

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08880

研究課題名(和文) 深部静脈血栓形成におけるオートファジーのメカニズムの解明とその法医学への応用

研究課題名(英文) Elucidation of intrathrombotic mechanism of autophagic functions in the deep vein thrombosis formation and its application to forensic medicine

研究代表者

野坂 みずほ (Nosaka, Mizuho)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00244731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血栓陳旧度にもなうオートファジー機能の動態を検討するために、LC3及びp62について実験的マウス血栓における両者の陽性細胞数や、両者の比(p62/LC3 ratio)の変化を明らかにした。血栓溶解過程では、オートファジーが関与していることが明らかとなり、法医診断学的には、血栓中のオートファジーの動態が、剖検例においても血栓の陳旧度判定の有用な指標となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Deep vein thrombosis (DVT) is multifactorial and often results from a combination of risk factors such as obesity, pregnancy, aging and malignancy. Eight-week-old male wild type mice were employed in this study. DVT was induced by the ligation of inferior vena cava. At 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21 days, immunohistochemical analyses were performed. In the murine thrombi, the LC3- or p62-positive cells were detected. The LC3-positive cells were observed all thrombus samples (n=5 per group). But in the thrombus age of 1 day, p62-positive cells were not detected and p62/LC3 ratios were nearly zero. After 3 days, p62-positive cells were detected, and p62/LC3 ratios were over 1.0. At 14 days, there were much p62-positive cells exceeded LC3+ cells, and p62/LC3 ratios reached over 2.0. Our observations indicated the detection of intrathrombotic LC3 and p62 could be a useful marker for thrombus age determination.

研究分野：法医学

キーワード：深部静脈血栓塞栓症 血栓陳旧度 オートファジー p62 LC3

### 1. 研究開始当初の背景

法医学実務において、正確な死因および死後経過時間の判定は最重要課題である。そこでその課題を解決するために、我々は以前から、特に剖検時に発見された血栓に着目してきた。血栓の形成時期を明らかにすることは、死亡に至るまでの過程や原死因の判定を左右することもある、重要な因子だからである。実際に、血栓は発症メカニズムにおいてこのような複雑な背景を持ちながらも、剖検時に血栓が発見された場合、外傷と肺動脈血栓症との因果関係を判断する上で、その陳旧度の判定が求められる。

細胞機能障害の最終段階ともいえる細胞死には、壊死(ネクロシス)やプログラム細胞死(アポトーシス)そして近年注目されている型プログラム細胞死(オートファジー)などさまざまな形態がある。最近、炎症性腸疾患患者において、これまで血栓症のリスクファクターと考えられていた、手術や長期臥床とは独立した要因による血栓症発症が確認されており、オートファジーと血液凝固異常との関連を示唆している<sup>1</sup>。そこで、血栓と細胞死の一つであるオートファジーとの関連に着目するに至った。血栓の形成時期の判定は、外傷や疾患、生活状況、肺動脈血栓症との因果関係等、死亡に至るまでの過程や原死因の判定を左右することもある重要な因子のひとつであり、オートファジーもまたその判定を決定する重要な指標となり得る可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

わが国における肺血栓塞栓症の発症数は10年間で2.25倍にも増加しており、臨床医学においてのみならず、法医学分野においても早急に、血栓の形成・溶解の機序についてのさらなる解明が望まれる。その一端として、細胞内のタンパク質分解経路のひとつであり、神経変性疾患、糖尿病、腎症、癌などさまざまな疾患の病態に関与しているオートファジーに着目した。そして免疫組織化学的手法を用いて、血栓形成から溶解に至る過程におけるオートファジーの分子メカニズムとその機能を解明し、さらには法医学分野への応用を視野に入れた包括的研究である。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスを用いた深部静脈血栓症モデルと血栓組織標本の作成

深部静脈血栓症モデルは申請者らの報告に基づいて作製する<sup>2</sup>。具体的には、マウスを麻酔下で開腹し、下大静脈を3-0絹縫合糸にて結紮する(図1)。結紮後は通常の飼養を行う。1, 3, 5, 7, 10, 14, 21日目(各グループ5匹)に安楽死させ、血栓を含む下大静脈部を採取する。これらの下大静脈は10%ホルマリンにより固定し、パラフィン包埋切片を作成する。

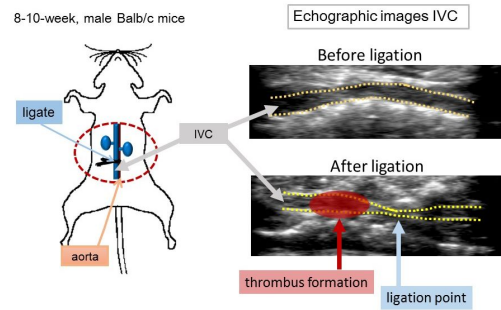


図1 深部静脈血栓塞栓症モデルの作成方法

#### (2) 血栓内の分子機構の解明

血栓形成および溶解過程において、オートファジーに関与する分子の中で、現在最も研究が進んでいるオートファゴソームのマーカであるLC3及びLC3に結合して選択的分解されるタンパク質であるp62/SQSTM1(p62)の動態について、免疫組織化学的に明らかにした。なお免疫染色による定量評価を行うため、自動免疫装置(Ventana Discovery® XT, Rosch, AZ, USA)を用いた。染色像について顕微鏡観察下(1000倍, 5視野)にてLC3及びp62それぞれの陽性細胞数を計測し、両者の比(p62/LC3)を求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 血栓中のLC3の動態

1日目以降の全ての血栓について、主に辺縁部に観察されるが、3日目以降減少傾向を認め、その後増加傾向に転じ、10日目に最も多く(25.2 ± 0.93)、以降は減少傾向を認めた(図2, 6)。

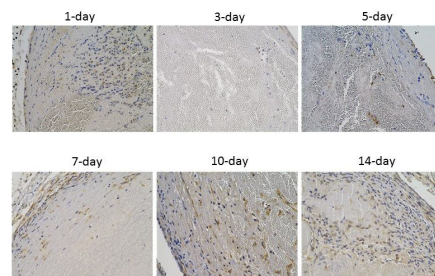


図2 陳旧度別血栓のLC3の免疫組織化学的染色像。

#### (2) 血栓中のp62の動態

1日目の血栓にはほとんど認められなかったが、3日目以降全ての血栓について、LC3と同様に主に血栓辺縁部に観察され、特に5~10日では明瞭に観察された(図3, 6)。また蛍光二重染色の結果、血栓内のLC3とp62の局在は一致し(図4)、p62の主な産生細胞はマクロファージやVEGFであることが分かった(図5)。

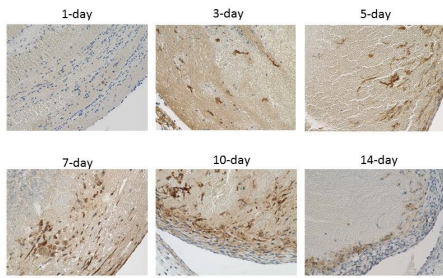
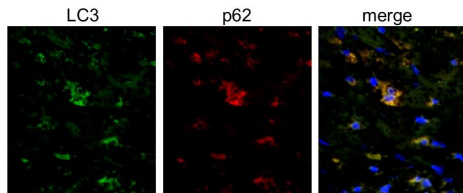
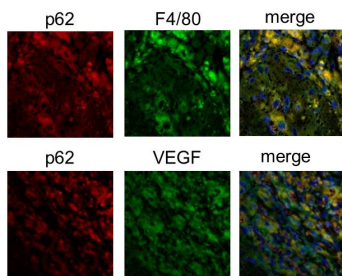


図3 陳旧度別血栓の p62 の免疫組織化学的染色像。



(10 days after IVC ligation)

図4 血栓の蛍光二重染色像。血栓の蛍光二重染色像。血栓中における LC3 と p62 の局在は一致した。



(14 days after IVC ligation)

図5 血栓の蛍光二重染色像。血栓中の p62 の局在は、マクロファージや VEGF と一致した。

### (3) LC3, p62 陽性細胞数と血栓陳旧度

血栓溶解過程では、血栓内に生じたオートファジーが関与していることが明らかとなり、特に血管新生に寄与している可能性が示唆された。LC3 陽性細胞は確認されるが、p62 陽性細胞が確認されず、両者の比がほぼ0に近い場合は1日目、p62 陽性細胞が観察され、両者の比が1以上の場合は3日以上経過した血栓であると推定できる。特に LC3 陽性細胞数が10以上で、多数の p62 陽性細胞が明瞭に認められる場合は、5~10日経過した血栓と推定できた。さらに両者の比が2以上の場合は14日経過していると推定できる可能性も確認できた(図6, 7)。

形成後2日目程度と推定される剖検例の血栓についても LC3, p62 とともに染色することが可能であったことから、剖検例においてもオートファジーにより血栓陳旧度評価の可能性も示唆された(図8)。以上の結果、法医学診断学的には、血栓中のオートファジーの動態が、剖検例においても血栓の陳旧度判定の有用な指標となると考えられた。

血栓形成・溶解過程におけるオートファジー

機能の動態を明確に示した研究、及びこれを指標とした血栓陳旧度判定を試みた研究は、国内外で他に例がない。本研究結果がもたらした成果は、法医学にとどまらず、臨床医学においても、深部静脈血栓塞栓症の新たな治療法の開発に際して重要な意義があると考えられる。

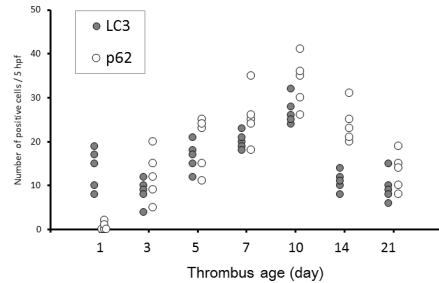


図6 形成から溶解過程における、血栓中の LC3, p62 陽性細胞数の変化

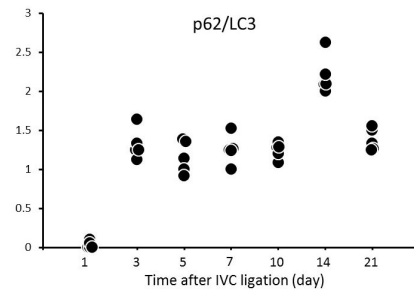


図7 血栓中の p62 / LC3 比の変化。10日と14日の血栓では明瞭な差が認められた。

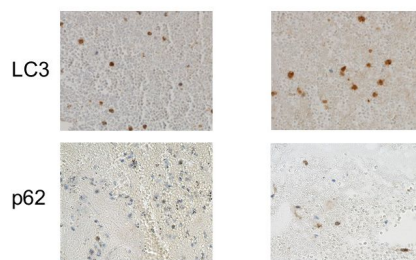


図8 形成後2日目程度と推定される剖検例から採取した血栓(左:急性呼吸不全,男・65歳;右:急性硬膜下血腫による脳ヘルニア,女・90歳)。

### <引用文献>

1. 松沢 優, 大島 茂, 渡辺 守. 炎症性腸疾患とオートファジー. *Thrombus Medicine*. 4(3): 246-252, 2014.
2. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- $\gamma$  accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF

expression in mice. *J Clin Invest.* 121(7), 2911-2920, 2011.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Kimura A, Ishida Y, Furuta M, Nosaka M, Kuninaka Y, Taruya A, Mukaida N, Kondo T. Protective Roles of Interferon- $\gamma$  in Cardiac Hypertrophy Induced by Sustained Pressure Overload. *J Am Heart Assoc.* 7(6): e008145, 2018. 査読有 . DOI: 10.1161/JAHA.117.008145.
2. Yamamoto H, Takayasu T, Nosaka M, Kimura A, Ishida Y, Kawaguchi T, Fukami M, Okada M, Kondo T. Fatal acute intoxication of accidentally ingested nifedipine in an infant –A case report. *Legal Medicine.* 24:12-18, 2017. 査読有 . doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.11.002.
3. Cecchi R, Muciaccia B, Ciallella C, Di Luca N, M, Kimura A, Sestili C, Nosaka M, Kondo T. Ventricular androgenic-anabolic steroid-related remodeling: an immunohistochemical study. *Int J Legal Med.* 131(6): 1589-1595, 2017. 査読有 . DOI: 10.1007/s00414-017-1589-3.
4. Inaba Y, Kanazawa N, Yoshimasu T, Shimokawa T, Nosaka M, Kondo T, Furukawa F. Severer lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice with homozygous Kitwsh/wsh mutation. *Mod Rheumatol.* 28(2): 319-362, 2017. 査読有 . doi: 10.1080/14397595.2017.1341591.
5. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Yamamoto H, Kuninaka Y, Shimada E, Okumoto K, Okada M, Hata S, and Kondo T. Influence of Circadian Rhythm on Thrombus Formation of Murine Deep Vein Thrombosis Model. *Ann Hematol Oncol.* 4(9): 1171, 2017. 査読有 . DOI: 10.26420/annhematoloncol.2017.1171.
6. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Yamamoto, Kato T, Kuninaka Y, Shimada E, Kondo T. Detection of intrathrombotic endothelial progenitor cells and its application to thrombus age estimation in a murine deep vein thrombosis model. *Int J Legal Med.* 131(6): 1633-1638, 2017. 査読有 . doi: 10.1007/s00414-017-1668-5.
7. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Hemmi H, Sasaki I, Kaisho T, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of fibrocyte and M2 macrophage migration. *Scientific Reports.* 7(1), 2017. 査読有 . doi: 10.1038/s41598-017-17007-8.
8. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Hama M, Kawaguchi T, Sakamoto S, Shinozaki K, Iwahashi Y, Takayasu T, Kondo T. Exaggerated arsenic nephrotoxicity in female mice through estrogen-dependent impairments in the autophagic flux. *Toxicology.* 339; 9-18, 2016. 査読有 . doi: 10.1016/j.tox.2015.11.005.
9. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kuninaka Y, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic fibrocytes and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. *Int J Legal Med.* 131: 179-183, 2016. 査読有 . DOI 10.1007/s00414-016-1465-6.
10. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Kimura A, Kawaguchi T, Hama M, Sakamoto S, Shinozaki K, Eisenmenger W, Kondo T. Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination. *Int J Legal Med.* 129(5): 1043-8, 2015. 査読有 . DOI 10.1007/s00414-015-1167-5.
11. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Hama M, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kuninaka Y, Shimada E, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic IL-6 and its application to thrombus age estimation. *Int J Legal Med.* 129: 1021-1025, 2015. 査読有 . DOI 10.1007/s00414-015-1147-9.
12. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Shiraki M, Hama M, Kawaguchi T, Kuninaka Y, Shimada E, Yamamoto H, Takayasu T, Kondo T. Autophagy in skin wounds: a novel marker for vital reactions. *Int J Legal Med.* 129: 537-541, 2015. 査読有 . doi: 10.1007/s00414-015-1168-4.
13. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Shimada E, Yamamoto H, Nishiyama K, Inaka S, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Detection of endothelial progenitor cells in human skin wounds and its application for wound age determination. *Int J Legal Med.* 129: 1049-54, 2015. 査読有 . doi: 10.1007/s00414-015-1181-7.
14. Kobayashi A, Tanizaki Y, Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Toujima S, Kuninaka Y, Minami S, Ino K, Kondo T. AG490, a Jak2 inhibitor, suppressed the progression of murine ovarian cancer. *Eur. J. Pharmacol.* 766: 63-75, 2015. 査読有 . doi: 10.1016/j.ejphar.2015.09.039.

〔学会発表〕(計 29 件)

1. Taruya A, Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Sasaki I, Kaisho T, Kondo T. Decline of lysyl oxidase protein causes acute aortic dissection in Spi-B knockout mice. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙

- 台市, 2017.12.
2. Kondo T, Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Kimura A, Mukaiida N. The absence of CCL3 exaggerates CaCl<sub>2</sub>-induced aortic aneurysm. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台市, 2017.12.
  3. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaiida N, Kondo T. Absence of CCR5 axis exaggerates thrombus formation through reduced uPA, tPA and VEGF expression in murine DVT model. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台市, 2017.12.
  4. 石田裕子, 國中由美, 野坂みずほ, 木村章彦, 近藤稔和. CCL2 は糖尿病マウスの創傷部に血管内皮前駆細胞浸潤を増加させて創傷治癒を促進する. 第 47 回日本創傷治癒学会, 京都市, 2017.11.
  5. Yamamoto H, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Shimada E, Kawaguchi M, Kimura A, Kondo T. Molecular toxicological study on the influence of circadian rhythms on acetaminophen hepatotoxicity. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, Düsseldorf, Germany, Sep. 2017.
  6. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Kimura A, Yamamoto H, Shimada E, Kawaguchi M, Kondo T. The absence of CCL3 exaggerated CaCl<sub>2</sub>-induced aortic aneurysm. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, Düsseldorf, Germany, Sep. 2017.
  7. Taruya A, Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kondo T. The absence of Spi-B exaggerates acute aortic dissection in mice. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, Düsseldorf, Germany, Sep. 2017.
  8. Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Yamamoto H, Shimada E, Kimura A, Hashizume Y, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic fibrocytes and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, Düsseldorf, Germany, Sep. 2017.
  9. Kimura A, Yamamoto H, Ozaki M, Hata S, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Hashizume Y, Kondo T. Acetaminophen-induced fulminant hepatic failure altered the biological clock in mouse heart. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, Düsseldorf, Germany, Sep. 2017.
  10. Ishida Y, Kuninaka Y, Hata S, Nosaka M, Kimura A, Yamamoto H, Shimada E, Kawaguchi M, Murakami K, Sakamoto S, Kondo T. The influence of circadian rhythm on thrombus formation, infection and intoxication. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, Düsseldorf, Germany, Sep. 2017.
  11. Hashizume Y, Hata S, Yamamoto H, Shimada E, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Takatsu A, Kondo T. A retrospective study on forensic autopsy ceases of elder persons in Wakayama prefecture. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, Düsseldorf, Germany, Sep. 2017.
  12. Kondo T, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kuninaka Y, Yamamoto H, Kawaguchi M, Shimada E, Hata S. Forensic diagnosis of compression based on expression of aquaporin-3 in human neck skin. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, Düsseldorf, Germany, Sep. 2017.
  13. Yamamoto H, Takayasu T, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Shimada E, Kondo T. Fatal acute intoxication of accidentally ingested nifedipine in an infant. 26. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (Region Süd) in Verbindung mit dem 47. Treffen der Oberrheinischen Rechtsmediziner, Freiburg, Germany, June 2017.
  14. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Yamamoto H, Shimada E, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic endothelial progenitor cell and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. 26. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (Region Süd) in Verbindung mit dem 47. Treffen der Oberrheinischen Rechtsmediziner, Freiburg, Germany, June 2017.
  15. Nosaka M. Immunohistochemical study on thrombus age determination. The Seminar for the Post-graduate Course of Legal Medicine of Institute of Legal Medicine of University of Parma, June 26, 2017 in Parma, Italy.
  16. Nosaka M. Molecular Pathophysiological Study on Thrombus Age Determination. The 1st Wakayama Medical University International Symposium of Forensic Molecular Pathology, Wakayama Medical University, Wakayama, Sep. 2, 2017.
  17. Taruya A, Kimura A, Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Sasaki I, Fukuda Y, Kaisyō T, Kondo T. The absence of Spi-B exaggerates acute aortic dissection in mice. 第 45 回日本免疫学会総会学術集会, 宜野湾, 2016.12.
  18. Mizoguchi M, Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kimura A, Mukaiida N, Kondo T. The absence of CX3CR1 impairs inflammation-induced preterm labor through the reduction of intrauterine

- macrophage recruitment. 第45回日本免疫学会総会学術集会, 宜野湾, 2016.12.
19. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Sasaki I, Fukuda Y, Kaisho T, Kondo T. Spi-B plays a protective role in pressure overload-induced heart failure through attenuation of cardiac inflammation. 第45回日本免疫学会総会学術集会, 宜野湾, 2016.12.
  20. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of CCR5 axes accelerates thrombus formation through reduced uPA and tPA expression in murine deep vein thrombosis model. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, Tokyo, May 2016.
  21. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of CCR5 axis exaggerates thrombus formation through reduced uPA and tPA expression in murine DVT model. International Congress of Immunology 2016, Melbourne, Australia, Aug. 2016.
  22. Kimura A, Nosaka M, Ishida Y, Yamamoto H, Kawaguchi T, Kuninaka Y, Furuta M, Kondo T. The roles of autophagy in skin wound healing. The 2016 Symposium of the International Academy of Legal Medicine (IALM), Venice, Italy, Jun. 2016.
  23. Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Yamamoto H, Shimada M, Kawaguchi T, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic fibrocytes and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. The 2016 Symposium of the International Academy of Legal Medicine (IALM), Venice, Italy, Jun. 2016.
  24. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of CCR5 axis accelerates thrombus formation through reduced uPA and tPA expression in mice. 第44回日本免疫学会総会学術集会, 札幌, 2015.11.
  25. Ishida Y, Kobatashi A, Sasaki S, Kuninaka Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Mukaida N, Kimura A, Mukaida N, Kondo T. Pivotal roles of CCR5 for the tumor progression in a mouse ovarian cancer. 第44回日本免疫学会総会学術集会, 札幌, 2015.11.
  26. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of CCR5 exaggerated pressure overload-induced heart failure. 第44回日本免疫学会総会学術集会, 札幌, 2015.11.
  27. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of CCR5 exaggerated pressure overload-induced heart failure in mice. Cytokines 2015 - Symphonies in Health and Disease, Bamberg, Germany, Nov. 2015.
  28. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IL-6 impairs thrombus resolution through reduced MMPs and uPA expression in murine deep vein thrombosis model. 48th Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology. Raleigh, USA, Sep. 2015.
  29. Sakamoto S, Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Hama M, Kawaguchi T, Kondo T. Forensic diagnosis of compression based on expression of aquaporin-3 but not aquaporin-1 in human neck skin. 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Leipzig, Germany, Sep. 2015.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
野坂 みずほ (NOSAKA Mizuho)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00244731
  - (2) 研究分担者  
近藤 稔和 (KONDO Toshikazu)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70251923
- 木村 章彦 (KIMURA Akihiko)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60136611
- 石田 裕子 (ISHIDA Yuko)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10364077