

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05163

研究課題名(和文) 病理組織学、網羅的代謝解析、レオロジーを融合したアテローム血栓症の発症機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of thrombus formation and propagation in the onset of atherothrombosis

研究代表者

浅田 祐士郎 (Asada, Yujiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70202588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：アテローム血栓症の発症機序の解明を目的として、プラーク破綻と血栓の形成・増大機序について、病理形態学・代謝系変動・レオロジーの観点から検討を行った。閉塞性血栓は非閉塞性に比して、フィブリンの占める割合が優位に高く、凝固系の寄与が大きいことから、組織因子の発現促進因子を検討し、炎症性サイトカイン、低酸素、およびキヌレニンの関与を明らかにした。また急性心筋梗塞症例の約6割はプラーク破綻から数日経過した血栓の器質化像が存在することを見出し、プラーク破綻部における血栓の増大機序の重要性を示した。併せて血栓能の高いプラークの画像イメージングを試み、核医学・MRIによるプラーク評価を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アテローム血栓症は、我国の死因の約3割を占める重要な疾患で、有効な予防・治療法の確立に向けた発症病態の解明は、医療経済の観点からも急務の課題となっている。本疾患は動脈硬化性プラークの破綻に伴う血栓によって発症するが、血栓形成の機序はまだ不明な点が多い。動脈の血栓は従来より血小板が主体とされてきたが、本研究結果は、発症には凝固系の寄与が重要で、プラークの形状や血流変動が血栓の増大に寄与することを示した。また血栓能の高いプラークの画像診断に有用なマーカーの検索を進め、数種類の候補物質を抽出した。これらの結果は、アテローム血栓症の病態解明と診断のみならず予防・治療への展開に有用である。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the pathogenesis of atherothrombosis, we investigated the mechanisms of thrombus formation/propagation on disrupted plaques from the viewpoint of pathomorphology, metabolic changes and rheology.

Because occlusive thrombi have a predominantly higher proportion of fibrin than non-occlusive ones, large contribution of the coagulation system is considered to be critical in the atherothrombosis. We demonstrated that tissue factor expression in plaques was promoted by many factors including inflammatory cytokines, hypoxia and kynurenine. In addition, about 60% of the cases of acute myocardial infarction were found to have organized thrombi suggesting the progress of several days to weeks from plaque disruption to the onset, and we clarified the contribution of blood flow alteration to thrombus propagation. We tried to visualize plaques with high thrombogenicity and proceeded with plaque evaluation by nuclear medicine and MRI.

研究分野：病理学

キーワード：アテローム血栓症

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

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞に代表される心血管イベントは、動脈硬化性プラークが破綻し、血栓が血管内腔を塞ぐことで発症することからアテローム血栓症と総称される。この疾患群は、我国の死因の約3割を占め、患者数と医療費は増加の一途を示している。近年、新たな抗動脈硬化薬、抗血栓薬が相次いで登場してきたが、その有効性はまだまだ不十分で、有効な予防・治療法の確立に向けた発症病態の解明は、医療経済の観点からも急務の課題となっている。

プラーク破綻は、脂質コアを被う線維性被膜が、浸潤したマクロファージにより菲薄化されて発生することから、研究の多くはマクロファージ機能と被膜破綻の分子機構に向けられている。また動脈の血栓形成に関しては、血小板が主役を演じる、との理解から、新規の血小板受容体や活性化経路の探索が精力的に進められてきているが、ヒトのプラークの病理像は極めて多彩で、プラーク破綻や血栓形成の様式は一様ではない。

申請者らは、アテローム血栓症の発症機序の解明を目指し、人体病理を中心とした研究を進めてきており、プラーク破綻部の血栓形成では、血小板に加えて凝固系反応が強く寄与すること、プラーク破綻には、被膜の炎症・酸化ストレスに加えて血行力学的因子の関与が大きいこと、高脂血症、糖尿病などの代謝異常は、プラーク及び血栓の組成性状にも深く関与すること、プラーク破綻部の血栓形成は破綻の程度に必ずしも相関しないこと、等々を明らかにし、これらの病態を踏まえたヒトの病態に類似した動物モデルを確立し、数種の抗血栓薬の開発にも寄与してきた。

以上の研究を通して注目されたことは、プラークの組織像や狭窄度、破綻の程度が類似していても、破綻部に形成される血栓は、極めて小さいもの(無症候性)から、内腔を閉塞する大きなもの(イベント発症)まで様々で、その頻度は前者が極めて高いことである。このことはアテローム血栓症の発症には、プラーク破綻後にサイズの大きい血栓が形成される、あるいは血栓が血管内腔で増大するプロセスが重要であることを示唆しているが、この機序については不明な点が多い。

2. 研究の目的

アテローム血栓症の発症につながる血栓の形成・増大機序の解明を目的とする。プラークと血栓の病理形態像と代謝系変動、および血行力学的因子を融合的に解析し、アテローム血栓症の発症機序の解明と新たな治療法への展開を進める。また血栓形成能の高いプラークの画像診断に向けたマーカーの探索を目指す。

3. 研究の方法

1) プラークと血栓標本の病理組織学的解析

虚血性心疾患の剖検症例(50症例)と狭心症・急性心筋梗塞症例の血栓吸引標本(305症例)を用いて、閉塞性血栓の病理組織所見と臨床情報(危険因子および予後)との関連性について、非閉塞性血栓と対比して解析を行った。また血中のキヌレニン濃度が冠動脈血栓症、冠疾患死亡率と相関することから、冠動脈硬化プラーク標本と培養細胞を用いて、トリプトファン代謝系産物の血栓形成への作用を検討した。

2) 高血栓能プラークのイメージング

プラーク破綻部における血栓サイズは、プラークの血栓能、特にプラーク内組織因子の多寡に依存している。組織因子の発現促進因子は炎症性サイトカイン、酸化ストレス群に加えて低

酸素があり、これらを指標にプラークの網羅的代謝解析を行い、アイソトープならびに核磁気共鳴画像装置を用いて高血栓能プラークの画像イメージングを進めた。

3) 組織標本を用いた3次元血管内構造構築と血流シミュレーション

剖検症例と動物モデルの血管組織標本を用いて、100 μ m 間隔で連続組織標本を作製し、標本をデジタル画像としてコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (AVIZO 6.1 + XSkeleton extension) を用いて内腔形状の3次元画像を構築し、流体解析ソフト (DEXCS2015 + Open FOAM2.0) を用いた血流・応力変化の3次元シミュレーションを行い、プラークにかかる垂直応力、ズリ応力、乱流強度を計算し、プラークにかかる力学的作用を算出した。

またプラーク破綻部における組織構造の初期変化を、厚切りパラフィン切片標本からの低真空走査電顕により観察し、血流シミュレーションの結果と対比検討した。

4. 研究成果

1) プラークと血栓標本の病理組織学的解析

これまでの検討結果と同様に、閉塞性血栓症例(急性心筋梗塞症例)では血栓に占めるフィブリンの割合が優位に高く、閉塞性血栓の形成・増大には組織因子をトリガーとする凝固系の関与が大きいことが確認された。

プラーク内の組織因子発現には、炎症性サイトカイン類など多くの因子が寄与しているが、新たにトリプトファン代謝系の代謝産物であるキヌレニンがマクロファージの組織因子発現に促進的に作用することを見出した。これ機序には律速酵素であるインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ1(IDO1)の発現が重要で、冠動脈プラークにはIDO1が高発現していること、またキヌレニンは芳香族炭化水素受容体(AHR)を介して組織因子発現を促進することも見出した。

急性心筋梗塞症例(発症24時間以内)から採取された吸引血栓標本はすべて急性期の血栓像(血小板とフィブリンの混合血栓)であるが、約6割の症例において白血球の崩壊像や血栓の器質化像など、血栓形成から数日(～週)経過した病理像が観察された。これらの症例では末梢血栓が多く、心筋障害の程度も高く、治療後6ヵ月での予後も不良で、吸引血栓標本における older thrombus の存在は年齢やショックと並んで予後不良の予測マーカーとなることを示した。

カテーテル治療後6ヶ月以内の予後予測因子			
Variable	OR	95% CI	P-value
Age	1.05	1.01 - 1.094	0.009
Shock	3.43	1.22 - 9.47	0.02
Peak CK	1.02	1.01 - 1.04	0.001
Older thrombus	3.03	1.12 - 9.52	0.028

2) 高血栓能プラークのイメージング

低酸素環境のプラークは凝固活性が高く、動物モデルにおいて¹⁸F-FDG取込みを指標としたPET画像が血栓能を反映できることを報告した。しかし臨床現場では、心筋や縦隔組織も¹⁸F-FDG取込みが高く、冠動脈プラークの評価には不適とされている。そこで心筋組織、健常動脈、動脈硬化病変の3者について網羅的代謝解析を行い、動脈硬化病変のみで高濃度に存在する代謝産物を抽出した。現在画像診断への応用展開を進めている。

動脈硬化の動物モデルを用いて、高血栓能プラークでは酢酸塩の取込が亢進していることを見出した。アイソトープ標識による画像イメージングを進めている。

核磁気共鳴画像(MRI)T1強調画像において高信号を示す冠動脈プラークは、心血管イベント発症の予測所見とされているが、このプラークの性状は明らかにされていなかった。剖検症例を用いてMRI-T1強調画像のプラーク性状を検討し、高信号はプラーク内出血 (Glycophorin A) を反映したもので、併せてMMP (Matrix metalloproteinase)-9 や組織因子発現の亢進したプラークであることを見出し、不安定かつ高血栓能のプラークの指標となることを報告した。

プラーク/心筋 シグナル強度比		
	Correlation coefficient	P-value
Glycophorin A (%)	0.35	<0.05
Fibrin (%)	0.35	<0.05
MMP-9 (%)	0.33	<0.05
Tissue factor (%)	0.37	<0.05

3) 組織標本を用いた3次元血管内構造構築と血流シミュレーション

プラーク破綻部の血栓の形成・増大には血管狭窄に伴う血流乱流が寄与する。

乱流に伴う血管壁へのズリ応力と乱流強度エネルギーがプラーク破綻(びらん)の形成に寄与しており、低ズリ応力領域では内皮細胞と平滑筋細胞のアポトーシスが誘導されることを見出した。

低ズリ応力領域のプラーク破綻部の低真空走査電顕により、同部位では内皮の剥離とともに内膜深層までの傷害が惹起され、血小板の粘着・凝集とフィブリンの析出、および血小板塊への好中球の付着が起こることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19件)

- 1) Kuroiwa Y, Uchida A, Yamashita A, Miyati T, Maekawa K, Gi T, Noguchi T, Yasuda S, Imamura T, Asada Y. Coronary high-signal-intensity plaques on (1)-weighted magnetic resonance imaging reflect intraplaque hemorrhage. Cardiovasc Pathol. 2019;40:24-31. (査読有)
- 2) Watanabe Y, Koyama S, Yamashita A, Matsuura Y, Nishihira K, Kitamura K, Asada Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in coronary atherosclerotic plaque enhances tissue factor expression in activated macrophages. Res Pract Thromb Haemost. 2018;2:726-35. (査読有)
- 3) Sawaguchi A, Kamimura T, Yamashita A, Takahashi N, Ichikawa K, Aoyama F, Asada Y. Informative three-dimensional survey of cell/tissue architectures in thick paraffin sections by simple low-vacuum scanning electron microscopy. Sci Rep. 2018;8:7479. (査読有)
- 4) Nishihira K, Shibata Y, Yamashita A, Kuriyama N, Asada Y. Relationship between thrombus age in aspirated coronary material and mid-term major adverse cardiac and cerebrovascular events in patients with acute myocardial infarction.

Atherosclerosis. 2018;268:138-144. (査読 有)

- 5) Asada Y, Yamashita A, Sato Y, Hatakeyama K. Thrombus Formation and Propagation in the Onset of Cardiovascular Events. J Atheroscler Thromb. 2018;25:653-664. (査読 有)
- 6) Yamasaki K, Yamashita A, Zhao Y, Shimizu Y, Nishii R, Kawai K, Tamaki N, Zhao S, Asada Y, Kuge Y. In vitro uptake and metabolism of [14C] acetate in rabbit atherosclerotic arteries: biological basis for atherosclerosis imaging with [11C]acetate arteries. Nucl Med Biol. 2018;56:21-25. (査読 有)
- 7) Yamashita A, Asada Y.: Pathology of coronary atherosclerotic plaques and mechanisms of plaque disruption. Ann Nucl Cardiol 2017 ; 3 : 66-72. (査読 有)
- 8) Matsuura Y, Yamashita A, Zhao Y, Iwakiri T, Yamasaki K, Sugita C, Koshimoto C, Kitamura K, Kawai K, Tamaki N, Zhao S, Kuge Y, Asada Y. Altered glucose metabolism and hypoxic response in alloxan-induced diabetic atherosclerosis in rabbits. PLoS One. 2017;12:e0175976. (査読 有)

〔学会発表〕(計 24 件)

- 1) Yamashita A, Kuroiwa Y, Uchida A, Maekawa K, Gi T, Imamura T, Asada Y. Magnetic resonance T1 high signal intensity in coronary atherosclerotic plaques reflects intraplaque hemorrhage-derived erythrocyte content ATVB/PVD2018 (San Francisco, 5/10-12, 2018)
- 2) Watanabe Y, Koyama S, Yamashita A, Kitamura K, Asada Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is expressed in macrophages in human coronary atherosclerotic plaque and is associated with tissue factor expression in activated THP-1 macrophages. ATVB/PVD2018 (San Francisco, 5/10-12, 2018)
- 3) 山下 篤, 浅田祐士郎. プラークびらんと血流・血栓形成. 第 50 回日本動脈硬化学会総会 (大阪市, 7/12-14, 2018)
- 4) Maekawa K, Yamashita A, Hatakeyama K, Nishihira K, Asada Y. Hypoxia augments tissue factor expression in inflammatory stimulated macrophages but not in smooth muscle cells or in endothelial cells. XXVI Congress, International Society on Thrombosis and Haemostasis (Berlin, 7/8-13, 2017)
- 5) Furukoji E, Yamashita A, Hirai T, Asada Y. Podoplanin overexpression on endothelial cells promotes superficial erosive injury and thrombus formation in rat carotid artery XXVI Congress, International Society on Thrombosis and Haemostasis (Berlin, 7/8-13, 2017)

〔図書〕(計 1 件)

浅田祐士郎: アテローム硬化、pp14-17 (2017), 臨床脈管学、日本脈管学会編集、日本医学出版 (東京)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/pathophysiology/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 勇一郎

ローマ字氏名：Yuichiro Sato

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): 90347055

研究分担者氏名：山下 篤

ローマ字氏名：Atsushi Yamashita

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。