

# 学位論文の要約

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 病態解明医学講座 生体防御医学分野	氏 名	三宅 泰士
-----	---	-----	-------

## 主論文の題名

Dose-dependent differential effects of thrombin in allergic bronchial asthma

(アレルギー性気管支喘息におけるトロンビンの二面的な効果)

Yasushi Miyake, Corina N. D'Alessandro-Gabazza, Takehiro Takagi, Masahiro Naito, Osamu Hataji, Hiroki Nakahara, Hisamichi Yuda, Hajime Fujimoto, H Kobayashi, T Yasuma, Masaaki Toda, Tetsu Kobayashi, Y Yano, John Morser, Osamu Taguchi, Esteban C. Gabazza

Journal of Thrombosis and Haemostasis  
Vol 11, pp 1903 - 1915, 2013

## 主論文の要約

### 序

トロンビンは血液凝固系の中心的なタンパク質分解酵素である。また、トロンビンはその受容体であるプロテアーゼ活性化型受容体 (PARs: protease-activated receptors) を切断・活性化することによって炎症反応において重要な役割を持つ。アレルギー疾患においてトロンビンは炎症メディエーター、炎症性サイトカインの分泌を促進する作用が知られている。また、トロンビンは細胞膜上のトロンボモデュリンと結合することによってフィブリンの切断、PAR-1の切断活性を失うとともに、抗凝固、抗炎症作用を持つ活性化プロテインC、活性型TAFIを生成することによって炎症に対して防御的にはたらく。このように、トロンビンはトロンボモデュリンと結合しているか遊離しているかによって、全く逆の効果を示す。

気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患であり、CD4 優位のT細胞、好酸球、マスト細胞の浸潤、気流制限、気道過敏性の亢進を示す疾患である。アレルギー性気管支喘息ではトロンビンが過剰に産生されており、トロンビンは病態の悪化と深く関わっていることが知られている。われわれは既にトロンビン-トロンボモデュリン複合体によって生成される活性化プロテインC の投与がマウス喘息モデルにおいて炎症を抑制すること、またTAFI 遺伝子欠損マウスでは炎症が悪化すること

を報告している。今回われわれは、低用量のトロンピンはトロンボモデュリンと複合体を作ることによってプロテインC、TAFIを活性化し、アレルギー喘息を抑制し、高用量で喘息を悪化させるとの仮説を立て研究を施行した。

## 方法

水酸化アルミニウムアジュバントを用いてトリ卵白アルブミン(OVA)を感作したマウスに、OVAを吸入させアレルギー性喘息を誘発した。メサコリンに対する気道過敏性を測定し、解剖時に肺胞洗浄液、血漿、肺組織を採取した。炎症の評価は、気道過敏性、肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球数、IgE、Th2型サイトカイン(IL-4, IL-10, IL-13)濃度、肺組織中のムチン産生細胞の増加を示すPAS染色による陽性領域の定量によって行った。

## 結果

凝固因子Factor VのLeiden型変異をもつマウスでは野生型マウスにくらべ高濃度のトロンピンを有する。このマウスにOVAによる喘息を誘発すると、野生型マウスに較べて気道過敏性、肺胞洗浄液中の好酸球数、IgE、Th2サイトカイン、PAS陽性細胞が有意に低値であった。

次に、喘息モデルマウスに対する用量の異なるトロンピン(125 または 250 U)投与の効果を調べた。対照群には生理食塩水を投与した。250 Uのトロンピンを投与したマウスでは気道過敏性、肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球数、IgE、Th2サイトカイン、肺組織PAS陽性細胞が対照群に較べて有意に高値を示したのに対し、125 Uトロンピン投与群では対照群よりも有意に低い値を示した。

さらに内因性のトロンピンの喘息発症における役割を明らかにするため、トロンピンの阻害剤であるヒルジンを吸入させたところ、生理食塩水吸入群と比較して気道過敏性、肺胞洗浄液中の好酸球数、IL-10、IL-13、PAS染色陽性細胞、の有意な高値が認められ、ヒルジン投与は喘息症状を増悪させることがわかった。また、アンチトロンピンとアルガトロバンの投与もそれぞれ炎症の指標を有意に高め、病態を増悪させる効果を示した。

気道上皮細胞上のトロンボモデュリンの影響を調べるため、喘息モデルマウスに抗トロンボモデュリン抗体を吸入によって投与したところ、肺胞洗浄液中のリンパ球数、IL-4、IL-13、IL-10、がコントロール抗体投与群と較べて有意に高値を示した。気道過敏性には差が認められなかったが、肺胞洗浄液中の好酸球数、IgEは高い傾向がみられた。また、抗トロンボモデュリン抗体投与マウスに125 Uのトロンピンを吸入させたところ、気道過敏性は有意に高まり、肺胞洗浄液中の好酸球数、IL-13レベルもコントロール抗体前処理群と比較して有意に高い値を示した。

トロンピン-トロンボモデュリン複合体と活性化プロテインCの活性を抑制するプロテインC抑制因子(PCI: Protein C Inhibitor)を強く発現するPCI遺伝子トランスジェニックマウスを用いた実験では、野生型マウスと較べ、気道過敏性、肺胞洗浄液中の好酸球数、IgE、IL-10で有意に高値を示した。また、NF- $\kappa$ B活性も有意に亢進していた。

トロンピン受容体であるPAR-1発現量の低いPAR-1遺伝子のヘテロ欠損マウスを用いて喘息を誘発したところ、野生型マウスと較べ、気道過敏性、肺胞洗浄液中の好酸球数、IgE、IL-4、IL-13

レベルが有意に低値であった。また、野生型マウスにPAR-1アゴニストを吸入させると対照群と比較して肺胞洗浄液中の総細胞数、リンパ細胞数、IgE、IL-13、IL-10は有意に高値を示した。気道過敏性には差は認められなかった。さらに、試験管内でPAR-1アゴニスト存在下で誘導したOVA特異的CD4 T細胞はマウスに移入すると、PAR-1アゴニスト非存在下で誘導したCD4 T細胞に比べ強い炎症を起こし、肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球数、リンパ細胞数、IgE、IL-5レベルが高い値を示し、PAS陽性細胞数も有意に増加していた。

試験管内の樹状細胞分化の系にトロンビンを加えると、低濃度では成熟マーカーの発現を抑制し、高濃度では逆に発現を増強することも示された。同時に、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ とIL-6の産生も、低濃度のトロンビンは抑制するが、高濃度では促進することが示された。

## 考察

トロンビンはPAR-1を介して炎症反応を促進するが、トロンボモデュリンと複合体を形成すると活性化プロテインC、活性型TAFIを生成し、抗凝固、抗炎症効果を示す。トロンボモデュリンは血管内皮細胞と同様に気道上皮細胞にも発現している。トロンビンとトロンボモデュリンの親和性はトロンボモデュリンがコンドロイチン修飾を受けていない場合解離定数0.5 nMと非常に高く、EPCR存在下ではさらに親和性が増すことが報告されている。一方、トロンビンはPAR-1を結合、切断するときのミカエリス定数は16 nMであり、トロンビンはトロンボモデュリンと優先的に複合体を形成し、PAR-1の切断には複合体を飽和させる以上のトロンビンが必要となる。細胞表面上にトロンボモデュリン分子の方がPAR-1分子よりも多く発現していることからこの傾向は生体内ではさらに強くなる。複合体によって生成される活性化プロテインCはEPCR結合を介してPAR-1を切断し抗炎症効果を示す。また活性型TAFIは線溶系を阻害するとともに、補体因子C3a、C5aやオステオポンチンを切断、不活化することによって抗炎症効果を示す。したがって、トロンビンは濃度に依存して炎症反応に対して全く逆の効果を示す。今回、われわれは気道上でもトロンビンは低濃度では炎症を抑制し、高濃度では炎症を増悪させることを明らかにした。

気道に存在する凝固因子は、血管から漏洩した血液由来の成分と、上皮細胞で作られるタンパク質があるが、健康な気道では止血反応やフィブリンによるバクテリア補足、生態防御反応に働いている。しかしながら、アレルギー性気管支喘息のような病態では過剰なトロンビン産生が起り、病態を増悪させる効果を示す。過剰のトロンビンはPAR-1を切断活性化することによって、T細胞、マスト細胞、好酸球を活性化する。

低濃度のトロンビンによるアレルギー性気管支喘息に対する防御的な効果は、低濃度トロンビン投与によって炎症が改善されたこと、ヒルジンなどの阻害剤処理によって炎症が増悪したこと、からも示された。また、抗炎症効果がトロンボモデュリンとの複合体形成によることは、抗トロンボモデュリン抗体投与による炎症の増悪、複合体によって生成される活性化プロテインC投与による炎症の低下、TAFI遺伝子欠損マウスにみられる炎症の増悪によって示された。

高濃度のトロンビンによる炎症増悪効果がPAR-1の切断、活性化を介することは、PAR-1アゴニスト投与によって炎症が増悪したこと、PAR-1遺伝子ヘテロ欠損マウスでは炎症が軽減することから示された。また、試験管内でPAR-1アゴニスト処理したCD4 T細胞を養子移入したマウスでは炎症が増悪したことから、T細胞上のPAR-1がTh2サイトカインの産生を促進し、アレルギー

ギー性喘息の増悪に関与すると考えられる。また、マウス骨髄由来樹状細胞成熟過程でトロンビン  
を添加すると、低濃度では成熟を抑制するが、高濃度では成熟を促し、炎症性サイトカインの発現  
も促進することが明らかになった。この成熟促進効果は PAR-1 中和抗体によってみられなくなる  
ことから、トロンビンは PAR-1 を介して樹状細胞の成熟を調整していると考えられる。

#### 結論

本研究によってトロンビンは低濃度ではアレルギー性気管支喘息を抑制するが高濃度では炎症  
反応、気道過敏性を亢進することが示された。