

## 新規トロンボモジュリン変異体を用いた血管内皮細胞保護薬の開発

池添隆之

福島県立医科大学 血液内科学講座

## 【研究の背景】

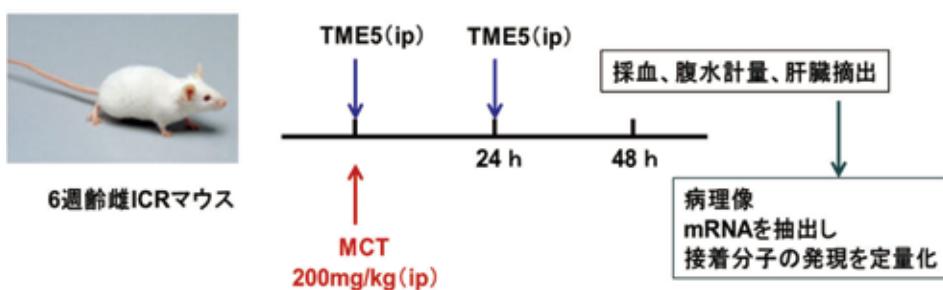
血管内皮細胞上に存在するトロンボモジュリン(TM)は、血液凝固線溶系を制御する重要な蛋白質である<sup>1)</sup>。TMは2008年5月に世界初の遺伝子組換えTM製剤として発売され、DIC(播種性血管内凝固症候群)治療に広く臨床使用されてきている<sup>2)</sup>。本申請者は、豊富な本剤の使用経験の中から造血幹細胞移植後の重篤な合併症を伴う患者において著効例を経験し、本剤は抗凝固作用以外に血管内皮保護作用を有することを世界で初めて見出した<sup>3,4)</sup>。培養細胞を用いた試験管内実験の結果、TM製剤が細胞増殖刺激シグナルERKの活性化を介して抗アポトーシス蛋白質Mcl-1を発現誘導し血管内皮細胞を保護すること、そしてその活性は上皮細胞増殖因子(EGF)様構造の4番目と5番目(TME45)に存在することを明らかにした<sup>5)</sup>。さらにその後の研究で内皮細胞保護作用は40アミノ酸からなる凝固系に全く作用しないTME5に局在することを見出した。

## 【目的】

本研究でTME5が内皮細胞を保護する作用機序の解明を試みる。また、TME5の効果をマウス血管内皮細胞障害モデル(肝類洞閉塞症候群)で検証し、移植後内皮細胞障害に起因して発症する合併症に対する新規内皮保護薬として臨床開発を進める。

## 【方法】

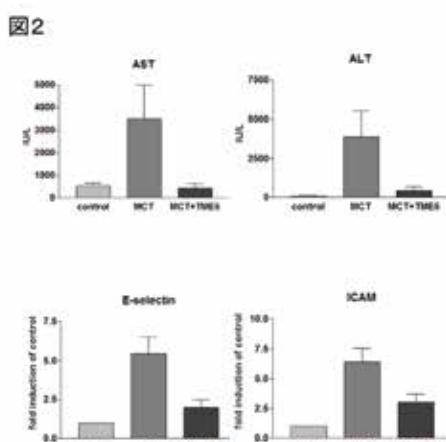
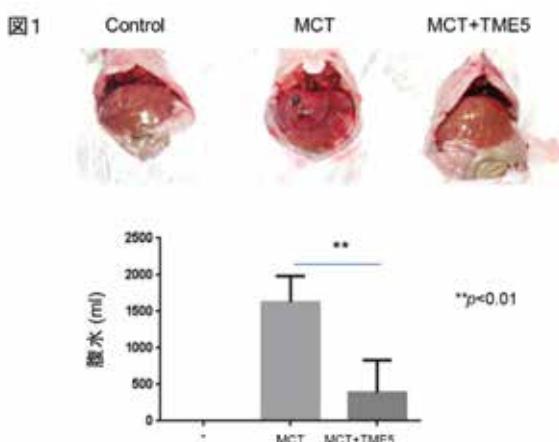
- ① TME5が結合する血管内皮細胞上の蛋白質(受容体)の同定:臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)から抽出した膜蛋白とタグ(V5)を付加したTME5蛋白を反応させた後、抗V5抗体で免疫沈降を行いTME5と結合する膜蛋白を獲得する。沈降蛋白を電気泳動し、ゲルをCoomassie染色して蛋白を可視化し、得られるバンドを切り出した後トリプシン消化を行う。得られたペプチドをAB SCIEX MALDI-TOF/TOF5800(AB SCIEX社製)を用いて質量分析にかけ、そのペプチドの質量から、解析ソフト(Mascot)を用いて蛋白質を同定する。
- ② 造血細胞移植後合併症に対するTME5の予防効果の検証:6週齢の雌ICRマウスにピロリジデイン・アルカロイドであるモノクロタリンを腹腔内投与し肝類洞閉塞症候群(SOS)を誘発するモデルの作製にも成功した。このSOSモデルにTME5を48時間おきに投与することでモノクロタリン誘発SOSを予防可能か検討する。具体的にはICRマウスにモノクロタリン注射時とその48時間後にTME5を腹腔内投与し、更に48時間後に採血を行いAST、ALTなどの肝酵素の測定後マウスを解剖し腹水の定量を行う(上図)。また肝臓の状態を組織学的に評価する。



## 【結 果】

① HUVEC の細胞膜蛋白と V5 を付加した TME5 を反応後、抗 V5 抗体で免疫沈降を行ない電気泳動を行うと 46kDa 近傍に一番強いバンドを認めた。そのバンドを切り出し、質量分析を行った結果 G-coupled receptor 15 (GPR15) が TME5 の結合パートナーとして抽出された。GPR15 ノックアウト (GPR15 KO) マウスを入手し血管内皮細胞上の GPR15 の機能解析を行った。野生型マウスから採取した血管内皮細胞をカルシニューリン阻害剤タクロリムスの存在下で培養するとアポトーシスが誘導されるが、その培養系に TME5 を一緒に添加するとアポトーシスが回避される(論文投稿中)。しかしながら、GPR15 KO マウスから採取した血管内皮細胞においては、TME5 はタクロリムスによるアポトーシスから細胞を保護できなかった。また、TME5 は血管内皮細胞で MAP キナゼファミリーに属する ERK を活性化して抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 を発現誘導するが、GPR15 KO から採取した内皮細胞ではこれらの現象を確認できなかった。これらのことから、TME5 は GPR15 を介して ERK/Mcl-1 を発現上昇させ、細胞障害から血管内皮細胞を保護していると考えられる(上図)。

- ② ICR マウスにモノクロタリン(MCT)を投与すると SOS が誘発され、肝臓の鬱血や腹水貯留の所見を認めるが、TME5 を投与することでそれらが有意に緩和された(図 1, 文献 6 より引用して改変)。また MCT にて誘導された肝酵素の上昇や肝組織での接着分子の発現上昇も TME5 を投与することで有意に抑制された(図 2, 文献 6 より引用して改変)。



## 【考 察】

接着分子の発現上昇は内皮細胞障害マーカーとしてとらえられており、TME5 を投与することで類洞内皮細胞が保護され、MCT 誘発 SOS が緩和されたと考えられる。今回の研究成果から、40 アミノ酸からなる TME5 は血管内皮細胞上の GPR15 を介して細胞生存シグナル ERK を活性化し抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 を発現誘導し内皮細胞保護作用を発揮することが明らかとなった。また、マウス SOS モデルで TME5 の有効性が確認された。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

今後の臨床開発に向け、他の SOS モデルでの TME5 の有効性や毒性の評価を行う予定である。TME5 は造血細胞移植後の内皮細胞障害に起因して発症する致死率の高い合併症の予防薬あるいは治療薬となり、移植成績の向上に寄与する可能性を秘める。

【参考・引用文献】

1. Ikezoe T. Thrombomodulin/activated protein C system in septic disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care.* 2015 Jan;7(1):1.
2. Ikezoe T. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in patients with acute promyelocytic leukemia, and its treatment using recombinant human soluble thrombomodulin. *Int J Hematol.* 2014 Jul;100(1):27-37.
3. Ikezoe T, Togitani K, Komatsu N, Isaka M, Yokoyama A. Successful treatment of sinusoidal obstructive syndrome after hematopoietic stem cell transplantation with recombinant human soluble thrombomodulin. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Apr;45(4):783-5.
4. Ikezoe T, Takeuchi A, Taniguchi A, Togitani K, Yokoyama A. Recombinant human soluble thrombomodulin counteracts capillary leakage associated with engraftment syndrome. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Apr;46(4):616-8.
5. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Honda G, Furihata M, Yokoyama A. Thrombomodulin protects endothelial cells from a calcineurin inhibitor-induced cytotoxicity by upregulation of extracellular signal-regulated kinase/myeloid leukemia cell-1 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Sep;32(9):2259-70.
6. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Pan B, Xu K, Furihata M, Nakamura K, Yurimoto H, Sakai Y, Honda G, Yokoyama A. The fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin exerts cytoprotective function and prevents SOS in a murine model. *Bone Marrow Transplant.* 2016 Jul 18. doi: 10.1038/bmt.2016.195.