

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21582

研究課題名（和文）急性放射線障害に対するトロンボモジュリン分子の臨床応用

研究課題名（英文）The effect of thrombomodulin on acute radiation injury

研究代表者

池添 隆之（Takayuki, Ikezoe）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80294833

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：血管内皮細胞上に発現する、複数のドメインから構成される膜タンパク、トロンボモジュリン（TM）はトロンピンと結合してプロテインCを活性化プロテインC（APC）に変換して抗凝固作用を発揮する。培養血管内皮細胞を用いた実験で、TMは放射線によるDNA傷害マーカーであるH2AXのリン酸化を抑制した。我々はトロンピンと結合しないTM変異体TM G412Dを作製した。TM G412Gは培養血管内皮細胞の増殖と血管新生作用を増強した。TM G412Dは急性放射線症候群の治療薬として有望かもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東京電力福島第一原子力発電所では今後廃炉作業が進められる。起きてはならないことではあるが、その発生リスクがゼロではない被ばく事故に備えた対策の確立が望まれる。特に1グレイ以上の線量を被ばくした際に生じる骨髄不全や消化管障害などからなる急性放射線症候群に対する治療法の確立は急務である。本研究により、放射線によるDNA損傷をTMが緩和する可能性や、放射線傷害の結果生じるフリーラジカルによる肺障害をTMが緩和する可能性が示された。TMは抗凝固薬であるため、被ばく患者に使用すると出血を助長することが危惧される。我々が合成したTM G412Dは凝固系に作用しないため安全に使用可能である。

研究成果の概要（英文）：Thrombomodulin (TM), a multi-domain membrane protein expressed on vascular endothelial cells, binds to thrombin and converts protein C to activated protein C (APC), exerting anticoagulant effects. In experiments using human umbilical vein vascular endothelial cells, TM inhibited phosphorylation of H2AX, a marker of radiation-induced DNA damage. We generated a TM mutant, TM G412D, which does not bind thrombin and is unable to produce APC, and TM G412G enhanced proliferation and angiogenesis of human umbilical vein vascular endothelial cells; TM G412D may be a promising therapeutic agent for acute radiation syndrome.

研究分野：血液内科学

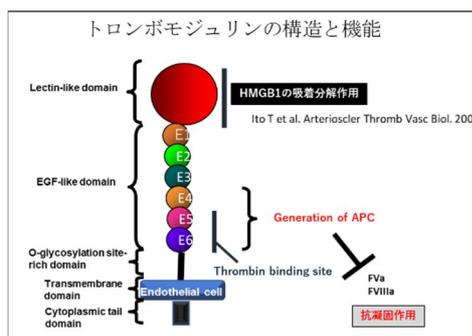
キーワード：トロンボモジュリン 急性放射線症候群

1. 研究開始当初の背景

2011年3月11日の福島県沖の東日本大震災とそれに引き続く東京電力福島第一原子力発電所の事故は未曾有の大災害をもたらした。現在、東京電力福島第一原子力発電所は廃炉に向けて準備が進められている。国は原子力災害対策特別措置法に基づき、原子力災害対策を円滑に実施するために「原子力災害対策指針」を定め、その中で「原子力災害予防対策を講じているにも関わらず、原子力災害が発生した場合には、原子力事業者、国、地方公共団体等が、住民の健康、生活基盤及び環境への影響を、事態の段階に応じた最適な方法で緩和し、影響を受けた地域が可能な限り早く通常の社会的・経済的な活動に復帰できるよう、様々な行動をとらなければならない」としている。すなわち、発生リスクがゼロではない被ばく事故に備えた万全の対策を講じることが強く求められている。

体細胞が大量の電離放射線の曝露を受けるとデオキシリボ核酸 (DNA) が傷害され細胞死を来す。骨髄中の造血細胞、口腔や腸の粘膜細胞は特に放射線感受性が高く、容易にアポトーシスに陥る。ヒトは一般的に、1グレイを越える放射線被ばくを受けると骨髄不全や消化管障害など複数の臓器機能不全に陥り急性放射線症候群を発症し、最悪の場合死に至る。有事の際、急性放射線症候群からヒトを守る手段を確立しておくことが求められる。

トロンボモジュリン (TM) は主に血管内皮細胞膜上に発現する、複数の構造からなる膜タンパクである。その上皮細胞増殖因子 (EGF) 様領域でトロンビンと結合し、プロテイン C を活性化化プロテイン C (APC) に変換して抗凝固作用を発揮する。TM の細胞外領域を遺伝子組換え技術で作製したリコンビナント TM (rTM) が播種性血管内凝固 (DIC) の治療薬として 2008 年から本邦で使用可能となっている。我々は、血管内皮細胞障害に端を発して発症する造血細胞移植後の合併症である肝類洞閉塞症候群 (SOS) や移植関連微小血管障害症 (TA-TMA) に DIC を合併した患者に rTM を投与すると SOS や TA-TMA も劇的に改善することに気付いた。培養血管内皮細胞やモデルマウスを用いた実験を行い、rTM に血管内皮細胞保護作用があることを突き止めた。



TM の N 末端のレクチン様領域には炎症性サイトカイン HMGB1 を吸着・不活化するなどの抗炎症作用が存在することが明らかとなっている。我々はマウス移植片対宿主病 (GVHD) モデルを作成し、rTM が GVHD 予防効果を発揮することを報告した (Bone Marrow Transplant. 2015)。この一連の研究のなかで、rTM がレシピエントマウスにおいて、造血の回復を促進していることに気付いた。これらのことから、rTM は造血幹細胞に作用し、その分化・増殖を促進しているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

電離放射線により血管内皮細胞も DNA 傷害を受けアポトーシスに陥る。その結果、血管数は減少し、主要臓器への酸素供給は途絶する。骨髄や各組織に存在する幹細胞も細胞死に陥るため分化した造血細胞や上皮細胞の供給も途絶え生体は死に至る。実際に、我々はこれまでの研究で、高用量の放射線を照射した後にドナー造血細胞を移植するマウスモデルでは、肝臓内で血管や類洞が減少していることを見出している (Haematologica 2018)。

被ばく後に rTM を投与することで血管内皮細胞が保護される、あるいは造血幹細胞や、近年その存在が明らかとなった血管内皮幹細胞に作用して血管障害が軽減されることで急性放射線症候群の発症を予防できるのではないかと考えるに至った。本研究で、培養血管内皮細胞やマウス放射線症候群モデルを用いて、rTM の内皮保護作用薬としての開発の可能性を見極める。

3. 研究の方法

(1) 出血の副作用のない TM 変異体の開発。

rTM はトロンビンと結合して APC を産生して抗凝固作用を発揮する DIC 治療薬である。従って骨髄機能不全により血小板が減少していることが想定される急性放射線症候群患者に使用すると出血の副作用が懸念される。近頃、我々の共同研究者らが、幼少時から出血を繰り返す患児において、トロンビンと結合できない構造変化をもたらす TM 遺伝子変異 (TM Gly412Asp TM G412D) を同定した (Blood Adv 2020)。この変異体はトロンビンと結合できないため APC を産生できず、したがって抗凝固作用を持たない。TM はトロンビンと結合後、TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) を抗線溶作用のある活性化 TAFI に変換する。この患児では活性化 TAFI が作られず線溶システムに抑制がかからないため出血を繰り返していると考えられた。TM G412D を化学合成し、その血管内皮保護作用や血管新生作用を、培養血管内皮細胞を用いて検証する。具体的にはプロモデオキシウリジン (BrdU) 取り込み法による細胞増殖アッセイと、マトリゲル

を用いた血管新生アッセイを行う。

(2) 放射線照射が血管内皮細胞の DNA 傷害に及ぼす影響と TM の効果の検証。

培養血管内皮細胞 EA.hy926 細胞に高線量の放射線照射後に、DNA 損傷マーカーである H2AX のリン酸化状態を観察する。培養液に TM を添加することで H2AX のリン酸化状態が変化するのが観察する。

(3) 血管内皮幹細胞に対する TM の効果の検証。

マウスの肝臓から既報 (Nat Protoc. 2020) に従い CD157 をマーカーとして血管内皮幹細胞を単離し、それに対する TM の増殖刺激作用をコロニーアッセイで評価する。

(4) 急性放射線症候群マウスモデルの作製。

C57BL/6 マウスに 9.5 グレイの放射線を照射して急性放射線症候群を惹起する。このモデルに血管内皮幹細胞と造血幹細胞を移植し放射線障害からの救援作用を評価する。マウスから採血を行い、白血球数、血小板数、ヘモグロビン値を測定し、骨髄障害の程度を評価する。血管内皮幹細胞は GFP を発現するグリーンマウスから採取し、造血幹細胞は C57BL/6 マウスから採取後に赤色を発現する Tomato 遺伝子を、レンチウイルスを用いて導入後に移植する。マウスを安楽死後に肝臓を摘出し、薄切切片を作成して蛍光顕微鏡で確認する。この実験で、放射線により肝臓内で傷害を受けた血管が造血幹細胞、血管内皮幹細胞のどちらの幹細胞で修復されたのか、肝臓内の血管の色を見ることで判別可能となる。

(5) 放射線誘発肺線維症に対する TM の効果の検証。

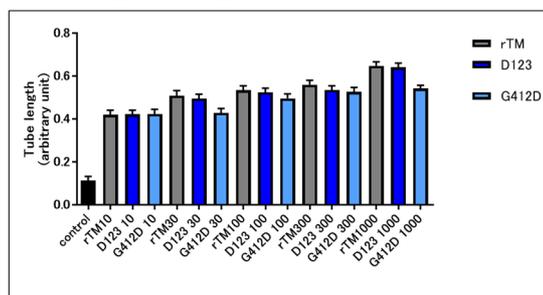
放射線照射により肺線維症が誘発され、その結果呼吸不全に陥る。我々はこの肺線維症に対する TM の予防効果の検証を試みた。残念ながら急性放射線症候群マウスモデルでは肺線維症を誘発することはできなかった。放射線による肺線維症の発症にはフリーラジカルが関与しているとされる。同様の機序で、プレオマイシンがマウスにおいて肺線維症を誘発することが知られているため、我々はプレオマイシンを経気管支的に投与することで肺線維症を作成することに成功した。このモデルマウスに TM を投与することで肺線維症の発症を予防可能か検討した。

4. 研究成果

(1) トロンピンとの結合能を持たない TM G412D は血管保護作用と血管新生作用を維持する。

化学合成した TM G412D と野生型の TM が凝固時間へ与える影響を検討した。健康人の血漿に TM を添加するとプロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) とともに延長するが、TM G412D を添加しても凝固時間の延長は認めなかった。従って、TM G412D はトロンピンとの結合力を失い凝固系には作用しないことが確認できた。

マトリゲルにヒト臍帯静脈血管内皮細胞をまき、様々な濃度の TM G412D あるいは野生型の TM (D123) を添加して tube 形成能を評価した。形成された tube の長さを Image J ソフトエアで計測してグラフ化した図を示す。無添加培地のコントロールと比較して TM は野生型、変異型ともに血管新生を促進したが両群間に有意な差を認めなかった。同様に BrdU 取り込み法でも D123 と TM G412D の血管新生作用が確認された。



(2) 血管内皮幹細胞の採取。

C58BL/6 マウスの肝臓を摘出し collagenase 処理により単一細胞化した。既報に従い (Nat Protoc. 2020) CD31、CD45、CD157 等の抗体で細胞染色を行いセルソーティングにて血管内皮幹細胞分画を採取した。その回収率は内皮細胞 10,000 個あたり約 50 個であった。この幹細胞分画の幹細胞活性をコロニーアッセイで評価することを試みたが、適切なアッセイ条件を確立するに至らなかった。また、採取できる幹細胞数が少なく、マウス移植実験を行うには不十分であるため、未だこれらの細胞の幹細胞活性は in vitro、in vivo とともに施行できておらず今後の課題である。

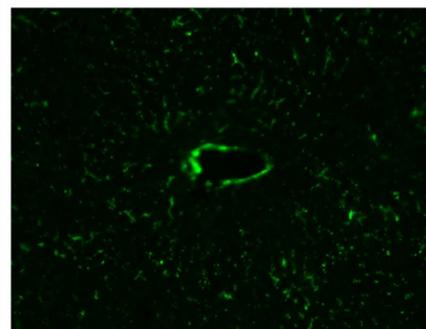
(3) 放射線照射による DNA 傷害に対する TM の効果。

高線量の放射線に EA.hy926 細胞を暴露すると線量依存的に H2AX のリン酸化が誘導された。培養液にあらかじめ rTM を添加すると H2AX がリン酸化する時間経過が遅れることが明らかとなった。また APC を添加しても同様の効果が得られ、rTM は APC を介して血管内皮細胞保護作用を発揮している可能性がある。APC を産生できない TM G412D が、放射線照射が誘導する H2AX のリン酸化に与える影響は今後確認予定である。

(4) 血管内皮細胞障害を幹細胞で救援する。

本来、急性放射線症候群マウスモデルを作製して造血幹細胞や血管内皮幹細胞を移植し、それら幹細胞による血管再構築を評価する予定であったが、本学は2020年と2021年に2度、震度5を超える地震に見舞われ、動物施設に設置された放射線照射装置が使用できない状況に陥った。そこで代替療法として、抗がん剤で骨髄不全をはじめ主要臓器障害を惹起するモデルを作製した。具体的には高用量のブスルファン（BU）とサイクロフォスファミド（CY）を Balb/c マウスに投与し、その後グリーンマウスの骨髄から採取した造血幹細胞を移植した。移植 36 日目にマウスを安楽死させ肝臓を摘出して蛍光顕微鏡で観察すると肝臓内の血管が緑色に発色している像が得られた。これはレシピエントの傷害を受けた血管がドナー由来の造血幹細胞により修復されたことを示唆する。今後、TM や TM G412D をこのモデルマウスや、急性放射線症候群モデルに投与することで、傷害血管の修復が促進されるのかを検討予定である。

肝臓内の血管内皮細胞がドナー由来の細胞で置換

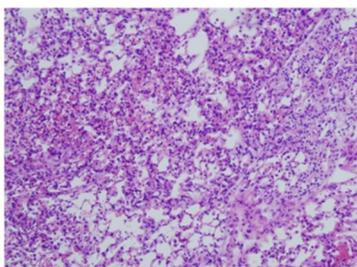


(5) rTM は肺線維症の発症を抑制する。

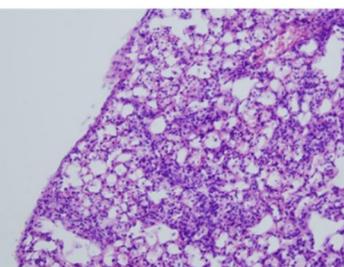
C57BL/6 マウスに高線量の放射線を照射したが肺に線維化を誘導できなかった。従ってブレオマイシンによる肺線維症マウスモデルを使用した。ブレオマイシン投与後、14 日間に及び rTM あるいはコントロール溶媒を腹腔内投与して最終日にマウスを安楽死させ、摘出肺をヘマトキシリン・エオジン染色してその線維化や炎症細胞浸潤の程度を評価した。下図は rTM 投与を受けたマウス 3 匹とコントロール溶媒の投与を受けたマウス 3 匹の肺組織の組織像であるが、rTM 投与を受けた何れのマウスも肺線維化の軽減と炎症細胞浸潤の減少を認める。

BLM D14 (subpleural, HE x100)

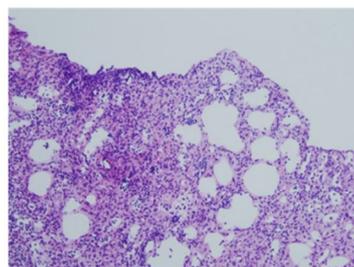
BLM-1



BLM-2

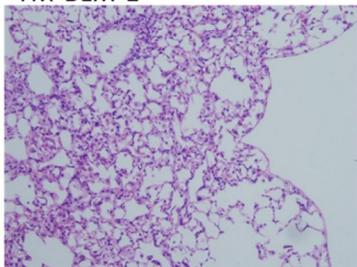


BLM-3

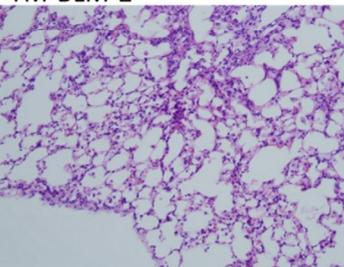


TM-BLM D14 (subpleural, HE x100)

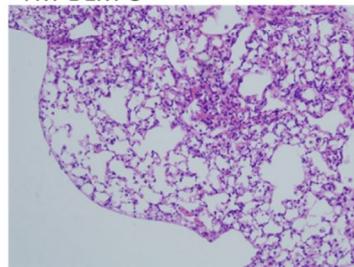
TM-BLM-1



TM-BLM-2



TM-BLM-3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Fukatsu M, Ohkawara H, Wang X, Alkebsi L, Furukawa M, Mori H, Fukami M, Fukami SI, Sano T, Takahashi H, Harada-Shirado K, Kimura S, Sugimoto K, Ogawa K, Ikezoe T.	4. 巻 15
2. 論文標題 The suppressive effects of Mer inhibition on inflammatory responses in the pathogenesis of LPS-induced ALI/ARDS.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 eabd2533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.abd2533.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li R, Li X, Zhao J, Meng F, Yao C, Bao E, Sun N, Chen X, Cheng W, Hua H, Li X, Wang B, Wang H, Pan X, You H, Yang J, Ikezoe T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Mitochondrial STAT3 exacerbates LPS-induced sepsis by driving CPT1a-mediated fatty acid oxidation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Theranostics.	6. 最初と最後の頁 976, 999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/thno.63751.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sun N, Meng F, Zhao J, Li X, Li R, Han J, Chen X, Cheng W, Yang X, Kou Y, Zheng K, Yang J, Ikezoe T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Aurka deficiency in the intestinal epithelium promotes age-induced obesity via propionate-mediated AKT activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Biol Sci.	6. 最初と最後の頁 1302-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/ijbs.56477.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Chen X, Sun N, Li R, Sang X, Li X, Zhao J, Han J, Yang J, Ikezoe T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Targeting HLA-F suppresses the proliferation of glioma cells via a reduction in hexokinase 2-dependent glycolysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Biol Sci.	6. 最初と最後の頁 1263-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/ijbs.56357.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen X, Wang C, Sun N, Pan S, Li R, Li X, Zhao J, Tong H, Tang Y, Han J, Qiao J, Qiu H, Wang H, Yang J, Ikezoe T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Aurka loss in CD19+ B cells promotes megakaryocytopoiesis via IL-6/STAT3 signaling-mediated thrombopoietin production.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theranostics.	6. 最初と最後の頁 4655-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/thno.49007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawasugi K, Wada H, Honda G, Kawano N, Uchiyama T, Madoiwa S, Takezako N, Suzuki K, Seki Y, Ikezoe T, Iba T, Okamoto K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Hypofibrinogenemia is associated with a high degree of risk in infectious diseases: a post-hoc analysis of post-marketing surveillance of patients with disseminated intravascular coagulation treated with thrombomodulin alfa.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thromb J.	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12959-021-00264-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li R, Sun N, Chen X, Li X, Zhao J, Cheng W, Hua H, Fukatsu M, Mori H, Takahashi H, Ohkawara H, Fukami M, Okamoto M, Hamazaki Y, Zheng K, Yang J, Ikezoe T.	4. 巻 11
2. 論文標題 JAK2V617F Mutation Promoted IL-6 Production and Glycolysis via Mediating PKM1 Stabilization in Macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 33628203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.589048.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mori H, Ohkawara H, Togawa R, Rikimaru M, Shibata Y, Ikezoe T.	4. 巻 113
2. 論文標題 Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation in COVID-19 patients: a scoping review.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 320-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03084-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Alkebsi L, Wang X, Ohkawara H, Fukatsu M, Mori H, Ikezoe T.	4. 巻 113
2. 論文標題 Dasatinib induces endothelial-to-mesenchymal transition in human vascular-endothelial cells: counteracted by cotreatment with bosutinib.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 441-455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03034-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikezoe T	4. 巻 113
2. 論文標題 Advances in the diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation in haematological malignancies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 34-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02992-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Han J, Jiang Z, Wang C, Chen X, Li R, Sun N, Liu X, Wang H, Hong L, Zheng K, Yang J, Ikezoe T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of Aurora-A Promotes CD8+ T-Cell Infiltration by Mediating IL10 Production in Cancer Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1589-1602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-19-1226.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oriuchi N, Aoki M, Ukon N, Washiyama K, Tan C, Shimoyama S, Nishijima KI, Takahashi K, Ito H, Ikezoe T, Zhao S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Possibility of cancer-stem-cell-targeted radioimmunotherapy for acute myelogenous leukemia using 211At-CXCR4 monoclonal antibody.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63557-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田佳代, 森 博隆, 深津真彦, 佐野隆浩, 高橋裕志, 木村 哲, 大河原浩, 山田晋吾, 池添隆之
2. 発表標題 急性白血病のDIC診断における核内蛋白の有用性について
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嶋田有里, 菅野喜久子, 金子裕眠, 山寺幸雄, 池添隆之, 志村浩己
2. 発表標題 血栓止血学会DIC診断基準2017を用いた凝固分子マーカーの評価
3. 学会等名 第21回 日本検査血液学会学術集会 (2020.7.11-7.12, 金沢)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田佳代, 森 博隆, 深津真彦, 佐野隆浩, 高橋裕志, 木村 哲, 大河原浩, 山田晋吾, 池添隆之
2. 発表標題 血液腫瘍に合併するDICの診断における核内蛋白の有用性について
3. 学会等名 第21回 日本検査血液学会学術集会 (2020.7.11-7.12, 金沢)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池添隆之
2. 発表標題 日本血栓止血学会DIC診断基準2017年版の有用性の評価と新規予後予測マーカーの検索
3. 学会等名 第42回 日本血栓止血学会学術集会 (2020.6.18-6.20, 大阪) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田英夫, 内山俊正, 川杉和夫, 窓岩清治, 竹迫直樹, 鈴木 圭, 関 義信, 池添隆之, 岡本好司, 射場敏明, 河野徳明
2. 発表標題 感染症型DICにおける低フィブリノゲン血症は予後不良である
3. 学会等名 第42回 日本血栓止血学会学術集会 (2020.6.18-6.20, 大阪)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池添隆之
2. 発表標題 臨床に直結するDIC検査学 「急性白血病に合併するDICの発症機序について」
3. 学会等名 第21回 日本検査血液学会学術集会 (2020.7.11-7.12, 金沢)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
中国	Xuzhou Medical University,		