

# リコモジュリン<sup>®</sup>による白血球インテグリンと 血管内皮細胞上のインテグリンリガンドを介した接着制御作用

長太 のどか<sup>1)</sup>, 川本 英嗣<sup>2), 3)</sup>, 朴 恩正<sup>2)</sup>, 島岡 要<sup>2)</sup>

1) 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療栄養学科

2) 三重大学大学院 医学系研究科 分子病態学講座

3) 三重大学医学部附属病院 救命救急センター

研究紹介

## リコモジュリン<sup>®</sup>による白血球インテグリンと血管内皮細胞上のインテグリンリガンドを介した接着制御作用

長太 のどか<sup>1)</sup>, 川本 英嗣<sup>2), 3)</sup>, 朴 恩正<sup>2)</sup>, 島岡 要<sup>2)</sup>

1) 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療栄養学科

2) 三重大学大学院 医学系研究科 分子病態学講座

3) 三重大学医学部附属病院 救命救急センター

キーワード： トロンボモジュリン,  $\beta 2$  インテグリン, 敗血症, 炎症, 血管内皮細胞

### 要 旨

リコモジュリン<sup>®</sup>は、遺伝子組み換え型ヒト可溶性トロンボモジュリン (rhsTM, TMD123) であり、敗血症性播種性血管内凝固症候群 (DIC) の治療薬として承認されている。我々は以前に、主要な白血球  $\beta 2$  インテグリン (LFA-1, Mac-1) が血管内皮細胞 (VECs) 上に発現している膜型トロンボモジュリン (TM, TMD12345) のセリン/スレオニンリッチドメイン (TMD3) に結合することを報告した。しかしながら、白血球インテグリンの VECs への接着において、可溶性 TMD123 を外因性に投与した場合の細部接着に及ぼす効果については明らかにされていない。本研究で我々は、末梢血単核球 (PBMCs) と VECs との間の結合がインテグリン依存的に可溶性 TMD123 によって阻害されることを実証した。さらに、TM 細胞外ドメインの変異タンパク質を用いて可溶性 TMD123 の抗接着特性の基となる構造特性について検討し、白血球接着阻害の新たな制御機構を提示した。

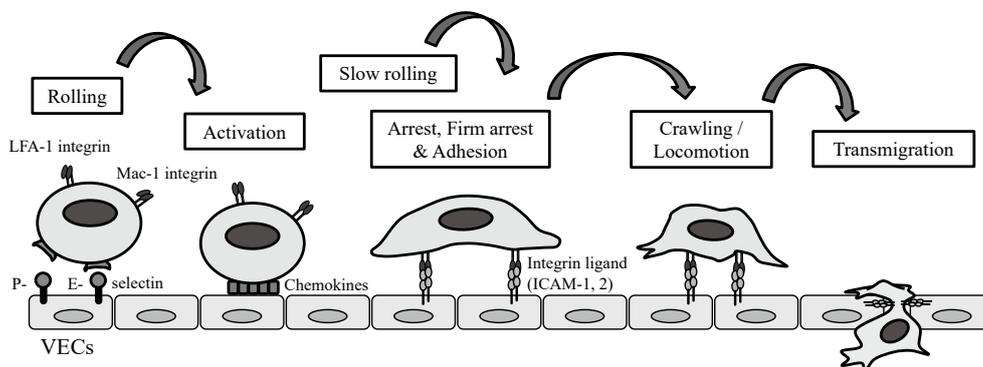
## 1. はじめに

感染や炎症は白血球の部位特異的誘引を引き起こすが、これは接着分子、ケモカイン、サイトカインおよび内因性調節分子等によって制御された複数のステップ(白血球接着カスケード)を経て行われる<sup>1)</sup>。このステップの中に含まれる白血球と血管内皮細胞(vascular endothelial cells: VECs)との接着過程は、白血球が炎症部位へ遊走するための1つのステップである。白血球とVECsとの接着相互作用では、白血球に特異的に発現するβ2インテグリンのLFA-1(Lymphocyte Function-associated antigen-1: LFA-1)およびMac-1(Macrophage-associated antigen-1: Mac-1)が活性化し、VECs上のインテグリンリガンドであるICAM-1(Intercellular adhesion molecule-1)と結合する(Figure 1)。白血球を炎症の局所部位に誘導することは、免疫応答の重要な部分である。しかし、局所炎症とは対照的に、全身性の炎症は循環全体にわたる過剰な白血球の活性化を特徴とする<sup>2)</sup>。

敗血症は、多臓器機能障害を誘発する制御不能な全身性炎症反応症候群である<sup>3)~5)</sup>。敗血症の初期段階においては、活性化した白血球は局所炎症部位だけにとどまらず遠隔炎症臓器にまで蓄積する。複数の臓器の機能障害は、白血球とVECsとの相互作用(接着や遊走)が過剰な炎症を助長することによって引き起こされる<sup>2)</sup>。こ

のような臓器障害は、白血球とVECsとの間の接着を抑制することによって軽減することができる<sup>6)~8)</sup>。そのため、VECsへの白血球の過剰な接着および遊走の阻害は、敗血症に対する重要な治療選択肢となる可能性がある。

重症敗血症患者の急性呼吸窮迫症候群(Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS)はVECsへの過剰な好中球の接着および肺胞への移動がひとつの誘因となり引き起こされるが、最近の研究において、遺伝子組み換え型ヒト可溶性トロンボモジュリン(recombinant human soluble thrombomodulin consisting of domains 1-3: rhsTM, TMD123)の使用がARDSを軽減した結果が報告された<sup>9)</sup>。また、リポ多糖誘発性敗血症モデルラットへの可溶性TMD123の投与が腸間膜微小循環の血管内皮への白血球の接着を抑制し<sup>10)</sup>、さらに可溶性TMD123投与によって脂肪肝疾患モデルマウスのマクロファージと好中球の蓄積を減少させた<sup>11)</sup>。これらの結果は、可溶性TMD123の投与が炎症反応における白血球のVECsへの接着を減弱させ、臓器機能障害のその後の段階における白血球の過剰な蓄積を阻害する可能性があることを示唆している。しかしながら、可溶性TMD123またはTMD123の部分ドメインであり様々な機能を有する各ドメイン(TMD1, TMD2およびTMD3)の投与が、白血球インテグリンとVECs上に発現しているリガンドとの間の接着に影響を及ぼすかどうかは明らかになっていない。



1) Mitroulis I et al, *Pharmacol Ther.* 2015; 147: 123-135を改変

**Figure 1. Leukocyte adhesion cascade.**

白血球の血管外遊出では、感染や炎症、組織損傷部位に向かって白血球が移動する(白血球の部位特異的誘引)。このプロセスは、Rolling, Arrest, Firm arrest & Adhesion, Crawling/ Locomotion, および Transmigrationのステップを含む。Rollingはセレクトリンによって媒介され、Arrest, Firm arrest, Crawling, Locomotionはインテグリンによって媒介される。インテグリンはケモカインによって活性化される。

トロンボモジュリン (TM) は、VECs 上に発現する 557 個のアミノ酸からなる細胞表面膜貫通糖タンパク質である。TM の構造は 5 つのドメイン、すなわち N 末端レクチン様ドメイン (D1)、6 つの EGF 様ドメイン (D2)、糖鎖を有するセリン/スレオニンリッチドメイン (D3)、膜貫通ドメイン (D4)、および細胞質ドメイン (D5) から構成される。TMD123 は、TM の細胞外ドメインである D1、D2 および D3 から構成され、遺伝子組み換え型ヒト可溶性トロンボモジュリン (rhsTM, TMD123) として敗血症の治療薬に臨床応用されている (Figure 2)。VECs 上の TM は、抗凝固システムにおいて重要な分子であるだけでなく<sup>12)</sup>、細胞接着分子としても作用することが明らかになっており、例えば、可溶性 TMD1 の外因性投与はヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Venous Endothelial Cells: HUVEC) の表面に発現しているルイス Y 抗原に結合することによって、HUVEC と白血球との結合を阻害する<sup>13)</sup>。

敗血症のような全身性の炎症性疾患では、外因性に投与された可溶性 TM (TMD123) が免疫細胞および内皮細胞上の受容体と相互作用し、それによって炎症を軽減する場合、血管内皮に存在する TM (内因性の膜型 TM) と白血球との直接的な相互作用が示唆される。しかしながら、これらの相互作用における分子レベルでの詳細は明らかにされていなかった。そのため、我々はこれまで

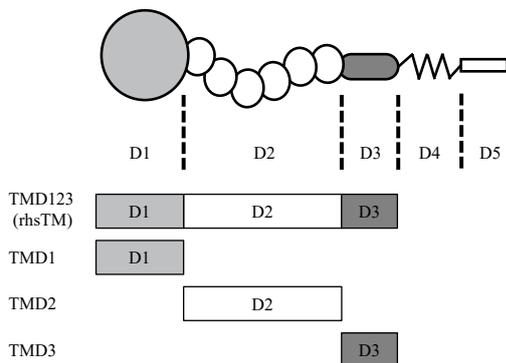


Figure 2. Structure and domain organization of thrombomodulin.

野生型トロンボモジュリン (TM) は 5 つのドメインから構成される。可溶性 TM (rhsTM, TMD123) はトロンボモジュリンの細胞外ドメイン (D1 ~ D3) からなる。D1 は TM のレクチン様ドメイン、D2 は 6 個のシステイン残基を持つ EGF 様ドメイン、D3 はセリン/スレオニンに富むドメインである。D4 は膜貫通ドメイン、D5 は細胞質ドメインである。

に内因性の膜型 TM が白血球と相互作用するかどうか調べ、相互作用する場合の分子のおよび構造的メカニズムの解明に着手してきた<sup>14)</sup>。以前の我々の研究では、主に次の 3 点について明らかにした；1) 固相化した TM-domains 123-Fc が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ことを見出し、この接着がインテグリンを 2 価陽イオンで活性化させた時により強固な接着が認められたことから、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を示した。2) どのインテグリンメンバーが TM と白血球との接着に依存するか調べるため、抗  $\beta 1$  インテグリン抗体および抗  $\beta 2$  インテグリン抗体を用いて接着阻害実験を実施したところ、TM-domains 123-Fc と白血球との結合が抗  $\beta 2$  インテグリン抗体によって阻害されたことを見出したことから、この結合が  $\beta 2$  インテグリンに依存していることを示した。また、 $\beta 2$  インテグリンの代表的なメンバーである LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ ) および Mac-1 ( $\alpha M\beta 2$ ) の抗体によって TM-domains 123-Fc と白血球との結合が阻害されたことから、TM に結合するインテグリンメンバーは、LFA-1 および Mac-1 であることを同定した。3) TM に結合するインテグリンメンバーである LFA-1 および Mac-1 が TM-domains 123-Fc のどのドメインに結合するのか明らかにするため、TM の各ドメイン欠失変異型タンパク質を用いて検討した結果、ドメイン 3 を欠いた TM-domains 12-Fc において接着が阻害されることを見出したことから、結合部位がセリン/スレオニンリッチドメイン (TMD3, ドメイン 3) であることを同定した<sup>14)</sup>。

このように、我々はこれまでに白血球  $\beta 2$  インテグリン (LFA-1, Mac-1) が TM 細胞外ドメインに特異的に結合し、LFA-1 および Mac-1 がインテグリンの結合部位として TM のセリン/スレオニンリッチドメイン (TMD3, ドメイン 3) に結合することを示したことで TMD123 を LFA-1 および Mac-1 の新規リガンドとして同定し、TM の新たな抗炎症作用を証明してきた<sup>14)</sup>。これはつまり、白血球  $\beta 2$  インテグリンの VECs への結合は VECs 上に存在する ICAM-1 だけでなく、TM とも結合するということであり、TM が白血球  $\beta 2$  インテグリンの新規リガンドとして白血球と VECs

との接着に関わっているということである。しかしながら、白血球  $\beta 2$  インテグリンと VECs との結合に可溶性 TMD123 が及ぼす影響については現在までにほとんど明らかになっていない。可溶性 TM は外因性に薬剤として投与されるだけでなく、様々な炎症性疾患で血清中に検出されるため<sup>15)</sup>、その生物活性を研究することには重要な意義がある。

本研究では、可溶性 TMD123 の外因性投与が白血球  $\beta 2$  インテグリンと VECs 上に発現する膜型 TMD123 との間の接着を阻害すると仮定し、可溶性 TMD123 による接着制御作用について検証した。さらに、その制御作用が TMD123 のどのドメインに依存するのか、特定の TM 細胞外ドメインで構成される変異タンパク質を構築して構造特性を分析し、検討した。

## 2. 方法

### 2-1. 組換えヒト TM ドメイン 1, 2, および 3 の構築

TMD123<sup>16)</sup> および変異型タンパク質 (TMD1, TMD2, TMD3) は、旭化成ファーマ株式会社 (Tokyo, Japan) より提供を受けた (Figure 2)。さらに、TM タンパク質の固相化を容易にし TM の生理学的配向性を維持するために、我々は以前の研究のように TMD123-Fc (ヒト免疫グロブリン G1 Fc フラグメント) および TMD3-Fc 融合タンパク質を構築し使用した<sup>14)</sup>。TMD123 を含む DNA フラグメントは、forward primer と reverse primer を使い、KOD FX Neo 試薬 (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) によってヒト TM の全配列<sup>17)</sup> を含む pSV2TMJ2 ベクターからポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅した。forward primer は *Hind III* 制限酵素サイト (5'-CTA GCG TTT AAA CTT AAG CTT AGC CAC CAT GCT TGG GGT CCT GGT-3') を含むように設計し、reverse primer は *Bam HI* 制限酵素サイト (5'-TGT GTG AGT TTT GTC GGA TCC CGA ATG CAC GAG CCC CAC-3') を含むよう設計した。

TM123 フラグメントをエンドヌクレアーゼ *Hind III* および *Bam HI* で消化し、pcDNA3.1 (+) ベクターのヒト免疫グロブリン (Ig) G1 Fc フラグメントに対してインプレ-

ムで *Hind III* / *Bam HI* 制限サイトにサブクローニングした。

可溶性 TM-Fc 融合タンパク質のドメイン欠失変異体 (例えば、D1 および D2 を欠いた TMD3-Fc) は、テンプレートとしての TMD123-Fc を含んだ pc DNA 3.1 (+) プラスミドと共に KOD Plus Mutagenesis Kit (Toyobo Co., Ltd.) を用いて、inverse PCR によって生成した。また、universal outer primers に加え、mu TM-1 (5'-GAC TCC GGC AAG GTG GAC GGT GGG G-3') および mu TM-2 (5'-GCA CAT TAG CTG TAA GCC GAG GG-3') を用いて TM の D1 および D2 を削除した。

TM および TMD-Fc 融合タンパク質の発現および精製は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動をした後、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を実施することによって確認した。TMD123-Fc タンパク質バンドを検出するために、ポリクローナルウサギ抗 TM 抗体 (Ab) (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan) および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG (H + L) Ab (Bio-Rad Laboratories, K.K., Tokyo, Japan) を用いてウエスタンブロッティングを行った。Fc 部分は、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト IgG (Fc 特異的) Ab (Sigma-Aldrich Japan K.K.) を用いて検出した。各プロットは、高感度化学発光キット (Nacalai Tesque, Inc.) を用いて発色させ、Image Quant LAS 4000 ミニデジタルイメージングシステム (GE Healthcare Japan Corporation, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

### 2-2. PBMC の調製

PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMCs) は、既報にあるように、健常者のクエン酸ナトリウム処理血液サンプルから単離した<sup>18)</sup>。すべての血液提供者は、採血前にインフォームドコンセントを提出した。血液サンプルは、パーコールプラス (GE Healthcare Japan Corporation) を用いて 1,000 × g, 15 分間の密度勾配遠心分離を行い、PBMC をリン酸緩衝食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS) に懸濁した。研究プロトコルは、三重大学医学部附属病院の施設内審査委員会による承認を得た (承認番号: 3026)。

### 2-3. 白血球と HUVEC との間の相互作用を検出するための細胞接着アッセイ

細胞接着アッセイは、96 ウェル V 底プレートを用いて実施した。内皮細胞増殖培地 (EGM-2; Lonza Cologne GmbH, Cologne, Germany) に懸濁した HUVEC ( $2 \times 10^5$  細胞 / mL) は、V 底プレートの 1 ウェルあたりに 100  $\mu$ L を播種して一晩培養した。V 底ウェルの細胞がコンフルエントに達した後、 $2 \times 10^5$  個の 2', 7'-bis - (2 - carboxyethyl) - 5 - (and - 6) - carboxyfluorescein (BCECF) - 標識 PBMC または HL-60 細胞を含む PBS 100  $\mu$ L を 1 mM  $MgCl_2$  および 1 mM  $CaCl_2$  の存在下または非存在下のいずれかで、各ウェルに分注した。このほか、インテグリンに対する 2~50  $\mu$ g / mL のブロッッキングモノクローナル抗体 (mAbs) または control IgG を添加した実験も行った。プレートは、室温で 5 分間インキュベートした後スイングバケットローターを用いて 1,000 rpm で 5 分間遠心した (EX-125; Tomy Seiko Co., Ltd., Osaka, Japan)。V 底ウェルの最下部分に蓄積した非接着細胞数は、2030 ARVO X-2 マルチラベリリーダー (PerkinElmer Japan Co. Ltd., Kanagawa, Japan) を用いて検出した。遠心後にクリスタルバイオレット染色を行い、HUVEC が V 底ウェルの側面に結合したことの確認を行った。

### 2-4. PBMC とインテグリンリガンドとの間の相互作用を検出するための細胞接着アッセイ

96 ウェル V 底プレートを用いた細胞接着アッセイは、既報と同様に実施した<sup>19)</sup>。0.25  $\mu$ M 野生型 TMD123-Fc、TMD3-Fc 融合タンパク質、または control ヒト IgG1 Fc 組換えタンパク質 (Millipore-Japan) を含む PBS 50  $\mu$ L を各ウェルに分注し固相化した。プレートは 4°C で一晩インキュベートし、2% ウシ血清アルブミンを含有した PBS で 37°C、2 時間ブロッッキングした。1 mM  $MgCl_2$  および 1 mM  $CaCl_2$  または 2 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の存在下において、 $2 \times 10^5$  個の BCECF 標識 PBMC を含む PBS 100  $\mu$ L を各ウェルに分注した。また、インテグリンまたは control IgG に対する 2-50  $\mu$ g / mL のブロッキ

ング mAb (monoclonal antibody) を添加し、プレートを 37°C で 5 分間インキュベートした。プレートは、スイングバケットローターを用いて 1,000 rpm で 5 分間遠心した。

### 2-5. インテグリンに対する抗体

抗インテグリン  $\beta 2$  mAb クローン TS1/ 18 は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入し、マウス IgG 1 isotype control Ab clone MOPC-21 は Sigma-Aldrich Japan K.K. から得た。

### 2-6. 統計分析

統計分析は、SPSS ソフトウェア v. 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) を用いて行った。データは平均値 ± 標準偏差として表した。Wilcoxon および Mann-Whitney のテストを各タンパク質濃度 (例えば、10  $\mu$ g / mL の isotype control vs. 10  $\mu$ g / mL の TMD 123) での群内比較および細胞間接着アッセイに使用した。実験の試行回数は少なくとも 3 回繰り返した。*p* 値は、 $< 0.05$  の確率で統計的に有意であると見なした。

## 3. 結果

### 3-1. TMD123 は内皮細胞に対する白血球の接着を阻害する

TMD123 が白血球と VECs との間の接着を阻害することを確認するために、PBMC (リンパ球を主体とし、単球も含む単核細胞) または HL-60 細胞 (白血球細胞株であり好中球のモデルとなる) の HUVEC への結合が可溶性 TMD123 の投与によって阻害されるかどうかを調べた。インテグリンは、2 価陽イオン ( $Mg^{2+}$  や  $Ca^{2+}$ ) 依存性の細胞接着分子であるため、PBMC および HL-60 細胞インテグリンは、炎症状態を模倣するために  $Mg^{2+}$  および  $Ca^{2+}$  の存在下でインテグリンリガンドとの結合を促進させた<sup>20)</sup>。2 価陽イオン依存的にインテグリンが TM や ICAM-1、フィブロネクチンなどのインテグリンリガ

ドへの結合を促進させることは以前の我々の研究でも証明している<sup>14)</sup> (Figure 3)。また、TM や ICAM-1 への結合は、 $\beta_2$  インテグリン依存的であることも明らかにしている<sup>14)</sup> (Figure 4a, 4b)。したがって、 $\beta_2$  インテグリン Ab も

しくは可溶性 TMD123 を白血球と共にプレインキュベートしV底ウェルに加え、生理学的剪断応力を模倣した剪断応力 (shear stress) に応じて細胞接着の有無を決定した。その結果、我々は可溶性 TMD123 が PBMC の

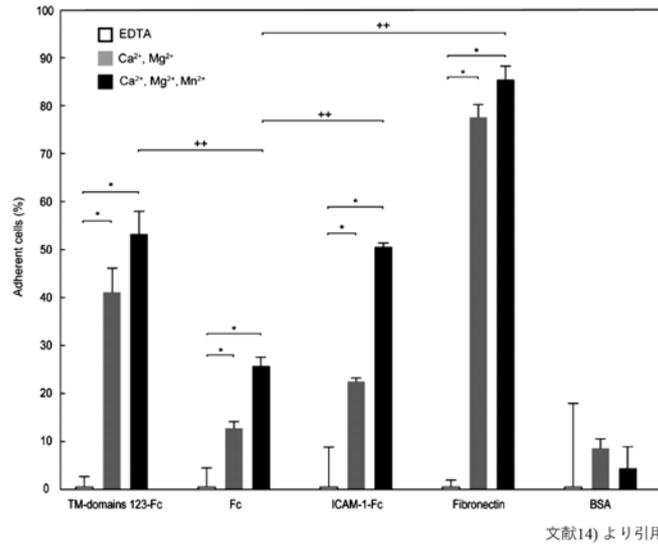


Figure 3. Adhesion of human PBMCs to thrombomodulin substrates is  $Mg^{2+}$ -dependent and  $Mn^{2+}$ -enhancing.

PBMC の TM-domains 123-Fc、Fc、ICAM-1-Fc、フィブロネクチン、および BSA への結合を、 $MgCl_2$  および  $CaCl_2$  (灰色バー) および  $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$  および  $MnCl_2$  (黒色バー) の存在下または非存在下 (EDTA 処理; 白色バー) で調べた。PBMC の TM-domains 123-Fc への結合は、2 価陽イオンによってインテグリンを活性化した場合により強固な結合を示したことから、この結合がインテグリン活性化依存性であることが示唆された。データは平均  $\pm$  SD として表した。\* $p < 0.05$  compared with EDTA at each group. \*\* $p < 0.05$  compared with Fc.

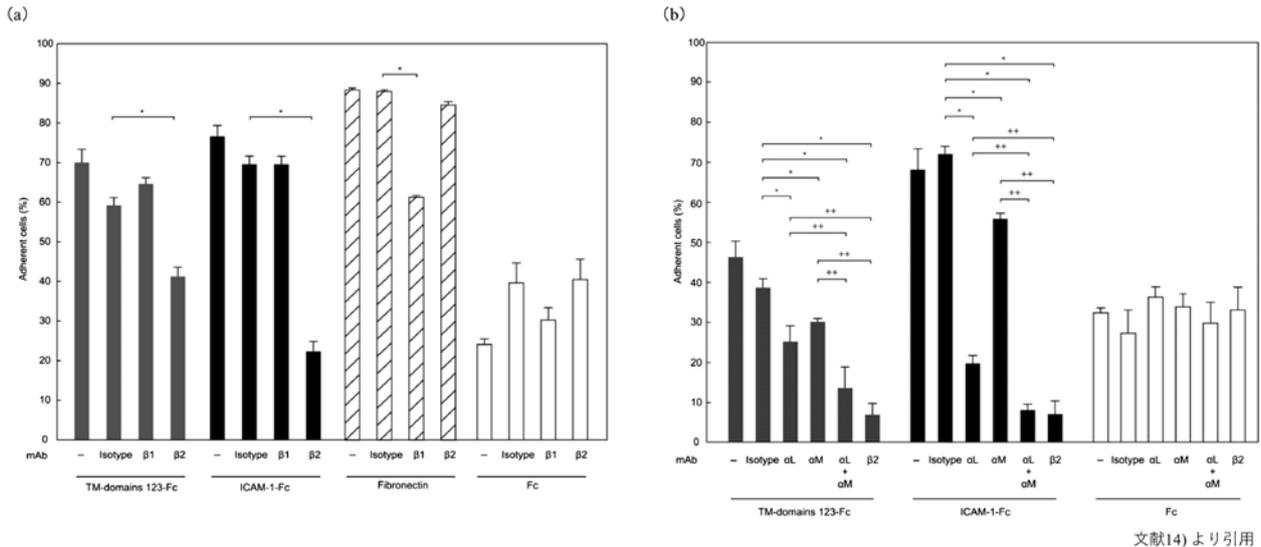
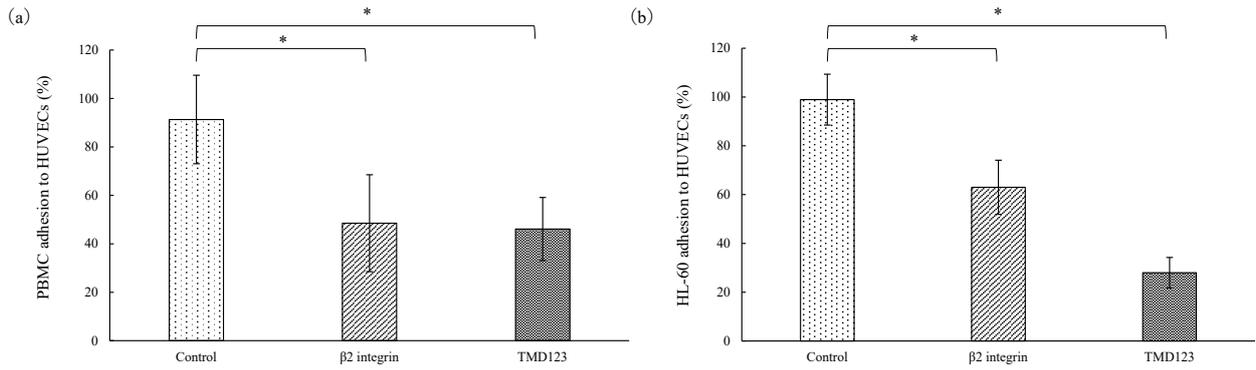


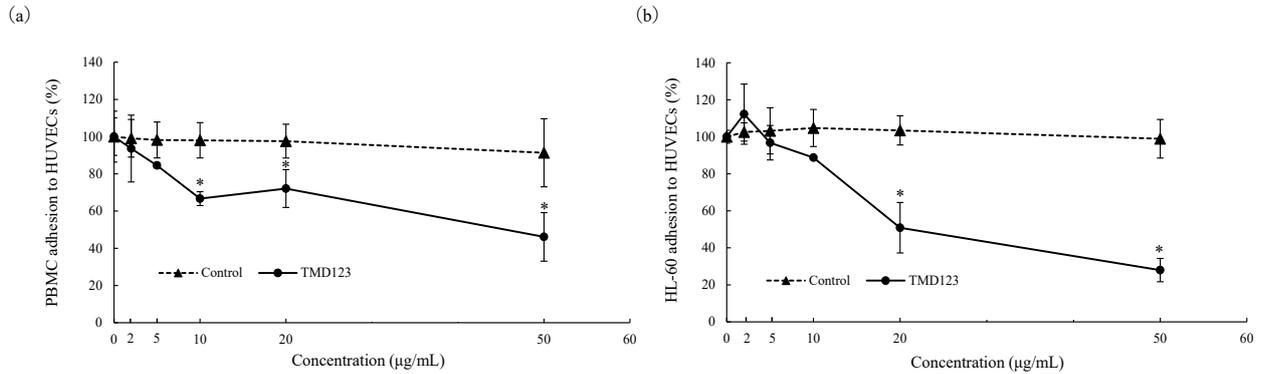
Figure 4.  $\beta_2$  integrins are required for binding of PBMCs to thrombomodulin substrates (a), and LFA-1 integrin ( $\alpha L$ ) and Mac-1 integrin ( $\alpha M$ ) interact with thrombomodulin substrates (b).

(a)  $\beta_1$  インテグリンブロッキング mAb (P5D2) または  $\beta_2$  インテグリンブロッキング mAb (TS1 / 18) または control IgG の存在下で、PBMC の TM-domains 123-Fc、ICAM-1-Fc、フィブロネクチン、および Fc への結合を検討した。ヒト PBMC のトロンボモジュリンへの結合は、 $\beta_2$  インテグリンを介して行われた。(b) PBMC の TM-domains 123-Fc への結合を、抗 CD11a ( $\alpha L$ ) mAb (MHM24)、抗 CD11b ( $\alpha M$ ) mAb (M1 / 70)、および抗  $\beta_2$  インテグリン mAb (TS1 / 18)、もしくは、isotype control IgG の存在下で調べた。代表的な  $\beta_2$  インテグリンである LFA-1 インテグリン ( $\alpha L$ ) および Mac-1 インテグリン ( $\alpha M$ ) の両方が内因性の膜型トロンボモジュリン (TM-domains 123-Fc) と相互作用することが示された。データは平均  $\pm$  SD として表した。\* $p < 0.05$  compared with isotype control. \*\* $p < 0.05$  compared with  $\alpha L$  or  $\alpha M$  integrin mAb.



**Figure 5. Soluble TMD123 inhibited adhesion of PBMC and HL-60 to HUVECs.**

可溶性 TMD123 による PBMC および好中球の HUVEC への接着阻害効果を調べた。  
 (a) HUVEC と PBMC の接着は 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TMD123 (rhsTM) によって有意に抑制された。  
 (b) HUVEC と好中球の接着は 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TMD123 (rhsTM) によって有意に抑制された。  
 HUVEC への PBMC または HL-60 細胞の接着は、TMD123 および抗  $\beta 2$  インテグリン mAb (TS1 / 18) または control (isotype control IgG) の存在下で行われた。PBMC および HL-60 細胞上のインテグリンは、 $\text{Mg}^{2+}$  および  $\text{Ca}^{2+}$  を用いてインテグリンリガンドとの結合を促進させた。データは平均  $\pm$  SD として表した。\* $p < 0.05$  vs. control (the isotype control).



**Figure 6. Soluble TMD123 dose-dependently inhibited PBMC and HL-60 adhesion to HUVECs.**

様々な濃度の可溶性 TMD123 による PBMC および好中球の HUVEC への接着阻害効果を調べた。  
 (a) HUVEC への PBMC の接着は、TMD123 の濃度依存的に減少した。  
 (b) HUVEC への HL-60 の接着は、TMD123 の濃度依存的に減少した。  
 HUVEC への PBMC または HL-60 細胞の接着は、TMD123 および control (isotype control IgG) の存在下で行われた。PBMC および HL-60 細胞上のインテグリンは、 $\text{Mg}^{2+}$  および  $\text{Ca}^{2+}$  を用いてインテグリンリガンドとの結合を促進させた。データは平均  $\pm$  SD として表した。\* $p < 0.05$  vs. control (the isotype control) at each concentration.

HUVEC への結合を減弱させる傾向を示すことを見出した (Figure 5a, 6a)。さらに、可溶性 TMD123 は HL-60 細胞の接着も減弱させた (Figure 5b, 5b)。これらの知見に基づくと、可溶性 TMD123 は白血球の VECs への接着を阻害しているように見られることから、白血球に対する可溶性 TM の抗炎症効果が示唆された。

### 3-2. TMD123 のドメイン 1 とドメイン 3 は PBMC の TMD123-Fc への結合を阻害する

VEC 上には、ICAM-1 などの多くのインテグリンリガ

ンドが発現している。我々は以前に、TMD3 が血管内皮に存在するインテグリンリガンドの 1 つであることを報告している (Figure 7a, 7b)<sup>14</sup>。そこで次の実験として、我々は白血球が VECs へ接着する際の VECs が発現している膜型 TM (内因性 TM) の寄与について調べることを目的に、白血球と VECs 上 TM との結合の程度を評価することとした<sup>21</sup>。VEC 上に発現する膜型 TM (内因性 TM) の寄与を調べるために、TMD123-Fc を V 底ウェルに固相化した。また、可溶性 TMD123, 可溶性 TMD1, 可溶性 TMD2, または可溶性 TMD3 を外因的に投与することで、TM 細胞外ドメインの内、どのドメインが白血球との

結合に重要な役割を果たしているかを調べた。その結果、可溶性 TMD123, 可溶性 TMD1 および可溶性 TMD3 は濃度依存的に結合を阻害したため、D1 および D3 が TM および PBMC の結合において重要な役割を果たすことが示された (Figure 8a)。これは、可溶性 TMD3 が白血球  $\beta 2$  インテグリンに結合し、この相互作用によって膜型 TM と白血球の結合を阻害することを示唆している。また、可溶性 TMD1 に関しては、白血球表面の既知の抗原 (フィブロネクチンなど) に結合することにより白血球と膜型 TM との接着を阻害すると推測した (Figure 9)。

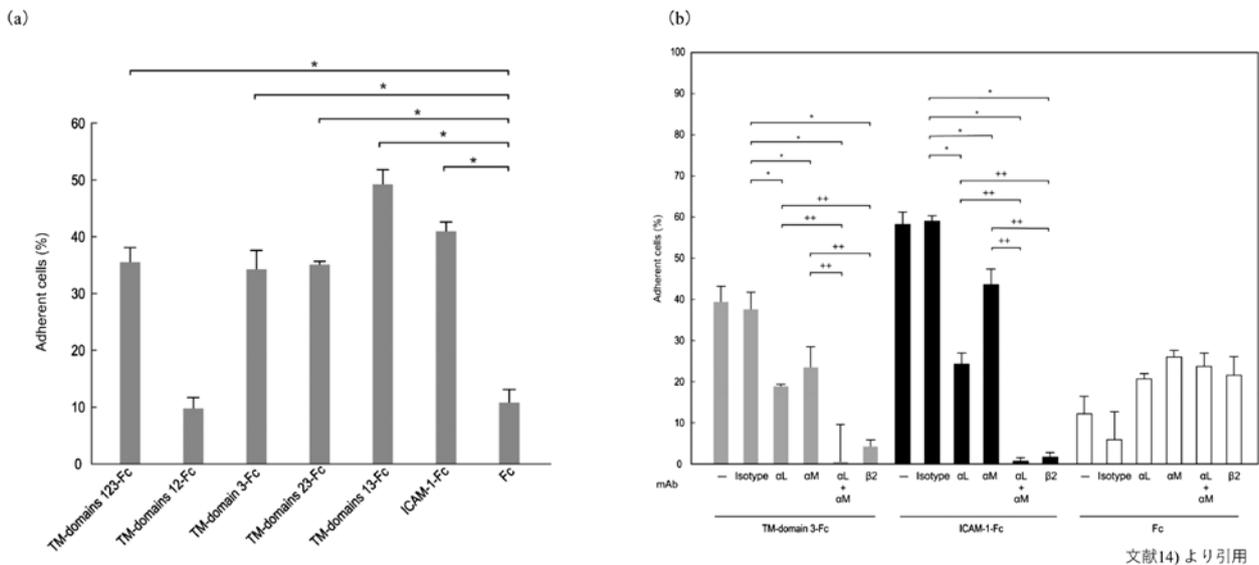
### 3-3. TM の D1 および D3 は、PBMC の TMD3-Fc への結合を阻害する

$\beta 2$  インテグリンは、インテグリン依存的に TMD123 の D3 に結合することが見出されている (Figure 7b)<sup>14)</sup>。また、Figure 8a に示すように、可溶性 TMD1 および可溶性 TMD3 は細胞接着に関与していることが示された。これらのことから、次に我々は TMD3 を固相化した場合、

PBMC の結合が可溶性 TMD1 または可溶性 TMD3 によって阻害されるかどうか調べることを目的に検討した。その結果、可溶性 TMD1 および可溶性 TMD3 の外因性投与によって PBMC と固相化 TMD3 とのインテグリン依存的結合が阻害されることを示した (Figure 8b)。興味深いのは、固相化 TMD3 と PBMC の結合が低濃度 (0.2  $\mu\text{M}$ ) の可溶性 TMD1 によっても阻害されたことである (Figure 8b)。この結果から、可溶性 TMD3 および可溶性 TMD1 は、異なるメカニズムによって白血球および VECs の結合阻害に関与している可能性がある。以上のことから、我々は可溶性 TMD3 が  $\beta 2$  インテグリンに対して阻害作用を有すること、そして、レクチン様ドメインである TMD1 が TMD3 の糖鎖に結合して  $\beta 2$  インテグリンの固相化 TMD3 への結合を阻害することを推測した (Figure 9)。

## 4. 考察

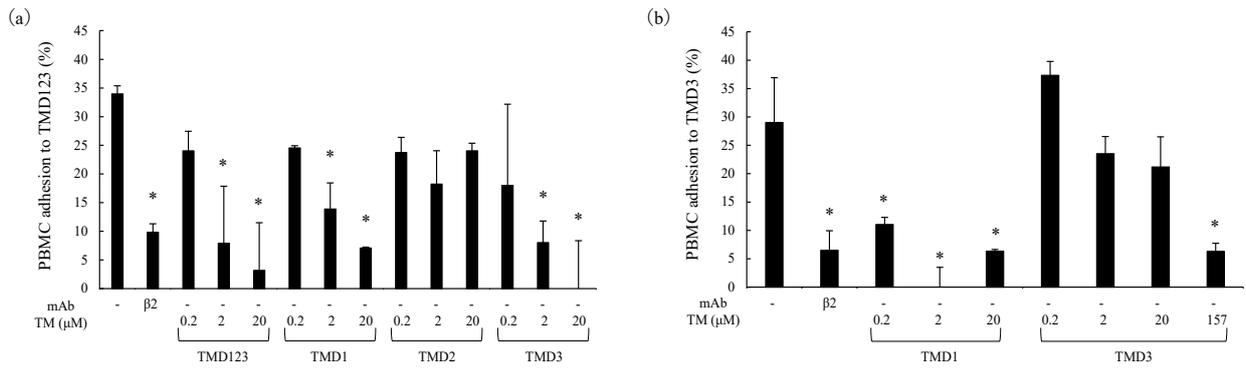
本研究では、可溶性 TMD123 を外因的に投与することによって、白血球と HUVEC との間の接着が濃度依存



**Figure 7. Thrombomodulin domain 3 contains the integrin binding site.**

(a) PBMC に発現する LFA-1 および Mac-1 インテグリンが TM-domains 123-Fc のどのドメインに結合するのか明らかにするため、トロンボモジュリン (TM) の各ドメイン欠失変異型タンパク質を用いて解析した。PBMC が TM へ結合するためには、TM のドメイン 3 (TMD3) が不可欠であることを同定した。ドメイン 3 以外の全てのドメインを欠失させた TM-domains 3-Fc は TM-domains 123-Fc と同じくらい効果的な結合を示した。  
 (b)  $\alpha\text{L}\beta 2$  インテグリン (LFA-1) および  $\alpha\text{M}\beta 2$  インテグリン (Mac-1) と TM のドメイン 3 に対する特異的相互作用を実証するため、抗  $\alpha\text{L}$ 、抗  $\alpha\text{M}$  および抗  $\beta 2$  インテグリン抗体を用いて PBMC の TM-domain 3-Fc に対する細胞接着アッセイを行った。抗  $\alpha\text{L}$  mAb (MHM 24)、抗  $\alpha\text{M}$  mAb (M1 / 70) および抗  $\beta 2$  mAb (TS1 / 18) は、isotype control と比較して PBMC の TM ドメイン 3 に対する接着を減少させた。これらの結果は、TM のドメイン 3 が  $\alpha\text{L}\beta 2$  インテグリンおよび  $\alpha\text{M}\beta 2$  インテグリンの結合部位を含むことを証明している。データは平均  $\pm$  SD として表した。\* $p < 0.05$  compared with IgG Fc protein.

文献14)より引用



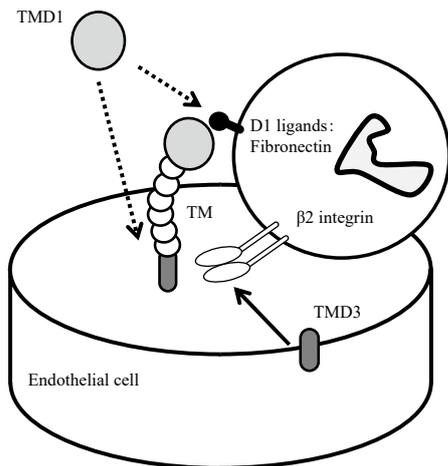
**Figure 8. Soluble TMD1 and TMD3, but not TMD2, inhibited PBMC adhesion to immobilized TMs.**

可溶性 TMD123 の各ドメインによる PBMC の内因性 TM への接着阻害効果を検討した。

(a) PBMC の TMD123-Fc への結合は、TMD123 (rhsTM), TMD1, および TMD3 によって抑制された。

(b) PBMC の TMD3-Fc への結合は、TMD1 と TMD3 によって抑制された。

PBMC の TMD123-Fc, TMD3-Fc, および control (Fc) への結合は、TMD123 (rhsTM), TMD1, TMD2, TMD3, または β2 インテグリン遮断 mAb (TS1/18) の試薬をいくつかの濃度に振り分け、各々の存在下で検討した。PBMC 上のインテグリンは、Mg<sup>2+</sup> および Ca<sup>2+</sup> によってインテグリンリガンドとの結合を促進させた。データは、白血球と control (Fc) の間のバックグラウンド結合を差し引いて示し、平均 ± SD として表した。\*p < 0.05 vs. leukocyte adhesion to TMD123-Fc or TMD3-Fc.



**Figure 9. Proposed model for the inhibition of leukocyte cell adhesion to TM expressed on VEC by TM extracellular domain.**

白血球と VEC 上に発現した TM を示す。活性化された白血球インテグリンは TM の D3 に結合するが、TMD1 または TMD3 の外因性投与により、その結合が阻害され得る。TMD3 はインテグリンに結合することにより阻害効果を示すが、TMD1 は白血球の D1 リガンド (フィブロネクチンまたは他の分子) への接着または TM の糖鎖による D3 への接着を介して白血球と TM 間の結合を阻害する可能性がある。

的に抑制されることを示した (Figure 6)。さらに、β2 インテグリンリガンドとして知られる TMD123 および TMD3 を固相化した場合、これらのインテグリンリガンドタンパク質と PBMC との間の結合が可溶性 TMD123, 可溶性 TMD1, または可溶性 TMD3 によって阻害され得ることが示唆された (Figure 8)。この結果は、可溶性 TMD123 (rhsTM) が白血球の接着および炎症部位における血管

内皮への遊走に対する治療薬として有用であることを示唆している。実際、既報にあるいくつかの動物実験では、rhsTM は損傷を受けた臓器への白血球の蓄積を抑制している<sup>10, 11)</sup>。我々の結果は、これらの動物実験結果の根底にある基本的メカニズムだけでなく、敗血症治療に対する有望な治療薬としての可溶性 TM の新規メカニズムもここで明らかにした。

本研究では、PBMC と固相化 TMD123-Fc との間の接着は、可溶性 TMD3 の外因性投与によって抑制された (Figure 8a)。これは、我々が以前にインテグリン LFA-1 および Mac-1 が固相化 TMD3 に結合することを証明した<sup>14)</sup> (Figure 7a, 7b) 事実からも裏付けされる。興味深いことに、白血球の固相化 TMD123 または固相化 TMD3 への結合は、可溶性 TMD1 によっても抑制された (Figure 8)。これは、可溶性レクチン様ドメイン TMD1 の外因性投与が固相化 TMD3 の糖鎖に結合し、β2 インテグリンと TMD3 との間の結合を阻害することを示唆する。タンパク質-炭水化物相互作用に関する研究は近年増加しており、糖とタンパク質の相互作用は多様であるため、それらの三次元構造もよくわかっている<sup>22)</sup>。特に、レクチンと糖との相互作用は非常に重要とされており、経口ドラッグデリバリーに関しては、レクチンは腸粘膜の炭水化物鎖に結合する生体接着剤として有望であると考えられる<sup>23)</sup>。TM は、レクチン様ドメイン (TMD1) および糖鎖を有す

るセリン／スレオニンリッチドメイン (TMD3) の両方を保有する。そのため、D1 と D3 が相互に影響を及ぼし合う可能性が考えられる。実際、炎症の際にどのような種類の TM が血管内皮から脱落するのかについては、現在のところ明らかになっていない。本研究における我々の結果を考えると、TMD1 と TMD3 が互いに結合して血液中で二量体または複合体を形成することを示唆しているかもしれない。

最近、多国籍多施設共同第 III 相無作為化対照試験である敗血症性凝固症候群 Asahi 組換え型 LE トロンボモジュリン (SCARLET) 試験が完了した<sup>16)</sup> が、敗血症に対する可溶性 TMD123 製剤の有効性は証明されなかった。これは、可溶性 TMD123 が複数の機能ドメインから構成されている、つまり、1 分子中に異なる機能を有するドメインから構成されているため、このことが可溶性 TMD123 の効果が確認されなかった理由であるかもしれない。したがって、我々は各ドメインの機能に焦点を当て、各々の可溶性タンパク質を作製し細胞接着能力に対する各ドメインの影響を分析した。その結果、TM 細胞外ドメインのうち、可溶性 TMD1 および可溶性 TMD3 は VECs が発現する TMD123 への白血球の接着を阻害する能力を有することを認めた。これらの結果を考慮して、我々は本研究にて、敗血症治療のための全ての細胞外ドメインを含む TMD123 の代わりに TMD1 または TMD3 の有効性について検討した。

ラットとマウスのモデルを用いたヒト rhsTM (TMD123) の外因性投与による VECs の結合を調べた研究はいくつか報告されている<sup>10), 11)</sup> が、ラット、マウス、およびヒトの間の TM のアミノ酸配列レベルでの相同性は約 60% と高くないため、rhsTM の機能を評価するための *in vivo* 実験を確立することは極めて困難であった。我々が知る限りでは、本研究は、ヒト白血球と HUVEC または TM とのインテグリン依存的結合がヒト TM によって阻害されたことを実証した最初の研究報告である。

本研究の結果では、実際に白血球の HUVEC への結合は、可溶性 TMD123 (> 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) の投与によって強く抑制された (Figure 6a, 6b)。興味深いのは、PBMC と比較して HL-60 細胞の接着が可溶性 TMD123 (> 20  $\mu\text{g} /$

mL) によってより強く抑制されたという点である (Figure 6b)。先行研究では、好中球がルイス Y 抗原に対してより強い接着性を持つことが示されており<sup>13)</sup>、可溶性 TMD123 の外因性投与もまた、PBMC (リンパ球または単球) よりも好中球の VECs への接着により強く関与し得る。それゆえ、TM は炎症において重要な役割を果たす好中球を抑制するという著しい効果を有する可能性がある。

この研究には対処すべきいくつかの limitations が 2 点ある。まず 1 点目として、本研究は *in vivo* 研究ではなく *in vitro* 研究であった点である。*In vivo* モデルでは、VECs 上に発現された膜型 TM はトロンピンに結合してその炎症促進効果を低下させる。トロンピンは炎症反応を促進する強力な刺激物質であると考えられているため、炎症中のインテグリンリガンドである Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) および Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の発現レベルを高めることによってトロンピンの血中濃度が上昇し、循環単球の動員が促進される<sup>24)</sup>。したがって、可溶性 TMD123 の外因性投与は、*in vivo* もしくはトロンピン存在下における VECs 上でインテグリンを介した白血球と ICAM-1 や VCAM-1 のようなインテグリンリガンドとの結合をさらに減弱させるかもしれない。我々の実験系では HUVEC と白血球のみが存在し、トロンピンは存在していない。そのため、可溶性 TMD123 (rhsTM) の効果を過小評価する可能性がある。2 点目は、我々がいくつかの既知の結合部位を通して白血球に結合する可溶性 TMD1 の可能性について言及しなかったことである (Figure 9)。先行研究においては、可溶性 TMD1 がフィブロネクチン<sup>25)</sup>、High mobility group box-1 (HMGB-1)<sup>26)</sup>、およびルイス Y 抗原<sup>13), 27)</sup> に結合することが示されている。それゆえ、可溶性 TMD123 の投与はインテグリン以外の結合部位を介した白血球と TMD1 との結合に影響を及ぼし得る (Figure 9)。将来は、白血球と VEC との結合に関連したインテグリン以外の接着分子を用いた *in vivo* 研究が必要である。

本研究を要約すると、ヒト白血球と内皮細胞との間の接着は、可溶性 TMD123 の外因性投与によって濃度依存的に抑制された。さらに、白血球インテグリンと固相化 TMD123-Fc または固相化 TMD3-Fc との間の結合は、可

溶性 TMD3 の外因性投与によって抑制された。また、可溶性 TMD1 の外因性投与によっても結合が減弱されたことが認められたため、固相化 TMD3 と  $\beta 2$  インテグリンとの間の接着を阻害する可溶性 TMD1 の新規機構が一因として寄与している可能性がある。つまり、可溶性 TMD1 および可溶性 TMD3 は、異なる機構によって VECs 上の膜型 TM に対する白血球の接着を阻害すると考えられた。したがって、白血球がインテグリンおよび膜型 TM を介して炎症部位に移動しようとする際、可溶性 TMD123 (rhsTM)、可溶性 TMD1 または可溶性 TMD3 の外因性投与が VECs に対する白血球のインテグリン依存的結合を弱め、白血球の望ましくない接着および遊走を阻害することによって、敗血症のような全身性炎症性疾患における多臓器機能障害の治療のための有望な選択肢になり得る。

以上、我々は 2016 年に白血球の  $\beta 2$  インテグリンが膜型 TM のドメイン 3 に結合することを実証したことで白血球の血管内皮細胞に対する新たな接着制御機構を見出し<sup>14)</sup>、2019 年にヒト可溶性トロンボモジュリン (rhsTM, TMD123) を用いた詳細な解析により TMD1 と TMD3 が白血球  $\beta 2$  インテグリンの膜型 TM への接着を阻害したことを実証したことから、白血球接着阻害の新たな炎症制御機構を解明した<sup>28)</sup>。なお、これらの研究成果は、2016 年と 2019 年に *Biochemical and Biophysical Research Communications* に採択され、報告したことをここに記す<sup>14), 28)</sup>。本文の研究内容の大方は 2019 年に報告した研究成果であるが、2016 年の研究成果も含めて敗血症のような炎症性疾患の治療に対する我々の貢献を紹介した。

## 文 献

- 1) Mitroulis I, Alexaki V I, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther.* 2015; 147: 123-135.
- 2) Ploppa A, Schmidt V, Hientz A, Reutershan J, Haerberle H A, Nohe B. Mechanisms of leukocyte distribution during sepsis: an experimental study on the interdependence of cell activation, shear stress and endothelial injury. *Crit Care.* 2010; 14: R201.
- 3) Maayah Z H, Ferdaoussi M, Takahara S, Soni S, Dyck J R B. Empagliflozin Suppresses Inflammation and Protects Against Acute Septic Renal Injury. *Inflammopharmacology.* 2020.
- 4) Zhang D, Han S, Zhou Y, Qi B, Wang X. Therapeutic Effects of Mangiferin on Sepsis-Associated Acute Lung and Kidney Injuries via the Downregulation of Vascular Permeability and Protection of Inflammatory and Oxidative Damages. *Eur J Pharm Sci.* 2020; 152: 105400.
- 5) Deutschman C S, Cereda M, Ochroch E A, Raj N R. Sepsis-induced cholestasis, steatosis, hepatocellular injury, and impaired hepatocellular regeneration are enhanced in interleukin-6  $-/-$  mice. *Crit Care Med.* 2006; 34: 2613-2620.
- 6) Liu L, Kubes P. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organspecific mechanisms of action. *Thromb Haemostasis.* 2003; 89: 213-220.
- 7) Laschke M W, Menger M D, Wang Y, Lindell G, Jeppsson B, Thorlacius H. Sepsis-associated cholestasis is critically dependent on P-selectin-dependent leukocyte recruitment in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292: G1396-G1402.
- 8) Watanabe S, Mukaida N, Ikeda N, Akiyama M, Harada A, Nakanishi I, *et al.* Prevention of endotoxin shock by an antibody against leukocyte integrin beta 2 through inhibiting production and action of TNF. *Int Immunol.* 1995; 7: 1037-1046.
- 9) Ogawa Y, Yamakawa K, Ogura H, Kiguchi T, Mohri T, Nakamori Y, *et al.* Recombinant human soluble thrombomodulin improves mortality and respiratory dysfunction in patients with severe sepsis. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012; 72: 1150-1157.
- 10) Iba T, Aihara K, Watanabe S, Yanagawa Y, Takemoto M, Yamada A, *et al.* Recombinant thrombomodulin improves the visceral microcirculation by attenuating the

- leukocyte-endothelial interaction in a rat LPS model. *Thromb Res.* 2013; 131: 295-299.
- 11) Fujii T, Kuriyama N, Hayasaki A, Iizawa Y, Tanemura A, Kato H, *et al.* Recombinant human soluble thrombomodulin attenuates hepatic ischemia and/or reperfusion injury by inhibiting leukocyte accumulation in mice with normal and fatty liver. *Transplant Proc.* 2018; 50: 2807-2814.
  - 12) Esmon N L, Owen W G, Esmon C T. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem.* 1982; 257: 859-864.
  - 13) Lin W L, Chang C F, Shi C S, Shi G Y, Wu H L. Recombinant lectin-like domain of thrombomodulin suppresses vascular inflammation by reducing leukocyte recruitment via interacting with Lewis Y on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 2366-2373.
  - 14) Kawamoto E, Okamoto T, Takagi Y, Honda G, Suzuki K, Imai H, *et al.* LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 473: 1005-1012.
  - 15) Ohlin A-K, Larsson K, Hansson M. Soluble Thrombomodulin Activity and Soluble Thrombomodulin Antigen in Plasma. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 976-982.
  - 16) Yamakawa K, Murao S, Aihara M. Recombinant human soluble thrombomodulin in sepsis-induced Coagulopathy: an updated systematic Review and meta-analysis. *Thromb Haemostasis.* 2019; 119: 56-65.
  - 17) Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y, Nishioka J, Maruyama I, Zushi M, *et al.* Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation, *EMBO J.* 1987; 6: 1891-1897.
  - 18) Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97: 77-89.
  - 19) Weetall M, Hugo R, Friedman C, Maida S, West S, Wattanasin S, *et al.* A homogeneous fluorometric assay for measuring cell adhesion to immobilized ligand using V-well microtiter plates. *Anal Biochem.* 2001; 293: 277-287.
  - 20) Zhang K, Chen J. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adhes Migrat.* 2012; 6: 20-29.
  - 21) Weitz-Schmidt G, Chreng S. Cell adhesion assays. *Methods Mol Biol.* 2012; 757: 15-30.
  - 22) Gabius H J, Siebert H C, Andre S, Jimenez-Barbero J, Rudiger H. Chemical Biology of the Sugar Code. *Chembiochem.* 2004; 5: 740-764.
  - 23) Haas J, Lehr C M. Developments in the area of bioadhesive drug delivery systems. *Expert Opin Biol Ther.* 2002; 2: 287-298.
  - 24) Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel A M, Bongrand P, *et al.* Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood.* 1998; 92: 1259-1267.
  - 25) Hsu Y Y, Shi G Y, Wang K C, Ma C Y, Cheng T L, Wu H L. Thrombomodulin promotes focal adhesion kinase activation and contributes to angiogenesis by binding to fibronectin. *Oncotarget.* 2016; 7: 68122-68139.
  - 26) Abeyama K, Stern D M, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, *et al.* The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1267-1274.
  - 27) Shi C S, Shi G Y, Hsiao H M, Kao Y C, Kuo K L, Ma C Y, *et al.* Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Blood.* 2008; 112: 3661-3670.
  - 28) Kawamoto E, Nago N, Okamoto T, Gaowa A, Masui-Ito A, Sakakura Y, *et al.* Anti-adhesive effects of human soluble thrombomodulin and its domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019; 511: 312-317.

— プロフィール —

**長太 のどか** 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療栄養学科・助教 博士（医学）

〔経歴〕2011年鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科医療栄養学専攻修士課程修了，2011-2019年鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療栄養学科助手，2012年四日市社会保険病院栄養課研修生（現 四日市羽津医療センター 栄養管理室），2013年四日市社会保険病院栄養課非常勤（現 四日市羽津医療センター 栄養管理室），2019年三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻博士課程修了，2020年鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療栄養学科助教。〔専門〕栄養学，分子病態学，救急医学，血栓止血学，炎症。

**川本 英嗣** 三重大学医学部附属病院救命救急・総合集中治療センター・講師 博士（医学）

〔経歴〕2004年富山医科薬科大学医学部医学科卒業，2004年中部ろうさい病院麻酔・集中治療，2009年聖マリアンナ医科大学救急医学，2012年三重大学医学部附属病院救命救急センター，2017年三重大学大学院医学系研

究科生命医科学専攻博士課程修了。〔専門〕救急医学，麻酔科学，集中治療学。

**朴 恩正** 三重大学大学院医学系研究科分子病態学講座・准教授 医学博士

〔経歴〕2004年大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学専攻博士課程修了，2005年米国ハーバード大学医学部講師，2012年東京大学医科学研究所炎症免疫学特任助教，2014年三重大学大学院医学系研究科分子病態学准教授。〔専門〕分子病態学，粘膜免疫学。

**島岡 要** 三重大学大学院医学系研究科分子病態学講座・教授 医学博士

〔経歴〕1989年大阪大学医学部卒業，1997年医学博士（大阪大学），1998-2010年ハーバード大学医学部研究員，独立助教授，独立准教授，2011年三重大学大学院医学系研究科分子病態学教授，2020年三重大学大学院医学系研究科副研究科長。〔専門〕免疫学，細胞接着，敗血症，炎症。

# Regulation of binding by Reomodulin via leukocyte integrin and integrin ligand on vascular endothelial cells

Nodoka NAGO<sup>1)</sup>, Eiji KAWAMOTO<sup>2), 3)</sup>,  
Eun Jeong PARK<sup>2)</sup>, Motomu SHIMAOKA<sup>2)</sup>

1) Department of Clinical Nutrition, Faculty of Health Science, Suzuka University of Medical Science

2) Department of Molecular Pathobiology and Cell Adhesion Biology, Mie University Graduate School of Medicine

3) Department of Emergency and Disaster Medicine, Mie University Graduate School of Medicine

**Key words:** Thrombomodulin,  $\beta$ 2 integrin, Sepsis, Inflammation, Vascular endothelial cell

---

## Abstract

Reomodulin is a recombinant human soluble thrombomodulin (rhsTM, TMD123) and is approved as a therapeutic agent for septic disseminated intravascular coagulation (DIC). We previously reported that leukocyte  $\beta$ 2 integrins (LFA-1 and Mac-1) bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin (TM) expressed on vascular endothelial cells (VECs). However, the effect of exogenous administration of TMD123 on adhesion of leukocyte integrins to VECs has not been clarified. In this study, we have demonstrated that the binding between human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and VECs was inhibited by TMD123 in an integrin-dependent manner. Subsequently, the mutant protein composed of the isolated TM extracellular domain was used to investigate the structural properties responsible for the anti-adhesive properties of TMD123. It was confirmed that TMD123, TMD1 and TMD3 inhibit the binding of PBMCs to the immobilized recombinant proteins TMD123 and TMD3. These results indicate that TMD123 inhibited leukocyte adhesion to endothelial cells via  $\beta$ 2 integrins and TM on VEC. Furthermore, TMD1 and TMD3 were considered to inhibit leukocyte adhesion to TM on VECs by different mechanisms. Taken together, TMD123 (rhsTM), TMD1 or TMD3 are promising therapeutic options for sepsis that attenuate integrin-dependent binding of leukocytes to VECs and may inhibit undesirable adhesion and migration of leukocytes to VECs in sepsis.