

令和元年6月21日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09963

研究課題名(和文) 局所蛋白過剰発現による深部静脈血栓の形成機序解析と治療法の確立

研究課題名(英文) Mechanism analysis and strategy establishment of deep vein thrombosis by local protein overexpression

研究代表者

古小路 英二 (Furukoji, Eiji)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：00423723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血管内カテーテルを用いた遺伝子導入による局所治療を想定し、カテーテル吸引により得られた静脈血栓の解析、ラット下大静脈と遺伝子導入を組み合わせた種々の静脈血栓の形成、血栓溶解および蛋白過剰発現による局所での静脈血栓抑制効果の評価を目的としている。結果として、静脈血栓の解析により発症期間と血栓性状との関連が見られた。動脈血栓実験ではPodoplaninの過剰発現により閉塞性血栓が見られた。また、ラットの下大静脈結紮および遺伝子導入による静脈血栓実験では目的の静脈血栓が得られ、溶解剤等による血栓量への影響に有意差が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

静脈血栓塞栓症の予防、治療に関して広く認知されてきているが、依然としてその発症頻度は高く、治療に関しても副作用の問題等で満足といえる結果は得られていない。我々の施設でも、治療開始後に血栓溶解剤や抗凝固剤の副作用による脳出血死亡例、薬剤継続困難のための血栓残存・増悪例などの治療困難例を多数経験した。これらの経験より得られたことは、動脈血栓と異なっている静脈血栓形成機序の解析不足、および既存の対策、薬剤、治療法の限界である。本研究の目的は、これまでの臨床経験および研究を組み合わせることにより、静脈血栓形成機序の解析、および治療、管理を確立することである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to evaluate the method of the formation of various type of venous thrombus in rat and local antithrombotic effect by protein overexpression. In this study, we analyzed vein thrombus obtained by catheter aspiration and examined the properties of various vein thrombus formed by the combination of rat inferior vena cava ligation and gene transfer. As a result, analysis of venous thrombus showed a relation between the onset period and thrombotic properties. Arterial thrombus experiments showed obstructive thrombosis caused by overexpression of Podoplanin. Besides, in the vein thrombus experiment by rat inferior vena cava ligation and gene transfer, the target vein thrombus was obtained, and a significant difference was recognized in the influence on the amount of thrombus by the thrombolytic agent.

研究分野：血管内治療

キーワード：血栓 遺伝子導入 ラット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

静脈血栓に関する血小板や血液凝固因子の相互作用、分子生物学的評価等に関してはまだ不明確な点が多い。静脈血栓は動脈と異なり一般にフィブリンと赤血球に富んだ赤色血栓であるといわれているが、我々の吸引した血栓あるいは剖検例の解析では、血小板を主とした白色血栓、あるいは赤色血栓との混合血栓など、血栓が形成された部位により種々の程度に血小板、フィブリン、赤血球、白血球などが混じり合った血栓であった。一方で、これまでの研究で行ったラット静脈血栓モデルでは下大静脈を結紮していたが、ラットの下大静脈に形成される血栓は静脈うっ滞を反映した赤色血栓が主体であった。このことより、実際の臨床に近い静脈血栓を解析するにあたっては、種々の性状の静脈血栓モデルを作製する必要性が考えられ、血管結紮と遺伝子投与による蛋白過剰発現との組み合わせが有用である点に着目した。局所遺伝子導入では蛋白発現部位および発現程度が長期間制御可能である。そこで本研究においては、ラット下大静脈において結紮および組換えアデノウイルスによる遺伝子投与を組み合わせる種々の性状の静脈血栓を形成し、この血栓に対しカテーテルによる局所治療を想定した血栓溶解剤および局所蛋白過剰発現による血栓形成抑制効果を検討することを目的とする。種々の性状の血栓形成目的として血小板凝集を惹起する Podoplanin 遺伝子、血栓抑制効果として血小板凝集抑制効果を有する ecto-ATPase の導入を予定している。本研究においては、この種々の性状の静脈血栓を再現し、状況に合わせた静脈血栓の解析、形成を抑制しようとするものである。

### 2. 研究の目的

静脈血栓塞栓症の予防、治療に関して広く認知されてきており、弾性ストッキングの使用、ヘパリン、ワーファリン、ウロキナーゼ等の薬剤使用が行われているが、依然としてその発症頻度は高く、治療に関しても副作用の問題等で満足といえる結果は得られていない。我々の施設でも IVC フィルター留置や静脈血栓の溶解・除去など、IVR による対策、治療が頂を奏しているが、血栓吸引後に使用する血栓溶解剤や抗凝固剤の副作用による脳出血死亡例、薬剤継続困難のための血栓残存・増悪例などの治療困難例を多数経験した。これらの経験より痛感したことは、動脈血栓と異なっている静脈血栓形成機序の解析不足、および既存の対策、薬剤、治療法の限界である。

本研究の目的は、これまでの臨床経験および研究を組み合わせることにより、静脈血栓形成機序の解析、および治療、管理を確立することである。この点に関連し、カテーテルによる局所治療を想定した局所遺伝子導入による動物実験での検討と共に、本研究開始前までに IVR にて下肢深部静脈より吸引した血栓を一部解析した。この解析結果も踏まえ、本研究ではこれまでの研究を臨床に応用することを目的として、これまでより臨床に近い性状の静脈血栓をラット生体内にて形成した後、血栓溶解および蛋白過剰発現による局所での静脈血栓抑制効果を検討する。

これまでのラット静脈における検討では、静脈結紮による赤色血栓をターゲットとして血栓溶解あるいは抗血栓蛋白過剰発現による血栓形成抑制効果を検討してきた。これを更に臨床に応用するため、実際の深部静脈血栓の性状に近い状況をラットに再現し、血栓溶解・抑制効果が得られるか検証が必要である。結紮および単独の薬剤投与等のみではこの再現は困難であり、本研究においてはまずこの状況を得られることを目的として、強い血小板凝集を起こす Podoplanin 蛋白の長期過剰発現と血管結紮とを組み合わせる種々の性状の血栓モデルを作成する。その後血栓溶解剤さらには抗血栓因子の遺伝子投与による静脈血栓抑制効果を検討する。

血小板凝集惹起を伴った静脈血栓形成はその形成機序が単なる結紮とは全く異なるため血栓の性状が異なることが予想され、深部静脈血栓のより詳細な解析が可能と考えられる。

静脈血栓の管理は慢性期も含め複雑であり、容易に治療を達成することは困難である。本研究では採取した静脈血栓の解析結果も踏まえ静脈血栓抑制効果を検討する予定であり、この研究の特徴は、新たな血栓モデルで種々の性状の血栓を評価すると共に、カテーテルによる局所の静脈血栓治療に応用することである。この検討はいままでになされていない。また、抗血栓因子等の分子の局所発現は出血など全身的な合併症を抑えるために重要で、かつ強力な静脈血栓抑制効果を示すと考えられる。この結果が示せば、カテーテルを用いた臨床応用により近づけるものと考えられる。

以上のことを踏まえ、今回の研究ではこれまでに採取された静脈血栓に関する検討(静脈血栓の性状と臨床経過、治療との関連)とともに以下のごとく実験を行い、局所の静脈血栓抑制効果を検討する。

#### ( 検討内容 )

( 1 ) Podoplanin の発現プラスミドおよびこれらの遺伝子を組換えたアデノウイルスベクターを作製する。これを培養血管内皮細胞に導入することにより、その活性、分泌能、遺伝子導入効率、血小板凝集反応への影響を *in vitro* にて検討する。

( 2 ) ラットに種々の性状の静脈血栓モデルを作成した上で、遺伝子導入による生体内での血栓形成への影響を組織学的、分子生物学的に検討する。また、血栓溶解剤の効果も同様に評価する。

#### ( 予想される結果と意義 )

( 1 ) これまでの研究結果から、血管壁に導入された遺伝子は長期間蛋白発現と活性を示すと予想される。蛋白発現は目的静脈でのみ見られ、全身の凝固状態には影響はもたらさないと予想さ

れる。

(2) 種々の性状の静脈血栓において、血栓溶解剤の評価および蛋白過剰発現による静脈血栓抑制効果が予想され、臨床応用への道がひらけるものとする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 吸引静脈血栓解析

静脈血栓はその形成場所、発生からの期間、患者背景などを考慮する必要がある、これらを基にした静脈血栓の検討が必要である。今回の研究では下記の培養細胞およびラットを用いた検討とともに、カテーテル血栓吸引により採取された静脈血栓について臨床経過や治療効果との関連、静脈血栓の性状解析を行う。

#### (2) 培養細胞

培養血管壁細胞に対して遺伝子導入を行い、ベクターの力価、蛋白発現評価、細胞機能への影響評価、血小板凝集反応への影響等の確認を行う。

#### (3) 動物実験モデル

SD ラットの皮下大静脈を露出・結紮し、血栓モデルを作成する。遺伝子導入群には組換えアデノウイルスを用いて遺伝子導入を行う。遺伝子導入は30分間のクランプにて行う。動静脈血栓の比較目的で、頸動脈においても血栓モデルを作成する。

形成された血栓および遺伝子組換えアデノウイルスベクターを用いた遺伝子過剰発現、血栓抑制効果の検討を行う。この状況に血栓溶解剤の投与を行う群を加える。ラットは経時的に安楽死させ、血管壁の目的蛋白量および活性の評価、静脈内血栓の量、性状、抑制効果を検討する。

以上を、非遺伝子投与群、遺伝子投与群に分け、検討を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 吸引静脈血栓

我々の施設において2008～2013年度にカテーテル血栓吸引(CDT)を施行した19例の症例について、患者背景、危険因子、CDTの効果、および吸引した静脈血栓の組織学的評価等の検討を行った。

年齢は20-78歳(平均54.6)、女性8例(42%)、発症から治療までは5～60日(19.3日)であった。静脈血栓は左側が14例(74%)と多く、19例のうち10例(53%)が肺血栓塞栓を伴っていた。危険因子としては、外傷後が4例(21%)と多く、その他術後2例(11%)、長期臥床3例(16%)、癌2例(11%)などであった。血栓性素因では、高ホモシスチン血症、ATIII欠乏症、プロテインC欠乏症、プロテインS欠乏症、第8因子高値、第11因子高値、VW因子高値が存在していた。これらの症例に対してIVRとして患側の膝窩静脈をエコー下に穿刺し、8Fr.のガイディングカテーテルにてCDTを行った。IVRの結果は、静脈血栓の完全消失が3例(16%)、部分消失13例(68%)、不成功3例(16%)であった。また、血栓塞栓後症候群(PTS)と思われる症状が2例(11%)で見られた。吸引除去した静脈血栓の組織学的検討では、症状発症からCDTまでの期間により器質化の程度が異なり、その日数と血栓内におけるSMA陽性細胞数(筋線維芽細胞、平滑筋細胞などの器質化)とに相関が見られた(図1、図2)。IVRの結果とSMA陽性細胞数には関連が見られず、他の要因が関連することが予想された。これらの結果については第26回熊本県血管造影IVR研究会・第23回宮崎血管内治療IVR研究会(2015)、第45回日本IVR学会総会(2016)、および第102回北米放射線学会・RSNA(2016)にて発表を行った。CDTの有効性に関しては血栓症発症から治療までの期間に加え複数の要因が関与していることが予想された。今回の結果を踏まえ、本研究では、ラット皮下大静脈結紮の部位や閉塞期間、白血球や血小板、フィブリン成分などと血栓量、薬剤への効果等の関連も検討することとした。

図1

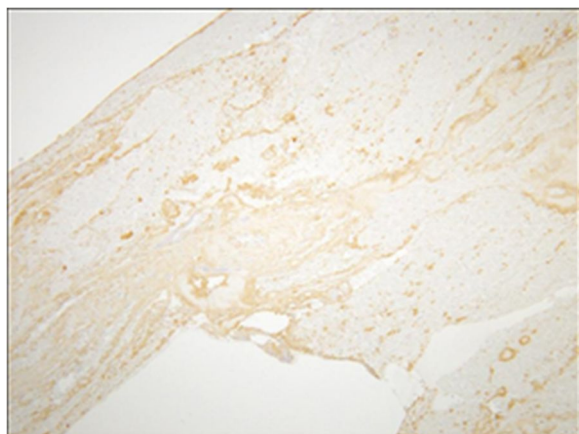
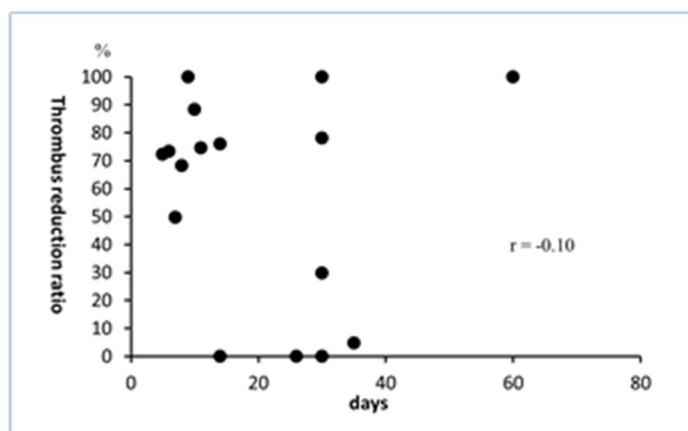


図2



今回検討を予定している Podoplanin 蛋白は、血小板膜上に発現している Clec2 蛋白と結合することにより、血小板凝集を惹起することが示されている。Podoplanin は腎系球体上皮細胞やリンパ内皮に発現している他、種々の癌細胞に発現しており、血小板凝集を基とした癌の転移との関連が言われている。Podoplanin 蛋白の血栓性状や量への検討は少なく、過剰発現による血栓形成への影響を確認する目的に、血栓の評価が多い頸動脈における遺伝子導入にて血栓形成への影響、関連因子の検討を行った。

## (2) ラット頸動脈

ラット頸動脈にて作成した血管壁びらん病態モデルにヒト Podoplanin 遺伝子を局所導入し、血栓形成への影響を評価した。また、培養大動脈血管内皮細胞を用いて Podoplanin 発現の条件を検討した。

ラット頸動脈にヒト Podoplanin の遺伝子を導入した1日後の血管壁に血管内皮細胞に Podoplanin 蛋白の発現が確認された。遺伝子導入4日後の評価では、対照コントロール群(LacZ 遺伝子導入)では血栓が形成されなかったのに対し、Podoplanin 遺伝子導入群では閉塞性血栓が形成された。この閉塞性血栓の免疫染色では、血栓の辺縁部を中心に Podoplanin 蛋白が見られ、血管内皮に過剰発現した Podoplanin が血栓形成に関与していることが示唆された(図3)。この結果を踏まえ、培養大動脈血管内皮細胞にて Podoplanin 発現に関与している可能性のある物質の影響を評価した。培養血管内皮細胞を IL-3、IL-6、TGF- $\beta$ 、VEGF-A にて刺激した結果、VEGF-A が血管内皮細胞に対し Podoplanin の発現を亢進させることが示唆された(図4)。

血管内皮細胞における Podoplanin の過剰発現が動脈のびらん性傷害および血栓形成の促進に関与すると考えられた。また、その機序には動脈硬化薬にて発現亢進が見られる VEGF-A の関与が示唆された。

この結果については、第26回国際血栓止血学会(2017)および第39回日本血栓止血学会学術集会(2017)にて発表をおこなった。

図3

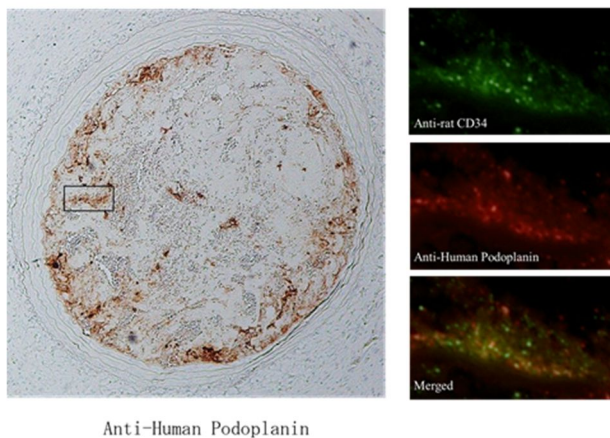
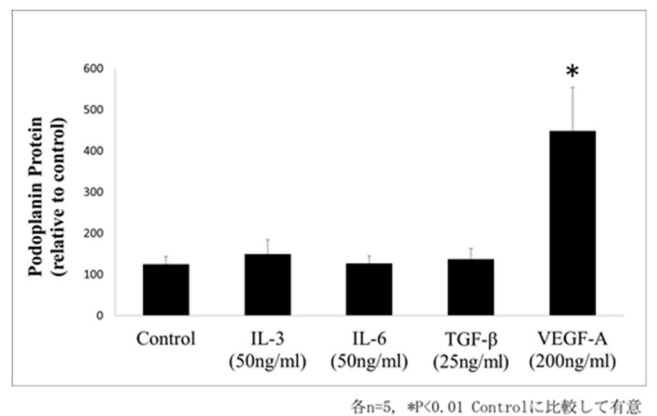


図4



上記検討により Podoplanin 過剰発現による血栓形成への影響が示され、次にラット下大静脈を用いた静脈血栓モデルの作成、評価および血栓溶解、蛋白過剰発現による局所での静脈血栓抑制効果の評価を行った。

## (3) ラット下大静脈

ラット下大静脈を露出し、下大静脈分枝の結紮、腎静脈合流下結紮にて静脈血栓モデルを作製した。このモデルにて一定の血栓ができることを評価した後、結紮および遺伝子導入による血栓形成への影響を検討した。

Podoplanin 遺伝子投与群と LacZ 遺伝子投与群での血栓の比較では、静脈血栓量の有意差は認めなかった。下大静脈への LacZ 遺伝子導入群では赤血球やフィブリンを主体とした血栓が形成されていた。一方、Podoplanin 遺伝子導入群では上記の赤血球やフィブリンを主体とした部分に加え、血小板を多く含む領域など様々な性状を示す静脈血栓の形成が見られた(図5)。免疫染色の結果も踏まえ(図6) 遺伝子導入により血管壁にて過剰発現した Podoplanin 蛋白が血小板凝集を惹起し、より血小板の多い静脈血栓を形成した可能性が考えられた。



図 5

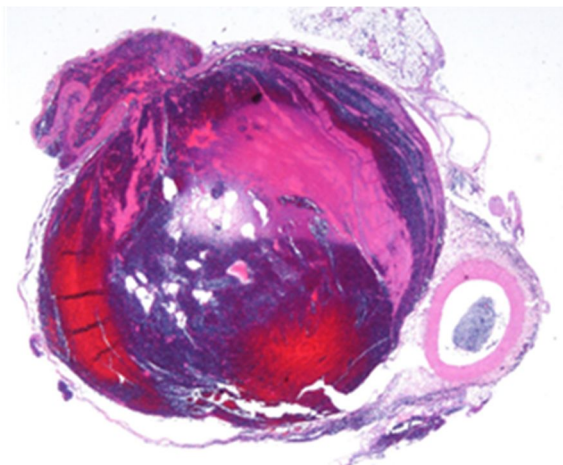
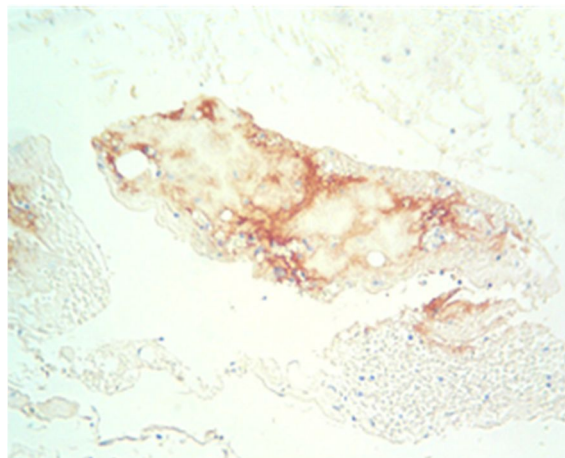
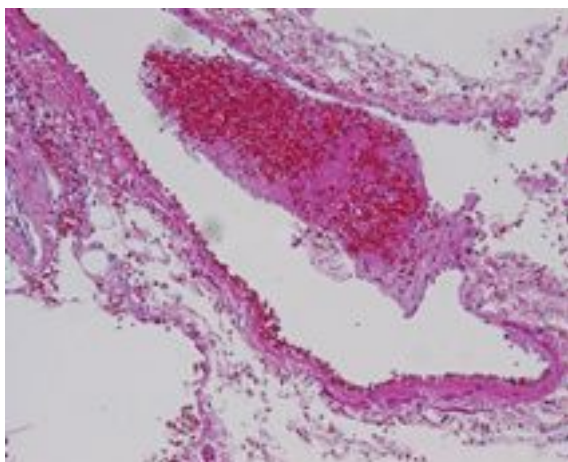


図 6



これらの結果より、ラットにおける下大静脈結紮と Podoplanin 遺伝子導入を組み合わせ、本研究の目的である性状の異なる静脈血栓が得られることが示された。この結果を踏まえ、この静脈血栓モデルを用いた血栓溶解剤（ウロキナーゼ）の投与、ecto-ATPase 遺伝子導入による血栓への影響を検討したが、血栓の性状による静脈血栓への治療効果の有意差が示唆されている（図 7）。

図 7



結論として、本研究により静脈血栓の解析が行われ、現在も多くの症例が見られる肺血栓塞栓症の治療への一歩が得られたと考えられる。DOAC などの新たな薬剤が登場しているが、長期合併症を含め未だ静脈血栓症の解明は十分ではなく、本研究の結果は実際の静脈血栓に即した治療へ応用が期待できるものと考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Furukoji E, Gi T, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Kojima M, Sugita C, Sakae T, Sato Y, Hirai T, Asada Y.

CD163 macrophage and erythrocyte contents in aspirated deep vein thrombus are associated with the time after onset: a pilot study.

Thromb J. 2016 Nov 22;14:46. doi: 10.1186/s12959-016-0122-0.2016. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

古小路英二、山下 篤、盛口清香、前川和也、魏 峻洸、佐藤勇一郎、平井俊範、浅田祐士郎

血管内皮細胞の Podoplanin 発現はラット頸動脈におけるびらん性傷害と血栓形成を促進する

第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋

2017 年 6 月

Furukoji Eiji、Atsushi Yamashita、Toshinori Hirai、Yujiro Asada  
Podoplanin overexpression on endothelial cells promotes superficial erosive injury and  
thrombus formation in rat carotid artery.  
第 26 回国際血栓止血学会、ベルリン  
2017 年 7 月

Furukoji E、Kawano M、Kadota Y、Shinkawa N、Sakae T、Hirai Toshinori  
Do Immunohistochemistry Features of Thrombus Affect Outcome of Catheter-directed  
Thrombolysis in Patients with Deep Venous Thrombus?  
Radiological Society of North America (RSNA)、シカゴ  
2016 年 11 月

古小路 英二、榮 建文、増田 梨絵、山下 篤、浅田祐士郎、平井 俊範  
静脈血栓塞栓症に対するカテーテル血栓溶解療法と組織学的検討  
第 45 日本 IVR 学会総会、名古屋  
2016 年 5 月

古小路 英二  
静脈血栓症の現状と基礎的検証  
第 26 回熊本県血管造影 IVR 研究会・第 23 回宮崎血管内治療 IVR 研究会、宮崎市  
2015 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：山下 篤

ローマ字氏名：(Yamashita, Atsushi)

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 90372797

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。