

令和元年6月28日現在

機関番号：34104

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06764

研究課題名(和文) トロンボモジュリン- を応用した劇症型感染症とDICの新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel pharmacotherapy by thrombomodulin-alfa for severe infection and 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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、トロンボモジュリン(TM)の薬理的な作用機序の全貌を明らかにし、敗血症性の播種性血管内凝固症候群(敗血症性DIC)に対する新たな薬物治療の開発に繋げるために行った。敗血症性DICと診断された10名の患者の血液を解析したところ、TMと相互作用している113種類のタンパク質が同定され、そのうち39種類のタンパク質が機能的に関連していた。さらに、23種類のタンパク質は敗血症の重症化やDICへの進展に関与するタンパク質であることがわかった。今後は、これらのタンパク質とTMとの直接的な相互作用または機能的な関連性について、in vivoおよびin vitro実験により確認していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症性DICは予後不良であり、死亡率が高い。そのため、治療法の改善が求められている。TMはDICに対して唯一生存期間の延長が認められた薬物であるが、血液凝固を抑制するため出血傾向が高くなる。本研究で同定したTMと相互作用しているタンパク質がどのようにTMと機能的に関連しているかを明らかにすることで、血液凝固に影響しないDIC治療薬の標的分子を見出すことに繋がり、新規DIC治療薬の開発に発展すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of study is to reveal pharmacological action mechanism of thrombomodulin alfa (TM) and lead to development of novel pharmacotherapy for septic Disseminated Intravascular Coagulation (DIC). We analyzed plasma of 10 DIC patients participated in this study. 113 proteins were identified. Functional associations among 39 proteins were identified. Moreover, 23 proteins are associated with progression to sever sepsis or DIC. We plan to validate interaction and functional association between TM and their identified proteins in vivo and in vitro.

研究分野：医療薬学

キーワード：thrombomodulin-alfa 播種性血管内凝固症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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。劇症型感染症は、健常人においても発症し、急激に DIC へと進行する予後不良の感染症である。そのため、DIC への進行を抑えるための新規予防法の開発が求められている。

トロンボモジュリン- (TM-) 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、出血の危険性が高く、投与されても 28 日死亡率は約 30% もあり、より安全で制御が容易な新規 DIC 治療薬の開発が求められている。DIC の患者の血液中には、好中球エラスターゼなどのプロテアーゼが発現しており、TM- は活性を失う可能性が示唆されている。プロテアーゼの発現は患者の病態により異なるため、臨床効果の個体差要因となる可能性がある。また、TM- は生体内の炎症関連タンパク質や細菌由来の毒素タンパク質と結合し、抗炎症作用による臓器障害の抑制に寄与している可能性が示唆されている。しかしながら、ヒトの検体を用いて TM- と結合するタンパク質を測定した報告はなく、臓器障害を抑制する抗炎症のメカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

当初の研究目的は、TM- α の切断機序および個体差要因の解明、TM- α が結合する炎症関連タンパク質および毒素タンパク質の同定を行うことであった。しかしながら、TM- α を投与される患者数が少なかったため、研究目的を DIC 患者の血漿中における TM- α と相互作用するタンパク質の網羅的同定に修正し、研究を進めた。

3. 研究の方法

DIC と診断された患者の血漿を検体として、抗 TM- α ポリクローナル抗体を用いて免疫沈降し、TM- α と結合しているタンパク質を抽出した。抽出したサンプルをトリプシン処理し、脱塩処理後、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC/TOF/MS) により結合しているタンパク質を網羅的に同定した (Figure 1)。同定されたタンパク質について STRING (Protein-Protein Interaction Networks database) による生物情報学的に解析を行い、TM- α や他のタンパク質、敗血症や DIC の増悪に関与するタンパク質を検索した。

4. 研究成果

DIC と診断された 10 名の患者が対象となった (Table 1)。これらの患者の血漿を解析し、113 種類のタンパク質が TM- α と相互作用しているタンパク質として同定された。STRING により解析を行った結果、同定された 113 種類のタンパク質のうち、39 種類のタンパク質が機能的に関連していることがわかった (Figure 2)。これらのタンパク質のうち、23 種類のタンパク質は、炎症、免疫、血液凝固、血管透過性亢進に関与していた (Table 2)。

同定された F-actin および S100-A9 は、DAMPs (Damage-associated molecular patterns) として知られており、敗血症時に細胞から血液中に漏出し、白血球の細胞膜上に発現している C 型レクチン受容体 (DNCR1)、RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) に作用し、全身性の炎症を惹起することが報告されている [1, 2]。

CPA3 は、エンドセリン-1 を分解することで、血管内皮細胞の障害を引き起こす炎症メディエーターの産生を抑制することが報告されている [3]。同じカルボキシペプチダーゼである TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) は、TM- α とトロンビンの複合体により活性化される [4]。CPA3 は、TAFI のアミノ酸配列と相同性が高いことから (Figure 3)、TM- α が CPA3 の活性化も調節している可能性が高いと考えている。

sPLA2 は敗血症性ショックの患者において活性が上昇することが知られており、リゾホスファチジルコリン (LPC) を産生することで、LPC 受容体である G-protein-coupled receptor 4 (GPR4) に作用し、血管内皮細胞のバリア機能を減弱させ、血管透過性を亢進することが報告されている [5]。また、ANG は直接的に血管内皮細胞に作用し、血管透過性亢進を引き起こすタンパク質である [6]。

これらのことから、TM- α が F-actin、S100-A9、CPA3、sPLA2 及び ANG と相互作用することで、抗炎症作用や血管透過性亢進の抑制作用を示し、これらのタンパク質の血漿中濃度や活性レベルが病態によって異なるため、TM- α の臨床効果に個体差を引き起こしている可能性が高いと考え、さらに *in vivo*、*in vitro* 実験による解析を進めている。

Table 1 Patients Characteristics.

Patient No.	Age	Infection	Pathogenesis	APACHE II score
1	40	Vulvar dermatitis	Escherichia coli	37
2	85	Pyelonephritis	Escherichia coli	28
3	85	Pyelonephritis	Escherichia coli	28
4	60	Pneumonia	influenzavirus A	28
5	81	Pneumonia	Streptococcus pneumoniae	30
6	32	Pneumonia	influenzavirus A	36
7	87	Pneumonia	Streptococcus mitis	36
8	33	Fulminant hepatitis	Herpes simplex virus	42
9	70	Pneumonia	influenzavirus A	42
10	75	Pneumonia	influenzavirus A	43

Table 2 Identified TMA interaction proteins.

Annotation	Protein names
DAMPs	Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1)
	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)
	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)
	Histone H2A type 1-A (Histone H2A/r)
	Histone H4
	Protein S100-A9 (Calgranulin-B)
Blood coagulation	Serpin B12
	von Willebrand factor (vWF)
Vascular permeability	Angiogenin (Ribonuclease 5) (RNase 5)
	Breast carcinoma-amplified sequence 3 (GAOB1)
	Catenin beta-1 (Beta-catenin)
	Fibronectin (FN) (Cold-insoluble globulin) (CIG)
	Integrin beta-4 (GP150) (CD antigen CD104)
	Mast cell carboxypeptidase A (MC-CPA) (Carboxypeptidase A3)
	Phospholipase A2, membrane associated (GIIC sPLA2)
	SRC kinase signaling inhibitor 1 (SNAP-25-interacting protein)
Immune system / Inflammation	Complement component C9
	Lipopolysaccharide-binding protein (LBP)
	Neutrophil defensin 1 (Defensin, alpha 1)
	Neutrophil defensin 3 (Defensin, alpha 3)
	B-cell receptor CD22 (Sialic acid-binding Ig-like lectin 2)
	Cartilage intermediate layer protein 1 (CILP-1)
	Caspase recruitment domain-containing protein 9 (hCARD9)
	Interleukin-25 (IL-25) (Interleukin-17E) (IL-17E)
Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 2	

Figure 1 Clinical study flow.

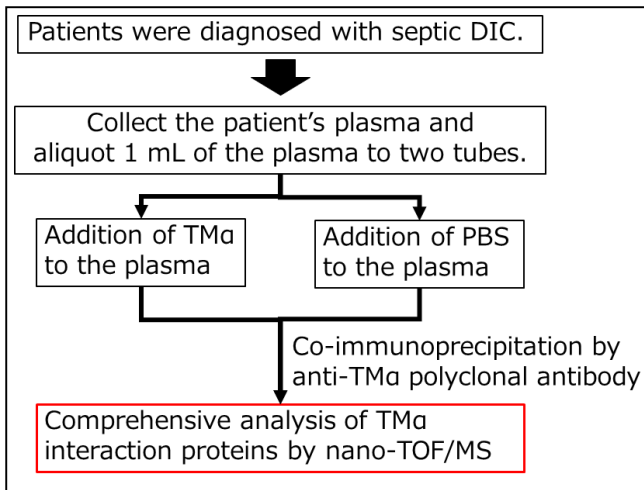


Figure 2 Functional association of TMa interaction proteins.

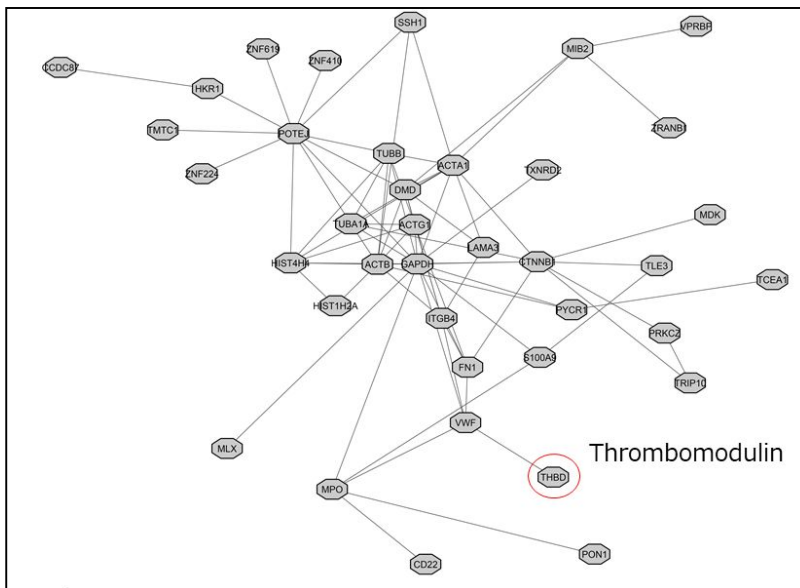


Figure 3 Amino acid sequence homology between carboxypeptidase A3 and B2.

carboxypeptidase A3	1:RNILFIGALIGSSI--GREFS--SD--TULRINVANGDEISK--SC--VNSNNLRFNFKSPSS--FN-R-F--DVLVFSVSL	73
carboxypeptidase B2	1:KLCSLAV--VFLVLE--ECHVSEKSGTULRALFSTRQVQLN--ITTYEIVL--KDFVIADLIVKPKCHFF--NASEV	77
carboxypeptidase A3	74:QAFSE--RSQ--LEYA--TIE--LQAL--DNEDEMCQHNQCQPS--NEN--EAWHSL--EATY--HEMDN--RADP--FLARRV--EG--SF	153
carboxypeptidase B2	78:DNV--K--NVN--S--F--FCS--LLA--VED--LQQC---ISNDTVSP--S--ASY--E--C--HSL--N--E--SWIEF--TER--E--L--TR--I--H--G--S--S	153
carboxypeptidase A3	154:ENF--L--V--L--K--S--T--G--T--V--R--R--F--M--N--A--G--I--S--R--E--W--I--S--T--A--I--N--T--A--R--K--I--U--S--D--L--Q--R--D--E--A--I--S--T--E--K--M--I--F--L--L--V--N--E--G--Y--M--T	231
carboxypeptidase B2	154:SKY--L--V--L--K--S--T--G--E--Q--A--R--N--I--N--I--D--C--I--H--R--E--W--I--S--F--C--L--F--I--G--H--I--I--Q--P--I--I--G--Y--N--I--R--L--V--E--Y--V--M--E--V--N--E--G--Y--M--S	231
carboxypeptidase A3	232:QTG--N--R--R--R--R--S--R--N--F--G--S--S--I--G--I--G--I--N--R--N--N--A--S--F--A--G--K--F--A--S--N--F--C--S--E--M--S--F--H--A--N--S--E--V--K--S--V--D--F--I--Q--K--H--G--N--F--G--F--I--D--L--S	309
carboxypeptidase B2	232:W--K--N--E--R--K--R--S--F--Y--A--N--N--E--I--C--I--L--N--R--N--F--A--S--K--H--W--C--E--E--A--S--S--S--C--S--E--T--I--S--L--Y--P--E--E--V--K--M--A--S--L--R--R--N--I--C--I--Y--I--S--M--S	311
carboxypeptidase A3	310:FS--C--L--M--Y--F--Y--E--V--K--M--A--F--E--E--L--D--N--R--I--R--K--L--A--S--V--E--T--E--L--V--E--I--C--T--I--M--E--S--S--I--C--K--W--T--G--I--F--A--F--E--L--P--E--T--G--I	398
carboxypeptidase B2	312:FS--C--H--I--V--F--E--S--I--R--S--K--F--E--E--L--S--I--V--A--S--E--V--R--I--E--K--T--E--K--N--T--R--I--H--G--S--E--L--I--G--F--G--D--W--I--E--G--I--E--S--T--E--L--P--E--T--G--I	391
carboxypeptidase A3	389:Y--G--F--L--L--E--N--C--I--E--T--E--E--T--W--L--G--L--K--T--M--E--V--R--D--N--L--Y	421
carboxypeptidase B2	392:Y--G--F--L--L--E--R--Y--E--I--E--R--F--A--V--S--K--I--A--W--V--I--R--N--V--	423

【参考文献】

- [1] Ahrens S et al., Immunity, 2012.
- [2] Turner NA, J Mol Cell Cardiol. 2016.
- [3] Maurer M et al., Nature. 2004, 432, 512.,
- [4] Plug T et al., J Thromb Haemost. 2015.
- [5] Qiao J et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006.
- [6] Gong B et al., BMC Infect Dis. 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

榎屋友幸, 今井寛, 丸山一男, 奥田真弘: 第28回日本医療薬学会年会(神戸) 2018年, シンポジウム40 救急・集中治療領域のクリニカル・クエスチョンに対する基礎的検討

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 奥田真弘、今井寛、丸山 一男

ローマ字氏名: Msahiro Okuda, Hiroshi Imai, Kazuo Maruyama

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。