様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　８　月　１４　日現在

機関番号：２１６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６１４０６

研究課題名（和文）トロンボモジュリン変異体による新規血管内皮保護薬の開発

研究課題名（英文）A novel cytoprotective agent with thrombomodulin mutant

研究代表者
池添　隆之（Ikezoe, Takayuki）

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）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに、血管内皮細胞上に発現して血液凝固を制御するトロンボモジュリン（TM: thrombomodulin）の4番目と5番目の上皮細胞増殖因子様領域（TME45）に血管内皮細胞保護作用や血管新生作用があることを報告した。今回の研究で、40アミノ酸からなる5番目のTME（TME5）にその活性が局在していることを明らかにした。さらに、TME5は血管内皮細胞膜上に発現するケモカイン受容体GPR15（G protein coupled receptor 15）と結合して、血管内皮細胞内に生存シグナルを伝達することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that the 4th and 5th epidermal growth factor like domain of thrombomodulin (TME45) possesses cytoprotective as well as pro-angiogenic activities. The current study has found that these activities were preserved in the TME5. Further studies employed immunoprecipitation followed by proteomic analysis to identify the cell surface protein which interacts with TME5. We found that TME5 binds to chemokine receptor GPR15, leading to activation of intracellular pro-survival signaling in vascular endothelial cells.

研究分野：血栓止血学

キーワード：thrombomodulin　transplantation

１．研究開始当初の背景

申請者は血管内皮細胞膜蛋白質であるトロンボモジュリン（TM）分子由来のペプチド配列が血管内皮細胞の恒常性維持機能（血管内皮保護作用）を有していることを発見した。

２．研究の目的

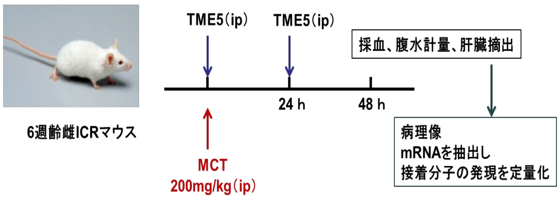
本研究では、この新規 TM 分子由来ペプチドについて、内皮細胞障害に起因する疾患に対する新たな治療薬として臨床応用するための研究基盤を確立する。
計画している具体的な研究項目は、①血管内皮保護作用発現に必須な TM 分子内の最小ペプチド配列の特定、②血管内皮障害の病態を反映した動物モデルでの効果の検証、③新規 TM 受容体の探索、の３つである。

３．研究の方法

a)血管内皮細胞保護活性の評価．これまでに TM の 4 番目と 5 番目の上皮細胞増殖因子様領域(TME45)に細胞保護活性が存在することを報告したが（Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012)、4 番目と 5 番目のどちらに活性が存在するか、それぞれに対する中和抗体を用いて細胞保護活性を検証する。
血管内皮保護活性の評価は、①細胞死抑制活性、②抗アポトーシス蛋白質 Mcl-1 発現誘導、③細胞透過性亢進抑制活性、④血管新生促進活性、⑤細胞増殖促進活性にて行う（Ikezoe et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012)。それぞれの方法は以下の通りである。

① シクロスポリンやタクロリムス（移植後に使用する免疫抑制剤）、サイトカインなどによって誘導される培養血管内皮細胞の細胞死をアネキシンV抗体染色や核染色で検出する。
② 抗アポトーシス蛋白質 Mcl-1 発現誘導をウエスタンブロット法にて定量化する。
③ 培養血管内皮細胞の透過性亢進を蛍光物質標識デキストランにて検出する。
④ 血管新生促進活性は、in vitro 血管内皮管腔形成、及びマウスを用いた in vivo マトリゲル皮下移植法にて評価する。
⑤ 内皮細胞増殖促進活性は、細胞内に取り込まれたブロモデオキシウリジンを測定する。

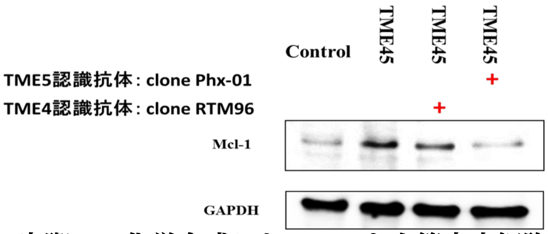
b) モノクロタリンによる血管内皮障害マウスモデルによる検証．ビンカアルカロイドであるモノクロタリンをマウスに投与して肝類洞閉塞症候群（SOS: sinusoidal obstruction syndrome)を作成する（図を参照)。TME4 あるいは TME5 をこのマウスに投与して SOS が緩和されるか肝酵素や腹水貯留の測定や肝臓組織を病理学的に観察して評価する。



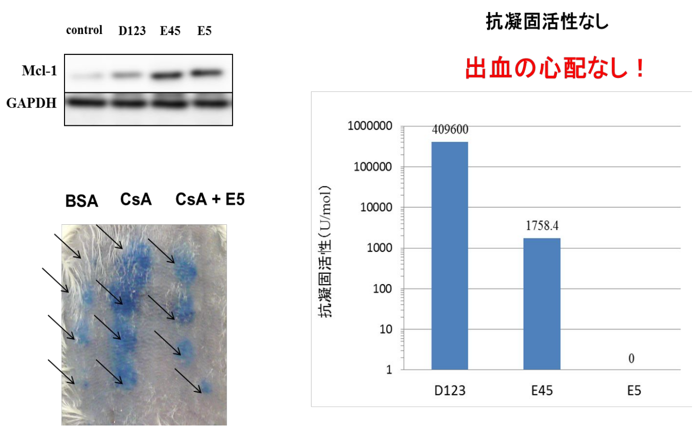
c) 新規 TM 受容体の探索．タグ付きの TM と臍帯静脈血管内皮細胞の膜蛋白質を反応させた後、免疫沈降を行う。沈降物を蛋白質量分析にかけ、TME5 が結合する細胞膜上の受容体を探索する。

４．研究成果

a)TME45 は血管内皮細胞に抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 の発現を誘導し、カルシニューリン阻害剤による細胞障害から内皮細胞を保護するが、この培養系に TME4 あるいは TME5 に対する特異的中和抗体を添加すると、TME5 に対する抗体を添加した際にのみ、TME45 の Mcl-1 発現誘導能はキャンセルされた（下図参照)。すなわち、TME45 の細胞保護活性は TME5 に集約されていると考えられた。

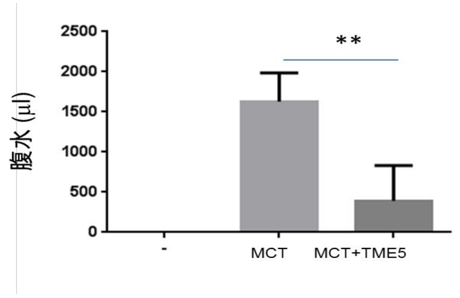


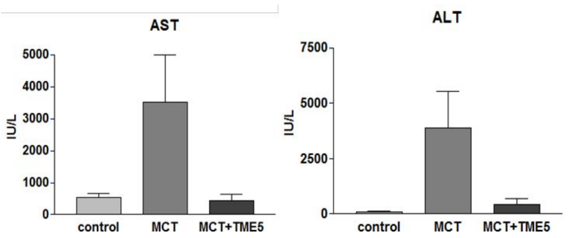
実際に、化学合成した TME5 を血管内皮細胞に投与すると Mcl-1 の発現誘導が確認されたし、カルシニューリン阻害剤によるマウスでの毛細血管漏出を TME5 は抑制することも明らかとなった（下図参照)。また、TME5 は血管内皮細胞の増殖を刺激すること、すなわち、血管新生作用を有することも明らかとなった。さらに重要なことに、TME5 は全く凝固系に作用しないため、生体に投与しても出血の副作用を懸念する必要がないことも明らかとなった。



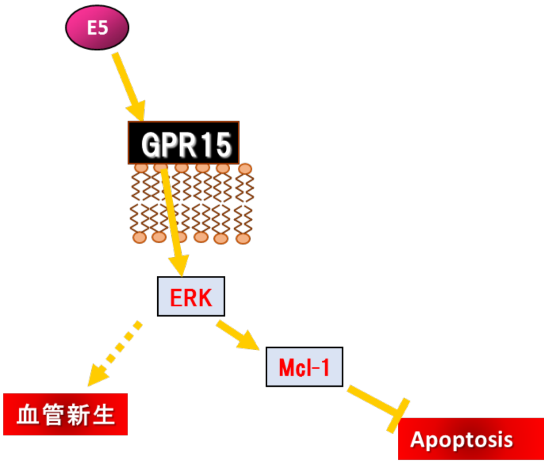
b)モノクロタリンを ICR マウスに投与して SOS を作製した。TME5 をこのモデルに投与す

ると腹水貯留の軽減、肝逸脱酵素の上昇緩和など、SOS の緩和作用が確認された（次ページの図を参照）。マウスから摘出した肝臓を病理学的に評価しても TME5 を投与することで SOS が緩和されていることが確認された。





c)TM 受容体の同定．タグ付き TME5 により沈降される臍帯静脈血管内皮細胞膜蛋白質を質量分析することで、TM の結合パートナーとしてケモカイン受容体 GPR15（G coupled protein receptor 15）の同定に成功した。TME5 は GPR15 ノックアウトマウスの血管内皮細胞では、カルシニューリン阻害剤による細胞障害からの細胞保護作用を発揮することができなかった。
また、TME5 は GPR15 ノックアウトマウスから採取した血管内皮細胞の増殖を刺激することはできなかった。以上より、TME5 の血管内皮保護作用や血管新生作用は GPR15 を介して発揮されていることが伺えた（下図）。



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　８　件）

① Pan B, Wang X, Nishioka C, Honda G, Yokoyama A, Zeng L, Xu K, Ikezoe T. G-protein coupled receptor 15 mediates angiogenesis and cytoprotective function of thrombomodulin. Sci Rep. 2017 Apr 6;7(1):692.査読有
② Pan B, Wang X, Kojima S, Nishioka C, Yokoyama A, Honda G, Xu K, Ikezoe T. The Fifth Epidermal Growth Factor-like Region of Thrombomodulin Alleviates Murine Graft-versus-Host Disease in a G-Protein Coupled Receptor 15 Dependent Manner. Biol Blood Marrow Transplant. 2017 May;23(5):746-756. 査読有
③ Pan B, Wang X, Kojima S, Nishioka C, Yokoyama A, Honda G, Xu K, Ikezoe T. The fifth epidermal growth factor like region of thrombomodulin alleviates LPS-induced sepsis through interacting with GPR15. Thromb Haemost. 2017 Feb 28;117(3):570-579.査読有
④ Ikezoe T. Diagnosis and management of DIC complicated by hematological malignancies. Rinsho Ketsueki. 2016;57(10):2136-2144.査読有
⑤ Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Umezawa K, Yokoyama A. The fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin exerts cytoprotective function and prevents SOS in a murine model. Bone Marrow Transplant. 2017 Feb;52(2):245-251.査読有
⑥ Nomura S, Maeda Y, Ishii K, Katayama Y, Yagi H, Fujishima N, Ota S, Moriyama M, Ikezoe T, Miyazaki Y, Hayashi K, Fujita S, Satake A, Ito T, Kyo T, Tanimoto M. Relationship between HMGB1 and PAI-1 after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. J Blood Med. 2016 Jan 18;7:1-4.査読有
⑦ Chi S, Ikezoe T. Disseminated intravascular coagulation in non-Hodgkin lymphoma. Int J Hematol. 2015 Oct;102(4):413-9.査読有
⑧ Ikezoe T. Thrombomodulin/activated protein C system in septic disseminated intravascular coagulation. J Intensive Care. 2015 Jan 7;3(1):1 査読有
⑨ Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Yokoyama A. Thrombomodulin alleviates murine GVHD in association with an increase in the proportion of regulatory T cells in

the spleen. Bone Marrow Transplant. 2015 Jan;50(1):113-20.査読有

⑩ 池添隆之　トロンボモジュリン Thrombosis Medicine 2015;5:12-17. 査読無

⑪ 池添隆之　造血細胞移植と肝中心静脈閉塞症　Angiology Frontier 2015;14:33-39.査読無

⑫ 池添隆之　造血細胞移植とDIC-TMA/GVHDなどとの鑑別は？血栓と循環 2015;23:58-64.査読無

〔学会発表〕（計　３件）

① Ikezoe T. The fifth region of epidermal growth factor like domain of thrombomodulin is essential to produce cytoprotection. 米国血液学会　2014年12月6日～12月10日サンフランシスコ（米国）
② 池添隆之、西岡千恵、Jing Yang、降幡睦夫、本田剛一、横山彰仁　モノクロタリン誘発SOSに対するトロンボモジュリン変異体の予防効果の検証　第37回日本血栓止血学会学術集会　20115年5月21日～5月23日　甲府市総合市民会館（山梨県甲府市）
③ 池添隆之、本田剛一　TME5はGPR15を介して血管内皮保護作用を発揮する　第３８回日本血栓止血学会学術集会　2016年6月8日～6月10日　奈良春日野国際フォーラム(奈良市)

〔産業財産権〕
○取得状況（計　１件）

名称：造血細胞移植に伴う生着症候群の予防及び/又は治療のための医療
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：特許第5924611号
取得年月日：平成28年4月28日
国内外の別：　国内

６．研究組織
(1)研究代表者
池添隆之　（IKEZOE, Takayuki）
福島県立医科大学・医学部・教授
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