

## 遺伝子組み換え型活性化プロテイン C の細胞保護効果と治療への応用

長屋聡美, 安田芽生, 森下英理子

金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 保健学専攻 病態検査学講座

### 【研究の背景】

生理的凝固制御因子であるプロテイン C (PC) は、血管内皮細胞上の内皮細胞プロテイン C レセプター (EPCR) と結合し、同じく血管内皮細胞上に発現しているトロンボモジュリンとトロンビンの複合体により活性化プロテイン C (APC) へと活性化される。APC は PC と同様に EPCR と結合することができ、プロテアーゼ活性化受容体 1 (PAR1) を活性化する。その結果、抗アポトーシス作用、抗炎症作用、細胞バリア機能といった細胞保護効果を発揮することが知られている。

当研究室では過去に、遺伝性 PC 欠乏症家系において、p.Arg189Gln (R189Q) バリエントを同定した<sup>1)</sup>。この部位は PC 軽鎖の C 末端に位置しており、この領域 (189Arg-197Leu) は構造的不安定性から APC の X 線結晶構造では欠損している。しかし、Glu191Ala 置換型 APC は抗凝固活性が増加し細胞保護効果が著減したとの報告<sup>2)</sup>や、今回のバリエントと同部位である Arg189Trp (R189W) 置換型 APC では、EPCR との結合親和性が約 3 割低下し細胞保護効果が減弱したとの報告<sup>3)</sup>がある。このように、PC または APC の軽鎖 C 末端領域は、抗凝固活性および細胞保護活性維持において重要な部位とされているが<sup>4)</sup>、この領域の機能についての解析は未だ十分ではない。

### 【目 的】

本研究では遺伝子組み換え型 APC が EPCR を介した細胞保護効果に及ぼす影響を解明することを目的とした。具体的には、EPCR との結合親和性が低下すると予想される R189Q 置換型 PC を作製し、EPCR との親和性低下が細胞保護効果および血栓傾向を含めた表現型に及ぼす影響を解明する。さらに、EPCR との結合に重要な Gla ドメイン内に変異を導入し、EPCR 高親和性型 PC を作製し、内皮細胞機能が低下した血管疾患等に対する抗炎症治療薬となりうるかを検証する。

### 【方 法】

- 1) EPCR 高親和性型 PC の作製: EPCR と PC の結合領域においては、PC-Gla ドメイン内の Phe46 および Leu47 といった疎水性アミノ酸が EPCR に接近している。したがって、この部位に近接する Ser45 および Arg51 を疎水性アミノ酸の Leu に置換した Ser45Leu (S45L) および Arg51Leu (R51L) 置換型 PC を作製した。また、EPCR との結合親和性低下のコントロールとして、EPCR との結合に極めて重要とされている Glu48 および Glu49 の Ala 置換体 (E49A、E48A&E49A) も作製した。発現ベクターの作製には、PC 遺伝子 (*PROC*) の C 末端に 3×FLAG tag を挿入した pcDNA3.4 *PROC* 発現ベクターを鋳型として用い、Inverse PCR 法にて変異導入を行なった。R189Q 発現ベクターは既に作製済みであった。これらを HEK293 細胞に遺伝子導入し、安定発現細胞株を樹立した。
- 2) PC の精製: ビタミン K 存在下にて回収した培養上清は、まず Q-sepharose を用いた陰イオン交換を行なった。次に、NaCl 420~540 mM 程度の溶出 Buffer にて溶出されたフラクションの FLAG 精製を行なった。精製 PC は ELISA キットにて PC 濃度を測定し、実験に使用した。
- 3) APC アミド分解活性測定: 精製 PC は、 $\alpha$ -トロンビンおよびトロンボモジュリン存在下で 37°C・2 時間で APC へと活性化し、溶液中の  $\alpha$ -トロンビンはアンチトロンビン-ヘパリン複合体で阻害した。APC は終濃度 25 nM の一定条件下で、19.5 - 1800  $\mu$ M の S-2366 と反応させ、405 nm での吸光度変化 (Kinetics) からアミド分解活性を測定した。

- 4) EPCR との結合親和性解析: 本来は表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて解析予定であったが、共同研究施設の Biacore X-100 故障のため ELISA ベースの固相结合実験を行なった。具体的には、C 末端に His-tag を有する soluble EPCR (sEPCR) を Nickel coated plate に固相化した。次に、1.95 – 500 nM の PC または APC を添加したのち、HRP 標識抗 PC 抗体を結合させ、OPD にて発色させた。PC または APC 濃度と吸光度 (492 nm) の非線形解析にて、解離定数 (KD) を算出した。

## 【結 果】

WT および R189Q は、培養上清 0.5~1 L あたり 500  $\mu$ g 前後の精製 PC を取得することができた。しかし、E49A 変異体は 0.5 L からでは実験に使用できるだけの精製 PC を取得できなかった。また、S45L、R51L、E48A&E49A は安定発現細胞株の増殖が遅く、精製を行えるだけの培養上清を回収できなかった。

まず、R189Q の APC アミド分解活性を測定した。その結果、Km ( $\mu$ M) 平均は、WT:848.3、R189Q:963.5、Kcat 平均は、WT:4.84、R189Q:5.03、Kcat/Km 平均は、WT:0.0057、R189Q:0.0052 となり、WT と R189Q の APC アミド分解活性に大きな差はないと推測された。なお、n 数の不足から統計解析は行なっていない。次に、EPCR との結合親和性を評価するため、まずは PC と EPCR の ELISA ベース固相结合実験を行なった。その結果、KD (nM) 平均は、WT:65.12、R189Q:14.23、ヒト血漿由来 PC:63.35 と、R189Q の親和性が有意に高い結果となった ( $p < 0.001$ )。また、APC アミド分解活性と同様の手法で PC を APC へと活性化し、EPCR との結合実験を行なった結果、KD (nM) 平均は、WT:120.5、R189Q:34.81、ヒト血漿由来 PC:69.97 であった。APC と EPCR との結合実験は n 数不足のため統計解析を行なっていない。

## 【考 察】

今回、リコンビナント PC の精製手法を確立することができた。しかし、実験に使用可能な量の PC を取得するには、培養スケールを大幅に上げる必要があると考えられた。R189Q の APC アミド分解活性は、統計解析は未実施ではあるが、WT とほとんど同等であると示唆された。R189Q-PC と EPCR の結合実験では、R189W での *in vitro* 実験結果<sup>3)</sup>と異なり、WT よりも親和性が高いとの結果になった。これは、 $\alpha$ -トロンビン・トロンボモジュリン複合体によって活性化した APC でも同様の結果であった。この原因として、EPCR との結合に重要であるとされる Gla ドメイン内の Gla 化効率の違いや、変異による構造変化と C 末端に付加されている 3 $\times$ FLAG tag との組み合わせによる構造学的影響などが考えられた。Gla 化効率に関しては、今後 PC の精製過程で Gla 化効率の高い PC を選択的に取得できるような改善が必要と考える。また、アッセイ系の誤差要因として、用手法の過程が多い ELISA ベース固相结合実験による影響も考えられる。ELISA ベースで算出された KD は WT と変異体との比較に用いることは可能であるが、正確な KD ではないとされる。正確な KD を算出し比較するためには SPR での測定が必須になってくるため、測定機器の準備が整い次第 SPR での親和性評価を行う予定である。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

APC の EPCR を介した細胞保護効果は、炎症により病態が悪化するような血管性疾患においても着目されている。EPCR 高親和性型 APC が作製できれば、新たな抗炎症治療薬の開発につながる可能性がある。また、細胞保護効果の減弱が血栓形成に及ぼす影響は未だ十分に解明されておらず、この経路による血栓形成メカニズムが解明されれば、血栓症治療薬の新たなターゲットとなりうると考える。

## 【参考・引用文献】

- 1) Noiri JI, *et al.*, *J Cardiol Cases* **26**, 360–363 (2022).
- 2) Mosnier LO, *et al.*, *Blood* **113**, 5970–5978 (2009).
- 3) Ding Q, *et al.*, *Thromb Haemost* **109**, 614–624 (2013).
- 4) Yamashita A, *et al.*, *J Thromb Haemost* **18**, 1027–1038 (2020).