

令和元年9月5日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08670

研究課題名(和文) 動脈硬化性血栓症における内因系凝固因子の役割

研究課題名(英文) Role of intrinsic coagulation factors on atherothrombosis

研究代表者

山下 篤 (Yamashita, Atsushi)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90372797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動脈硬化性プラークにおける内因系凝固因子、外因系因子の活性化とその機能を検討し、動脈硬化性血栓の形成機序の解明を目的とした。破裂プラークには内因系因子の活性化因子であるコラーゲンやNETs (neutrophil extracellular trap) が少なく、外因系因子の組織因子が過剰に発現していた。その組織因子発現にトリプトファンのキヌレニン代謝酵素が作用していることを明らかにした。組織因子阻害物は動物モデルの血栓形成早期過程を抑制したが、血液凝固FXI因子阻害物は血栓形成に影響を与えなかった。今後、血栓の成長過程におけるFXIの作用を検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、動脈硬化性プラークにおける内因系凝固因子(FXI)、外因系因子(組織因子)の機能を検討し、動脈硬化性血栓の形成メカニズムの解明を目的としました。冠動脈の血栓性プラークには内因系因子の活性化因子が少なく、組織因子が過剰に発現していました。その組織因子発現にトリプトファンのキヌレニン代謝酵素が作用していることを明らかにしました。動物モデルの検討で、組織因子は血栓形成の早期に作用していましたが、血液凝固FXI因子はその作用は明確ではありませんでした。今後、血栓の成長過程におけるFXIの作用を検討する必要があります。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of intrinsic coagulation factors and extrinsic coagulation factor (TF: tissue factor) on atherothrombus formation. We found small amounts of collagenous matrix and neutrophil extracellular trap, activator of intrinsic factors, on ruptured coronary plaques. TF but not coagulation factor XI contributed mural thrombus formation in a rabbit model of plaque erosion. We found over expression of a tryptophan metabolic enzyme in thrombotic coronary plaques and its contribution of TF expression on activated macrophages. It is necessary to examine the role of intrinsic coagulation factors on thrombus growth on disrupted plaques.

研究分野：血栓症

キーワード：動脈硬化性血栓 血液凝固FXI因子 組織因子 キヌレニン代謝酵素

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

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性血栓症の予防に、抗血小板薬が第一選択薬として使用されている。しかし出血性合併症が問題となっており、より安全な抗血栓薬の開発が期待されている。

心血管イベントの発症にはプラーク破綻が重要であることは認識されているが、これまでの人体病理研究や臨床画像診断により、プラーク破綻の多くは無症候性(血栓が小さく非閉塞性)であることが明らかにされてきており、プラーク破綻が必ずしも血栓性イベントに発展するとは限らない。よって、プラーク破綻によって生じた血栓が大きく成長することがイベント発症に極めて重要であると考えられる。このため、血栓の成長機序の解明は、動脈硬化性血栓症の病態解明のみならず、あらたな血栓症予防薬の開発に繋がることが予想される。

血液凝固反応は組織因子より開始される外因系凝固経路と内因系凝固経路により活性化され最終的にフィブリンが形成される。内因系凝固経路はガラス面などの陰性荷電物質と血液凝固 XII 因子(FXII)の接触により活性化されるが、血栓形成において生理的な FXII 活性化因子は明確になっておらず、生体内で血栓形成への関与は少ないものと考えられている。一方、血液凝固 XI 因子(FXI)は FXII、トロンピン、FXI 自身により活性化され増幅系を構成している。これまでに動物モデルを用いて FXI が静脈血栓の成長に関与することを明らかにしており(Thromb Res 2010, Thromb Haemost 2013)、血栓形成において成長過程に関与することが示唆される。しかしながら、動脈硬化性血栓症において、FXII の活性化機構の存在や内因系凝固経路の関与は明確ではない。なお FXII や FXI 欠損症に重篤な出血傾向がないことから、それらを標的とする薬剤は、出血性合併症の少ない理想的な血栓症予防薬となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、虚血性心疾患の冠動脈プラークや吸引血栓、in vitro 血栓作成装置、および動物モデルを用いて、動脈硬化性プラークにおける内因系凝固因子、外因系因子の活性化とその機能を検討し、動脈硬化性血栓の形成機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) 急性心筋梗塞症例の冠動脈吸引血栓の解析

急性心筋梗塞の責任病変より得られた吸引血栓中のプラーク成分を病理学的に解析した(n=73)。内因系凝固因子を活性化しうる線維性結合組織成分、neutrophil extracellular trap (NET)s、組織因子発現、細胞成分、血小板、フィブリン沈着などを検討した。

2) in vitro 血栓形成解析装置(T-TAS)を用いた血栓形成の動的解析

コラーゲンと組織因子をコーティングしたマイクロチップ内に全血を灌流させ、血栓形成を内圧変化で計測した。外因系、内因系凝固反応の作用を検討するために、抗 FXI 抗体、抗組織因子抗体を用いた。

3) ウサギ大腿動脈狭窄モデル

ウサギ大腿動脈のバルーン傷害により平滑筋細胞に富むプラークを作成した。傷害3週後に大腿動脈を露出し vascular occluder により血管を狭窄させ、血流異常を生じさせた。血管内腔に生じる変化を病理学的に解析した。外因系、内因系凝固反応の作用を検討するために、抗 FXI 抗体、抗組織因子抗体を用いた。

4) 冠動脈プラークの組織因子発現におけるトリプトファンキヌレニン代謝酵素の解析

不安定狭心症、安定狭心症の冠動脈プラーク標本と培養マクロファージを用いて組織因子発現におけるキヌレニン代謝酵素の作用を検討した。

4. 研究成果

1) 急性心筋梗塞症例の冠動脈吸引血栓標本を用いて、吸引血栓中に含まれるプラーク成分を病理学的に解析した。破綻性プラークと血栓との境界部では、プラーク壊死物、マクロファージ、コレステリン結晶が血栓と接しており、平滑筋細胞やコラーゲンなどの線維性結合組織はわずかに認めるのみであった。好中球はマクロファージに次ぐ細胞成分であったが、citruillinated histone H3 を指標とした NETs 形成はわずかに認めるのみであった。プラークの細胞内外には組織因子の発現を認め、フィブリン沈着を伴っていた。いずれの血栓も血小板とフィブリンから成る血栓であった。内因系凝固活性化に関与しうるコラーゲンや NETs はわずかであったことより、急性心筋梗塞の発症に起因する血栓形成は主に組織因子による外因系経路により生じることが示唆された。

2) in vitro 血栓形成解析装置(T-TAS)を用いて、組織因子、FXI の中和抗体とコントロール抗体を灌流血液に事前添加し血栓形成、成長を評価した。いずれの抗体も T-TAS のマイクロチップ内流路(内腔が一定であり層流と想定される)に形成される血栓形成に影響を与えなかった。このことより、血液中の組織因子の関与は否定的で、組織因子が十分に存在し層流条件下での FXI の関与も否定的と考えられた。

3) プラーク破綻の一形態であるプラークびらんモデルを用いて評価した。15 分後には狭窄末梢部の一部に内皮細胞の剥離とわずかな血小板の付着を認めた。30-60 分後の走査電子顕微鏡、免疫組織化学で内皮細胞の剥離部に血小板とフィブリンからなる壁在血栓が形成され、血栓上、血栓内、プラーク表層内に好中球が観察された。プラーク表層で血流方向に配列する平滑筋細胞がびらん性プラークでは内腔側に細胞質が伸びた星型に変形していた。またプラーク表層には TUNEL 陽性のアポトーシス細胞も散見された。以上のことより、プラークびらんの発生には内皮細胞剥離が先行し、血小板とフィブリン血栓が形成されること、早期より好中球浸潤、平

滑筋細胞の形態変化、プラーク細胞のアポトーシスが起りうることを示唆された。特異抗体を用いて、血管狭窄から60分後の血栓早期における組織因子、FXIの作用を検討した。抗組織因子抗体は壁在血栓の形成を抑制したが、抗FXI抗体の効果にはばらつきが見られた。以上の結果より、プラークびらんモデルにおける血栓形成の早期に組織因子が重要な役割を果たしており、FXIの関与は限定的と考えられた。今後、血栓の成長過程におけるFXIの関与を検討する必要がある。

4) 虚血性心疾患の発症においてプラークの組織因子発現が重要であることが予想された。これまでに肺の炎症、修復反応にキヌレニン代謝が影響を与えることを報告しており(Nakada H. et al. Jpn J Radiol. 2014)、不安定狭心症、安定狭心症の冠動脈プラーク標本と培養マクロファージを用いて組織因子発現におけるキヌレニン代謝酵素の作用を検討した。冠動脈血栓症である不安定狭心症のプラークでは、安定狭心症プラークと比してT細胞、組織因子、キヌレニン代謝酵素 ID01(Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1)の発現が増加しており、ID01は主にマクロファージに発現し、ID01の発現はマクロファージ、組織因子の発現と正相関を認めた。Th1サイトカイン(TNF α , INF γ)刺激で ID01 発現が誘導され、その阻害薬にて組織因子発現、活性が抑制された。よって、冠動脈プラークの組織因子発現にキヌレニン代謝酵素の ID01 が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 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 T1-weighted magnetic resonance imaging reflect intraplaque hemorrhage. *Cardiovasc Pathol*. 2019;40:24-31. 査読あり
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;2:726-735. 査読あり
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. 査読あり
4. 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. 査読あり
5. 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. 査読あり
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. *Nucl Med Biol*. 2018;56:21-25. 査読あり
7. 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(4):e0175976. 査読あり
8. Nakamura E, Sato Y, Iwakiri T, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Maekawa K, Gi T, Asada Y. Asymptomatic Plaques of Lower Peripheral Arteries and Their Association with Cardiovascular Disease: An Autopsy Study. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24:921-927. 査読あり
9. Yamada S, Koike T, Nakagawa T, Kuniyoshi N, Ying Y, Itabe H, Yamashita A, Asada Y, Shiomi M. Morphological features of coronary plaques in WHHLMI rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), an animal model for familial hypercholesterolemia. *Exp Anim*. 2017;66:145-157. 査読あり

[学会発表](計 3 件)

1. 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)
2. 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、明日へのシンポジウム(大阪市、7/12-14, 2018)

3. 山下 篤：血栓形成における内因系凝固因子の関与：第 XI 因子の役割．第 59 回日本脈感学会総会、第 10 回 JCAC シンポジウム（広島市、10/25, 2018）

4.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔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：盛口 清香

ローマ字氏名： Moriguchi Sayaka

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：90468041

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。