

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791139

研究課題名(和文)細胞接着分子による深部静脈血栓症制御機構の解析

研究課題名(英文)Regulation of deep vein thrombosis by adhesion molecules

研究代表者

桑野 嘉弘(KUWANO, Yoshihiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60625044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：好中球がローリング中に、ローリングの進行方向に長く伸びる構造(スリング)を形成していることを発見し、これにより、ずり応力の高い場合においても好中球が安定してローリングが可能となることが明らかになった。深部静脈血栓症においては、比較的ずり応力の高い血管内において炎症細胞浸潤が起きているため、スリング上の細胞接着分子の働きが深部静脈血栓症の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rolling neutrophils form very unique structure called "sling" at the front of rolling cells, and this structure stabilizes the rolling at high shear stresses. Our data suggest that the behavior of adhesion molecules on sling plays important role in deep vein thrombosis since the migration of inflammatory cells occurs at relatively high shear stresses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 皮膚科学

キーワード：深部静脈血栓症 炎症細胞浸潤 sling 細胞接着分子

## 1. 研究開始当初の背景

深部静脈血栓症 (deep venous thrombosis) は、急性あるいは慢性に、深部静脈に血栓を生じることにより、腫脹、疼痛、皮膚の色調変化を3大症候として生じる疾患で、急性のものは、腫脹、疼痛が急速に拡大し、場合によっては、静脈の高度還流障害に伴う動脈還流障害により静脈性壊死を来し、最終的には下肢切断に至ることもある。慢性のものは、静脈瘤、色素沈着や皮膚炎や皮膚潰瘍を生じることにより、患者のQOLを著しく障害する重大な疾患である。また、深部静脈血栓症により生じた血栓が剥離し、肺に到達する急性肺血栓塞栓症は最も重篤な病態であり、特に術後合併症として生じることが多いことや、エコノミークラス症候群として報道される機会も多く、社会的な認知度も高い。さらに本症は難治性疾患克服研究事業の対象疾患であるベッチェット病の主要な合併症でもある。

現在までに外科的血栓摘除術、血栓溶解療法や抗凝固療法といった治療が行われているが、合併症である肺血栓塞栓症が発症した場合の死亡率は依然14%と高率であり、新規治療法及び、新規予防法の開発が急務である。血栓溶解療法や抗凝固療法は強力な治療手段ではあるが、ともに出血傾向をもたらすという副作用があるため、薬剤の効果を強くすることにより治療効果を得ようとするには自ずと限界が生じてしまう。予防効果のための投薬ということであれば、この制限は更に強くなってしまふ。そのため、抗凝固療法とはまったく別のアプローチによる疾患コントロール方法が発見されれば、治療、予防法に飛躍的な発展をもたらす可能性が高い。現在まで、血栓形成、及び血栓進展には、血管内皮細胞や好中球、血小板の細胞接着分子、血流中の血小板由来微小粒子や組織因子の関与が示されている。一方、血栓形成後の溶解や退縮には各種サイトカインの関与が判明している。しかし、未だその詳細な発症メカニズム、特に、細胞接着分子を中心とした炎症細胞浸潤のメカニズムは詳細には解明されていない。

## 2. 研究の目的

細胞接着分子ノックアウトマウスと下大静脈の完全閉塞による深部静脈血栓症マウスモデルを組み合わせた実験系においては、深部静脈血栓症における細胞接着分子の役割がはっきりとしなかったため、深部静脈血栓症における炎症細胞浸潤、つまり比較的ずり応力の高い環境下における炎症細胞浸潤について、近年、新しく開発された観察法により詳細な検討を行った。

## 3. 研究の方法

骨髓から単離し、DiIで標識した好中球を6-10 dyn/cm<sup>2</sup>のずり応力下でローリングさせqDF法を用いてフットプリントを観察し、また、骨髓から単離した好中球をやはり、微小流体装置内で6-10 dyn/cm<sup>2</sup>のずり応力下でローリングさせ、ローリング中にグルタルアルデヒド及びパラホルムアルデヒドに液体を置換することにより、固定した。ローリング中に固定された好中球を走査型電子顕微鏡にて観察した。

## 4. 研究成果

qDF法を用いてフットプリントを観察したところ、細胞の進行方向前方に長い突起を形成していた。この突起はこれまでに発見されていなかったため、我々は"スリング(sling)"と命名した。次に、スリングを走査型電子顕微鏡写真においても確認した。走査型電子顕微鏡(SEM)の場合は、フットプリントではなく、細胞全体の構築を観察することが出来るが、やはり、細胞の進行方向前方に長い突起を形成していた。さらに、qDF法のフットプリントを観察することにより、細胞が前方にローリングすると、スリングが好中球に巻き込まれていくことが、示唆された。SEM法にて細胞全体を観察したところ、やはり好中球が前方にあるスリングを巻き込んでいる様子が観察された。qDF法はフットプリントのみの観察となるが、real timeに細胞の動きを追うことが可能で、SEM法はreal timeに追うことは出来ないが細胞の全体像を確認することができる。今回の観察によって、real timeに追った画像と、細胞の全体をみた画像の両方法において、スリングを細胞が巻き込んでいる姿を確認することができた。

更に好中球表面を蛍光抗体で標識し、intravital microscopyにて観察したところ、スリングはin vivoにおいても形成されることが明らかになった。更に、微小流体装置内の流速をいろいろと変更することにより、スリングは、高ずり応力下ではより多く、より長く形成されることも明らかになった。また、qDF法では、スリングが下床と接地している部位の輝度の変化からスリングに加わっている力を計算し、細胞がスリングの下床と結合している部位を乗り越えると、スリングがくの字型に曲がり、その部分に力が加わることが明らかとなった。

スリング上の接着分子の分布について検討するため、好中球を抗PSGL-1抗体で染色し、P-セレクチンでコートした微小流体装置内をローリングさせ、qDF法で観察することにより、スリングにおいてはその全長にパッチ状の分布でP-セレクチンが点在していることがわかった。さらにSEMでの観察を加えることにより、微絨毛の先端部分がスリング上

に小さな突起の様にぼつぼつと点在していることも明らかにした。こうした観察事実からは、ローリング中に細胞後方に形成されるテザーが作られる際に、一緒に複数の微絨毛が細胞表面から引き出され、その後、テザーが引き出された微絨毛ごと前方にスリングしてスリングとなり、そのため、引き出された微絨毛がそのまま小突起として残ったと考えられた。先端部の一点だけが下床と接し、その一点が離れてしまうと全体として結合が離れてしまうテザーと違い、複数の小突起上の PSGL-1 を介して、複数のポイントで下床とスリングは結合している。そのため、一カ所の結合が離れたとしても、その次にある結合ポイントがスリングと下床の結合を支えるため、スリングと下床の結合は保たれたままとなり、この機序により、スリングは非常に効果的に好中球のローリングを減速させることが出来ると考えられた。

深部静脈血栓症では、径の比較的大い血管内にて、炎症細胞浸潤が起きており、ズリ応力は高い環境にあることが予想される。そのため、深部静脈血栓症では炎症細胞表面にスリングの形成が起きており、PSGL-1 を始めとするスリング上の細胞接着分子が炎症細胞浸潤に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。また、従来からの深部静脈血栓症マウスモデルは血管を完全閉塞させ、血流が止まるため、スリングは形成されず、深部静脈血栓症における細胞接着分子の役割の解明のためには、血管を完全閉塞させないことにより、流速を高く保ち、スリングを形成することが可能なマウスモデルが必要とされる可能性が高いことが明らかとなった。

#### 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 17 件)

Sumida H, Asano Y, Hatano M, Aozasa N, Toyama T, Akamata K, Miyazaki M, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Noda S, Kuwano Y, Yanaba K, Sato S: Effect of ambrisentan on peripheral circulation in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol*. in press. 査読有

Akamata K, Asano Y, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S: Serum levels of mannose-binding lectin in systemic sclerosis: a possible contribution to the

initiation of skin sclerosis in the diffuse cutaneous subtype. *Eur J Dermatol*. 2014 Feb 1;24(1):123-5. doi: 10.1684/ejd.2013.2245. 査読有

Yanaba K, Asano Y, Akamata K, Noda S, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Toyama T, Ichimura Y, Sumida H, Kuwano Y, Miyazaki M, Sato S: Circulating galectin-1 concentrations in systemic sclerosis: potential contribution to digital vasculopathy. *Int J Rheum Dis*. 2014 Feb 11. doi: 10.1111/1756-185X.12288. 査読有

Ichimura Y, Asano Y, Akamata K, Takahashi T, Noda S, Taniguchi T, Toyama T, Aozasa N, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T: Fli1 deficiency contributes to the suppression of endothelial CXCL5 expression in systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res*. 2014 May;306(4):331-8. doi: 10.1007/s00403-013-1431-9. 査読有

Masui Y, Asano Y, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T: Serum resistin levels: a possible correlation with pulmonary vascular involvement in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int*. in press. 査読有

Taniguchi T, Asano Y, Tamaki Z, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sugita M, Sumida H, Kuwano Y, Miyazaki M, Yanaba K, Sato S: Histological features of localized scleroderma 'en coup de sabre': a study of 16 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. in press. 査読有

Ichimura Y, Asano Y, Akamata K, Aozasa N, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T: Serum Angiopoietin-like Protein 3 Levels: Possible Correlation with Progressive Skin Sclerosis, Digital Ulcers and Pulmonary Vascular Involvement in Patients with Systemic Sclerosis. *Acta Derm Venereol*. 94(2):157-62, 2014. 査読有

Kagami S, Kuwano Y, Shibata S, Uwajima Y, Yamada D, Miyamoto A, Miyagawa T, Araki M, Takahashi K, Isomura S,

Aozasa N, Masui Y, Yamamoto M, Inuzuka R, Katori T, Sato S: Propranolol is more effective than pulsed dye laser and cryosurgery for infantile hemangiomas. *Eur J Pediatr.* 172(11):1521-6, 2013. doi: 10.1007/s00431-013-2075-7. 査読有

Akamata K, Asano Y, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S: An inverse correlation of serum angiogenin levels with estimated glomerular filtration rate in systemic sclerosis patients with renal dysfunction. *Eur J Dermatol.* 23(2):269-70, 2013. doi: 10.1684/ejd.2013.1924. 査読有

桑野嘉弘: スリングは高張り応力下における好中球ローリングを可能にする. *実験医学* 31(3):433-436, 2013 査読無

Noda S, Asano Y, Takahashi T, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S: Decreased cathepsin V expression due to Fli1 deficiency contributes to the development of dermal fibrosis and proliferative vasculopathy in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 52(5):790-9, 2013. doi: 10.1093/rheumatology/kes379. 査読有

Noda S, Asano Y, Aozasa N, Akamata K, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S. Clinical significance of serum soluble Tie1 levels in patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res.* 305(4):325-31, 2013. doi: 10.1007/s00403-012-1307-4. 査読有

Yanaba K, Asano Y, Noda S, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S: Increased production of soluble inducible costimulator in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res.* 305(1):17-23, 2013. doi: 10.1007/s00403-012-1292-7. 査読有

Yanaba K, Asano Y, Noda S, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S:

Increased circulating fibrinogen-like protein 2 in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 32(1):43-7, 2013. doi: 10.1007/s10067-012-2089-y. 査読有

Yanaba K, Asano Y, Noda S, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S: Augmented production of soluble CD93 in patients with systemic sclerosis and clinical association with severity of skin sclerosis. *Br J Dermatol.* 167(3):542-7, 2012. 査読有

Sundd P, Gutierrez E, Koltsova EK, Kuwano Y, Fukuda S, Pospieszalska MK, Groisman A, Ley K: 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature.* 488(7411):399-403, 2012. doi: 10.1038/nature11248. 査読有

Sugaya M, Kuwano Y, Suga H, Miyagaki T, Ohmatsu H, Kadono T, Okochi H, Blauvelt A, Tamaki K, Sato S. Lymphatic dysfunction impairs antigen-specific immunization, but augments tissue swelling following contact with allergens. *J Invest Dermatol* 132(3 Pt 1):667-76, 2012. doi: 10.1038/jid.2011.349. 査読有

#### 〔学会発表〕(計 2件)

Kuwano Y, Adler M, Zhang H, Groisman A, Ley K: G $\alpha$ i2 and G $\alpha$ i3 differentially regulate arrest and chemotaxis in neutrophils. 15th International Congress of Immunology. August 22-27, 2013. Milan, Italy.

Kuwano Y, Nanko H, Kubo M, Sato S: Ultrasonographic features for the diagnosis of subcutaneous venous malformation. 第10回日独皮膚科学会 2012年11月14日、徳島.

#### 〔図書〕(計 1件)

Yoshihiro Kuwano, Wageningen Academic Publishers, Chapter 10: Alopecia areata and chemokine (Edited by V Preedy, Handbook of hair in health and disease, p199-216) 2012. 分担著

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/der/>

6 . 研究組織

桑野 嘉弘 (KUWANO Yoshihiro)

研究者番号 : 60625044