

# 学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 基礎医学系講座 分子病態学分野	氏 名	川本 英嗣
-----	---	-----	-------

## 主論文の題名

LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin

## 主論文の要旨

背景：敗血症ショックでは感染症を契機に起こる過剰な炎症反応によって多臓器不全を引き起こし、死亡率は 20-30%と依然として高い。過剰な炎症による血管内皮障害と過凝固による Disseminated Intravascular Coagulation(DIC)が“負の臓器障害スパイラル”を引き起こす。これまでに抗炎症薬（大量ステロイド、抗サイトカイン療法など）や抗凝固薬（遺伝子組み換えヒト活性化プロテイン C、ヘパリンなど）が敗血症治療臨床試験に試みられたが、いずれも有効性は認められていない。炎症や凝固を別々に抑制するのではなく、炎症と凝固の双方を同時にバランス良く制御することが敗血症の中心病態にある敗血症性 DIC の治療に最も有効であると考えられる。敗血症性 DIC に対して抗炎症・抗凝固作用を有するリコモジュリン®（細胞外ドメインから成る可溶性トロンボモジュリン）が敗血症性 DIC の有効な治療薬として承認され、敗血症性 DIC 患者の死亡リスクを約 20%減少させることが示された(Thrombosis and Haemostasis 2016)が、敗血症性ショックによる多臓器不全の進展を抑止できるかどうかは解明されていない。多臓器不全病態の中心にある免疫系と凝固系の制御異常をより良く理解するために、本研究では正常血管内皮に恒常的に発現する凝固系制御分子である内因性トロンボモジュリン（TM）が免疫系でどのような役割を果たしているのかを検討する。

目的：リコモジュリンはラット敗血症モデルで白血球の血管内皮細胞への接着と血栓形成の両方を抑制する (Thrombosis research 2013)。これは血管内皮に存在する TM と白血球との直接的な相互作用を示唆するが、分子レベルでの詳細は明らかではない。本研究では白血球の表面上に存在し、炎症時に活性化され細胞接着を制御している接着分子インテグリンと血管内皮細胞上に発現している抗炎症・抗凝固作用を併せ持つトロンボモジュリンの相互作用に注目して解析を行った。

方法：(1) TM と白血球インテグリンの結合を調べるために、まず健常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 2 価陽イオンにより活性化させた。さらに TM の細胞外ドメイン全てを IgG の Fc 部分と融合させた可溶性リコンビナントタンパク (TM-domains 123-Fc) をプレートに固相化した。この固相化した

TM-domains 123-Fc 上にインテグリンを活性化した白血球を生理的なシェアストレス下に相互作用させ、細胞接着アッセイを行い TM と白血球との結合を解析した。

(2) 次に各種抗インテグリン抗体を用いて TM の細胞外ドメインと結合する白血球インテグリン・メンバーを特定した。

(3) 最後に TM 内のインテグリン結合部位を明らかにするために、TM の 3 つの細胞外ドメイン (血管内皮細胞上に発現している部分) の欠損変異蛋白を作成して、白血球インテグリンとの細胞接着アッセイを行った。

**結果:** (1) 固相化した TM-domains 123-Fc は白血球インテグリンリガンドである ICAM-1 やフィブロネクチン (FN) と同様に白血球と接着した。またこの結合はインテグリンを 2 価陽イオン (Mg, Mn イオン) により活性化した際により強固に認められることから、TM の細胞外ドメインと白血球との結合がインテグリン活性化依存性であることが強く示唆された。

(2-①) ヒト PBMC と TM の結合がどの白血球インテグリン・メンバーに依存するかを調べるため B1 および B2 インテグリン抗体を用いて結合の阻害実験を行った。TM-domains 123-Fc とヒト PBMC との結合は B2 インテグリン抗体により阻害された。この結果により TM-domains 123-Fc とヒト PBMC との結合が B2 インテグリンに依存していると考えられた。

(2-②) ヒト PBMC に発現する代表的な B2 インテグリン・メンバーは LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2) と Mac-1( $\alpha$ M $\beta$ 2)である。我々はヒト PBMC とプレートに固相化した TM の結合が  $\alpha$ L および  $\alpha$ M 抗体の双方で阻害されることを見いだした。この結果により TM と結合するインテグリン・メンバーが LFA-1 および Mac-1 であることを同定した。

(3) ヒト PBMC 上に発現する LFA-1 および Mac-1 インテグリンは、TM-domains 123-Fc と結合するが、我々は TM の細胞外ドメイン (Domains 123) のうちどのドメイン (D1: レクチン様ドメイン、D2: EGF 様ドメイン、D3: セリンスレオニンリッチドメイン) がインテグリンと結合するか検討し、ヒト PBMC と TM の結合部位はセリンスレオニンリッチドメイン (D3) であることを同定した。

**結論:** ヒト PBMC 上の LFA-1 と Mac-1 インテグリンは TM のセリンスレオニンリッチドメイン (D3) と結合することを新たに見いだした。そのため血管内に発現する TM が白血球とインテグリンを介して結合することで血管内皮細胞上において凝固と炎症の相互作用に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。