

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590741

研究課題名（和文） 深部静脈血栓塞栓症の分子病理学的研究の確立とその法医学への応用

研究課題名（英文） Establishment of molecular pathological study on deep vein thrombosis and its application for 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

研究成果の概要（和文）：野生型マウスを用いて下大静脈結紮による深部静脈血栓塞栓症モデル作成し、血栓とともに採取した下大静脈のパラフィン包埋切片について、病理組織学的及び免疫組織化学的染色を行った。その結果から血栓中の白血球や凝固・線溶系因子等の動態を明らかにし、血栓の陳旧度判定に有用な指標を検索した。さらに深部静脈血栓塞栓症の予防及び治療方法開発のために、IFN- γ 遺伝子欠損マウスを用いた研究を行い、IFN- γ の血栓溶解における役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The histopathological and immunohistochemical examinations were performed on venous thrombi, which developed in the ligation of the inferior vena cava to obtain the index of the thrombus age determination. For example, the ratio of neutrophils and macrophages, appearance of neovessels and the harmonization of uPA, tPA and PAI-1 on the thrombi were useful indices for thrombus age determination. Furthermore, we found that IFN- γ may be a novel molecular target to prevent intravenous thrombus development in patients with high risk factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医病理学、深部静脈血栓塞栓症、血栓陳旧度

1. 研究開始当初の背景

急性肺動脈血栓塞栓症は欧米に多い疾患とされるが、我が国においても食生活の欧米化、高齢者の増加、本疾患に対する認識および各種診断法の向上に伴い、最近増加している救急疾患であり、報道を通してエコノミクス症候群として注目されるようになった。我が国では、年間 4000 例以上の肺動脈血栓塞栓症の報告があり、その数は年々増加

傾向にある。死亡率は 10～30%であるが、それらの多くが発症直後に突然死をきたすことから、法医学領域においても重要な疾患のひとつである。肺動脈血栓塞栓症の 95%以上が、下肢の深部静脈もしくは骨盤内の静脈からの血栓に由来し、その原因は肥満・薬剤・外傷・妊娠・悪性腫瘍・高齢・長期臥床などである。しかし深部静脈血栓塞栓の発症機序については、いまだ解明されていない点

が多い。

また慢性化した血栓塞栓症では、血栓が器質化して広範囲な肺動脈の閉塞が生じた場合は、症状に乏しいため診断が遅れ、剖検時にはじめて血栓塞栓症であったことが判明することがある。さらに剖検時に肺動脈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、その血栓陳旧度の判定が求められる場合もある。しかしこれまでに報告されている静脈血栓についての研究では、法医学的に必要な血栓の陳旧度判定に関する報告は極めて少なく、血栓の陳旧度を推定するための、有用な組織学および分子生物学的指標は確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

血栓の形成時期の判定結果は、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である。そこで、本研究では血栓形成の分子メカニズムを解明するとともに、いくつかの **key molecule** を見つけ出し、血栓陳旧度の判定を試みる。

(1) 深部静脈血栓塞栓症モデルにおける組織学的・免疫組織学的検索、サイトカイン・ケモカインについての病態生理学的検討を行い、これらの機能と動態を解明し、血栓陳旧度推定法の確立を目指す。

(2) 静脈血栓塞栓症に関わるサイトカイン・ケモカインの動態を遺伝子及びタンパク質レベルで検索し、血栓の発症時期を推定する方法の開発と法医実務への応用の可能性を検討する。

(3) 法医実務的検討としては、法医剖検例より血栓を収集して、マウスによる動物実験で得られた結果に基づき、血栓の陳旧度を推定する方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) マウス深部静脈血栓塞栓症モデル

Balb/c (野生型, 8~10 週齢, 雄) を用い、ペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔下にて開腹し、下大静脈を 3-0 絹縫合糸により結紮した。結紮後 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 日目に安楽死させ、下大静脈を採取する。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した。また、下大静脈結紮 5, 10, 14 日後に各 5 匹を安楽死させて血栓を採取し、血栓の重量および長さを測定した後、 -80°C にて保存した。

(2) 深部静脈血栓塞栓症モデルについてヘマトキシリン・エオジン染色により、血栓の形態学的変化の観察を行った。血栓内のコラーゲンの定量評価やヘモジデリン陽性細胞の検出のためにマッソン・トリクローム染色やベルリン・ブルー染色を行った。

さらに好中球, マクロファージ, uPA, tPA,

PAI-1, MMP-2, MMP-9 それぞれに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学的染色像について、各分子の局在を検索するとともに、半定量的評価を行った。また CD31 に対する抗体を用いた免疫組織化学的染色像からは、血栓内に形成された新生血管を検出した。これらの結果と下大静脈結紮日数との関連性を明らかにした。

冷凍保存した血栓試料から total RNA を抽出し逆転写を行い、得られた cDNA について、サイトカイン・ケモカイン、凝固・線溶系に関連する因子及び β -actin についての特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を用いた定量的 PCR による解析を行った。

(3) 血栓発症からの経過時間 (血栓の陳旧度) を推定する方法の確立

以上の実験結果に基づき、下大静脈結紮時間と血栓質量との関連性、および血栓形成過程における分子病理学的変化との関連を明らかにした。

(4) 遺伝子欠損マウスを用いた基礎的実験

以上の野生型マウスを用いた基礎的実験結果に基づき、深部静脈血栓塞栓症の発症及び血栓形成過程において、より変化を認めたサイトカイン・ケモカインについて、その遺伝子欠損マウスを用いて、深部静脈血栓塞栓症モデルを作成し、野生型マウスにおける結果と比較・検討した。

さらに、野生型マウスの下大静脈結紮した後、各分子に対する中和抗体を投与し、血栓の形成や溶解にどのような影響があるかを明らかにした。

(5) 肺血栓塞栓症ヒト剖検試料との関連性—実務への応用の可能性についての検討

当教室で行われる法医解剖において、肺血栓塞栓症が疑われる事例について血栓を採取し、組織標本についてヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン・トリクローム染色、ベルリン・ブルー染色及び免疫組織化学的染色を行った。これらの結果を評価し、法医実務において、本法による血栓形成時期推定についての有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) 深部静脈血栓塞栓症血栓塞栓症モデル

マウス下大静脈を結紮することにより、結紮後 1 日目から 21 日目までの、陳旧度の異なる血栓を得ることが可能となった (図 1)。

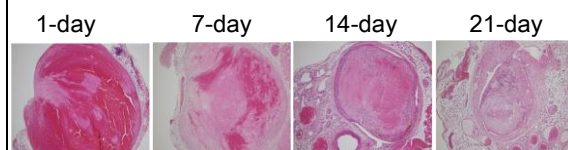


図 1 深部静脈血栓塞栓症モデルにおける下大静脈血栓のヘマトキシリン・エオジン染色像 ($\times 100$)

(2) 血栓陳旧度と血栓中の白血球の動態

組織像では IVC 結紮後 7 日目には線維化が認められ、14 日後には血栓内に血流の再開通を示唆する新生血管を検出した。血栓内の白血球について、好中球は結紮後 1 日目に最も多く、その後徐々に減少した。一方マクロファージは結紮 7 日後に最大となり、その後減少した。好中球数/マクロファージ数 (N/M) 比は、1 日目では 4.0 以上、5 日目では 1.1 ± 0.1 、7 日目以降では 1.0 未満であった (図 2, 表 1)。

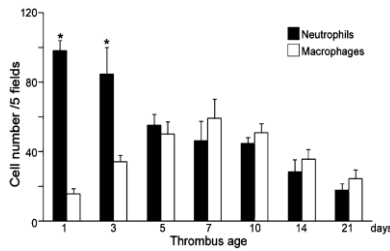


図2 血栓陳旧度にもなう血栓中の好中球・マクロファージ数の変化

表1 血栓陳旧度と N/M 比の関係

Age of thrombus	N/M ratio Mean±SEM (range)
1 day	6.8±1.1 (4.8-9.0)
3 days	2.5±0.4 (1.7-4.2)
5 days	1.1±0.1 (0.8-1.4)
7 days	0.9±0.2 (0.2-1.3)
10 days	0.9±0.1 (0.8-1.0)
14 days	0.9±0.1 (0.2-1.3)
21 days	0.8±0.3 (0.2-1.4)

(3) 血栓陳旧度にもなう器質的变化

IVC 結紮後 3 日目までの血栓は大部分を赤血球が占めており、コラーゲン含量はほとんど認められなかった。5 日目ではコラーゲン含量は血栓の面積の約 20% を占め、血栓陳旧度とともに増加し、21 日目には 80% 以上に達した。またヘモジデリン陽性細胞は 3 日目に 5 例中 1 例に、5 日目以降では全ての血栓で認められ、その数は血栓陳旧度とともに増加した。血栓内の新生血管数については CD31 陽性所見に基づいて判断したところ、5 日目に 5 例中 1 例に出現し、7 日目で 4 例に、10 日目以降では全例に認められた。α-smooth muscle actin 陽性である myofibroblast は 7 日目では 5 例中 3 例に、10 日目以降では全例に認められた (表 2)。

表2 血栓陳旧度に伴う血栓の器質的变化

Parameter	Earliest appearances (appearance ratio)	Constant appearances
Hemosiderin-positive cells	3 days (1/5)	5 days
Intrathrombotic neovessels	5 days (1/5)	10 days
Myofibroblasts	7 days (3/5)	10 days

(4) 血栓中の MMP-2 と MMP-9 の動態

免疫組織化学的染色像から計測した

MMP-2 または MMP-9 陽性細胞数は、血栓陳旧度にもなう減少する傾向を認めた。さらに両者の比を求めたところ、7 日目以降では 2.0 未満を示すことが明らかになった (図 3)。

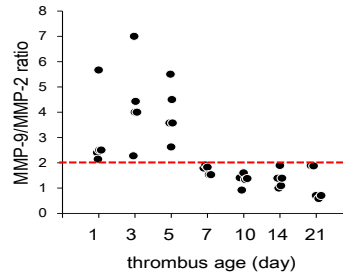


図3 血栓陳旧度にもなう MMP-2/MMP-9 の変化

(5) 血栓凝固・線溶系に関わる因子の動態

uPA, tPA, PAI-1 それぞれの陽性細胞を計測し比を求めたところ、uPA/PAI-1 は 7 日目までは 0.15 未満、10 日以降で 0.15 以上を tPA/PAI-1 は 7 日目までは 0.2 未満、10 日以降で 0.2 以上を示した (図 4)。これらの結果は、血栓内の新生血管の出現や血栓内の myofibroblast の出現とも相関していた。

また IVC 組織血流量は IVC 結紮後、時間経過とともに増加しており、血栓溶解に伴う血流量の回復を示した。以上より血栓内の uPA, tPA, PAI-1 の動態は、剖検例においても血栓の陳旧度判定に有用な指標となり得ると考えられた。

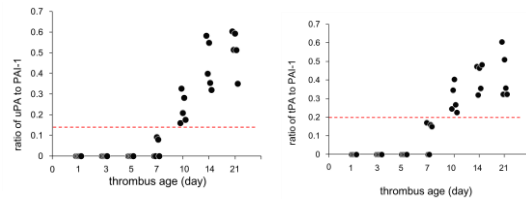


図4 血栓陳旧度にもなう uPA/PAI-1 (左), tPA/PAI-1 (右) の変化

(6) IFN-γ の血栓溶解における役割

次に、野生型マウスと IFN-γ 遺伝子欠損 (*Ifng*^{-/-}) マウスを用いて深部静脈血栓症モデルを作成し、IFN-γ の欠損が血栓溶解に及ぼす影響を明らかにするとともに、その機序の解明を試みた。

野生型マウスの血栓では、下大静脈結紮後の時間経過に伴い、IFN-γ の遺伝子発現及び IFN-γ タンパク量が増加した。また免疫蛍光二重染色の結果、F4/80 陽性マクロファージが IFN-γ 産生細胞であった (図 5)

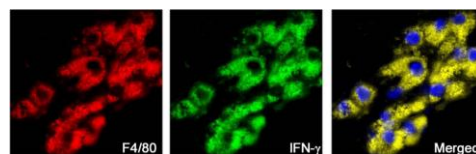


図5 血栓の F4/80 及び IFN-γ の免疫蛍光二重染色像

野生型マウスと *Ifng*^{-/-}マウスの血栓を計測し、thrombus mass を求めたところ、5日から14日目までの間、野生型マウスではほとんど変化しなかったが、*Ifng*^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して有意に減少した（図6）。

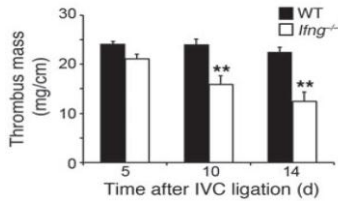


図6 野生型マウスと *Ifng*^{-/-}マウスの Thrombus mass の変化

血栓のマッソン・トリクローム染色像より、野生型マウスと比較して *Ifng*^{-/-}マウスでは繊維化の程度が低下し、血栓中のハイドロキシプロリン含量も野生型マウスと比較して有意に低値を示した。

野生型マウスの傾向は、*Ifng*^{-/-}マウスにも共通しており、血栓内の好中球とマクロファージ数の変化は野生型と *Ifng*^{-/-}マウスの間に有意な差を認めなかった。

血栓における MMP-2 と MMP-9 の遺伝子発現と酵素活性を調べたところ、MMP-9 については遺伝子発現、酵素活性のいずれも、野生型マウスでは、時間経過とともに低下するのに対して、*Ifng*^{-/-}マウスでは結紮からの時間が経過してもほとんど変化を認めず、野生型マウスと比較して高値を示した（図7、図8）。

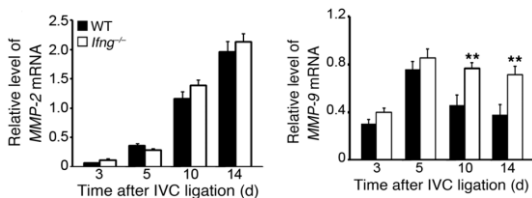


図7 血栓中の *Mmp2* と *Mmp9* の遺伝子発現の変化

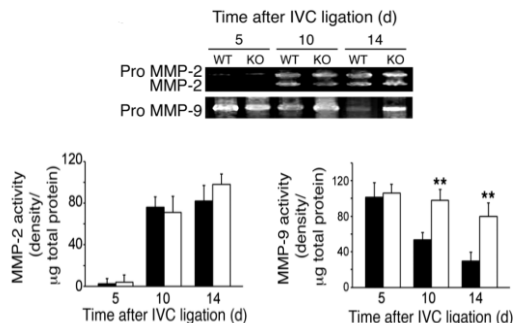


図8 血栓中の MMP-2 と MMP-9 の酵素活性の変化

MMP-9 の主な産生細胞は、免疫蛍光二重染色の結果、F4/80 陽性マクロファージであ

ることが分かった（図9）。免疫組織化学的検索により、血栓内の MMP-9 陽性細胞数の変化は、先に示した遺伝子発現及び酵素活性の結果と同様の傾向を示した。以上の理由としては、IFN- γ /Stat1 シグナルが MMP-9 の転写を抑えていることが考えられるが、実際に、野生型マウスの血栓の F4/80 陽性マクロファージには、Stat1 のリン酸化が認められたが、*Ifng*^{-/-}マウスの血栓には認められなかった。

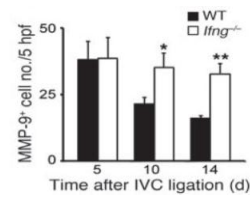
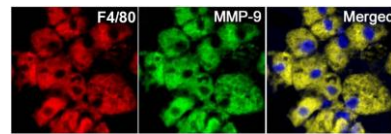


図9 F4/80 と MMP-9 の免疫蛍光二重染色像と血栓中の MMP-9 陽性細胞数の変化

Ifng^{-/-}マウスでは、結紮後10日と14日目に野生型マウスよりも有意に、新生血管が増加し（図10）、VEGF の遺伝子発現も、野生型マウスと比較して、*Ifng*^{-/-}マウスで有意に増強された。また免疫蛍光二重染色により、VEGF の主な発現細胞も、F4/80 陽性マクロファージであることが分かった（図11）。

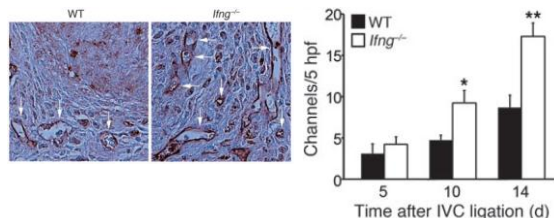


図10 血栓の新生血管の免疫染色像と血栓内新生血管数の変化

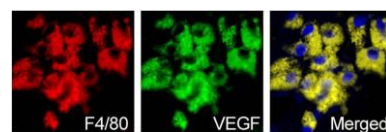
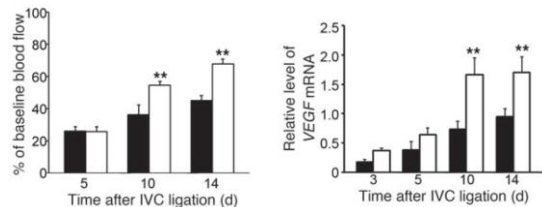


図11 下大静脈血流量の変化と、血栓における *Vegf* 遺伝子発現量の変化、F4/80 と VEGF の免疫蛍光二重染色像

以上の結果をもとに、野生型マウスについて下大静脈結紮後、4, 8, 12 日目に IFN- γ 中和抗体を投与して、14 日目に血栓を採取した。IFN- γ の中和抗体を投与すると、thrombus mass が有意に減少し、血栓中のハイドロキシプロリンも減少することが明らかになった (図 12)。

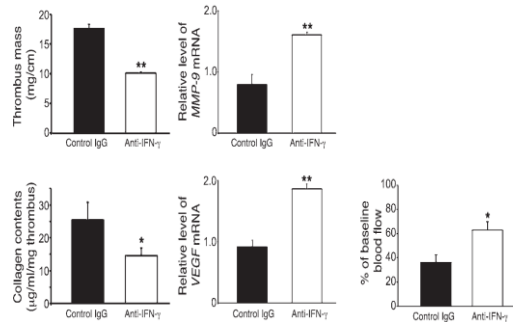


図 12 IFN- γ 中和抗体の投与が及ぼす血栓溶解過程への影響

下大静脈結紮による深部静脈血栓塞栓症モデルにおいて、野生型マウスに比較して、*Ifng*^{-/-}マウスでは、MMP-9 や VEGF の発現が高まり、その結果、血栓の溶解が促進されました。また野生型マウスに IFN- γ 中和抗体を投与することにより、*Ifng*^{-/-}マウスと同様、血栓の溶解を促進することができた。これらの結果は、これらの結果は、IFN- γ の欠損が深部静脈血栓溶解を促進することを明らかにするとともに、新たな血栓治療法の開発につながる可能性が示唆されるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical detection of uPA, tPA, and PAI-1 in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age estimation. *Int J Legal Med*, 査読有, 126: 2012, pp421-425, DOI: 10.1007/s00414-012-0680-z
- ② Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest*, 査読有, 121(7), 2011, pp2911-2920, DOI: 10.1172/JCI40782
- ③ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kondo

T. Immunohistochemical detection of MMP-2 and MMP-9 in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age estimation. *Int J Legal Med*, 査読有, 124(5), 2010, pp439-44, DOI: 10.1007/s00414-010-0484-y

- ④ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Time-dependent organic changes of intravenous thrombi in stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age determination. *Forensic Sci Int*, 査読有, 195(1-3), 2010, pp143-7, DOI: 10.1016/j.forsciint.2009.12.008
- ⑤ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Time-dependent appearance of intrathrombus neutrophils and macrophages in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age determination. *Int J Legal Med.*, 査読有, 123(3), 2009, pp235-240, DOI: 10.1007/s00414-009-0324-0

[学会発表] (計 15 件)

- ① 近藤稔和, 石田裕子, 野坂みずほ, 木村章彦, 国中由美, 向田直史. 深部静脈血溶解における IFN- γ の病態生理学的役割. 第 41 回日本創傷治療学会. 2011 年 12 月 6 日, 名古屋市
- ② Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Role of TNF-Rp55 on murine deep vein thrombosis model. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 千葉市, 2011.11.29
- ③ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical detection of uPA, tPA and PAI-1 in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age determination. 8th International Symposium Advances in Legal Medicine. September 27, 2011, Frankfurt/Main, Germany
- ④ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kawaguchi M, Ohata S, Kondo T. Immunohistochemical detection of harmonization of uPA, tPA and PAI-1 within experimental thrombi and its application to thrombus age determination. The 19th Triennial Meeting of the International Association of Forensic Science. September 15, 2011, Funchal, Portugal
- ⑤ 野坂みずほ, 石田裕子, 木村章彦, 近藤

- 稔和. 深部静脈血栓症モデルにおける血栓の病態生理学的変化とその血栓陳旧度判定への応用 (第2報). 第95次日本法医学会学術全国集会. 2011年6月16日, 福島市
- ⑥ 石田裕子, 野坂みずほ, 木村章彦, 國中由美, 向田直史, 近藤稔和. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. 第32回日本炎症・再生医学会. 2011年6月3日, 京都市
- ⑦ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. Experimental Biology 2011. April 11, 2011, Washington, DC, USA
- ⑧ Kondo T, Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Kawaguchi M. Immunohistochemical detection of MMP-2 and MMP-9 in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age estimation. 89th Annual Meeting of the German Society of Legal Medicine 2010. September 25, 2010, Berlin, Germany
- ⑨ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression., 14th International Congress of Immunology. August 24, 2010, Kobe
- ⑩ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2010. May 20, 2010, Kumamoto
- ⑪ Kondo T, Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kimura A, Mukaida N. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. 第39回日本免疫学会総会・学術集. 2009年12月2日, 大阪市
- ⑫ Kondo T, Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. Tri-Society Annual Conference 2009 of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research. October 21, 2009, Lisbon, Portugal
- ⑬ Kondo T, Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kawaguchi M. Time-dependent organic changes of intravenous thrombi in stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age determination. 88th Annual Meeting of the German Society of Legal Medicine 2009. September 3, 2009, Basel, Swiss
- ⑭ Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Forensic pathological study on thrombus age determination-The second report. XXI Congress of the International Academy of Legal Medicine. May 29, 2009, Lisbon, Portugal
- ⑮ 野坂みずほ, 石田裕子, 木村章彦, 近藤稔和: 深部静脈血栓症モデルにおける血栓の病態生理学的変化とその血栓陳旧度判定への応用. 第93次日本法医学会総会. 2009年5月14日, 豊中市

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

(3)連携研究者

()

研究者番号: