

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03445

研究課題名(和文)アテローム血栓症の発症につながる血栓の増大・成長機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of thrombus formation and propagation leading to 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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：アテローム血栓症の発症に繋がる血栓の形成機序について、人体病理標本、動物モデルを用いて検討した。また出血リスクの少ない抗血栓薬のターゲット因子について検討した。その結果、動脈硬化巣破綻部での血栓形成部では凝固系が著しく亢進していること、血小板はフォンビルブラン因子やフィブリンを足場に凝集していること、好中球細胞外トラップは血栓の初期の器質化に寄与していることを見出した。また血栓・プラークの網羅的解析から、冠動脈ハイリスクプラークの新たな画像診断の標的となる分子を見出した。凝固XI因子阻害により、出血リスクは軽微で有意な抗血栓作用が確認され、安全性の高い新規の抗血栓薬の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞や脳卒中に代表されるアテローム血栓症は、動脈硬化巣の破綻による血栓形成で発症する。このため血栓形成の機序解明と血栓の画像診断の質的向上は本疾患の診断に重要である。また現在使用されている抗血栓薬は出血リスクを伴うものが多く、安全な抗血栓薬の開発は喫緊の課題とされている。本研究では、人体病理と実験病理の立場から研究を進め、プラーク破綻部での血栓形成の新たな機序と血栓の画像診断のターゲットとなる分子を複数同定した。加えて、凝固XI因子の阻害は出血リスクを伴わずに抗血栓作用を有することを明らかにした。これらの結果は、我が国のアテローム血栓症の診断・予防・治療の発展に寄与する内容である。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of thrombus formation leading to the onset of atherothrombosis was investigated using human pathological specimens and animal models. We also examined the target factors for antithrombotic drugs without bleeding risk.

As a result, the coagulation system is significantly enhanced at the disruption sites of atherosclerotic lesions, and platelets are aggregated on the von Willebrand factor and fibrin as a scaffold, in addition, neutrophil extracellular trap contributes to the early stage of thrombus organization. From a comprehensive analysis of thrombi and atheromatous plaques, we found several molecules that are targets for new diagnostic imaging of coronary high-risk plaques. Inhibition of coagulation factor XI confirmed a significant antithrombotic effect with a slight risk of bleeding, suggesting the anti-factor XI compound would be possible candidate for a novel and safer antithrombotic drug.

研究分野：病理学

キーワード：アテローム血栓症

## 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、わが国の死因の4分の1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、その有効性はまだ不十分で、その発症病態の解明と有効な予防・治療法の確立は、医療経済の観点からも急務の課題となっている。

発症の引金となるプラーク破綻は、脂質コアを覆う線維性被膜が、浸潤したマクロファージを主とした炎症細胞により菲薄化されて発生する。このため、これまでの研究の多くは、被膜菲薄化の分子機構や不安定プラークの画像評価に向けられてきた。しかし、近年 病理解剖の詳細な検討と血管画像診断法の進歩により、プラーク破綻は数多く存在すること、その多くは無症候性であることが明らかにされてきているが、イベント発症に繋がるプラークの性状ならびにその評価法についてはまだ確立していない。また現状の抗血栓薬・抗凝固薬は、出血性リスクの課題が残されている。

## 2. 研究の目的

アテローム血栓症の発症機序において、イベント発症に繋がるプラークの性状解析およびこれを評価し得る画像診断への展開を目的とする。また出血性リスクの少ない新たな抗血栓薬の開発にも貢献する。

## 3. 研究の方法

### 1) 冠動脈吸引血栓標本を用いた解析

急性心筋梗塞患者の責任冠動脈から吸引採取された血栓・プラークの病理組織標本を用いて、閉塞性血栓の形成部における凝固活性、血小板の粘着部位の構造、プラーク内低酸素状態および好中球細胞外トラップの関与について検討した。

### 2) ハイリスクプラークの新たな画像診断法への展開

冠動脈のMRI-T1強調画像において、高輝度を示すプラークはその後の心筋梗塞の頻度が高いことに注目し、病理解剖症例の冠動脈画像と病理組織を比較検討し、高輝度を示すプラークの組織性状を解析した。併せて頸動脈におけるハイリスクプラークの画像評価と病理像について頸動脈内膜切除標本を用いて検討した。さらにミトコンドリア膜透過性遷移孔の構成タンパクであるTranslocator protein (TSPO) が、マクロファージで高発現していることに着目し、ウサギ動脈硬化モデルを用いてPETイメージングによる評価を行った。

### 3) 新規抗凝固薬の血栓抑制評価

ウサギ血栓症モデルを用いて、活性化XI因子阻害低分子化合物の抗血栓作用と出血リスクを評価した。

## 4. 研究成果

### 1) 冠動脈吸引血栓標本を用いた解析

急性心筋梗塞症例の血栓はフィブリン形成が高度で、血栓形成部では凝固系が著しく亢進し

ていることが確認された。またプラーク破綻部では、血小板はコラーゲンよりもフォンビルブラン因子やフィブリンを足場に凝集していることを明らかにし、報告した。免疫染色の観察において、血栓に隣接するプラーク組織には組織因子とともに低酸素状態を示すマーカー（ヘキサキナーゼ II）が広範囲に陽性像を呈することを見出した。これを踏まえて血管壁細胞の培養系において、プラーク内の凝固系亢進には、プラーク内の低酸素と炎症性サイトカインの相互作用が重要であることを明らかにした。また好中球細胞外トラップは血栓形成よりも、血栓の初期の器質化に寄与していることを見出した。

## 2) ハイリスクプラークの新たな画像診断法への展開

冠動脈のMRI-T1強調画像における高輝度プラークは、プラーク内出血に伴うヘモジデリン沈着を反映していることを明らかにした。また頸動脈のハイリスクプラークにおいても同様にプラーク内出血がプラークの不安定化と血栓形成能に重要であること、MRI画像の定量的磁化率マッピング法によりプラーク内出血の定量化が可能となることを報告した。TSPOは動脈硬化症の動物モデルにおいて、プラーク中のマクロファージに高発現し、心筋組織では低発現であることを見出し、冠動脈プラークの描出に有用な画像診断手法となる可能性を報告した。さらにプラークと心筋組織の網羅的解析を行い、プラーク内のコリンがハイリスクプラークの非侵襲診断の新たな標的となる可能性を見出した。

## 3) 新規抗凝固薬の血栓抑制評価

ウサギ血栓症モデルにおいて、活性化XI因子阻害低分子化合物は、既存の活性化X因子阻害薬と同様の抗血栓作用を示し、出血リスクについては活性化X因子阻害薬よりも軽微であることを明らかにした。この結果は、活性化XI因子阻害物は安全性の高い新規の抗血栓薬の有効な候補となることを示すものである。現在、臨床試験が進められており、新たな抗血栓薬の可能性が期待できる。

## 5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計 14 件)

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

Maekawa K, Sugita C, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Furukoji E, Sakae T, Gi T, Hirai T, Asada Y. Higher lactate and purine metabolite levels in erythrocyte-rich fresh venous thrombus: Potential markers for early deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 2019 ;177:136-144. 査読有

Furukoji E, Yamashita A, Nakamura K, Hirai T, Asada Y. Podoplanin expression on endothelial cells promotes superficial erosive injury and thrombus formation in rat carotid artery: Implications for plaque erosion. *Thromb Res*. 2019;183:76-79. 査読有  
Azuma M, Maekawa K, Yamashita A, Yokogami K, Enzaki M, Khant ZA, Takeshima H, Asada Y, Wang Y, Hirai T. Characterization of carotid plaque components by quantitative susceptibility mapping. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2020;41:310-317. 査読有  
Asada Y, Yamashita A, Sato Y, Hatakeyama K. Pathophysiology of atherothrombosis: Mechanisms of thrombus formation on disrupted atherosclerotic plaques. *Pathol Int*. 2020;70:309-322. 査読有

Gi T, Kuroiwa Y, Yamashita A, Mizutani Y, Asanuma T, Miyati T, Maekawa K, Aman M, Imamura T, [Asada Y](#). High signal intensity on diffusion-weighted images reflects acute phase of deep vein thrombus. *Thromb Haemost.* 2020;120:1463-1473. 査読有

Yamashita A, Nishihira K, Gi T, Maekawa K, Hatakeyama K, Horiuchi S, Wada K, Shibata Y, [Asada Y](#). Pathological Features of Ruptured Coronary Plaque and Thrombus Interfaces: Fibrin and von Willebrand Factor as Platelet Scaffolds on Rupture Sites. *Thromb Haemost.* 2021;121:234-241. 査読有

Bao HL, Ishizuka T, Yamashita A, Furukoji E, [Asada Y](#), Xu Y. Improving thermodynamic stability and anticoagulant activity of a thrombin binding aptamer by incorporation of 8-trifluoromethyl-2'-deoxyguanosine. *J Med Chem.* 2021;64:711-718. 査読有

Nishimura M, Yamashita A, Matsuura Y, Okutsu J, Fukahori A, Hirata T, Nishizawa T, Ishii H, Maekawa K, Nakamura E, Kitamura K, Nakamura K, [Asada Y](#). Upregulated kynurenine pathway enzymes in aortic atherosclerotic aneurysm: macrophage kynureninase downregulates inflammation. *J Atheroscler Thromb.* 2021;28:1214-1240. 査読有

Koyama S, Yamashita A, Matsuura Y, Saito Y, Maekawa K, Gi T, Kitamura K, [Asada Y](#). Intracellular glutamine level determines vascular smooth muscle cell-derived thrombogenicity. *Atherosclerosis.* 2021;328:62-73. 査読有

Sugita C, Yamashita A, Tsutsumi S, Kai H, Sonoda T, Yoshida H, Yamamoto R, [Asada Y](#), Kurokawa M. Brazilian propolis (AF-08) inhibits collagen-induced platelet aggregation without affecting blood coagulation. *J Nat Med.* 2021;75:975-984. 査読有

Sawaguchi A, Kamimura T, Takahashi N, Yamashita A, [Asada Y](#), Imazato H, Aoyama F, Wakui A, Sato T, Chojookhuu N, Hishikawa Y. In situ strategy for biomedical target localization via nanogold nucleation and secondary growth. *Commun Biol.* 2021;4:710.

Maekawa K, Tsuji AB, Yamashita A, Sugyo A, Katoh C, Tang M, Nishihira K, Shibata Y, Koshimoto C, Zhang MR, Nishii R, Yoshinaga K, [Asada Y](#). Translocator protein imaging with <sup>18</sup>F-FEDAC-positron emission tomography in rabbit atherosclerosis and its presence in human coronary vulnerable plaques. *Atherosclerosis.* 2021;337:7-17. 査読有

Sasaki S, Nishihira K, Yamashita A, Fujii T, Onoue K, Saito Y, Hatakeyama K, Shibata Y, [Asada Y](#), Ohbayashi C. Involvement of enhanced expression of classical complement C1q in atherosclerosis progression and plaque instability: C1q as an indicator of clinical outcome. *PLoS One.* 2022;17:e0262413. 査読有

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Asada Y, Yamashita A, Sato Y, Hatakeyama K.	4. 巻 70
2. 論文標題 Pathophysiology of atherothrombosis: Mechanisms of thrombus formation on disrupted atherosclerotic plaques.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 309-322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12921.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gi T, Kuroiwa Y, Yamashita A, Mizutani Y, Asanuma T, Miyati T, Maekawa K, Aman M, Imamura T, Asada Y.	4. 巻 120
2. 論文標題 High signal intensity on diffusion-weighted images reflects acute phase of deep vein thrombus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 1463-1473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0040-1714280.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita A, Nishihira K, Gi T, Maekawa K, Hatakeyama K, Horiuchi S, Wada K, Shibata Y, Asada Y.	4. 巻 121
2. 論文標題 Pathological Features of Ruptured Coronary Plaque and Thrombus Interfaces: Fibrin and von Willebrand Factor as Platelet Scaffolds on Rupture Sites.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 234-241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0040-1716539.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bao HL, Ishizuka T, Yamashita A, Furukoji E, Asada Y, Xu Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Improving thermodynamic stability and anticoagulant activity of a thrombin binding aptamer by incorporation of 8-trifluoromethyl-2'-deoxyguanosine.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Med Chem	6. 最初と最後の頁 711-718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.0c01711.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura M, Yamashita A, Matsuura Y, Okutsu J, Fukahori A, Hirata T, Nishizawa T, Ishii H, Maekawa K, Nakamura E, Kitamura K, Nakamura K, Asada Y.	4. 巻 0
2. 論文標題 Upregulated kynurenine pathway enzymes in aortic atherosclerotic aneurysm: macrophage kynureninase downregulates inflammation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.58248.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Azuma M, Maekawa K, Yamashita A, Yokogami K, Enzaki M, Khant ZA, Takeshima H, Asada Y, Wang Y, Hirai T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Characterization of Carotid Plaque Components by Quantitative Susceptibility Mapping.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AJNR Am J Neuroradiol	6. 最初と最後の頁 310-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3174/ajnr.A6374.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuroiwa Y, Uchida A, Yamashita A, Miyati T, Maekawa K, Gi T, Noguchi T, Yasuda S, Imamura T, Asada Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Coronary high-signal-intensity plaques on T(1)-weighted magnetic resonance imaging reflect intraplaque hemorrhage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovasc Pathol	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carpath.2019.01.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maekawa K, Sugita C, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Furukoji E, Sakae T, Gi T, Hirai T, Asada Y.	4. 巻 177
2. 論文標題 Higher lactate and purine metabolite levels in erythrocyte-rich fresh venous thrombus: Potential markers for early deep vein thrombosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thromb Res	6. 最初と最後の頁 136-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2019.03.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nakamura E, Yamashita A, Maekawa K, Saito Y, Komohara Y, Asada Y
2. 発表標題 Identifying metabolic biomarker of unstable plaque toward coronary artery imaging.
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita A, Nishihira K, Maekawa K, Gi T, Saki Horiuchi, Hatakeyama K, Shibata Y, Asada Y.
2. 発表標題 Contribution of fibrin and von Willebrand factor to platelet adhesion on ruptured atherosclerotic plaque in acute myocardial infarction.
3. 学会等名 28th Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oguri N, Yamashita A, Okawa H, Kouyama S, Asada Y.
2. 発表標題 ONO-1600586, an oral direct factor XIa inhibitor, suppresses thrombus formation in rabbit jugular vein without bleeding tendency.
3. 学会等名 28th Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 篤、浅田祐士郎
2. 発表標題 動脈硬化性血栓の形成機序
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 篤、浅田祐士郎
2. 発表標題 血管病理と心血管イメージング：プラーク代謝とイメージング
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 篤、浅田祐士郎
2. 発表標題 冠動脈の血栓形成能評価に繋がる血管代謝イメージング
3. 学会等名 第29回日本心血管画像動態学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/pathophysiology/">http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/pathophysiology/</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前川 和也  (Maekawa Kazuya)  (30754171)	宮崎大学・医学部・助教    (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 勇一郎  (Sato Yuichiro)  (90347055)	宮崎大学・医学部・准教授    (17601)	
研究分担者	山下 篤  (Yamashita Atsushi)  (90372797)	宮崎大学・医学部・准教授    (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関