

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790985

研究課題名(和文)免疫抑制剤による血管内皮障害の分子機序の解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism of FK506-induced endothelial dysfunction

研究代表者

江口 良二 (Eguchi, Ryoji)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00461088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制剤FK506は造血幹細胞移植時に発症する移植片対宿主病を予防するのに使用される。一方で、造血幹細胞移植では重篤な合併症である血管内皮障害がしばしば発症する。本研究では、血管内皮障害の病原因と考えられるFK506に焦点を当てて、3次元血管モデルを用いた血管内皮障害の分子機序の解明を目的に実験を行った。その結果、1)FK506は免疫抑制作用およびカスパーゼ経路とは独立して血管内皮細胞の生存因子ERK1/2およびAktの活性を減弱させることにより管腔構造の崩壊と細胞死を誘導する、2)組換え型トロンボモジュリンはFK506によるAkt不活性化を抑制することで細胞死を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：FK506 has been used in hematopoietic stem cell transplantations to suppress immune function, but is associated with severe endothelial dysfunction. We investigated whether FK506 induces endothelial dysfunction using a three-dimensional culture blood vessel model, in which human umbilical vein endothelial cells form and maintain capillary-like tube and lumen structures. We found that FK506 induced tube breakdown and endothelial cell death through attenuation of Akt and ERK1/2 independently of calcineurin inhibition and the caspase pathway and that recombinant human soluble thrombomodulin suppresses FK506-induced endothelial cell death through prevention of Akt inactivation.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管生物学 血管内皮細胞 血管内皮障害 免疫抑制剤 管腔崩壊 細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植や造血幹細胞移植において、免疫抑制剤は拒絶反応や移植片対宿主病 (GVHD) などの免疫応答を抑制するために使用される。しかし、移植時、特に造血幹細胞移植時では、血栓性微小血管症などの致死的な血管内皮障害を合併することが知られている。その病因には、移植血液による GVHD、患者血液中の腫瘍細胞に対する放射線、GVHD を抑制するために使用される免疫抑制剤やステロイド剤などの薬剤が考えられるが、明確な病因は明らかになっていない。

(2) リコモジュリン (rTM) はトロンボモジュリン (TM) の可溶性 (細胞外ドメイン) の組換えタンパク質で、播種性血管内凝固症候群 (DIC) の治療薬として使用されている。白血病などの造血器悪性腫瘍では正常に血小板が生成されないどころか、化学療法などにより造血器悪性腫瘍から組織因子が分泌され、フィブリン血栓などの凝固が亢進し、DIC が発症する。TM は血管内皮細胞の細胞膜に存在し、トロンピンと結合することでフィブリン生成の阻害およびプロテイン C の活性化による凝固促進因子の分解を通して過剰な凝固亢進を調節する。しかし、化学療法や造血幹細胞移植によりダメージを受けた血管内皮細胞では、TM が正常に機能できないため凝固が亢進 (DIC の発症) する。rTM は血管内皮細胞の TM の代替として使用され、DIC の発症が抑制される。近年、rTM が造血器悪性腫瘍 DIC の抑制以外にも血管内皮障害の抑制に関わることが臨床的に示唆されているが、その分子機序は明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 造血幹細胞移植時に合併する血管内皮障害の病因に考えられる免疫抑制剤が血管内皮障害を直接的に誘導するかを明らかにする。

(2) rTM が血管内皮障害を抑制する分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 本研究で使用する免疫抑制剤には、国内の臨床現場で現在使用されているシクロスポリン A (CsA) とタクロリムス (FK506) を用いた。

(2) 血管内皮障害の解析には、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) による in vitro 3 次元血管モデルを構築した実験モデルを使用した。in vitro 3 次元血管モデルとは、HUVEC をウシ由来 I 型コラーゲンに包埋し、繊維芽細胞増殖因子と血管内皮細胞増殖因子により HUVEC に血管新生を誘導させて管腔構造を構築させる 3 次元培養法を指す (図 1)。in vitro 3 次元血管モデルに使用した培地を CsA や FK506 などの免疫抑制剤を含んだ培

地に交換し、光学位相差顕微鏡を用いて管腔構造の変化を観察した。また、免疫抑制剤使用後の細胞生存率の変化を WST-8 により解析し、細胞内シグナルの変化をウェスタンブロット法により解析した。

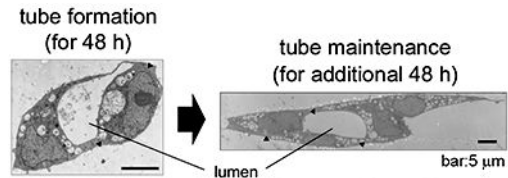


図1. 血管新生および新生後の管腔維持

4. 研究成果

(1) 管腔構造を構築した HUVEC に CsA と FK506 が直接的に影響するかを調べた結果、臨床で使用される血中濃度 (CsA: 0.2-0.8 μg/ml、FK506: 10-20 ng/ml) において CsA はそれよりも高い濃度でも影響は見られなかったが、FK506 は濃度・時間依存的に管腔構造の崩壊 (管腔崩壊) を誘導することを見出した (図 2)。

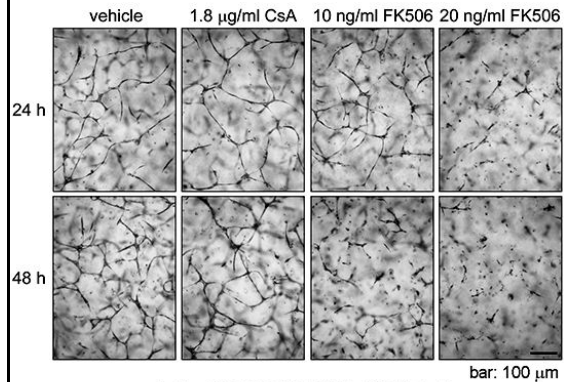


図2. FK506は管腔崩壊を誘導する

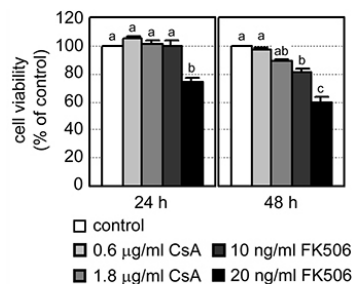


図3. FK506は細胞生存率を減少させる

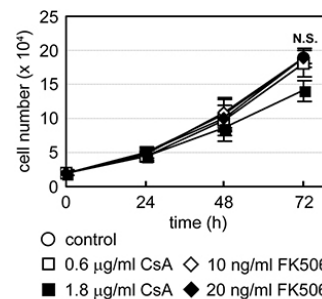


図4. 免疫抑制剤は細胞増殖に影響しない

また、WST-8 を用いた解析から、CsA は HUVEC の細胞生存率に影響を与えなかったが、FK506 は濃度時間依存的に生存率の減少、即ち細胞死を誘導した (図 3)。一方で、単層

培養における免疫抑制剤の影響は無処理と比べて細胞増殖に影響を示さなかった(図 4、前頁)。以上の結果から、CsA ではなく FK506 が直接的に血管内皮障害に関与することが示唆された。また、薬剤などの影響を解析する培養法には単層培養ではなく 3 次元培養がより適していることが示された。

次に、免疫抑制経路が FK506 による血管内皮障害に関与するか解析した。FK506 が T 細胞内に入ると細胞質に存在する FK506 結合タンパク質と複合体を形成する。その複合体は脱リン酸化酵素であるカルシニューリンに結合し、その活性を抑制する。その結果、インターロイキン-2(IL-2)の発現が抑制され、IL-2 による T 細胞自身の増殖・活性化を抑制することで免疫機能が抑制される。

この免疫抑制経路が血管内皮細胞にも作用し、血管内皮障害が誘導されるかを調べた。カルシニューリンに対する short hairpin RNA(shRNA)を組み込んだレンチウイルスベクターによりカルシニューリンの発現を恒常的に抑制(ノックダウン)させた HUVEC を

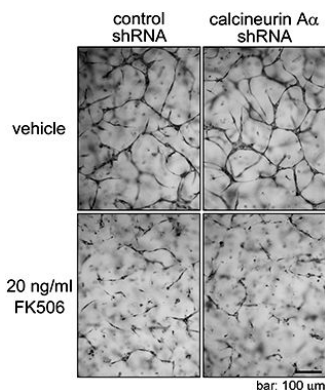


図5: カルシニューリンはFK506による管腔崩壊に関与しない

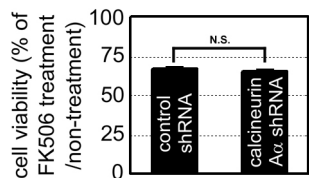


図6: カルシニューリンはFK506による細胞死に関与しない

作製した。カルシニューリンをノックダウンした HUVEC を用いて無処理と比べて問題なく管腔が形成されるのを確認した後に、FK506 を処理することで管腔崩壊および細胞死が抑制されるかを調べた(図 5、6)。残念ながら、カルシニューリンの発現を抑制しても FK506 による管腔崩壊および細胞死は抑制されないことから、FK506 による血管内皮障害は免疫抑制経路を介さないことが示唆された。

WST-8 を用いた解析結果(図 3)から FK506 によって細胞死が誘導されたため、アポトーシスの関与も疑った。管腔を形成している HUVEC 内で FK506 処理によりアポトーシス実行因子であるカスパーゼ-3 の活性化が見られた(図 7)。そこで、

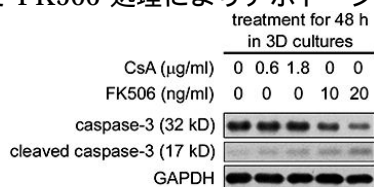


図7: FK506はカスパーゼ-3を活性化する

広域カスパー

ーゼ阻害剤である zVAD(OMe)-fmk を処理したところ、FK506 によるカスパーゼの活性化は阻害されたが、管腔崩壊および細胞死を抑制出来なかった(図 8)。

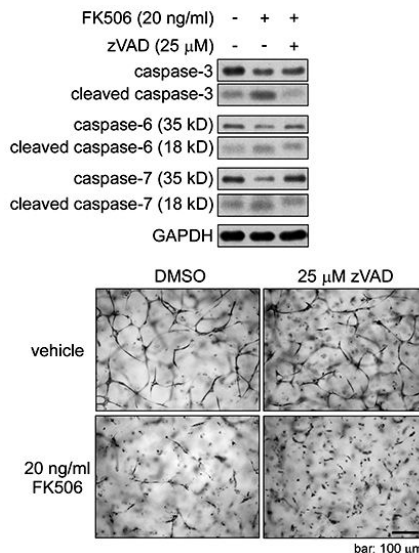


図8: FK506による血管内皮障害はカスパーゼ経路を介さない

これらの結果から、FK506 による血管内皮障害はカスパーゼ経路も介さないことが示唆された。しかし、細胞死が誘導されるということは死のシグナルの増加だけでなく生のシグナルの低下も考えられるため、血管内皮細胞において生存のシグナルである Akt と ERK1/2 の活性化を調べたところ、非常に弱い活性化の抑制が見られた(図 9)。

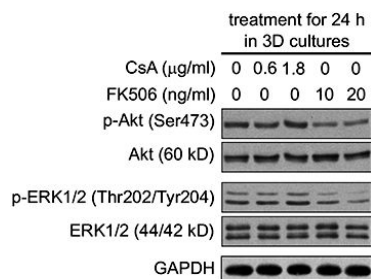


図9: FK506はAktとERK1/2を不活性化する

そこで、Akt の上流の阻害剤 LY294002 と ERK1/2 の上流の阻害剤 PD98059 を低濃度で処理する実験を行ったところ、どちらの阻害剤においても管腔崩壊および細胞死が濃度依存的に誘導された(図 10、次頁)。

以上の結果から、FK506 による血管内皮障害は免疫抑制経路やカスパーゼ経路とは独立して Akt および ERK1/2 の不活性化により

誘導されることが示唆された(図 11、Eguchi et al、Cell. Signal.、2013)。

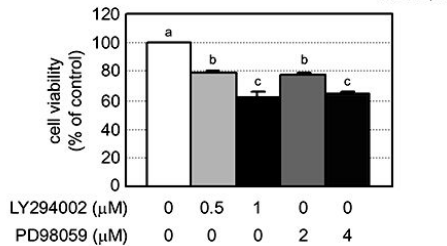
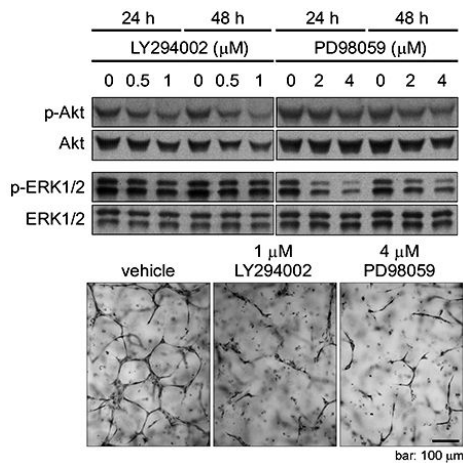


図10. FK506によるAktとERK1/2の不活性化が血管内皮障害を引き起こす

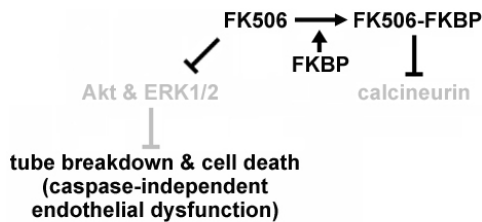


図11. FK506による血管内皮障害の分子機序

(2) rTM が FK506 による血管内皮障害を抑制するかを解析した。3 次元培養で管腔を形成した HUVEC に FK506 と同時に rTM を加えて形態観察を行ったところ、FK506 による管腔崩壊は抑制できなかったが(図 12)、FK506 による細胞死を抑制することが明らかとなった(図 13)。

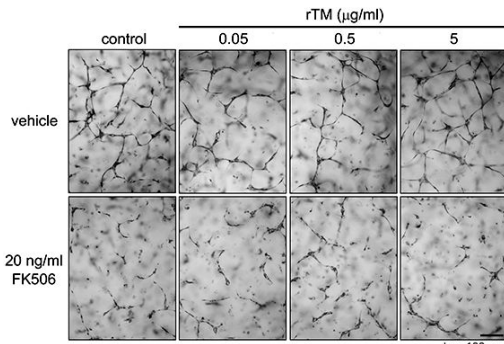


図12. rTMはFK506による管腔崩壊を抑制できない

次に、rTM が FK506 による細胞死を抑制するのに関与する因子を解析した。細胞核内に存在する DNA 結合タンパク質で、細胞死によって核内から細胞外に放出される HMGB1 は炎症性サイトカイン様の活性を

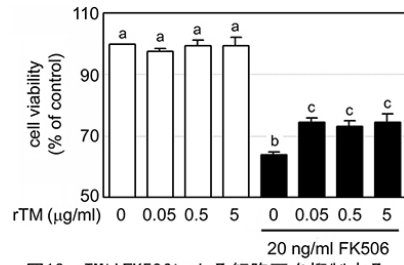


図13. rTMはFK506による細胞死を抑制する

もつことが知られており、TM と同様に rTM は放出された HMGB1 を N 末端のレクチン様ドメインで捕獲・分解することも知られている。FK506 によって 3 次元培養の培養上清に HMGB1 が放出されているか ELISA 法にて解析した結果、HMGB1 は 3 次元培養上清中に FK506 濃度依存的に放出されていることが確認された(図 14)。さらに、放出された HMGB1 が FK506 による細胞死の原因であるかを調べるため、FK506 と同時に HMGB1 中和抗体を処理した。rTM と同様に HMGB1 中和抗体も FK506 による管腔崩壊は抑制できなかったが(図 15)、rTM 処理で見られた FK506 による細胞死の抑制は HMGB1 中和抗体処理では見られなかった(図 16)。

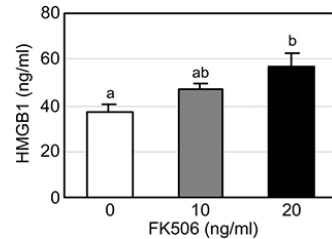


図14. FK506処理によりHMGB1は管腔形成したHUVECから放出される

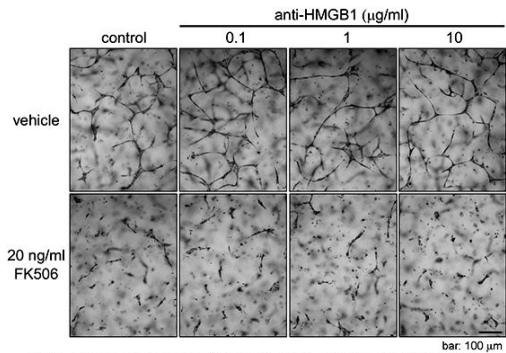


図15. HMGB1中和抗体はFK506による管腔崩壊を抑制できない

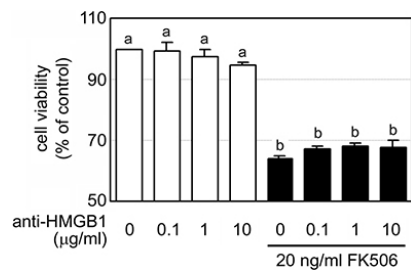


図16. HMGB1中和抗体はFK506による細胞死を抑制できない

以上の結果から、FK506 による HMGB1 の放出が FK506 による血管内皮障害の直接的な原因ではないことが示唆された。

rTM 処理により FK506 誘導性細胞死が抑制されたことから、生存シグナルである Akt と ERK1/2 の活性化を調べた結果、非常に興味深いことに FK506 による Akt の不活性化が rTM 処理により抑制されていることが明らかとなった(図 17)。一方で、FK506 による ERK1/2 の不活性化は rTM 処理でも抑制できなかった。

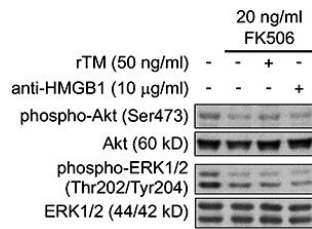


図17. rTMはFK506によるAktの不活性化を抑制する

さらに、rTM による FK506 誘導性の Akt 不活性化の抑制と rTM による FK506 誘導性細胞死の抑制の因果関係を調べるために、Akt の上流の阻害剤である LY294002 を用いて解析した。その結果、rTM による FK506 誘導性の Akt 不活性化の抑制が LY294002 によって解除され(図 18)、rTM による FK506 誘導性細胞死の抑制も LY294002 によって解除された(図 19)。

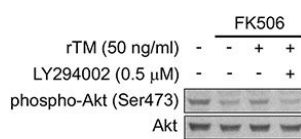


図18. LY294002はrTMによるFK506誘導性のAkt不活性化の抑制を阻害する

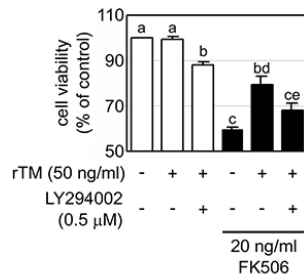


図19. LY294002はrTMによるFK506誘導性細胞死の抑制を阻害する

以上の結果から、rTM は FK506 誘導性の Akt 不活性化を抑制することにより血管内皮細胞の細胞死を抑制させ、血管内皮障害を軽減させることが明らかとなった(図 20、Eguchi et al, Exp. Cell. Res., 2014)。また、rTM によって FK506 による細胞死が抑制されたにも拘らず、管腔崩壊は抑制されないことから、管腔崩壊の誘導機序は細胞死のそれとは独立して存在することが示唆された。

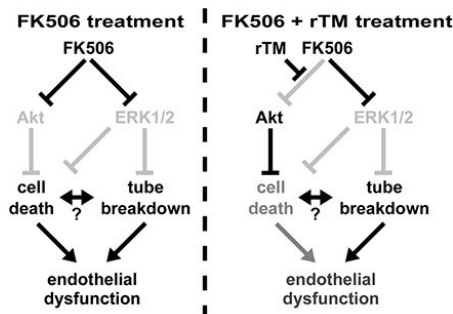


図20. rTMによるFK506誘導性血管内皮障害の抑制機序

今後は、FK506 による ERK1/2 の不活性化と管腔崩壊の因果関係を明らかにする必要がある。

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 2 件)

Eguchi R, Fujimori Y, Okada M, Tamaki H, Wakabayashi I, Ogawa H, Recombinant human soluble thrombomodulin attenuates FK506-induced endothelial dysfunction through prevention of Akt inactivation, *Experimental Cell Research*, 査読有, Vol.323, NO.1, 2014, 112-117
Doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.023.

Eguchi R, Kubo S, Ohta T, Kunimasa K, Okada M, Tamaki H, Kaji K, Wakabayashi I, Fujimori Y, Ogawa H, FK506 induces endothelial dysfunction through attenuation of Akt and ERK1/2 independently of calcineurin inhibition and the caspase pathway, *Cellular Signalling*, 査読有, Vol.25, No.9, 2013, 1731-1738
Doi: 10.1016/j.cellsig.2013.05.008.

[学会発表](計 8 件)

江口 良二、藤盛好啓、岡田昌也、玉置広哉、若林一郎、小川啓恭、組換え型トロンボモジュリンは FK506 が誘導する Akt の不活性化により引き起こされる血管内皮障害を抑制する、第 37 回日本造血細胞移植学会、2015 年 3 月 6 日、神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

江口 良二、藤盛好啓、小川啓恭、若林一郎、Recombinant human soluble thrombomodulin attenuates FK506-induced endothelial dysfunction through prevention of Akt inactivation, 第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 18 日、京都国際会議場(京都府・京都市)

江口 良二、藤盛好啓、岡田昌也、若林一郎、小川啓恭、Recombinant thrombomodulin suppresses FK506-induced endothelial cell death by preventing Akt inactivation, 第 75 回日本血液学会、2013 年 10 月 12 日、札幌市教育文化会館(北海道・札幌市)

江口 良二、藤盛好啓、久保秀司、小川啓恭、若林一郎、FK506 induces endothelial dysfunction through attenuation of Akt and ERK1/2 independently of calcineurin inhibition and the caspase pathway, 第 21 回日本血管生物医学会、2013 年 9 月 27 日、千里阪急ホテル(大阪府・豊中市)

江口 良二、藤盛好啓、久保秀司、小川啓恭、若林一郎、FK506 は calcineurin 阻害や caspase 経路とは独立して Akt と ERK1/2 活

性の減衰により血管内皮障害を誘導する、第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

江口 良二、藤盛好啓、久保秀司、小川啓恭、A complex of FK506 and FK506 binding protein 12 is involved in FK506-induced breakdown of capillary-like tube structures independent of calcineurin inhibition、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場・マリノメッセ福岡（福岡県・福岡市）

江口 良二、岡田昌也、藤盛好啓、相馬俊裕、小川啓恭、Recombinant thrombomodulin suppresses FK506-induced endothelial cell death、第 74 回日本血液学会、2012 年 10 月 21 日、京都国際会議場（京都府・京都市）

江口 良二、藤盛好啓、久保秀司、小川啓恭、FK506 binding protein 12 is involved in FK506-induced endothelial dysfunction、第 74 回日本血液学会、2012 年 10 月 20 日、京都国際会議場（京都府・京都市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 良二 (EGUCHI, Ryoji)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00461088