

TM 類縁体を用いた新規血管内皮保護薬の開発

池添隆之

福島県立医科大学 血液内科学講座

【研究の背景】

①**移植後合併症**:造血細胞移植は難治血液がんを完治することができる究極の治療方法である。しかしながら、約 20～30%の頻度で、感染症や免疫抑制剤などにより血管内皮細胞が障害を受けて肝類洞閉塞症候群 (sinusoidal obstruction syndrome: SOS) や移植関連血栓性微小血管症 (transplant-associated thrombotic microangiopathy: TA-TMA) を合併する。現在これらに対する有効な治療法は確立していないため、重篤化すると死に至る。従って、これら移植後合併症に対する治療薬の開発は極めて医療上の必要性が高い。

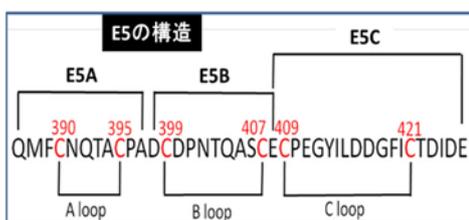
②**トロンボモジュリン (thrombomodulin: TM) の新規作用**:TM は複数のドメインからなり、主に血管内皮細胞上に発現している。トロンビンと結合後、活性化プロテイン C を介して、血液凝固を負に制御する。TM の細胞外ドメインよりなる遺伝子組換え TM 製剤 (rTM) は 2008 年から播種性血管内凝固 (DIC) に対する治療薬として日本で臨床使用されている。申請者はさまざまな基礎疾患に合併した DIC 患者を rTM で治療していくなかで、rTM が血管内皮保護作用をもち、SOS や TA-TMA などの病態を改善することを見出し、特許を取得した (業績 23, 28-30, 特許第 5924611 号)。しかしながら、rTM の効能効果は DIC であり、また抗凝固薬であるがゆえに、移植患者での使用は出血のリスクが高い。そこで、抗凝固作用が無く血管内皮保護活性のみをもつ TM 類縁体を創製しようとするに至り研究を開始した。そしてこれまでに、40 アミノ酸からなる TM の 5 番目の上皮細胞増殖因子様領域 (E5) にその活性が局在することを突き止めた。

【目 的】

E5に含まれる、抗凝固作用を持たず内皮保護作用を発揮するTM最小単位 (TME5-X) の取得を目指す。

【方 法】

① 血管内皮細胞保護作用を発揮する TM 最小単位の取得



E5 ペプチドには 3 つのジスルフィド結合が存在し、3 つのループ構造をとる (左図参照)。この 3 つのループ構造 (E5-A, B, C) を化学合成 (大阪府のペプチド研究所に委託) し、細胞保護活性を培養内皮細胞増殖アッセイ、血管新生促進アッセイ、フローサイトメーターによる細胞死数測定アッセイ、細胞内リン酸化アッセイ、または細胞内抗アポトーシスタンパク質定量アッセイで評価する。これらの手法は全てこれまでの研究で確立しており、成果の実現性は高い。予

備実験結果から 19 アミノ酸からなる TME5-C に内皮保護活性が局在すると考えている。この 19 アミノ酸から 1 アミノ酸ずつ短縮した類縁体を複数種類化学合成し、上記試験を繰り返して最小単位構造 (TME5-X) を取得する。

② TME5-X の凝固系への作用を評価

正常血漿にトロンビンを添加して凝固時間を測定する。トロンビンとともに TME5-X を添加して凝固時間が延長しないことを確認する。

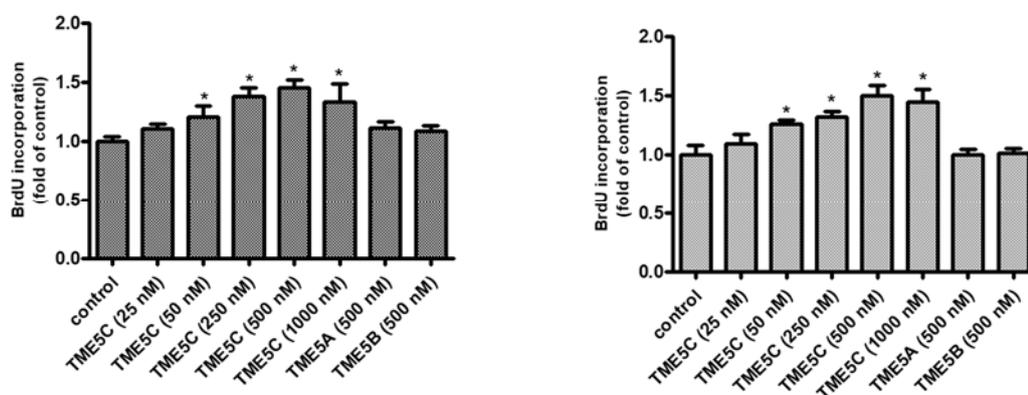
③ 内皮細胞障害マウスモデルでの TME5-X の薬効評価

われわれの既報 (Ikezoe T, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012, Ikezoe T, Bone Marrow Transplant 2017) に従いタクロリムスやモノクローリンをマウスに投与して TA-TMA や SOS を誘導する。ヒトに造血幹細胞移植を行う際に前処置に用いるサイクロフォスファミドとブスルファンをマウスに投与して SOS を誘導する。これらマウスモデルに TME5-X あるいはコントロール溶媒を前処置開始時から腹腔内投与し SOS の予防効果を評価する。経時的にマウスから採血し ALT や AST を測定して肝障害の程度を評価する。また以下の内皮細胞障害マーカーを測定する。

- a. **フィブリン分解産物 (FDP)**: 血管内皮細胞障害の結果、内皮細胞上に組織因子が発現し生体に凝固異常が惹起される結果 FDP が上昇する。市販の ELISA キットで測定。
- b. **TM**: 血管内皮細胞障害の結果、細胞表面に発現する TM は切断され体内を循環する。市販の ELISA キットで測定。

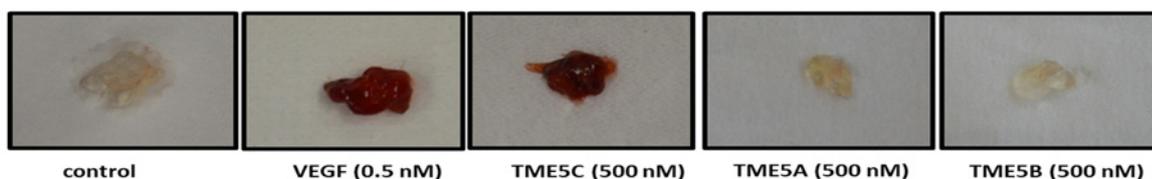
【結 果】

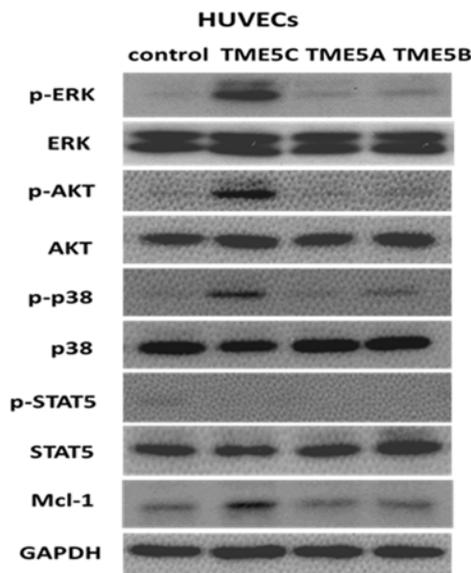
① 19 アミノ酸から構成される TME5C のみがヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) とヒト肝類洞内皮細胞 (HHSECs) の細胞増殖を試験管内で促進した。



② HUVECs の培養液に TME5C を添加すると管腔形成が誘導された。

③ マウスを用いたマトリゲルアッセイにて、TME5C には血管新生作用が存在することが示された。



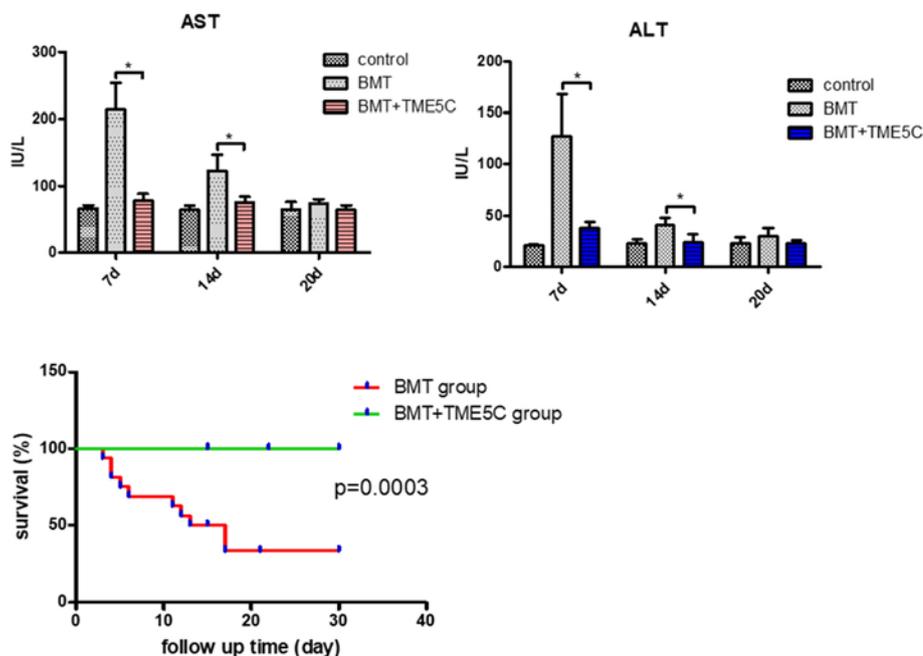


④ TME5C は HUVECs においてシグナル伝達経路を活性化して抗アポトーシスタンパクの発現を誘導した。

⑤ 免疫抑制剤タクロリムスは HUVECs にアポトーシスを誘導するが、TME5C はこれを抑制した。

⑥ ヒト血漿にトロンビンと共に TME56C を添加してもプロトロンビン時間や活性化部分トロンビン時間は延長しなかった。即ち、TME5C は血液凝固系に採用しない。

⑦ マウス SOS モデルにおいて、TME5C を移植前処置時から予防投与するとマウス SOS の発症を予防可能であった。SOS を発症したマウスでは肝酵素以外に TM や FDP の上昇が認められたが、TME5C を予防投与したマウスではこれらの上昇は有意に抑制された。



【考 察】

本研究で 19 アミノ酸からなる TME5C に血管内皮保護作用と血管新生作用が存在することを明らかにした。この構造からアミノ酸を削る、あるいは何れのアミノ酸を他のアミノ酸に変換しても血管内皮細胞に対する作用が消失することも確認できた。以上より TME5C が血管内皮保護作用と血管新生作用を発揮する最小単位を結論付けることができた。幸いなことに TME5C は血液凝固系に作用しないことも確認できた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

造血細胞移植後には血管内皮細胞障害に起因する SOS や TMA といった致死率の高い合併症が 20～30% の頻度で発症する。更なる移植成績の向上にはこれらの合併症をいかに予防あるいは治療するかにかかっているといても過言ではない。これら合併症は血小板減少を伴うことから出血の副作用を伴う薬剤は使用しづらい。TME5C は血液凝固系には作用せ

ず内皮保護作用に特化したアミノ酸構造を持つため、理想的な移植後合併症の治療薬として期待される。

【参考・引用文献】

上記研究成果は以下に報告した。

Wang X, Pan B, Honda G, Wang X, Hashimoto Y, Ohkawara H, Xu K, Zeng L, Ikezoe T. Cytoprotective and pro-angiogenic functions of thrombomodulin are preserved in the C loop of the fifth epidermal growth factor-like domain. *Haematologica*. 2018 Oct;103(10):1730-1740.