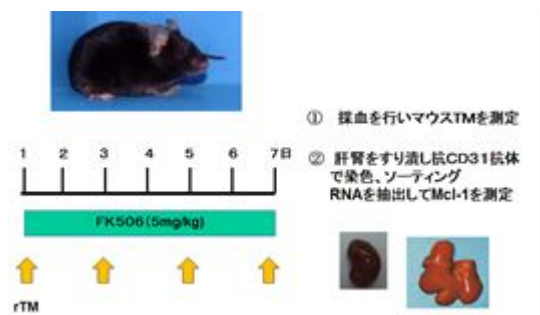
トロンボモジュリン(TM)は血管内皮細胞表面に存在する糖蛋白質であり、抗凝固・抗炎症作用を發揮することで血液中の恒常性を維持する上で重要な分子である。TM 遺伝子は世界に先駆けて日本国内で取得され(Suzuki et al. EMBO J 1987) その活性部位を含む細胞外部分のみを可溶化型分子として遺伝子工学的に生産することに成功、遺伝子組換え TM 製剤(rTM)は2008年に抗凝固薬として世界に先駆けて日本で認可された。申請者は、rTMの多彩な作用機序に興味を持ち、第相臨床試験にも参加、それ以来rTMの臨床応用に取り組んできた。そのような背景のもと、種々の基礎疾患に合併した血管内皮細胞障害に起因する血液凝固異常患者へrTMを投与し患者を治療してきた。その中で申請者はrTMには単なる抗凝固作用のみならず、従来全く明らかにされていなかった血管内皮細胞保護作用が存在する可能性に気付いた。

2. 研究の目的

- (1) TM が有する血管内皮保護作用を試験管内及び実験動物モデルを用いた実験で検証する。
- (2) TM が有する血管内皮細胞保護作用の機序を明らかにする。
- (3) 血管内皮細胞保護作用を發揮する TM の機能活性部位を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試験管内実験: ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にカルシニューリン阻害剤シクロスポリン(CsA) +/- rTM を投与し、アポトーシスによる細胞死をアネキシン染色で評価する。動物実験: マウスに7日連続してカルシニューリン阻害剤タクロリムス(FK506)を腹腔内投与し血管内皮細胞傷害を誘導する。その結果、マウス血管内皮細胞表面から TM が剥がれ、血漿中のマウス TM 濃度は上昇する。この動物モデルに1日おきに rTM あるいはコントロール溶媒を投与し、7日目に採血を行いマウス TM 濃度を測定し、血管内皮細胞障害を定量化する。また、腎と肝を摘出後、ホモジェナイズし抗 CD31 抗体で血管内皮細胞を染色して陽性に染まる血管内皮細胞のみをソーティングして採取する。これらの細胞から RNA を抽出して real time-RT-PCR で Mcl-1 の発現レベルを定量化する。

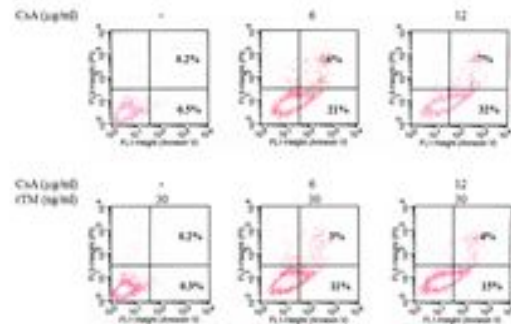


(2) HUVEC を rTM に暴露後 24 時間と 48 時間後に蛋白質を抽出し、ウエスタンブロット法で各種シグナル伝達経路やアポトーシスに関連のある蛋白質の発現レベルを評価する。

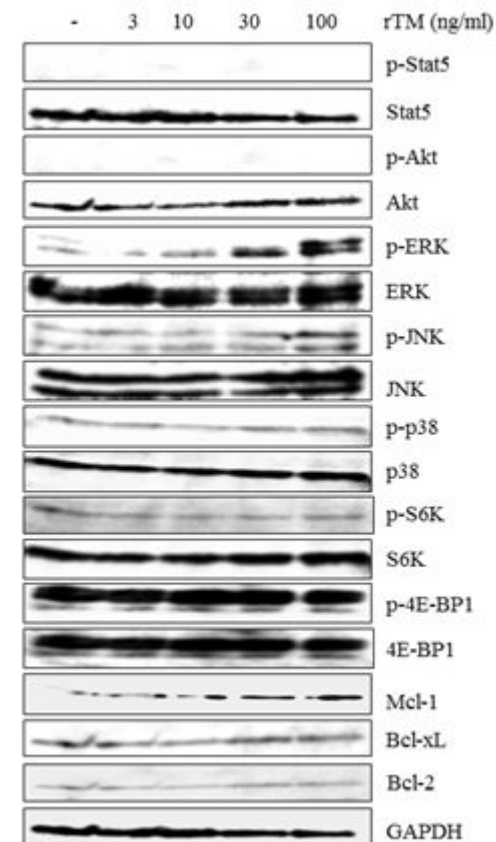
(3) 各種 TM 変異遺伝子を作製し、それらをサル腎臓 COS-1 細胞に導入して変異蛋白質を産生、純化する。これら TM 変異蛋白質を HUVEC に投与し、細胞保護活性を評価し、活性部位を同定する。

4. 研究成果

(1) HUVEC に炎症性サイトカインやシクロスポリン(CsA)を投与するとアネキシン染色陽性細胞が出現し、細胞がアポトーシス死に陥っていることが伺われた。そこに rTM を投与しておくくとアポトーシス死が予防されることが確認できた。



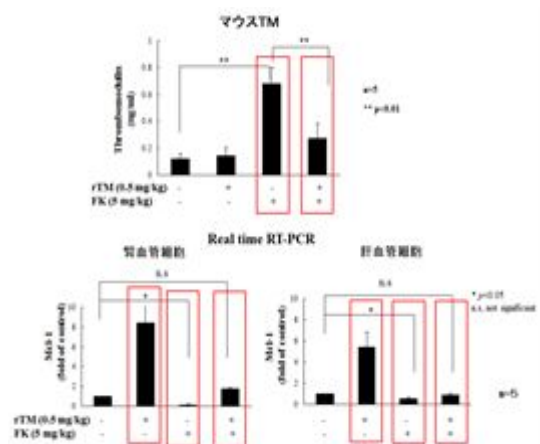
(2) HUVEC に rTM を投与するとシグナル伝達経路 ERK が活性化し、それと同時に抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 が発現誘導されることがウエスタンブロット法で明らかとなった。



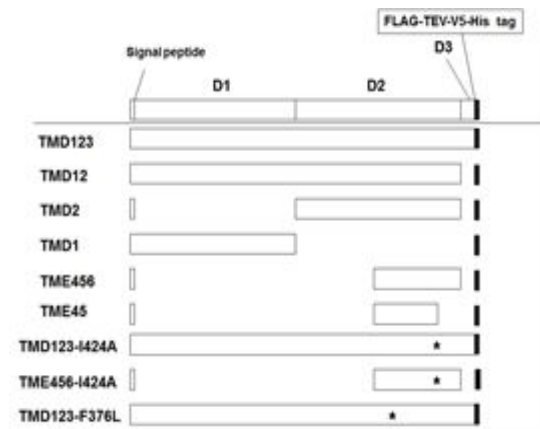
HUVEC に TM 遺伝子を強制発現させると ERK が活性化し Mcl-1 の発現が上昇すること、ERK シグナルを特異的阻害剤でブロックすると Mcl-1 の発現が低下することから rTM は ERK の活性化を介して Mcl-1 の発現を制御していることが伺えた。

次に、Mcl-1 が血管内皮細胞の生存に真に重要であるかを以下の実験で検証した。HUVEC に Mcl-1 遺伝子を導入し強制発現させておくと、CsA の暴露を受けても HUVEC は細胞死に陥らないこと、逆に Mcl-1 の発現を RNA 干渉でノックダウンしておくと、CsA によるアポトーシス死は rTM でも防ぎ得ないことを証明した。即ち、Mcl-1 は血管内皮細胞の生存に重要であると結論付けることができた。

次に、マウスにタクロリムス (FK506) を連日投与することで血管内皮細胞傷害を惹起し、そこに rTM を投与することでこの傷害を緩和可能か否か検証した。FK506 の投与を受けたマウスの腎臓及び肝臓の血管内皮細胞では Mcl-1 の発現が低下し、血漿中のマウス TM 濃度は上昇しており、血管内皮細胞傷害が惹起されていることが確認できた。一方、rTM の投与を受けたマウスの血管内皮細胞では Mcl-1 の発現レベルが増加し、FK506 を rTM と共に投与されたマウスの内皮細胞では、FK506 による Mcl-1 の発現阻害は防御され、マウス TM の濃度上昇も緩和されていた。即ち、rTM は実験動物においても、カルシニューリン阻害剤による血管内皮細胞傷害を Mcl-1 の発現上昇を介して緩和させることが示された。

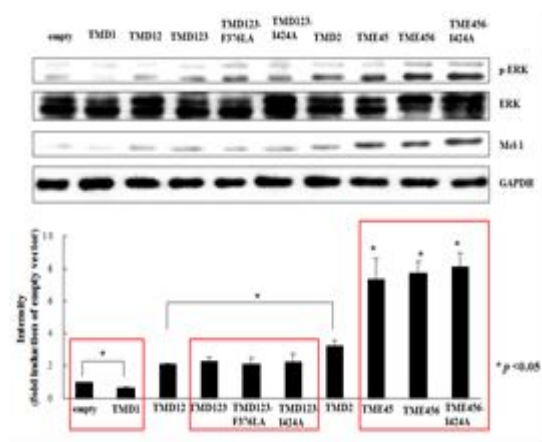


(3) 以下の図に示す、各種 TM 変異遺伝子を作製した。図中の星印はトロンビンの結合活性や、プロテイン C 産生活性を持たない遺伝子変異の導入を示す。



これら遺伝子を COS-1 細胞に導入し変異蛋白質を産生、純化した。得られた蛋白質を HUVEC に投与し、ウエスタンブロット法で ERK のリン酸化と Mcl-1 の発現レベルをウエスタンブロット法で定量化した。次の図に示すように

TME45(上皮細胞増殖様ドメインの 4 番目と 5 番目に)TM よりも強い Mcl-1 の誘導活性が存在すること、Mcl-1 誘導活性は、トロンビンの結合活性や、プロテイン C 産生活性を持たない遺伝子変異体でも得られることが明らかとなった。



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 9 件)

池添隆之 トロンボモジュリンの臨床応用 日本血栓止血学会誌 2014;25:61-69. 査読無

池添隆之 造血器腫瘍による類洞閉塞症候群の発症機構と治療のポイント Thrombosis Medicine 2012;2:79-83. 査読無

Ikezoe T. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in patients with acute promyelocytic leukemia, and its treatment using recombinant human soluble thrombomodulin. Int J He

matol. 2013 Nov 12. [Epub ahead of print] 査読有

Chi S, Ikezoe T, Takeuchi A, Takaoka M, Yokoyama A. Recombinant human soluble thrombomodulin is active against hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. Int J Hematol. 2013 Nov;98(5):615-9. 査読有

Ikezoe T, Takeuchi A, Chi S, Takaoka M, Anabuki K, Kim T, Sakai M, Taniguchi A, Togitani K, Yokoyama A. Effect of recombinant human soluble thrombomodulin on clinical outcomes of patients with coagulopathy after hematopoietic stem cell transplantation. Eur J Hematol. 2013 Nov;91(5):442-7. 査読有

Ikezoe T, Takeuchi A, Isaka M, Arakawa Y, Iwabu N, Kin T, Anabuki K, Sakai M, Taniguchi A, Togitani K, Yokoyama A.

Recombinant human soluble thrombomodulin safely and effectively rescues acute promyelocytic leukemia patients from disseminated intravascular coagulation. Leuk Res. 2012 Nov;36(11):1398-402. 査読有

Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Isaka M, Iwabu N, Sakai M, Taniguchi A, Honda G, Yokoyama A. Thrombomodulin enhances the antifibrinolytic and antileukemic effects of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. Exp Hematol. 2012 Jun;40(6):457-65. 査読有

Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Honda G, Yokoyama A. Thrombomodulin-induced differentiation of acute myelomonocytic leukemia cells via JNK signaling. Leuk Res. 2012 May;36(5):625-33. 査読有

Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Honda G, Furihata M, Yokoyama A. Thrombomodulin protects endothelial cells from a calcineurin inhibitor-induced cytotoxicity by upregulation of extracellular signal-regulated kinase/myeloid leukemia cell-1 signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Sep;32(9):2259-70. 査読有

[学会発表](計3件)

Molecular mechanisms by which calcineurin inhibitors increase vascular permeability. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Yokoyama A. 第35回日本血栓止血学会 2013年5月30日-6月1日 山形国際ホテル 山形

Thrombomodulin protects endothelial cells by upregulation of ERK/Mcl-1 signaling. Ikezoe T, 第34回日本血栓止血学会, 2012年6月7日-9日 ハイアットリージェンシー東京 東京

トロンボモジュリンの血管内皮細胞保護作用の検証. 池添隆之. 第12回DIC研究会(招待講演)2012年3月3日 東京千代田区丸の内三菱コンファレンススクエア M+ 東京

[産業財産権]

出願状況(計3件)

名称: 新規なポリペプチド及びその用途
発明者: 池添隆之、横山彰仁、本田剛一
権利者: 国立大学法人高知大学、旭化成ファーマ株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2013-199627

出願年月日: 2013年9月26日

国内外の別: 国内

名称: 造血細胞移植に伴う生着症候群の予防及び/又は治療剤

発明者: 池添隆之、横山彰仁
権利者: 国立大学法人高知大学、旭化成ファーマ株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2011-131768

出願年月日: 2011年6月14日

国内外の別: 国内

名称: Method for prophylactic and/or the therapeutic treatment of pain associated with hematopoietic cell transplantation

発明者: 池添隆之、横山彰仁
権利者: 国立大学法人高知大学

種類: 特許

番号: 米国特許出願番号 US12/869477

出願年月日: 2011年8月26日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池添 隆之 (IKEZOE, Takayuki)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号: 80294833

(2) 研究協力者

西岡 千恵 (NISHIOKA, Chie)
高知大学・医学部・研究員

楊 晶 (YANG, Jing)
高知大学・医学部・外国人特別研究員