

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461942

研究課題名(和文) トロンボモジュリンの多機能性解析と移植における治療戦略の開発

研究課題名(英文) Analysis of pleiotropic property of thrombomodulin and development of therapeutic strategy using thrombomodulin in transplantation

研究代表者

三輪 祐子 (MIWA, YUKO)

愛知医科大学・医学部・寄附講座 助教

研究者番号：90572941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞に存在し、凝固系のレギュレーターであるトロンボモジュリン(TM)を用いた移植医療における治療戦略は、i)敗血症DICの治療薬としてもちいられている可溶性リコンビナントTMの投与とii)TMを血管内皮細胞に膜型に強発現させる2つの方法が考えられる。研究結果より、第一に可溶性hTMの投与は、APCの産生を高め、トロンビンの産生を制御し、過剰なトロンビン産生が予想される、移植直後の虚血再灌流傷害などハイリスクな状況において有用な抗凝固作用が期待されると思われる。一方膜型hTMは、血管内皮細胞膜状での炎症因子を直接抑制する抗炎症効果が期待され、グラフトの長期生着に必要な因子と思われた。

研究成果の概要(英文)：Thrombomodulin (TM) is a vascular endothelial cell receptor that functions as a cofactor for activated protein C (APC). From the viewpoint of coagulation control using TM in transplantation, two strategy including (i) administration of recombinant soluble thrombomodulin (S-hTM), which has been approved for the treatment of sepsis-induced DIC, and (ii) upregulation of membrane-bound TM (MB-hTM) expression in endothelial cells would be proposed. As a result, S-hTM had more potent capacity of APC production and inhibitory effect on thrombin generation than MB-hTM. In contrast, MB-hTM suppressed the expression of inflammatory factor in endothelial cells. It was speculated that S-hTM treatment would be of assistance during high-risk periods for excessive thrombin formation (e.g., ischemia reperfusion injury or severe infection/rejection). Considering the properties of MB-hTM exhibiting anti-inflammatory function, might be required to long-term stabilization of graft endothelial cells.

研究分野：移植免疫学

キーワード：移植・再生医療 凝固系制御 異種移植

1. 研究開始当初の背景

臓器移植では、移植後のグラフトに対する傷害（虚血再灌流傷害、急性・慢性拒絶反応など）を抑制し、いかに長期生着を実現するかが課題となっている。研究の歴史を繙くと、有効な保存液の開発、カルシニューリン阻害剤によるT細胞制御により、飛躍的に移植成績は向上し、近年では抗体関連型拒絶反応抑制のためのB細胞制御が注目されている。私たちは、補体、凝固、炎症反応が、グラフト傷害を増悪させることに着目し、従来の免疫抑制療法（免疫担当細胞の制御）とは異なる視点からグラフト保護を目的とした新しい治療法を開発をめざす。敗血症DICの治療薬として用いられているトロンボモジュリンは、凝固系の生理的な調整因子として血管内皮細胞膜に存在し、抗補体、抗炎症作用を持つ可能性が示唆されている。本研究では、トロンボモジュリンの特性を分子レベルで解析し、細胞膜発現レベルを調節する因子を見出す。異種移植用に開発したトロンボモジュリン発現クローンブタを用い、その多機能性が臓器移植後の様々な局面で有効であるか評価し、グラフト機能廃絶を阻止し長期生着を可能にする治療戦略を探索する。

2. 研究の目的

(1) トロンボモジュリン(TM)の血管内皮細胞における抗炎症作用の解明
移植後の臓器傷害において、虚血再灌流傷害、自然免疫による炎症反応、抗体関連型拒絶反応においてもTMの抗炎症作用は広く求められている。血管内皮細胞を使った *in vitro* の系でこれらのモデルを作成し、TMの抗炎症作用を確認する。ブタ血管内皮細胞(PAEC)に導入された膜型の外来性hTMが、虚血再灌流傷害や感染により放出されたサイトカインの刺激により上昇した炎症因子を抑制し、また抗体の接着により上昇した凝固のイニシエーターであるTF(tissue factor)の発現を

抑制し、凝固の亢進を抑制可能か確認する。また臨床応用を目指してヒトの血管内皮細胞(HAEC)を使って、薬剤による膜型の内在性TMの誘導、可溶性リコンビナントトロンボモジュリンの投与によって、同様の抗炎症効果が得られるか確認する。

(2) ブターヒヒ腎移植モデルによるhTMの凝固抑制効果の解明

in vitro の系で確認したhTMの抗炎症作用が、*in vivo* の系でも効果を発揮し、凝固系を抑制するか確認する。抗体関連型拒絶反応のモデルとして、異種移植のブターヒヒ腎移植モデルを用い、hTMの導入によって移植臓器の長期生着につながるか確認する。

3. 研究の方法

(1) トロンボモジュリン(TM)の血管内皮細胞における抗炎症作用機序を解明するために、トロンボモジュリン発現クローンブタから採取したブタ血管内皮細胞(hTM-PAEC)に存在する膜型のトロンボモジュリン(MB-hTM)と可溶性トロンボモジュリン(S-hTM)の抗凝固作用、抗炎症作用の機能性の違いをTNFα存在下で刺激したPAECにおいて比較検討した。S-hTMはDICで使用される濃度を投与し、活性化プロテインC(APC)産生、pig tissue factor (TF), E-selectin の発現抑制、thrombinの産生抑制を指標にして比較した。
(2) ブターヒヒ腎移植モデルによるhTMの凝固抑制効果を確認するためにヒト型トロンボモジュリン(hTM)が導入されたブタ(Galノックアウト、補体制御因子導入)の腎臓をヒヒに移植実験をし、hTM導入により移植臓器を長期生着に導くか確認する。

4. 研究成果

(1) 膜型のトロンボモジュリン(MB-hTM)と可溶性トロンボモジュリン(S-hTM)の抗凝固作用、抗炎症作用の機能性の違いは、APCの産生上昇、トロンピン産生の抑制は、S-hTM

が有意な効果を認めたが(図1)、血管内皮細胞膜状の外因性凝固反応のイニシエーターである pig TF, また血管内皮細胞の炎症因子である pig E-selectin の発現抑制は、MB-hTM が有意な効果を認めた。(図2) また薬剤による膜型の内在性 TM の誘導はスタチンを投与して行い、内在性の pig TM の発現の上昇と pig TF の発現抑制を認めた。

S-hTM の投与は、過剰な thrombin 産生が予想される、移植直後の再灌流傷害などハイリスクな状況に置いて有用な抗凝固作用が期待される。一方 MB-hTM は、血管内皮細胞膜状での抗炎症効果が期待され、グラフトの長期生着に必要な因子と思われる。

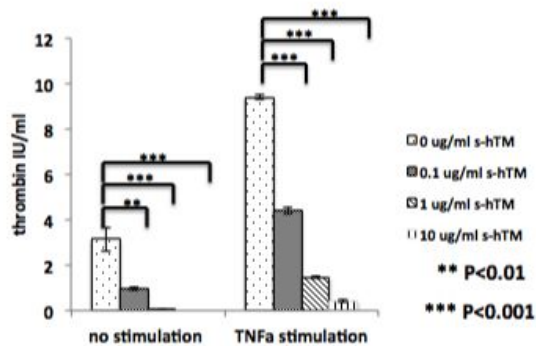


図1 s-hTMのトロンビン産生抑制効果

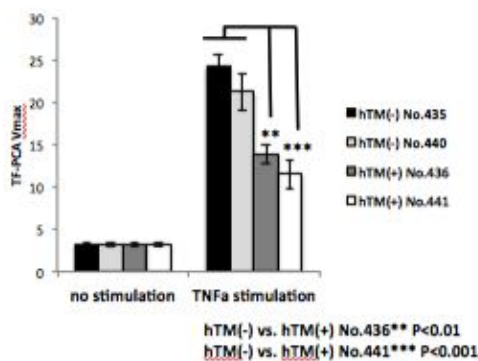


図2 MB-hTMの抗炎症効果

(2) プターヒヒ腎移植モデルによる hTM の凝固抑制効果

異種移植のモデルであるプターヒヒ腎移植モデルによる hTM の凝固抑制効果を確認するためにヒト型トロンボモジュリン(hTM)が導

入された(Gal ノックアウト、補体制御因子導入)の腎臓をヒヒに移植実験をし、hTM 導入により移植臓器を長期生着に導くのか確認する予定であったが、成果として GTKO/hDAF/hTM pig 作製に関して、核移植で使用する細胞株は、Flow cytometry の sorting システムを用い、GTKO pig より採取した fibroblast に hDAF, hTM を高発現する、細胞株が樹立できた。しかしその樹立細胞の核を用いた、核移植による GTKO/hDAF/hTM pig の誕生までには至らず、プターヒヒ腎移植実験を行うことができなかった。現在も GTKO/hDAF/hTM pig の作製は、継続して行っている。

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 4 件)

Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Kuzuya T, Ogawa H, Onishi A, Kobayashi T

AMP-activated protein kinase as a promoting factor, but complement and thrombin as limiting factors for acquisition of cytoprotection: implications for induction of accommodation.

Transplant International 査読有り
26:1138-1148, 2013 DOI: 10.1111/tri.12186

Haneda M, Owaki M, Kuzuya T, Iwasaki K, Miwa Y, Kobayashi T.

Comparative analysis of drug action on B-cell proliferation and differentiation for mycophenolic acid, everolimus, and prednisolone.

Transplantation 査読有り
27:405-412, 2014

DOI:10.1097/01.TP.0000441826.70687.f6

Kurata Y, Kuzuya T, Miwa Y, Iwasaki K, Haneda M, Amioka K, Yamada K, Watarai Y,

Katayama A, Uchida K, Kobayashi T.
Clinical relevance of post-transplant
pharmacodynamic analysis of cyclosporine
in renal transplantation.

Int Immunopharmacol. 査読あり 22:384-391
2014

DOI:10.1016/j.intimp.2014.07.022.

Miwa Y, Yazaki S, Iwamoto M, Suzuki S,
Iwasaki K, Haneda M, Yamamoto K, Maruyama
S, Onishi A, Kobayashi T

Functional Difference between
Membrane-Bound and Soluble Human
Thrombomodulin

Transplantation 査読有り 99:702-709,2015

DOI:10.1097/TP.0000000000000571

〔学会発表〕(計 14 件)

三輪祐子、山本貴之、岩崎研太、羽根田
正隆、後藤憲彦、渡井至彦、武田朝美、丸山
彰一、小林孝彰

液性拒絶反応における血管内皮細胞の役割
と凝固制御の役割

第 49 回日本移植学会総会 2013 年 9
月 5-7 日、京都

Miwa Y, Yamamoto T, Shintoku Y, Iwasaki
K, Haneda M, Goto N, Watarai Y, Takeda A,
Morozumi K, Sawa Y, Maruyama S, Uchida K,
Kobayashi T

Analysis of donor ABO antigen expression
in ABO incompatible kidney
transplantation

CAST 2013(The 13th Congress of the Asian
Society of Transplantation) 2013 年 9
月 2-6 日、京都

Miwa Y, Iwasaki K, Haneda M, Iwamoto M,
Onishi A, Kobayashi T

Development of therapeutic interventions
using anticoagulant factor thrombomodulin
in organ transplantation

CAST 2013 (The 13th Congress of the Asian

Society of Transplantation)

2013 年 9 月 2-6 日、京都

三輪祐子、岩元正樹、岩崎研太、羽根田
正隆、大西彰、小林孝彰

移植医療における抗凝固因子トロンボモジ
ュリンを用いた治療戦略

第 16 回日本異種移植研究会 2013 年 1
月 10 日、大阪

Miwa Y, Yamamoto T, Shintoku Y, Iwasaki
K, Haneda M, Goto N, Watarai Y, Takeda A,
Morozumi K, Sawa Y, Maruyama S, Uchida K,
Kobayashi T

Comparative study on donor ABO antigen
expression levels in red blood cells,
platelets and graft endothelial cells

IXA 2013 (International
Xenotransplantation Association) Jointly
with the iABO/Hyper Immune Symposium, 2
013 年 11 月 10-13 日、大阪

Miwa Y, Iwasaki K, Haneda M, Iwamoto M,
Onishi A, Kobayashi T

Control of procoagulant state using
anticoagulant factor thrombomodulin in
xenotransplantation

IXA 2013 (International
Xenotransplantation Association) Jointly
with the iABO/Hyper Immune Symposium 2
013 年 11 月 10-13 日、大阪

三輪祐子、山本貴之、岩崎研太、羽根田
正隆、後藤憲彦、渡井至彦、武田朝美、両角
國男、丸山彰一、小林孝彰

ABO 不適合腎移植におけるリスク因子の総合
解析: IgM, IgG サブクラスおよびドナー抗原
量の解析

第 50 回日本移植学会総会 2014 年 9 月
10-12 日、東京

三輪祐子、岩崎研太、羽根田正隆、鈴木
俊一、岩元正樹、大西彰、小林孝彰

抗凝固因子 thrombomodulin に着目した異種
移植における凝固異常の調節

第50回日本移植学会総会 2014年9月
10-12日、東京

三輪祐子、鈴木俊一、岩崎研太、羽根田正隆、岩元正樹、大西彰、小林孝彰

異種移植における human thrombomodulin の有用性

第26回東海北陸腎不全治療研究会 2015年2月28日、名古屋

三輪祐子、鈴木俊一、岩崎研太、羽根田正隆、岩元正樹、大西彰、小林孝彰

ブタ血管内皮細胞における適正なヒト型トロンボモジュリンの発現レベルの検討

第17回日本異種移植研究会 2015年3月14日、宇都宮

三輪祐子、山本貴之、岡田学、岩崎研太、渡井至彦、武田朝美、丸山彰一、小林孝彰

ABO 不適合腎移植におけるリスク因子の総合解析：レシピエント抗 A/B サブクラス、C1q, ドナーA/B 抗原発現量の評価

第51回日本移植学会総会 2015年10月1-3日、熊本

三輪祐子、岩崎研太、羽根田正隆、鈴木俊一、岩元正樹、大西彰、小林孝彰

ヒト型トロンボモジュリンを発現する cloned pig 作成における適正な発現レベルの検討

第51回日本移植学会総会 2015年10月1-3日、熊本

Miwa Y, Iwamoto M, Iwasaki K, Suzuki S, Iwamoto M, Onishi A, Kobayashi T.

Study of proper expression level of human thrombomodulin in pig endothelial cell with effective anti coagulant activity and no bleeding tendency.

IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress, 2015年11月15-19日、メルボルン

三輪祐子、岩崎研太、鈴木俊一、岩元正樹、大西彰、小林孝彰

ヒト型 Endothelial protein C receptor (hEPCR) と thrombomodulin(hTM)の共発現に

よるブタ内皮細胞における炎症反応制御の比較検討

第18回日本異種移植研究会 2016年2月20日、長崎

〔図書〕(計 0 件)

〔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

http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060704/1197954_1443.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

三輪 祐子 (MIWA YUKO)

愛知医科大学 医学部 腎疾患・移植免疫学
寄附講座 助教

研究者番号：90572941

(2)研究分担者

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)

愛知医科大学 医学部 外科学講座(腎移植
外科)教授

研究者番号：70314010

岩崎 研太 (IWASAKI KENTA)

愛知医科大学 医学部 腎疾患・移植免疫学
寄附講座 准教授

研究者番号：1050881

(3)連携研究者

大西 彰 (ONISHI AKIRA)

日本大学 生物資源科学部 教授

研究者番号：30414890