

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591822

研究課題名(和文)動物モデルを用いた静脈血栓塞栓症の診断と治療

研究課題名(英文)Development of the diagnosis and treatment of venous thromboembolism using animal model

研究代表者

田村 正三 (Tamura, Shozo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60150439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、種々の性状の静脈血栓を遺伝子導入にてラット下大静脈に作成し、質的診断を行った上で、血栓溶解剤等での効果を検討することを目的としている。

遺伝子組換えアデノウイルスの作製後、生体内外での評価を行った。生体内ではSDラットの下大静脈を露出し、同部に対して組換えアデノウイルスを用いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入の後、結紮下で下大静脈に形成される静脈血栓の質的評価を行った。この結果、血栓溶解を組み合わせた評価が期待され、今後は画像評価、薬剤との関連検討を更に進める予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine the effects of the thrombolytic agents to various types of thrombosis in rat inferior vena cava (IVC). We exposed rat IVC and performed gene transfer using recombinant adenovirus. After gene transfer, venous thrombosis was induced by ligation of the IVC, and evaluated the antithrombotic effects of the thrombolytic agents. As a result, it was expected that we could evaluate the association between venous thrombosis and thrombolytic agents in this animal model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：深部静脈血栓症 遺伝子導入 ラット

1. 研究開始当初の背景

静脈血栓塞栓症において、血管内治療による早期の静脈血栓除去、血栓溶解は、治療後の QOL 改善のため重要である。しかし、その治療効果には症例により差がみられ、血栓の増大や副作用により治療困難となった例も存在する。これは血栓形成からの期間、性状（器質化の程度）が大きな要因であり、血栓の性状に合わせた治療法の選択が必要である。これまでに我々は、遺伝子導入手技を用いた局所血管壁での血栓形成の検討、および画像診断を用いた動物モデルでの静脈血栓の評価をおこなった。本研究ではこれらの検討を治療に結びつけることを目的とする。すなわち、動物モデルで作成した様々な性状の静脈血栓を MRI 等の画像診断にて評価した後、各性状における血栓溶解剤等の薬剤の効果を検討するものであり、静脈血栓塞栓症の有用な治療法を確立するものである。

静脈血栓症の重要性が認識され、種々の予防がおこなわれているが、静脈血栓症の発症数は依然として多く、治療対象も多い。静脈血栓の治療においては、状況に応じて血栓溶解剤の使用も行われているが、血栓の性状によっては十分な治療効果が得られない場合も多い。また、血栓溶解剤を使用しない例でも血栓の消失する例も認められ、実際の臨床現場においては個々の症例ごとに、血栓吸引との組み合わせや、薬剤の変更、保存的観察など、静脈血栓の形成時期や性状にあわせた治療法の検討が必要である。

今回の研究では、種々の性状の静脈血栓をラットに作成し、画像診断での血栓の質的診断を行った上で、血栓溶解剤等での効果を検討することを目的とする。これまでの静脈血栓の実験モデル作成は静脈結紮や異物留置などで行われているが、画像診断の後に引き続き、血栓溶解剤の投与と実験が行える状況までは作成困難であった。遺伝子導入法は結紮や異物を残すことなく数種類の性状の静脈血栓を作成することが可能であり、経時的な画像診断、治療効果を検討することが可能である。

使用する遺伝子は podoplanin を用いる。podoplanin は膜蛋白であり、血小板上に発現している CLEC-2(c-type lectin-like receptor 2)と結合することにより、血小板凝集を惹起するといわれている。さらに最近の研究では、動脈硬化性病変など血管壁の異常状況においては podoplanin が過剰発現しており、これが血栓形成を引き起こすことが示されてきている。本研究では、静脈壁に podoplanin を過剰発現させることにより、局所静脈での血小板凝集、血栓形成を惹起するものである。遺伝子導入法では、動物に繰り返し処置を加えることなく、これまでの動物実験では困難であった種々の性状の静脈血栓症モデルの作成が可能と考えられる。

2. 研究の目的

これまでに我々は、動物モデルに対し、遺伝子導入法による血栓の検討、および画像診断を用いた血栓の質的評価をおこなった。動物モデルでは、血管壁に組換えアデノウイルスを用いた一回の局所遺伝子導入により、全身の凝固系には影響することなく、目的の血管壁において目的の蛋白が発現可能であり、強力な酵素活性が持続的に見られることを報告した。また、ウサギの頸静脈モデルを用いて画像診断での静脈血栓の質的診断の可能性を報告した。これらの結果を踏まえ、遺伝子導入法を用い種々の性状の静脈血栓モデルを作成し、まずはその質的診断(血栓量、器質化の有無、程度)を画像診断にて行う。さらに、静脈血栓モデルごとに抗凝固剤、血栓溶解剤投与を行い、血栓の性状によるこれらの薬剤の反応を明らかにする。

静脈血栓モデルの作成には、静脈結紮や異物留置、血管外から障害などの方法が用いられているが、血栓の性状をコントロールすることが難しく、また、その後の連続した薬剤投与と実験には不向きである。遺伝子導入を用いた静脈モデルでは、遺伝子の種類や type、投与量をコントロールすることにより、血小板や血球成分の量、器質化の程度などを変えて作成することが可能と考えられる。

そこで、今回の研究では、

- (1) podoplanin 遺伝子を組換えアデノウイルスベクターを作製し、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) 次に実験動物の静脈壁に遺伝子導入し、生体内での血栓量、性状を画像診断、組織学的、分子生物学的に検討する。
- (3) 上記の動物静脈血栓モデルを用い、血栓の性状差による抗凝固剤、血栓溶解剤への反応を検討する。

(予想される結果と意義)

- (1) これまでの研究結果から、遺伝子導入法により性状の異なる血栓を広い範囲で形成させることが可能と予想される。
- (2) 画像診断による静脈血栓の更なる質的検討が期待される。
- (3) 画像診断に合わせて、静脈血栓の治療が選択できることが可能となる。

局所遺伝子導入による種々の静脈血栓モデルの検討、画像診断での評価、および抗凝固剤、血栓溶解剤の検討を一連として行った報告は国内外においてまだなく、本研究はこの点において独創的と考える。

3. 研究の方法

平成 23 年度には、遺伝子組換えベクターの作成、in vitro での評価を行う。平成 24 年度には、SD ラットの 下大静脈に遺伝子導入を行い、遺伝子導入による静脈血栓形成の程度、性状の検討、および画像診断での評価を行う。平成 25 年度には、作成した種々の性状の静脈血栓モデルにおいて抗凝固剤、血栓溶解剤の投与をおこない、その効果を検討する。我々はこれまでに血栓形成に関する研究、報告を行ってきた。実験動物における種々の血管病変の作成、血栓形成の手技に関しては、我々の研究チーム、施設で確立された手技であり、本研究でもその手技を応用する。

「平成 23 年度」

(1) 遺伝子組換えベクターの作製

podoplanin の発現 plasmid および組換えアデノウイルスを作製する。この蛋白の cDNA を遺伝子ライブラリーより PCR 法にて作製し、その発現 plasmid を作製する。この Plasmid にはサイトメガロウイルスの初期プロモーターが組み込まれており、その末梢に目的蛋白の cDNA を入れ込むことにより、動物細胞内にて蛋白を強制発現させる plasmid を作製する。組換えアデノウイルスは、アデノウイルス遺伝子の E1、E3 領域を欠落させ、自己増殖能を欠落させたアデノウイルスに対し、上記の発現ベクターから切り出した遺伝子を入れ込むことにより作製する。

(2) 培養細胞への導入実験

作製した遺伝子組換えベクターによる遺伝子導入効率を培養細胞にて検討する。培養細胞には COS7 およびヒト血管壁内皮細胞を使用する。これらの細胞に対し、発現 plasmid および組換えアデノウイルスにて遺伝子を導入し、wild type および変異体の遺伝子導入効率、蛋白の発現、酵素活性を測定する。

「平成 24 年度」

動物実験モデルの作製、遺伝子導入、評価

SD ラットの 下大静脈を麻酔下で露出し、同部に対して遺伝子導入を行う。この手技の後、経時的に画像診断を施行し、静脈血栓の評価を行う。また、安楽死後、血管壁の蛋白量 (Western blot 法、免疫染色)、遺伝子発現量 (Northern blot、RT-PCR 法) および酵素活性と血栓形成 (光学顕微鏡、走査電子顕微鏡) を検討し、導入遺伝子による血栓形成を解析する。

「平成 25 年度」

動物実験モデルへの血栓溶解剤投与

上記の結果に基づき、SD ラットの 下大静脈に静脈血栓モデルを作成したのち、抗凝固剤、血栓溶解剤を投与する。血栓を画像診断および組織学的に観察し、血栓量や性状を検討する。

薬剤の投与量、投与期間を変えて検討する予定であり、安楽死後の評価を含め 1 実験につき約 2 か月を予定する。

4. 研究成果

本研究では、種々の性状の静脈血栓をラット 下大静脈で作成し、質的診断を行った上で、血栓溶解剤等での効果を検討することを目的とした。

本研究目的達成のため、初年度の平成 23 年度には静脈血栓を惹起させる蛋白をラット 下大静脈壁にて過剰発現させる目的で、組換えアデノウイルスの作成、生体外での評価を行った。

組換えアデノウイルスはサイトメガロウイルスの初期プロモーターの末梢に podoplanin 蛋白の cDNA を入れ込んだ状態で作成した。培養細胞を用いたこの組換えアデノウイルスの検討では、目的蛋白の発現を確認し、血小板凝集反応でも目的とした蛋白機能発現を確認した。

平成 24 年から 25 年度にはこの生体外での実験結果および実験計画に基づき、ラットでの静脈血栓モデル作製、血栓評価を行った。

まず、SD ラットの 下大静脈を麻酔下で露出・結紮することにより、静脈血栓モデルの作製を行った。腎静脈下での 下大静脈結紮にて 2 日後には閉塞性静脈血栓が一定して形成されることを確認した (図 1)。

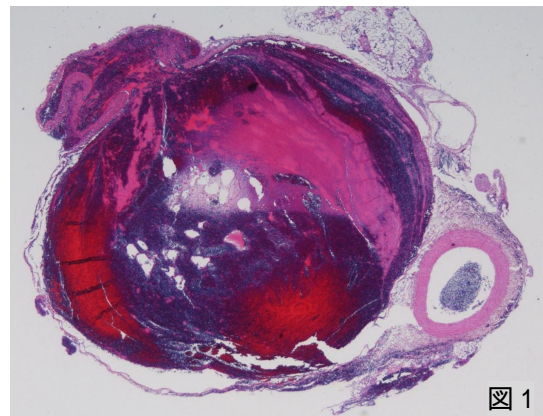


図 1

血栓は腎静脈下の結紮直下で最も大きく、結紮部から尾側へ距離が離れるに従って 下大静脈の血栓量は減少した (図 2)。

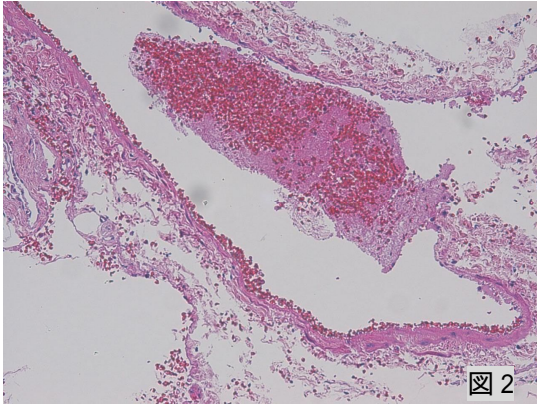


図 2

この結果をふまえ、ラット静脈壁に対し組換えアデノウイルスによる遺伝子導入を行い、血栓の性状を変化させることを検討した。ラット下大静脈の結紮時に podoplanin 遺伝子を組換えアデノウイルスを 30 分間投与・クランプし、静脈壁への遺伝子導入を行った。まず、遺伝子導入の効率を評価する目的で、静脈壁における蛋白発現を Western blot 法および免疫組織化学で評価した。この結果静脈壁において目的蛋白の発現を確認したため、遺伝子導入と結紮を組み合わせて血栓形成を起こさせることとした。当初遺伝子導入において血栓の性状が異なることが予想されたが、目的蛋白発現と予想される静脈血栓の性状との関連性が一定せず、結果を再検討することとした。まず、組換えアデノウイルスの力価を評価した。精製直後と比べ数ヶ月保存後には若干の力価低下を認めしたが、実験に影響をおよぼす程度の変化ではないと考えられた。しかし、ラット生体を用いた実験結果からは蛋白発現の低下（不均一さ）が予想されたため、培養細胞を用いて蛋白発現の再評価を行った。

培養細胞(COS 細胞)に遺伝子導入して精製直後と約 3 ヶ月-80 保存した後の組換えアデノウイルスを比較したところ、発現量の差に不均一であるが違いが見られることが判明した（蛋白発現細胞は茶色に染色。図 3：精製直後、図 4：-80 3 ヶ月保存）。

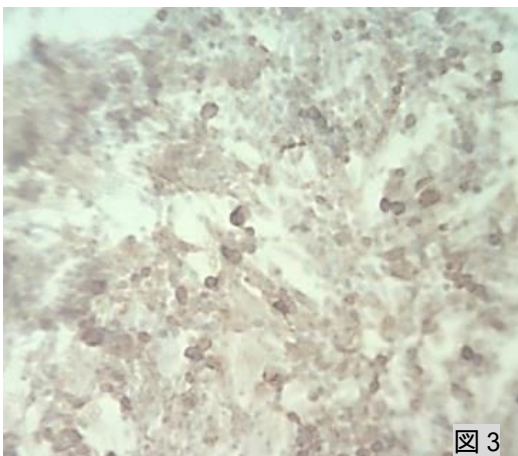


図 3

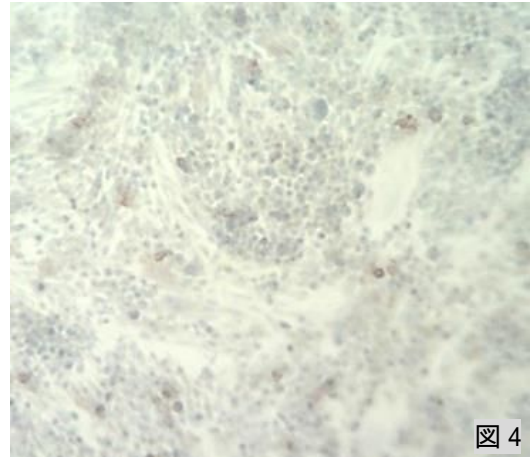


図 4

これまで他の蛋白を組換えアデノウイルスを使用した実験においては見られなかった現象であり、原因として蛋白の差異によるものや組換えアデノウイルスの状態、手技的要因（生体内では静脈を遮断する方法や枝の処理法等）なども少なからず影響していることが考えられた。遺伝子導入による蛋白発現および血栓形成の不安定さがある状態では、次の実験段階に影響があると考えられたため、画像診断実験に入る前に実験の再評価・修正が必要となった。修正では組換えアデノウイルスの精製頻度、評価を高め、目的蛋白発現が一定して得られる状態を確認することとした。

試行錯誤の結果、組換えアデノウイルスの精製の頻度、精製キットの変更、保存液中のウイルス濃度を変更等の修正後、ラット血管壁において podoplanin 蛋白の発現が一定して得られる状況を確認した。この状態における下大静脈結紮では血栓の内部性状が異なる状況が見られるようになった（図 5）。

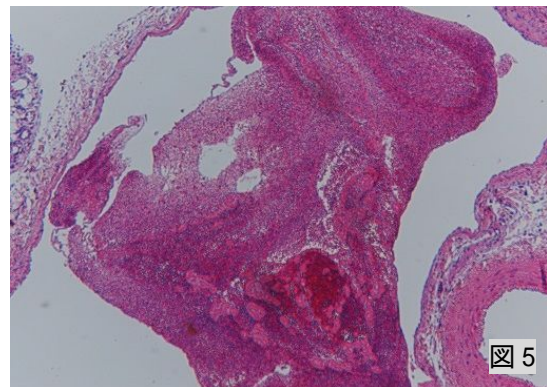
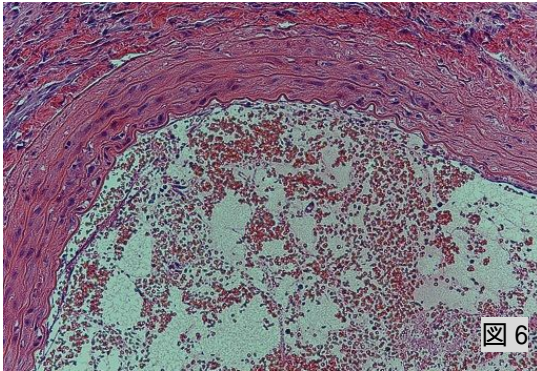


図 5

さらにこの後血栓溶解剤を使用し、血栓の縮小効果を評価したが（図 6）、組み換えアデノウイルスの安定状態が得られるまで予想外の期間を要したため、画像診断を組み合わせた十分な評価には至っていない。



しかし、実験計画期間内には遺伝子導入を併用してラット下大静脈に一定の性状の血栓が形成され、血栓溶解にて血栓縮小を確認し、実験の継続に必要な状況は得られている。今後は継続して画像診断、薬剤との関連検討を進める予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 正三 (TAMURA SHOZO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60150439

(2)研究分担者

矢野 貴徳 (YANO TAKANORI)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20315378

畠山 金太 (HATAKEYAMA KINTA)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：60325735

山下 篤 (YAMASHITA ATSUSHI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90372797

(3)連携研究者

該当なし