

博士（医 学） アクム タリクツ ザマン

学 位 論 文 題 名

Effects of Tacrolimus Hydrate(FK-506)  
on the Expression of Tissue Factor  
in THP-1 Human Monocyte Cell Line

(ヒト単球系細胞の組織因子発現に対するタクロリムス水和物の作用)

学位論文内容の要旨

移植心に見られる進行の非常に早い動脈硬化症は長期予後を規定する重要な因子である。凝固系の活性化と血栓症は移植心動脈硬化症の発症や進展に重要な働きをする。血液に暴露されると組織因子は凝固VII因子(FVII)と結合し、組織因子-FVII複合体は凝固IX因子とX因子を活性化し、その結果トロンビンが活性化されることによりフィブリンが生成する。ヒト単球はサイトカインやエンドトキシンlipopolysaccharide (LPS)刺激により組織因子を発現する。組織因子発現の亢進は動脈硬化性虚血性心疾患、特に不安定狭心症と関連が深い。従って単球での組織因子発現の亢進は移植心冠状動脈での血栓形成やフィブリン沈着に関与する可能性が考えられる。最近、免疫抑制薬シクロスボリンがLPS刺激によるヒト単球での組織因子発現を抑制することが報告された。タクロリムス水和物 (Tacrolimus hydrate, FK-506) は心臓移植に用いられるもう一つの免疫抑制薬である。その凝固系に与える作用の詳細は検討されていない。そこで今回我々は、単球機能の解明に広く用いられ組織因子を発現することが知られているヒト単球由来THP-1細胞を用いて、タクロリムスの組織因子発現と凝固活性に及ぼす影響を検討した。THP-1細胞は10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地で37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養器で培養した。細胞は2-5 × 10<sup>5</sup>個/ml に培養後LPSで刺激し 0-24時間後に回収した。細胞は回収後凍結溶解を 3 回繰り返し細胞溶解質を作成した。細胞溶解質の凝固活性は凝固一段法で測定した。凝固時間は mU 単位に変換し細胞10<sup>6</sup> 個あたりの凝固活性として表した。ウサギ脳トロンボプラスチンを用いて標準検量線を作成し、各サンプルの凝固活性を定量した。ヒト組織因子抗原量は ELISA法を用いて測定した。総蛋白量はBCA 法を用いて測定した。細胞の組織因子局在を抗ヒト組織因子モノクローナル抗体を用いて検索した。細胞を4% パラホルムアルデヒドで固定し、一次抗体と室温で30分反応させた。その後、ストレプトアビジンビオチン複合体でラベルし、DABを用いて発色させた。抗体特異性は、免役されていない非特異的マウス IgGを対照に用いた免疫染色を行い非特異的染色が起こっていないことから確認した。RNAはacid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法で抽出した。cDNA 作成とPCR は従来の方法を用い TF mRNA に特異的なプライマー配列を用いた。コントロールとして β アクチン発現を検討した。RT-PCR後アガロース電気泳動にかけエチジウムプロミドで染色した。結果は平均±標準偏差で表した。統計学的検討は Student's t-test を用い危険率 p < 0.05を有意とした。LPS刺激 6 時間ににより THP-1 細胞の凝固活性は上昇した。凝固活性は10 μg/ml LPS 刺激で最大となった。FK-506はLPS 刺激により誘導される凝固活性を用量依存性に抑制した。抑制は0.5 μM から見られ、2 μM で更に低下し5 μM で完全に抑制された。LPS (10 μg/ml)刺激により誘導される凝固活性は 6 時間で最大となり、FK-506 (5 μM) により抑制された。誘導

された凝固活性が組織因子発現の亢進によるかを検討するため、細胞をLPS(10 μg/ml)で6時間刺激後、凝固活性をFVII欠乏血漿で測定した。FVII欠乏血漿を用いると凝固時間は短縮されなかった。更に凝固活性は抗ヒト組織因子モノクローナル抗体1-10 μg/ml添加により抑制された。非特異的マウスIgGでは凝固活性の抑制は見られなかった。従ってLPS刺激により誘導される凝固活性は組織因子由来と考えられた。凝固活性の上昇が組織因子抗原量の上昇を伴い、またFK-506による凝固活性低下が組織因子発現の低下によるものかを検討するため、細胞溶解質の組織因子抗原量をELISA法にて測定した。LPS刺激により組織因子抗原量は上昇した(対照 100 ± 12%、LPS 10 μg/ml刺激 385 ± 51%, n = 5, p < 0.001)。FK-506(5 μM)は有意にLPS刺激による組織因子発現の亢進を抑制した(141 ± 28%, n = 5, p < 0.001)。FK-506(5 μM)は非刺激細胞の組織因子発現も軽度抑制した(93 ± 8%, n = 5)。細胞を10<sup>6</sup>個/mlで24時間培養した上清の組織因子量は25 pg/ml以下であった。また、細胞溶解質中の総蛋白量はFK-506により変化しなかった。組織因子の細胞内発現を検討するため細胞をFK-506存在下と非存在下でLPS刺激後、免疫染色を行った。LPS未刺激細胞ではごく軽度の免疫反応のみが認められた。LPS(10 μg/ml)刺激後6時間で明確な顆粒状の染色が認められた。FK-506(5 μM)はLPS刺激による染色を減少させた。FK-506単独刺激あるいは非特異的マウスIgGでは組織因子は染色されなかった。FK-506が組織因子の遺伝子発現を抑制するかをRT-PCR法で検討した。LPS(10 μg/ml)刺激した細胞では組織因子mRNA発現が亢進し、FK-506(5 μM)はこの亢進を抑制した。FK-506はβアクチン遺伝子の発現を変化させなかった。単球の内皮下組織への侵入は感染、癌転移、動脈硬化症などにみられる。単球ないしマクロファージの組織因子発現によるフィブリン沈着は局所の炎症反応を惹起すると考えられる。すなわち、内皮への単球の接着は内皮での組織因子発現を誘導し、血管外腔での凝固系の活性化は炎症反応に関与する細胞を活性化すると考えられ、実際フィブリン沈着や組織因子発現を減少させると炎症反応が弱まる。したがって、単球での組織因子発現の亢進は、移植心動脈硬化症における免疫反応と凝固系をつなぐ機構と考えられる。免疫反応と凝固系をつなぐ最初の反応は血管内皮細胞への単球の接着で、次に内膜へのフィブリン沈着が生じる。この過程で内皮に接着した単球の組織因子発現が亢進していると、凝固系が活性化されフィブリン沈着が増加する。実際、組織因子による凝固系の活性化経路を抑制することにより、ミニブタを用いた血管障害モデルで血管狭窄が改善する。また、単球はインテグリンα4β1とVCAM-1を介して内皮に接着することにより組織因子発現が亢進し、FK-506はグラフトの血管障害を軽減することも知られている。LPSは単球で組織因子の転写活性を上昇させ、組織因子のmRNAを安定化させる。組織因子抗原量が低下し、組織因子mRNA発現が減少することからFK-506の作用の一部は少なくとも組織因子遺伝子の転写を抑制することによると考えられる。FK-506は単球の組織因子を介した凝固活性を減少させることで移植後の血管障害軽減に寄与する可能性が示された。また、今後イムノフィリン情報伝達系に作用し移植心の血管障害を軽減する作用のある薬物を開発する場合、凝固系に対する検討も必要になると思われる。また、免疫抑制薬は不安定狭心症のように炎症反応と同時に組織因子が活性化される他の疾患にも有用となる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 北畠 顯  
副査教授 川口秀明  
副査教授 吉岡充弘

## 学位論文題名

### Effects of Tacrolimus Hydrate(FK-506) on the Expression of Tissue Factor in THP-1 Human Monocyte Cell Line

(ヒト単球系細胞の組織因子発現に対するタクロリムス水和物の作用)

凝固系の活性化と血栓症は移植心動脈硬化症の発症や進展に重要な働きをする。血液に暴露されると組織因子は凝固VII因子(FVII)と結合し、組織因子-FVII複合体は凝固IX因子とX因子を活性化し、その結果トロンビンが活性化されることによりフィブリンが生成する。ヒト単球はエンドトキシンlipopolysaccharide(LPS)刺激により組織因子を発現する。組織因子発現の亢進は動脈硬化性虚血性心疾患、特に不安定狭心症と関連が深い。従って単球での組織因子発現の亢進は移植心冠状動脈での血栓形成やフィブリン沈着に関与する可能性が考えられる。そこでヒト単球由来THP-1細胞を用いて、臓器移植に用いられる免疫抑制薬タクロリムスの組織因子発現と凝固活性に及ぼす影響を検討した。THP-1細胞は培養後LPSで刺激し0-24時間後に回収した。細胞溶解質の凝固活性は凝固一段法で測定した。凝固時間はmU単位に変換し細胞 $10^6$ 個あたりの凝固活性として測定した。ウサギ脳トロンボプラスチンを用いて標準検量線を作成し、各サンプルの凝固活性を定量した。ヒト組織因子抗原量はELISA法を用いて測定した。細胞の組織因子局在を抗ヒト組織因子モノクローナル抗体を用いた免疫染色法で検索した。組織因子遺伝子発現は特異的なプライマー配列を用いてRT-PCR法で検討した。LPS刺激THP-1細胞の凝固活性は上昇した。凝固活性は $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  LPS刺激で最大となった。FK-506はLPS刺激により誘導される凝固活性を用量依存性に抑制した。抑制は $0.5\text{ }\mu\text{M}$ から見られ、 $2\text{ }\mu\text{M}$ で更に低下し $5\text{ }\mu\text{M}$ で完全に抑制された。LPS刺激により誘導される凝固活性は6時間で最大となり、FK-506により抑制された。凝固活性をFVII欠乏血漿で測定すると凝固時間は短縮されなかった。また、凝固活性は抗ヒト組織因子モノクローナル抗体添加により抑制された。LPS刺激により組織因子抗原量は上昇した。FK-506は有意にLPS刺激による組織因子発現の亢進を抑制した。免疫染色ではLPS刺激で明確な顆粒状の染色が認められた。FK-506はLPS刺激による染色を減少させた。RT-PCR法ではLPS刺激した細胞では組織因子mRNA発現が亢進し、FK-506はこの亢進を抑制した。組織因子発現によるフィブリン沈着は局所の炎症反応を惹起し、血管外腔での凝固系の活性化は炎症反応に関与する細胞を活性化すると考えられる。単球での組織因子発現の亢進は、

移植心動脈硬化症における免疫反応と凝固系をつなぐ機構と考えられる。LPSは単球で組織因子の転写活性を上昇させた。組織因子抗原量が低下し、組織因子mRNA発現が減少することから FK-506の作用の一部は少なくとも組織因子遺伝子の転写を抑制することによると考えられる。FK-506は単球の組織因子を介した凝固活性を減少させることで移植後の血管障害軽減に寄与する可能性が示された。口頭発表に際し、川口教授からFK-506の細胞内作用機序、組織因子発現制御機構について質問がなされた。吉岡教授から免疫担当細胞に作用するFK-506濃度、FK-506の血管壁構成細胞への作用について質問がなされた。北畠教授から移植心動脈硬化症と加齢による動脈硬化の病態の相違、心移植患者の凝固系の特徴について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去のデータや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文は北海道医学雑誌に掲載予定である。この論文で得られた結果は移植心動脈硬化症の発症機序解明、新たな治療法の開発に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。