69　TM由来変異ペプチドによる血管内皮細胞保護薬の開発	池添　隆之

【目的】我々が発見したトロンボモジュリン（TM）由来新規血管内皮保護ペプチドを、造血細胞移植後合併症である類洞閉塞症候群（SOS）予防薬としての薬事承認を目指した治験に橋渡しするため、現在の候補化合物の中から最終開発化合物を決定することを目的とする。

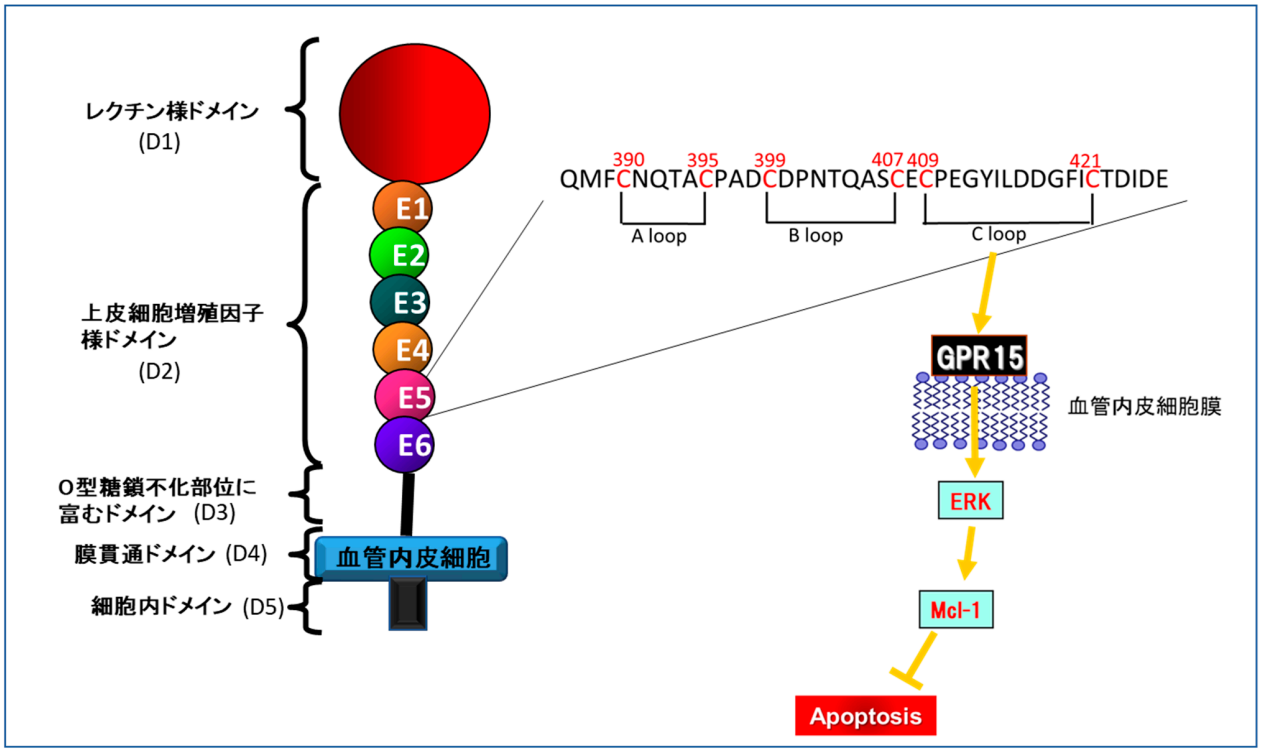
【方法】これまでに TM 分子の 40 アミノ酸からなる 5 番目の上皮細胞増殖因子様領域（E5）に血管新生作用や血管保護作用が存在することを見出している。E5 は 2 つの S-S 結合により 3 つのループ構造（A，B，C ループ）をもつため、それぞれの構造をペプチド合成し、どのループにこのような作用が局在するのか培養血管内皮細胞を用いて検討する。

造血細胞移植後に SOS を発症する場合は輸血不応性の血小板を併発していることが多い。従って SOS の予防剤は血液凝固系に作用しないものが望ましい。E5 にはトロンビンとの結合能が残存しているため、血小板減少患者に使用すると出血の副作用が懸念される。内皮保護活性をもつループが血液凝固系へ与える影響をプロトロンビン時間（PT）や活性化部分トロンボプラスチン時間（APP）を測定して確認する。

培養血管内皮細胞を用いた実験で血管保護作用をもつ TM の最小分子が決定されれば、その効果をマウス移植 SOS モデルで検証する。

【結果】E5 の C ループに血管内皮細胞増殖刺激作用や、タクロリムスによるアポトーシスから血管内皮細胞を保護する作用があることが明らかとなった。また、この C ループは PT や APTT に影響しないことから、血液凝固系への作用はないと判断された。マウス SOS モデルにおいて SOS の予防効果も確認できた。

トロンボモジュリンの構造と血管内皮保護作用を発揮する最小単位の同定とその機序



69. TM 由来変異ペプチドによる血管内皮細胞保護薬の開発

池添　隆之

福島県立医科大学 血液内科学講座

Key words：トロンボモジュリン，類洞閉塞症候群，造血細胞移植，血管内皮細胞

緒　言

我々は、遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤（rTM）の新たな臨床応用に積極的に取り組む過程で造血細胞移植後に併発する血管内皮障害に起因する致死的な合併症に対して rTM が病態を改善し救命できることを見出した。一方、rTM は本来強力な抗凝固作用を有していることから、血小板数が低値である移植患者にとって出血副作用のリスクも高いことが懸念される。そこで、出血のリスクの全くない血管内皮保護作用のみを有する rTM 改変体の新たな医薬開発を目標に TM の血管内皮保護作用の解明研究を進めた。TM の内皮保護作用は、抗アポトーシス蛋白質 Mcl-1 誘導による細胞死抑制、血管透過性亢進の抑制、内皮細胞増殖促進による血管新生作用の 3 つの機序により発揮されていることを明らかとした。この TM の内皮保護作用発揮に重要な構造として TM の第 5 番目の上皮細胞増殖因子（EGF）様ドメイン（E5）を特定し、その化学合成 E5 ペプチドは、rTM が有する全ての内皮保護活性を有し、静脈内投与により移植後合併症モデルにて効果を発揮した［1］。また、rTM 及び E5 が作用する内皮細胞上の受容体としてオーファン G 蛋白質共役受容体である GPR15 を見出した［2］。rTM 及び E5 は内皮細胞上の GPR15 を介して細胞死抑制、血管透過性亢進の抑制、内皮細胞増殖促進による血管新生作用の 3 つの内皮保護作用を発揮している。しかしながら E5 は大量生産に適した構造を有しておらず開発候補品としては不適切である。また、トロンビンと結合し、血液凝固系に影響するため、造血細胞移植後、血小板の少ない患者に使用すると出血の危険が伴う。そこで E5 の類縁体を複数合成し、より開発候補品に適したペプチドの取得を目指すこととした。

方　法

1. ペプチド合成

E5 は下図に示すように 3 つのループ構造より構成される。それぞれのループをペプチド研究所（大阪府茨木市）で化学合成した。

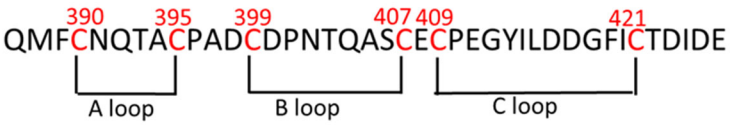


図 1. ペプチド配列

2. 血管新生作用

臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）や肝類洞内皮細胞（HHSEC）をさまざまな濃度の化学合成した A、B、C ループの存在下で培養後、Bromodeoxyuridine（BrdU）取り込み法でその増殖刺激活性を定量化した。

HUVEC を化学合成した A、B、C ループの存在下で培養後、顕微鏡下に管腔形成を観察した。陽性コントロールとして血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を使用した。

C57BL6 マウスの皮下に、各種ループを混入したマトリゲルを植え込み、72 時間後に摘出して血管新生作用を肉眼的に確認した。これらの実験は全て我々の既報に従った［2］。

3. 抗アポトーシス作用

HUVEC あるいは HHSEC を、細胞障害を誘導する高濃度のカルシニューリン阻害剤タクロリムス（FK506）単独、あるいは各種ループの存在下で培養した。48 時間後に細胞を回収し、アネキシン V と propidium iodide で染色し、フローサイトメトリーで陽性細胞（アポトーシスに陥った細胞）を定量化した。これらの実験は全て我々の既報に従った［3］。

4. E5 類縁体の抗凝固作用

シスメックス（神戸市）から PT および APTT 測定用試薬を購入し KC1 Delta coagulometer（Tcoag、Bray、Co. Wicklow，Ireland）を用いて、E5 類縁体が凝固時間に及ぼす影響を検討した。

5. マウス移植 SOS モデルにおける E5 類縁体の効果

C57BL/6 マウスに下図に示すようにブスルファン（BU）とエンドキサン（CY）を大量に投与し BALB/C マウスの骨髄細胞を移植して SOS を誘発した。ブスルファン投与開始時から移植 13 日目まで E5 類縁体を隔日投与した。移植 7 日目に一部のマウスを安楽死後、腹水を採取して軽量グラフ化した。

移植 7 日、14 日、20 日目にマウスの顔面静脈から採血を行い AST と AST を測定して肝障害の程度を評価した。

結　果

1.　血管新生作用は C ループ（TME5C）に局在する

下図に示すように C ループ（TME5C）のみに HUVEC（左）と HHSEC（右）の細胞増殖刺激活性を認めた（図 1）。TME5C は 25～500 nM までは濃度依存的に細胞増殖刺激作用を発揮したが、1000 nM に増量しても更なる増殖刺激作用の上乗せは認められなかった。

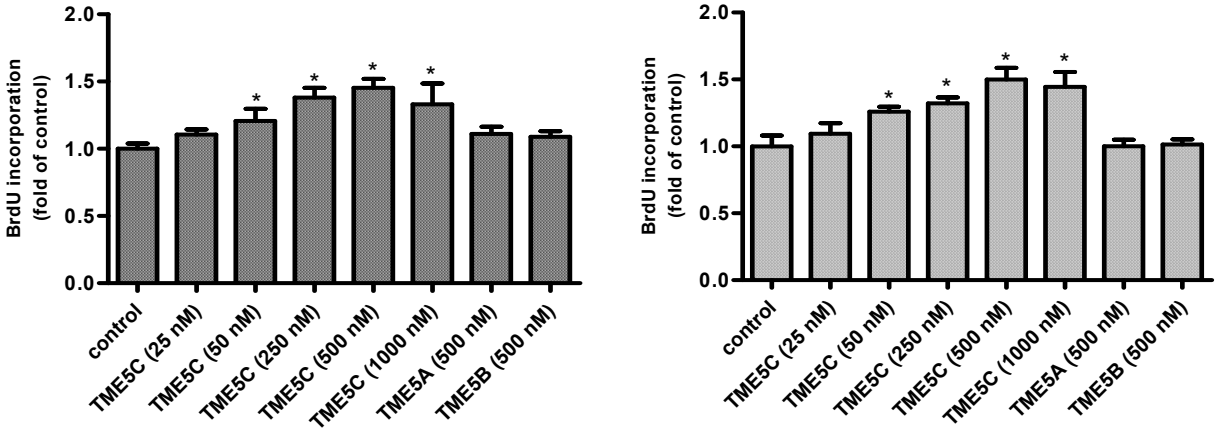


図 2.　E5 類縁体の血管新生作用

HUVEC（左）あるいは HHSEC（右）を各種 E5 類縁体の存在下で 72 時間培養後、BudU 取り込み法で細胞増殖活性を定量化した。コントロールと各ペプチド群の比較は student-t test で行った。*$p < 0.05$。

また、C ループのみが、陽性コントロールとして使用した血管内皮細胞増殖因子（VEGF）と同様に HUVEC に管腔形成を誘導した（図 2）。

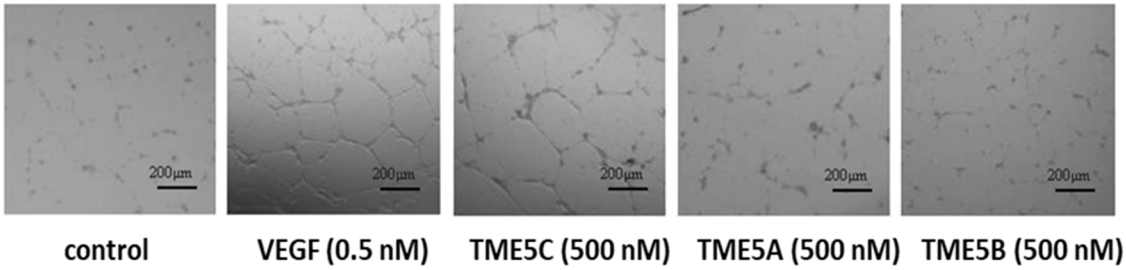


図 3. E5 類縁体の管腔形成作用

HUVEC を各種 E5 類縁体の存在下で培養後、顕微鏡下に管腔形成を確認した。VEGF を陽性コントロールとして使用した。

更に、C57BL6 マウスの皮下に、各種ループを混入したマトリゲルを植え込み、72 時間後に摘出したところ、C ループに血管新生作用が存在することが確認できた（図 3）。

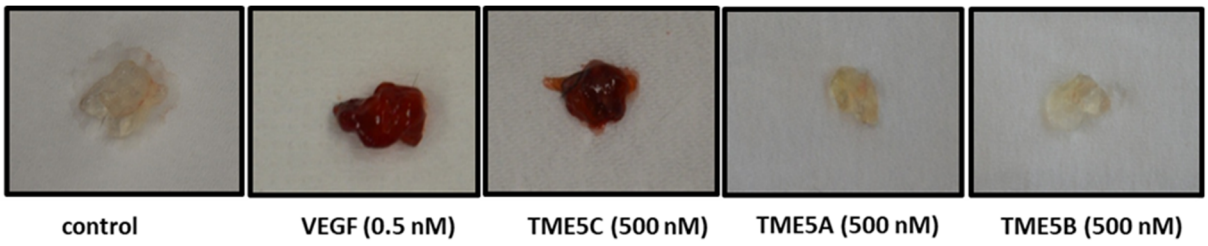


図 4. E5 類縁体のマウスでの血管新生作用

マトリゲルに各種 E5 類縁体を混じた後、マウスの皮下に移植した。72 時間後にマトリゲルを摘出して肉眼的に観察した。

2. TM5C はカルシニューリン阻害剤による細胞傷害から血管内皮細胞を保護する

タクロリムス（FK506）は HUVEC と HHSEC にそれぞれ 35%あるいは 55%のアポトーシスを誘導した。A と B ループにはアポトーシスを抑制する作用は認めなかったが、C ループを FK506 と共に培養液中に添加すると、アポトーシスに陥る細胞は統計学的に有意差をもって減少した（図 4）。これらの結果から、C ループに内皮細胞保護作用が存在することが明らかとなった。

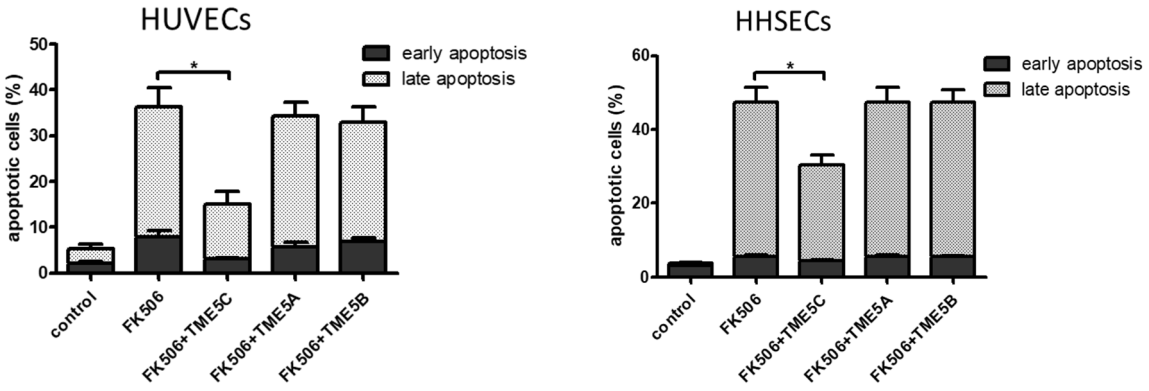


図 5. E5 類縁体の抗アポトーシス作用

HUVEC（左）あるいは HHSEC（右）を FK506 単独あるいは各種 E5 類縁体の存在下で培養後、アネキシン V と propidium iodide で染色し、フローサイトメトリーで陽性細胞（アポトーシスに陥った細胞）を定量化してグラフ化した。各群の比較は one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test で行った。*$p < 0.05$。

3. E5 類縁体は血液凝固に影響しない

E5 は PT を約 1.2 倍、APTT を約 2 倍に延長させたが、TME5C は両者とも延長させなかった。従って、TME5C は血液凝固系に作用しないと判断できる。

4. TME5C はマウス SOS を予防する

マウスに BU/CY を投与し移植を行った。無作為に 2 群に分け、一方には移植前処置開始日より TME5C を腹腔内に隔日投与した。もう一方のコントロール群には溶媒を投与した。コントロール溶媒投与群では移植後 28 日目までに 75%のマウスが死亡したが、TME5C の投与を受けたマウスは全例が 1 か月後も生存した（図 5A）。7 日目に採取した腹水量や肝逸脱酵素はコントロール溶媒群で有意に増加していた（図 5B～D）。ヘマトキシリン・エオジン染色による肝組織の病理学的検討でも、コントロール溶媒群で重度の SOS が確認できた（図は示さず）。

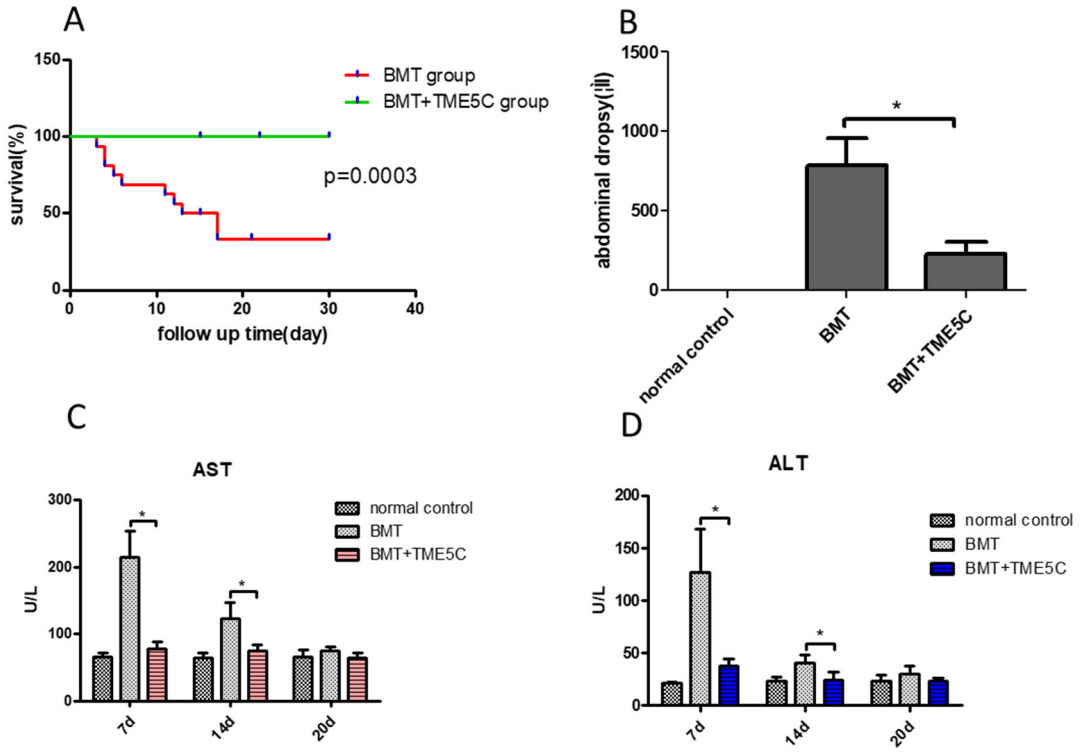


図 6. TME5C はマウス移植 SOS を予防する

A, マウスの生存曲線。C57BL/6 マウスに BU/CY を投与後 BALB/C の骨髄細胞を移植後、生存期間を観察した。BMT group, コントロール溶媒を投与した。BMT+TME5C group, TME5C を投与した。各郡 16 匹。Log-rank 試験で両群の生存曲線の有意差を解析した。B, 腹水量の比較。移植 7 日目に各グループから 3 匹を安楽死後、腹水を採取して計量、グラフ化した。C, AST ; D, ALT。移植 7 日、14 日、20 日目にマウスから採血を行い肝逸脱酵素を測定した。Normal control は移植を受けていないマウス。マウス生存曲線音比較は log-rank 試験で行った。それ以外のグラフの両群の比較は one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test で行った。*$p < 0.05$。

考　察

本研究で E5 の C ループに血管新生作用と内皮細胞保護作用が存在することが明らかとなった。重要なことにこの C ループは血液凝固系に作用しない。即ち、移植後の血小板が少ない患者に使用しても出血を助長する危険性がない。われわれはマウスに BU/CY を投与して移植を行い SOS を誘導することに成功した。C ループはこのモデルにおいて SOS 予防効果を発揮した。既に欧米では重症 SOS に対して、豚の腸粘膜 DNA より作製したデフィブロタイド（DF）が治療剤として承認されている［4］。今後は C ループの SOS に対する治療効果を DF と比較検討する予定である。

文 献

1) Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Pan B, Xu K, Furihata M, Nakamura K, Yurimoto H, Sakai Y, Honda G, Yokoyama A. The fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin exerts cytoprotective function and prevents SOS in a murine model. Bone Marrow Transplant. 2017 Jan;52(1):73-79. DOI:10.1038/bmt.2016.195.

2) Pan B, Wang X, Nishioka C, Honda G, Yokoyama A, Zeng L, Xu K, Ikezoe T. G-protein coupled receptor 15 mediates angiogenesis and cytoprotective function of thrombomodulin. Sci Rep. 2017 Apr 6;7(1):692. doi: 10.1038/s41598-017-00781-w.

3) Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Honda G, Furihata M, Yokoyama A. Thrombomodulin protects endothelial cells from a calcineurin inhibitor-induced cytotoxicity by upregulation of extracellular signal-regulated kinase/myeloid leukemia cell-1 signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Sep;32(9):2259-70. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.251157.

4) Richardson PG, Smith AR, Triplett BM, Kernan NA, Grupp SA, Antin JH, Lehmann L, Miloslavsky M, Hume R, Hannah AL, Nejadnik B, Soiffer RJ. Earlier defibrotide initiation post-diagnosis of veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome improves Day +100 survival following haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol. 2017 Jul;178(1):112-118. doi: 10.1111/bjh.14727.