

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861520

研究課題名(和文) トロンボモジュリンと好中球の相互作用と細胞接着への影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between neutrophil and thrombomodulin.

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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：白血球表面上に発現するLFA-1とMac-1インテグリンは血管内皮上のインテグリンリガンド(ICAM-1,2)と結合する。この結合は炎症時の白血球の血管内皮への接着と遊走を制御している。我々は血管内皮上に存在する抗凝固因子のトロンボモジュリン(TM)が白血球のLFA-1、Mac-1インテグリンと結合すること、さらにこの結合部位はTMの細胞外ドメインのセリンスレオニンリッチドメインであることを同定した。この発見は炎症時に認められる白血球と血管内皮細胞の接着において、TMが血管内皮細胞上でICAM-1,2とともに白血球との結合に関与している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：LFA-1 and Mac-1 integrins regulate leukocyte trafficking in health and disease by binding primarily to IgSF ligand ICAM-1 and ICAM-2 on endothelial cells. Here we have shown that the anti-coagulant molecule thrombomodulin (TM), found on the surface of endothelial cells, functions as a potentially new ligand for leukocyte integrins. Furthermore, we show that the serine/threonine-rich domain of TM is required for the interaction with the LFA-1 and Mac-1 integrins to occur on PBMCs. These results demonstrate that the LFA-1 and Mac-1 integrins on leukocytes bind to TM, thereby establishing the molecular and structural basis underlying LFA-1 and Mac-1 integrin interaction with TM on endothelial cells. In fact, integrin-TM interactions might be involved in the dynamic regulation of leukocyte adhesion with endothelial cells.

研究分野：inflammation and coagulation

キーワード：Thrombomodulin LFA-1 integrin Mac-1 integrin

1. 研究開始当初の背景

敗血症の死亡率は近年でも依然として20-30%と高く、感染症による臓器障害よりも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併発することが原因と考えられている。多臓器不全が起こる背景には、敗血症時の過剰な炎症による血管内皮障害と凝固亢進による Disseminated Intravascular Coagulation(DIC)の2者が生み出す“負の臓器障害スパイラル”が存在すると考えられる。これまでに炎症をターゲットとして各種抗炎症医薬(大量ステロイド、抗サイトカイン療法など)の敗血症治療への応用が試みられたが、いずれも良い成績が得られていない。このことから炎症だけを抑制する治療だけでなく炎症と血液凝固のクロストークを制御することが敗血症性ショックの中心病態に最も有効であると考えられる。

こうした背景から敗血症やDICに対して抗炎症・抗凝固作用を有した医薬品の開発が試みられてきた。現在、リコモジュリン®(可溶性トロンボモジュリン)が敗血症に起因したDICの有効な治療薬として臨床応用され、リコモジュリンの投与は患者のDIC離脱率の向上に効果を示している。(J Trauma Acute Care Surg. 2012) 今後、敗血症やDICの治療成績の向上、多臓器不全を抑止するためにも、TMの抗炎症作用の病態生理メカニズムを解明し、リコモジュリンの治療の最適化を図る必要がある。そのためには、そもそも血管内皮に恒常的に発現する膜タンパクとしての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すのかの検討から始める必要があると考えられた。

2. 研究の目的

TMの細胞外ドメインの中のレクチン様ドメインがメラノーマ細胞同士の接着に寄与していることを示す報告や、レクチン様ドメインがLewy Y antigenを介して好中球の血管内皮細胞への接着を抑制することが示されている。しかしTMと代表的接着分子インテグリンとの直接的な相互作用については解明されていない。

こうした背景を踏まえて、我々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凝固因子である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。

3. 研究の方法

(1) TMと白血球インテグリンの結合を調べるために、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TMを用いて細胞接着実験を行い、TMとインテグリンとの結合

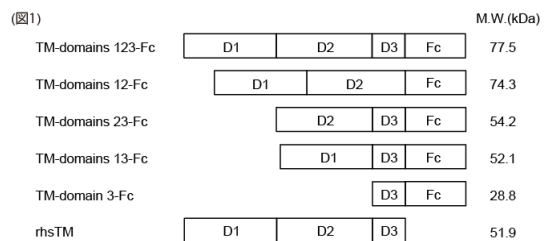
を解析した。

(2) 次に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)のいずれかと白血球インテグリンが結合すると予想されたため、TMの各ドメイン欠損変異蛋白を作成して、各ドメインとLFA-1インテグリンの結合を比較した。

4. 研究成果

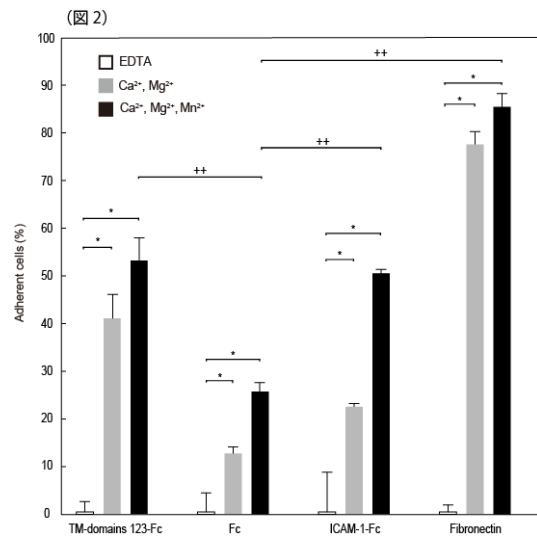
(1) TMは5つのドメインで構成される。3つのドメイン(D1-3)が血管内皮細胞上に存在し、この3つの部位が他の蛋白質と相互作用し、抗凝固作用、抗炎症作用を発揮すると考えられている。

我々は本研究においてこの細胞外ドメインとヒトIgGのFc部分を融合させたりコンビナントタンパクを作成した。(図1)

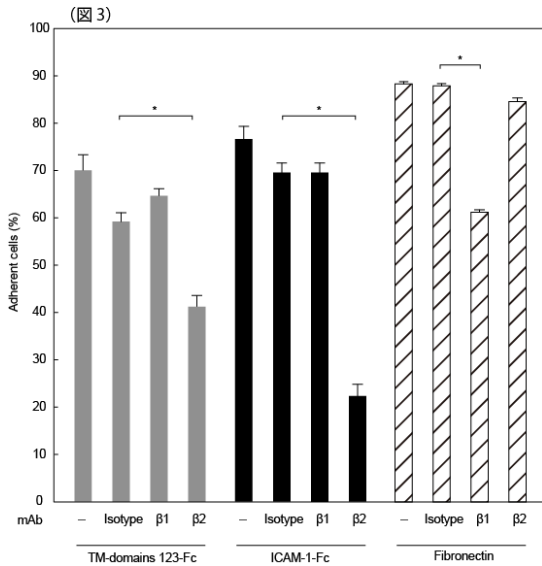


(2) TMの細胞外ドメイン(TM-domains 123)をFc部分と融合させたりコンビナントタンパク(TM-domains 123-Fc)をプレートに固相化し、健常成人のヒトPBMCを添加して生理的なシエアストレス下に細胞接着アッセイを行った。

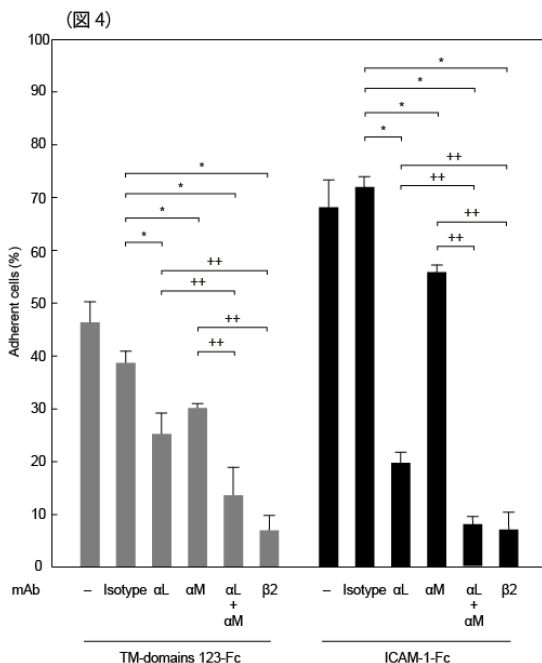
TM-domains 123-Fcは白血球インテグリンリガンドであるICAM-1やフィブロネクチン(FN)と同様に白血球と接着した。またこの結合はインテグリンをMgイオンやMnイオンにより活性化した際により強固に認められることから、TMの細胞外ドメインと白血球との結合がインテグリン依存性であることを強く示唆した。(図2, *P<0.05, **P<0.05)



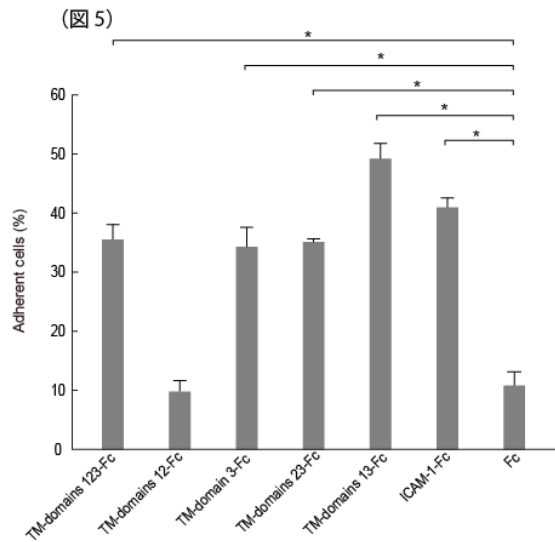
(3) ヒト PBMC とプレートに固相化した TM の結合がどのインテグリンに依存するかを調べるため 1 および 2 インテグリン抗体を用いて結合の阻害実験を行った。TM-domains 123-Fc とヒト PBMC との結合は 2 インテグリン抗体により阻害された。(図 3, *P<0.05) この結果は TM-domains 123-Fc とヒト PBMC との結合が 2 インテグリンに依存していることを示唆した。



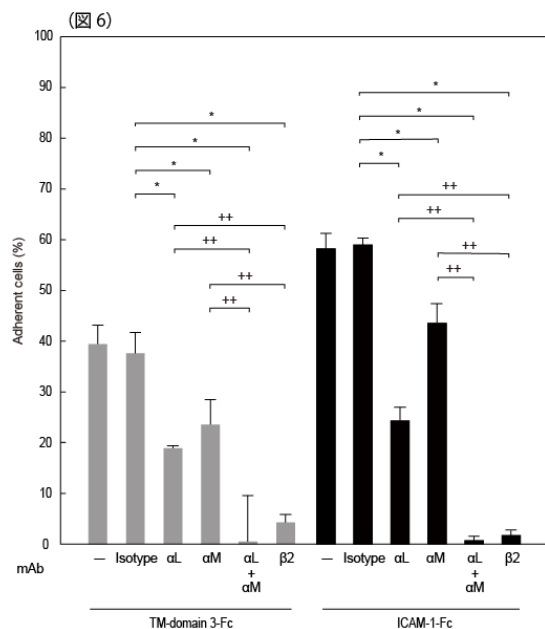
(4) ヒト PBMC に発現する代表的な 2 インテグリンは LFA-1 (L/ 2) と Mac-1(M/ 2)である。我々はヒト PBMC とプレートに固相化した TM の結合が L および M 抗体の双方で阻害されることを見いだした。(図 4, *P<0.05, ++P<0.05) この結果により TM と結合するインテグリンが LFA-1 および Mac-1 インテグリンであることを同定した。



(5) 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。次に我々は 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た。TM-domains 123-Fc の代わりに図 1 に示すタンパク質を等モル数用いて細胞接着実験を行い、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。(図 5, *P<0.05)



(6) TM-domain 3-Fc とヒト PBMC との結合は 2、L、M インテグリン抗体によりそれぞれ阻害されることを確認した。(図 6, *P<0.05, ++P<0.05)



以上より、本研究により血管内皮細胞上に発

現している 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影響を及ぼしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

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

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) トロンボモジュリン(TM)は白血球インテグリンと結合する: TM 抗炎症作用機序への関与の可能性 川本英嗣、岡本貴之、今井寛、島岡要 第30回日本 shock 学会 パネルディスカッション 2015年5月22,23日 京王プラザホテル八王子(東京都・八王子市)

(2) An anti-coagulant factor thrombomodulin as a novel leukocyte integrin ligand. Eiji Kawamoto, Takayuki Okamoto, Hiroshi Imai, Motomu Shimaoka. International Symposium for Bioengineering Research and Education, La Jolla, CA, USA, 2015.8.3.-8.4.

〔その他〕

ホームページ等

三重大学大学院医学系研究科 分子病態学
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/molpath/theme.html>

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 救命救急センター 助教

研究者番号: 20577415

(4) 研究協力者

岡本貴行 (OKAMOTO, Takayuki)

三重大学大学院医学系研究科 分子病態学 助教

研究者番号: 30378286

今井寛 (IMAI, Hiroshi)

三重大学医学部附属病院 救命救急センター 教授

研究者番号: 00184804

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