◆トピックス◆

ビタミン A 誘導体 (レチノイド) による血液凝固の制御機構

小山 高 敏*, 広 沢 信 作*

Regulation of Blood Coagulation by Vitamin A Derivatives, Retinoids

Takatoshi KOYAMA*, Shinsaku HIROSAWA*

Key words: retinoids, vitamin A, retinoic acid (RA), tissue factor, thrombomodulin

はじめに

ビタミン A (レチノール) は動物の成長・機能維持に不可欠な因子で多くの生理作用が明らかになってきているが、特に生命の存続に関わる作用はレチナールから不可逆的に生成するレチノイン酸 (retinoic acid; RA) が活性の本体である。ビタミン A 誘導体は総称してレチノイドと呼ばれる。レチノイドの悪性細胞の分化誘導・増殖抑制作用、細胞の腫瘍性転化の予防作用は、悪性腫瘍に対する治療の面から注目されていたが、われわれは、レチノイドの凝固調節作用に着目して研究を行っている。血液凝固・線溶と、癌の進展の関係が最近注目されており、レチノイドはきわめて興味深い物質と考えられる。

ビタミン A 誘導体による凝固制御

ATRA による TF 発現低下と TM 発現上昇

急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia; APL, FAB 分類 AML M3) は、播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation syndrome; DIC) を高率に

発症する白血病の一型として古くから知られていた。白血病細胞中の凝固促進物質としては組織因子 (tissue factor; TF) が主体であるとされている。APL の DIC は、線溶が優位に現れ、致命的出血が多い型として恐れられていた。しかし、ビタミン A 誘導体の all-*trans* RA (ATRA) による分化誘導療法が導入されると、原疾患の寛解が高率に得られ、その上、抗凝固療法なしできわめて早期に DIC が改善することが臨床的に認められた。

われわれは、上記の臨床的観察から、ATRA が TF の発現低下を引き起こすことにより、DIC の改善がもたらされるのではないかと考え、研究を行った。一方、インターロイキン 1 (interleukin-1; IL-1)、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF) などは、血管内皮細胞の TF の発現上昇および抗凝固糖蛋白トロンボモジュリン (thrombomodulin; TM) の発現低下を対照的に起こすことが知られていたため、白血病細胞中の TF とともに TM の発現を併せて検討した。経口投与で実際に達可能な薬理的濃度以下で ATRA が、APL および単球性白血病細胞株 (NB4 あるいは U937 細胞) において、TF の発現低下、TM の発現上昇を遺伝子の

* 東京医科歯科大学第一内科 (〒113-8519 文京区湯島 1-5-45)

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University (1-5-45 Yushima Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519 Japan.)

図1 レチノイン酸 (RA) の白血病細胞に対する効果

RA や合成レチノイドは、APL や単球性白血病細胞の TF 発現を抑制し、TM 発現を増強させて^{1)~5)}、正常血管内皮細胞表面に近づけるように凝固活性を変化させる。ATRA には APL 細胞の cancer procoagulant (CP) の発現を低下させる作用もある³⁾。APL 細胞は、TF 発現の増強した病的な単球や病的な血管内皮細胞に置き換えて考えることもでき、他の悪性細胞に対しても RA が同様な効果を発揮する可能性がある。RA にはまた、TNF などのサイトカインによる TF 発現上昇、TM 発現低下という凝固促進活性をブロックする作用もある。EC: endothelial cell, Mo: monocyte, RA: retinoic acid, TF: tissue factor, CP: cancer procoagulant, TM: thrombomodulin

転写レベルでもたらし、白血病細胞の凝固活性を低下させることを見出した(図1)¹⁾。これらの作用は、白血病細胞株のみならず、患者血液から分離した白血病細胞でも認められた²⁾。ATRA には、もともと発現している血管内皮細胞や単球の TM 発現を、さらに軽度上昇させる作用がある。また、血管内皮細胞や単球において、TNF などの刺激による TF 発現上昇・TM 発現低下をブロックする作用もある。ATRA はまた、APL 細胞中の TF 以外の凝固促進物質 cancer procoagulant の発現低下ももたらす³⁾。これらのことより、ATRA は血球細胞や血管内皮細胞の TF・TM 発現を遺伝子転写レベルで調節し、抗凝固効果を発揮する新しいタイプの抗血栓薬である可能性が明らかとなった。APL に対する ATRA の使用は、悪性細胞の崩壊を回避した原疾患の改善と抗凝固作用という

面から、急速に DIC を治癒させる。ATRA 療法は、副作用が少なく、高価な抗凝固薬や輸血を軽減することで、経済面、ウイルス感染の機会軽減の面でも意義は大きい。一方、最近、TF 発現が癌の進展に関与し、TM 発現がプロウロキナーゼの分解を促進して癌の浸潤・転移の抑制に関与することが示唆されている。レチノイドの TM・TF 発現調節は白血病細胞に限らず、固型癌細胞でも認められるものがあり、癌の進展制御にも関わってくる可能性もある。

合成レチノイドの TF, TM 発現に対する効果とレセプター

RA の受容体には RAR (RA receptor) と RXR (retinoid X receptor) の二種があり、それぞれ α , β , γ サブタイプが知られている。RA の生物学的作用は、主に RA と RXR-RAR のヘテロダイマーの複合体が標的遺伝子に結合することにより発揮される。9-*cis* RA は ATRA の立体異性体で生体内にも存在するが、ATRA が RAR のみに結合するのに対し、RAR, RXR の両者に結合できる。9-*cis* RA は抗凝固効果についても ATRA と同等かそれ以上の作用のあることが示されている²⁾。RAR, RXR 各受容体サブタイプに親和性の異なる合成レチノイドが日欧で作成され、レチノイドの生物学的効果の詳細な解明が進んでいる。また、合成レチノイドは薬剤としても、必要な作用のみ引き出し、副作用を軽減する意味で注目されている。例えば、Am80 という本邦で合成されたレチノイドは、RAR α と RAR β に結合するが、RAR γ に結合せず、ATRA よりも化学的に安定で、薬剤濃度の低下をもたらすような代謝を受けにくく、分化誘導効果が失われにくい、という長所がある。本邦で、APL に対する臨床治験がすでに行われており、ATRA 抵抗性症例への有効性が報告されている。Am80 を含む種々の合成レチノイドを用いた、各レセプターのサブタイプの関与について、検討した結果、われわれは白血病細胞や血管内皮細胞の TM 上昇には RAR α が、TF 発現低下には RAR α と β の両者が関与してい

図 2 レチノイドの TM 発現低下, TF 発現上昇の作用機作

A) TM 発現上昇には, レチノイドと RXR/RAR α の複合体が TM 遺伝子上の RA 応答領域 (RARE, -1537) に反応することが関与する. TM 発現に必要な, TATA ボックス, CAAT ボックスのほかに, Sp1 結合部位や Ets 結合部位を示してある. CRE: cyclic-AMP responsive element

B) TF 発現低下の機序は, 転写因子 AP-1 (Fos/Jun) が TF 遺伝子の AP-1 結合部位に結合するのを, レチノイドと受容体 RXR/RAR α ないし RXR/RAR β , RXR/VDR の複合体が蛋白-蛋白結合, あるいは AP-1 結合部位に競合的に働くことにより抑制すること, が推定されている. TF 遺伝子上流の TATA ボックス, Sp1, Egr-1, c-Rel/p65 結合部位を示してある.

ることを見出した⁴⁾. Falanga らも同様に, TF 発現低下に RAR α と β の両者が関与していることを報告している³⁾. APL 細胞において, can-

cer procoagulant は, ATRA 刺激による細胞の分化に伴って発現が低下するが, TF については, 細胞が分化能を失っても ATRA 刺激によ

り発現が低下する, という³⁾. RAR α 特異的レチノイドの一つ Ro40-6055 は, APL 細胞の分化誘導作用, 抗凝固作用の両者に有効な物質であることが判明している⁵⁾.

TM 発現上昇, TF 発現減少の機序

TM 発現上昇には, レチノイドと RXR/RAR α の複合体が TM 遺伝子上の RA 応答領域 (図 2) に反応することが関与する. この RA 応答領域には, 単球系細胞では, リガンドである活性型ビタミン D₃ (vitamin D₃) が結合した RXR/ビタミン D レセプター (vitamin D receptor, VDR) (RXR/VDR) 複合体も結合できることが判った⁶⁾.

TF 発現低下の機序は, 転写因子 AP-1 が TF 遺伝子の AP-1 結合部位に結合するのを, レチノイドと受容体の複合体が蛋白-蛋白結合により抑制することが推定されているが, まだ証明されていない. RAR と AP-1 の蛋白-蛋白結合が, RA によるコラゲナーゼの発現抑制に関与するという報告がある一方, TF 遺伝子には AP-1 結合部位が, 近接して並ぶ特異な構造もあり, RXR/RAR の複合体が直接 TF 遺伝子と結合する可能性もあり, われわれも検討を行っている. また, 単球系白血病細胞 THP-1 を用いた検討では, リポポリサッカライドで誘導される TF 発現を ATRA が抑制する効果には, AP-1 との関連が認められなかった, とする報告もあり⁷⁾, レチノイドの効果にはその他のシグナル伝達経路の関与も考えられる. TM, TF 発現調節に細胞特異性がある原因も不明で, 今後の研究課題である.

サイトカインに対する効果

白血病細胞のうちには, IL-1, TNF などのサイトカインを産生するものがある. これらのサイトカインは, 血管内皮細胞や単球の TF 発現を増強し, TM 発現を低下させ, 内皮細胞によるプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター-1 (plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1) の発現を増強し, 血管内の凝固活性を亢進させる. ATRA は, APL 細胞による IL-1 の

産生を増強する可能性があるが, ATRA の持続投与により, IL-1 による血管内皮細胞の凝固活性の亢進はブロックされる⁸⁾.

レチノイドによる線溶系の制御

APL 細胞については, ATRA がウロキナーゼおよびそのレセプターの発現に引き続き, PAI-1, PAI-2 の発現増強をもたらして, ウロキナーゼの活性を低下させ, 総じて線溶活性を低下させるとの報告がある. 一方, APL 患者血漿より得たユーグロブリン分画を用いて, 線溶能を検討すると, ATRA 投与により, 変化はないとする報告もある⁹⁾. ちなみに, APL の ATRA 療法では, 治療開始時上昇していたフィブリン分解産物 (FDP, D ダイマー) やプラスミン・プラスミンインヒビター複合体は, 1 週間以内に正常域まで回復する, との報告が多い⁹⁾.

APL 細胞は, カテプシン G という蛋白分解酵素を産生放出する場合がある. この酵素は, 成熟顆粒球のアズール顆粒にも貯蔵されており, フィブリノゲン, PAI-1 を分解し, TF pathway inhibitor (TFPI) を中和し, 好中球による血小板凝集を惹起する. ATRA は, APL 細胞のカテプシン G の発現も速やかに減少させ, 凝固促進活性の低下に寄与する.

内皮細胞に対するレチノイドの効果は, *in vitro* で検討されている. ヒト臍帯静脈においては組織型プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator; tPA) の発現を, ウシ大動脈内皮細胞においてはウロキナーゼの発現を, 遺伝子転写レベルで上昇させる. PA の発現促進および PAI-1 発現抑制には, レチノイドで誘導される midkine (MK) が関与する. 次いで, transforming growth factor- β (TGF- β) が活性化されて, PAI-1 の発現を促進し, 過度の線溶活性上昇を起こさないようにフィードバックをかける, という¹⁰⁾.

以上, レチノイドの血液凝固の制御機構について, 白血病細胞を中心に解説した.

文 献

- 1) Koyama T, Hirosawa S, Kawamata N, Tohda S, Aoki N: All-*trans* retinoic acid (ATRA) upregulates thrombomodulin and downregulates tissue factor expression in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **84**: 3001-3009, 1994.
- 2) Saito T, Koyama T, Nagata K, Kamiyama R, Hirosawa S: Anticoagulant effects of retinoic acids on leukemia cells. *Blood* **87**: 657-665, 1996.
- 3) Falanga A, Consonni R, Marchetti M, Locatelli G, Garattini E, Gambacorti Passerini C, Gordon SG, Barbui T: Cancer procoagulant and tissue factor are differently modulated by all-*trans*-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **92**: 143-151, 1998.
- 4) Shibakura M, Koyama T, Saito T, Shudo K, Miyasaka N, Kamiyama R, Hirosawa S: Anticoagulant effects of synthetic retinoids mediated via different receptors on human leukemia and umbilical vein endothelial cells. *Blood* **90**: 1545-1551, 1997.
- 5) Shibakura M, Koyama T, Ohsawa M, Kamiyama R, Hirosawa S: A retinoic acid receptor (RAR)- α selective agonist modulates procoagulant activity of acute promyelocytic leukemia cells and induces their differentiation into neutrophils. *Blood* **91**: 724-725, 1998.
- 6) Koyama T, Shibakura M, Ohsawa M, Kamiyama R, Hirosawa S: Anticoagulant effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on human myelogenous leukemia cells and monocytes. *Blood* **92**: 160-167, 1998.
- 7) Oeth P, Yao J, Fan S-T, Mackman N: Retinoic acid selectively inhibits lipopolysaccharide induction of tissue factor gene expression in human monocytes. *Blood* **91**: 2857-2865, 1998.
- 8) Barbui T, Finazzi G, Falanga A: The impact of all-*trans*-retinoic acid on the coagulopathy of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **91**: 3093-3102, 1998.
- 9) Watanabe R, Murata M, Takayama N, Tokuhira M, Kizaki M, Okamoto S, Kawai Y, Watanabe K, Murakami H, Kikuchi M, Nakamura S, Ikeda Y: Long-time follow-up of hemostatic molecular markers during remission induction therapy with all-*trans* retinoic acid for acute promyelocytic leukemia. *Thromb Haemost* **77**: 641-645, 1997.
- 10) 小嶋聡一: レチノイドによる血管内皮細胞の線溶活性調節の機序と意義. 日本血栓止血学会誌 **7**: 102-108, 1996.