

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20386

研究課題名(和文) 2インテグリンとトロンボモジュリンの結合が炎症と凝固に与える影響

研究課題名(英文) Interaction between beta2 integrin and thrombomodulin effect to immunothrombosis

研究代表者

川本 英嗣 (Kawamoto, Eiji)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20577415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症では炎症と凝固のクロストーク、いわゆる免疫反応による凝固障害(Immunothrombosis)が注目されている。これらは細菌の体内での広がりを抑制するための生体反応と考えられているが、その生成過程で血管内皮と白血球がどのように相互作用しているか不明な点が多い。我々はImmunothrombosisの病態解明のためにTMの炎症時と非炎症時の発現量をフローサイトメトリーと免疫染色により確認し、さらに白血球と血管内皮細胞との結合実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Immunothrombosis, the immune response of blood vessels caused by preventing the spread of bacteria, plays an important role in inflammation and coagulation for sepsis. Many researchers are going to investigate that coagulation factor, like APC and EPCR, binds to leukocyte, leading to immunothrombosis. We have indicated that leukocyte LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin (TM). In fact, integrin-TM interactions might be involved in the dynamic regulation of leukocyte adhesion with endothelial cells, or immunothrombosis. Based on the results, we indicated here how the coagulation factor, TM on endothelial cell, is associated with leukocyte binding. First, we confirmed that the TNF- α induced inflammatory response downregulates TM expression on endothelial cells. Moreover we showed that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) bind to human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) dependent upon integrin activation.

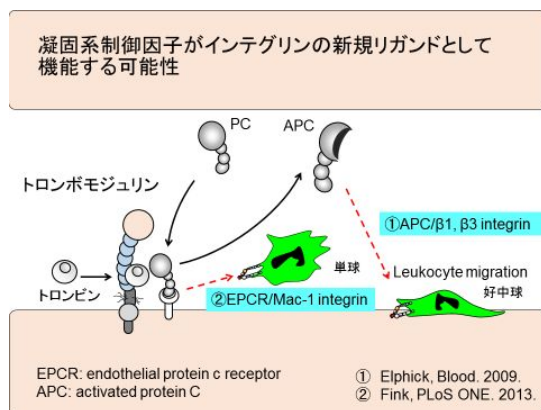
研究分野：敗血症における炎症制御

キーワード：beta2 integrin thrombomodulin anti inflammation anti coagulation 炎症と凝固のクロストーク
Immunothrombosis

1. 研究開始当初の背景

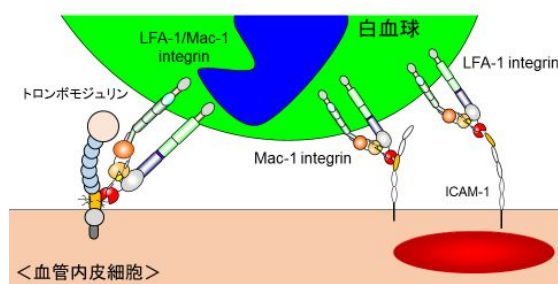
敗血症など炎症性疾患病態生理の基盤には免疫系と血液凝固系のクロストークが存在し、Immunothrombosis という概念が提唱されている。

Immunothrombosis の根幹の一つに白血球上インテグリンと血液凝固関連分子の相互作用があり、血管内皮上での血液凝固状態が白血球の接着を制御していることを強く示唆する。過去のいくつかの研究において血液凝固因子 (APC、EPCR など) が白血球と結合することが示され、これらの結合が敗血症における炎症と凝固の制御につながる可能性が示唆されてきた。(下図: APC が好中球の $\beta 1$ インテグリンと結合し、EPCR が単球の Mac-1 インテグリンと結合する様子)



我々はこれまでに、独自に内因性抗凝固因子のトロンボモジュリン (TM) がインテグリン LFA-1 ($\alpha L/\beta 2$) と Mac-1 ($\alpha M/\beta 2$) に結合することを明らかにし、結合ドメインも同定してきた。(下図)

白血球インテグリン LFA-1 と Mac-1 はトロンボモジュリンのドメイン 3 と結合する



Biochem Biophys Res Commun. 2016

2. 研究の目的

本研究では、これらの研究結果を踏まえ、炎症時と非炎症時における血管内皮細胞上でのインテグリンリガンドの発現量の比較を行い、炎症刺激により血管内皮細胞と白血球との結合の変化を調べることで白血球インテグリン LFA-1 や Mac-1 とトロンボモジュリン (TM) の相互作用が生み出す免疫系と血液凝固系のクロストークの基盤解明を行う。

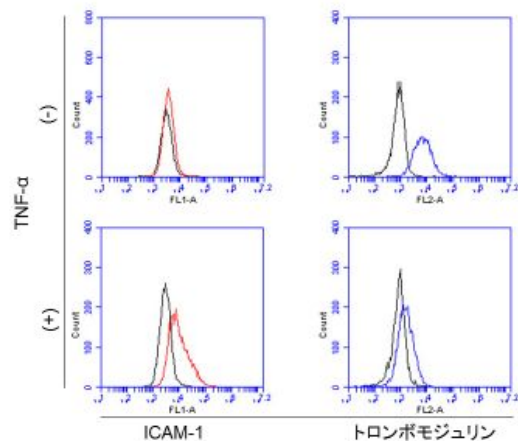
3. 研究の方法

HUVEC に炎症刺激 (TNF α , 10 ng/ml, 12 時間刺激) を加えて HUVEC に発現する ICAM-1 ($\beta 2$ インテグリンリガンド) および TM の発現量をフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡像にて比較した。

血管内皮細胞の TM と白血球インテグリンの結合を調べるために、健康人から取り出したヒト末梢血単核細胞 (human peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) のインテグリンを活性化させた。さらにインテグリンを活性化した白血球と固相化した HUVEC を用いて細胞接着実験を行い、血管内皮細胞と PBMC との結合実験を確立した。

4. 研究成果

-1 血管内皮細胞上のトロンボモジュリンは炎症刺激で発現量が減少する。(図 1)



(図 1) TM 発現量のフローサイトメトリーでの比較

炎症刺激を与えた HUVEC では ICAM-1 の発現量は増加するが、TM の発現量は低下する。この結果は炎症時と非炎症時で TM、ICAM-1 などインテグリンリガンドの担う役割が異なる可能性を示唆する。

-2 血管内皮細胞上のトロンボモジュリンは非炎症時と炎症時では発現部位の分布を変化させる。(図 2)

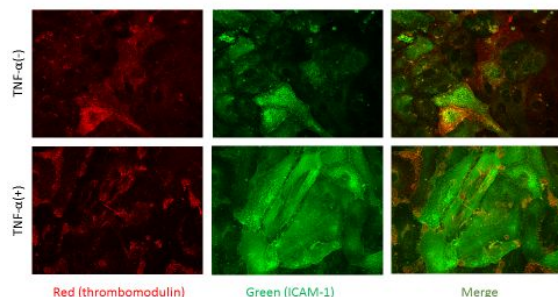
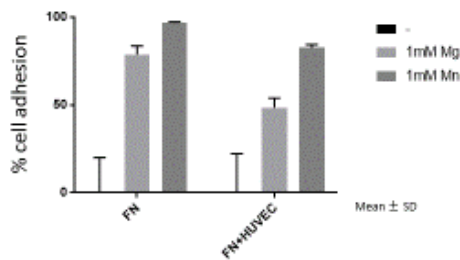


Fig. Immunofluorescence image of the thrombomodulin/ICAM-1 of cultured HUVEC with TNF- α (10 ng/mL) for 12 h.

(図 2) 炎症刺激を加えることでの TM の血管内皮細胞での分布の違い

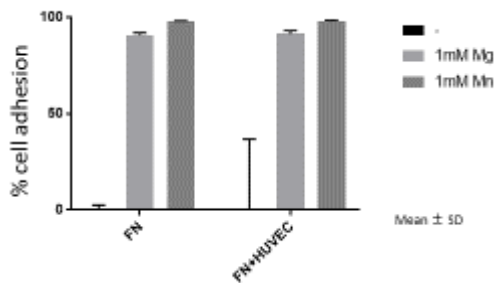
フローサイトメトリーの結果を蛍光顕微鏡でも確認した。血管内皮上での TM 発現は炎症により異なる分布を来す可能性がある。

HUVEC と PBMC との結合は 2 価の陽イオン依存性、すなわちインテグリン活性化に伴い増強することを確認した。(図 3 右)このように HUVEC と PBMC のシェアストレス下での結合実験の系を調整した。



(図 3) 左: fibronectin (FN) を固相化して PBMC との結合を確認した。右: FN を固相化してその上に HUVEC を固相化した。

また、同様の結合が THP-1 細胞でも確認した。(図 4 右)



(図 4) HUVEC と THP-1 との結合

以上より本研究により血管内皮細胞上の TM の発現量が炎症と非炎症状態で異なること、さらに血管内皮細胞上の TM が白血球インテグリンと結合することで新たな Immunothrombosis 形成のメカニズムの一端を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Okamoto T, Takagi Y, Kawamoto E, Park EJ, Usuda H, Wada K, Shimaoka M. Reduced substrate stiffness promotes M2-like macrophage activation and enhances peroxisome proliferator-activated receptor γ expression. *Exp Cell Res.* 2018 Jun 15;367(2):264-273. (査読有り)

Ito A, Enokiya T, Kawamoto E, Iwashita Y, Takeda T, Ikemura K,

Okuda M, Imai H. Two cases of life-threatening arrhythmia induced by risperidone: evaluation of risperidone and 9-hydroxy-risperidone concentrations. *Acute Med Surg.* 2017 Apr 24;4(3):341-343. (査読有り)

Okamoto T, Kawamoto E, Takagi Y, Akita N, Hayashi T, Park EJ, Suzuki K, Shimaoka M. Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness. *Sci Rep.* 2017 Jul 21;7(1):6134. (査読有り)

Eiji Kawamoto, Takayuki Okamoto, Hiroshi Imai, Motomu Shimaoka. LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 May 13;473(4):1005-12 (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

川本英嗣 伊藤亜沙実 江口暁子 岡本貴行 今井寛 島岡要 敗血症患者の細胞外小胞にはインテグリン、PD-L1、PD-L2 が発現する—細胞外小胞 PD-L1 が免疫麻痺を引き起こす可能性— 第 32 回日本 shock 学会総会 2017 年

川本英嗣、坂倉庸介、今井寛、島岡要 トロンボモジュリンはインテグリンに結合し、白血球の接着と遊走を制御する 第 23 回 外科侵襲とサイトカイン研究会 2016 年 7 月

〔図書〕(計 2 件)

川本英嗣、へるす出版、次世代の救急医学と救急医療 若手に聞く 救急医学 vol.41:130(14-21).2017.

伊藤亜紗実、川本英嗣、へるす出版、DIC 治療薬の選択 救急医学 vol.40:128(1523-1532).2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/molpath/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川本 英嗣 (KAWAMOTO, Eiji)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20577415

(4)研究協力者

伊藤 亜沙実 (ITOU, Asami)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80740448

今井 寛 (IMAI, Hiroshi)

三重大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：00184804

岡本 貴行 (OKAMOTO, Takayuki)
島根大学・医学部・准教授
研究者番号：30378286

朴 恩正 (PARK, Eun Jeong)
三重大学・大学院医学系研究科分子病態学・
准教授
研究者番号：20644587

島岡 要 (SHIMAOKA, Motomu)
三重大学・大学院医学系研究科分子病態学・
教授
研究者番号：40281133