

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460440

研究課題名(和文) 動脈硬化巣の血栓能を反映する血管代謝産物の同定

研究課題名(英文) Metabolic factors reflecting thrombogenicity of atherosclerotic plaque

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：動脈血栓症では動脈硬化巣(プラーク)の血栓形成能が重要であるが、その血栓能を反映する指標は確立していない。本研究では、動脈硬化巣の血栓形成能を反映する代謝産物の同定を目的とし、病理標本や動物モデル等を用いて検討した。プラーク内では炎症性刺激や低酸素刺激により代謝変動が生じており、特に糖代謝経路の亢進がみられた。低酸素刺激は血栓性因子の発現を促進し動脈血栓の形成に寄与していた。糖代謝酵素であるヘキソキナーゼIIの発現が冠動脈の血栓サイズと相関していた。このようにプラークの糖代謝産物や解糖系の代謝酵素、および低酸素状態の検出により血栓症のリスク評価や、新たな治療指標の確立への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerotic plaque disruption does not always result in acute symptomatic events. Therefore, the thrombogenicity of the atherosclerotic plaques is a critical factor in the development of atherothrombosis. However, little is known about determinants of the plaque thrombogenicity. We found that metabolite levels of glycolysis increase in macrophage-rich atherosclerotic arteries, and that arterial glucose uptake reflects vascular thrombogenicity, which might be partly explained by metabolic adaptation and enhanced procoagulant activity in a hypoxic microenvironment. Expression of hexokinase II, a glycolytic enzyme upregulated by hypoxia, in the atherosclerotic plaques correlated with human coronary thrombus size. The novel findings will allow the detection of high-risk plaques and the development of atherosclerosis therapies.

研究分野：血栓症

キーワード：動脈硬化性血栓 プラークの血栓能 代謝 低酸素

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞などの心血管イベントの多くは、プラークの破綻に伴う血栓形成によって発症することから「アテローム血栓症」と総称されている。血栓形成はイベント発症の「引き金」となるが、これまでの人体病理研究や臨床画像診断において、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いる。したがって、プラークの血栓形成能（血栓能）が血栓のサイズ（すなわちイベント発症）を規定する極めて重要な因子あると考えられる。しかしプラーク破綻部における血栓の形成機序についてはまだ不明な点が多く、プラークの血栓能を評価するための有効な指標は見つかっていない。

申請者は、アテローム血栓症の病態解明を目標に病理学的立場から研究を進めてきた。これまでに

- 1) ヒトのプラーク破綻部では血小板に加えて血液凝固系が強く活性化されていること、
- 2) プラーク内には、血液凝固の開始因子である組織因子(TF)が種々の程度で発現していること、
- 3) プラーク破綻部の多くは非閉塞性（無症候性プラーク破綻）であること、
- 4) これらヒトの病態を踏まえたアテローム血栓症の動物モデルを確立し、血栓サイズに影響を与える血管・血液因子や血流の関与を報告してきた。この一連の研究から、プラークの血栓能がイベント発症において極めて重要であることが示されたが、プラーク血栓能の制御機構やその指標は明らかにされていない。

ヒトのプラークにおいて低酸素領域が存在することが報告され、動脈硬化の病態との関連性が示唆されている。また動脈硬化病変において糖の取込みの指標である¹⁸Fフルオロデオキシグルコース(FDG)の高集積が報告されており、血管壁の低酸素や代謝状態が血栓能を反映することが予想された。

2. 研究の目的

本研究では動脈硬化疾患患者の血管手術標本とアテローム血栓症の動物モデルを用いて、プラークの代謝と血栓能の関連を明らかにするとともに、血栓能を反映する指標（代謝産物や経路など）を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) ヒト血管標本の病理学的解析
急性心筋梗塞の責任冠動脈と非心臓死で冠動脈血栓を有する標本を用いた。狭心症症例のアテレクトミー標本を用いた。
- 2) 日本白色家兎動脈硬化性モデル
コレステロール食負荷と大腿動脈のバルーン傷害で動脈硬化巣を作成した。
- 3) 家兎動脈硬化性血栓モデル
上記同様に動脈硬化巣を作成し、再度バル

ーンカテーテルで内膜を傷害し血栓を作成した。

- 4) FDG-PET(positron emission tomography)解析

モデル動物に FDG を投与し PET で撮影。動脈硬化血管の画像解析を行った。

- 5) 代謝産物の解析

家兎大腿動脈（動脈硬化血管、コントロール血管）を摘出しキャピラリー電気泳動質量分析法で代謝産物を解析した。

- 6) 培養細胞

単球系細胞 TFP-1 細胞をマクロファージに分化させ使用した。

4. 研究成果

1) 冠動脈の血栓形成と関連する血管性因子

冠動脈血栓サイズに関連する血管性因子を明らかにするために、急性心筋梗塞症例（症候性）の冠動脈と無症候性血栓を有する冠動脈を組織学的に比較検討した。血栓サイズや血栓による内腔の占拠率は症候性症例で大きかった。また、血栓サイズはプラーク破綻の程度（破綻した被膜間の距離や血栓附着部の長さ）や血液凝固の開始因子である TF の免疫染色陽性面積と正相関を示した。TF は脂質コア内部と周囲に、また症候性プラークでは表層の細胞にも局在していた。プラーク破綻の程度と TF の多寡は血流に露出するプラーク成分や血液凝固の活性化に影響し、形成される血栓サイズに関与すると考えられた。

次に糖代謝関連因子と血栓サイズの関連を検討した。Glucose transporter (Glut)-1 は細胞へのグルコースの供給を担う糖輸送体の一つで、肝細胞をはじめ多くの細胞で発現している。Hexokinase (HK)-II はミトコンドリアの細胞膜に発現する解糖系酵素で取り込まれたグルコースをグルコース 6-リン酸に変換する際に働く。Glut-1 と HK-II の発現は冠動脈の症候性プラークで亢進しており、それらは脂質コア辺縁部のマクロファージの分布と関連していた。さらに冠動脈の血栓サイズは HK-II の陽性面積と正相関を示すことから、TF や HK-II の発現がプラークの血栓能を反映する可能性が示唆された。

2) プラークのグルコース取込みと血栓能

ヒト冠動脈の検討から解糖系代謝酵素である HK-II と血栓能との関連が示唆されたことから、家兎動脈硬化性血栓モデルを用いて、FDG 集積と動脈硬化巣の血栓形成能との関連を検討した。内膜バルーン傷害と 0.5% コレステロール食で家兎片側腸骨大腿動脈に動脈硬化病変を作成し、傷害 3 週後に FDG を投与し、その 2 時間後に PET 撮影を施行した。FDG 集積と血管の血栓能の関連を検討するために、撮影後に両側腸骨大腿動脈の内膜バルーン傷害にて血栓を作成した。PET 画像にて病変側下腿部に健常側と比較して FDG の高集積を認めた。動脈に形成された血栓のサイズは PET 画像から算出した血管壁の放

射活性や動脈切片のオートラジオグラフィで測定した血管壁の放射活性と相関した。また FDG の集積は血管壁におけるマクロファージの集積、TF 発現、TF の転写因子の一つである nuclear factor (NF)- κ B 陽性核数と正相関を示した。これらの結果から動脈壁における FDG 集積の程度は TF の発現と関連し病巣の血栓形成能を反映すると考えられ、FDG-PET によって動脈硬化巣の血栓性リスクを非侵襲的に評価できる可能性が示唆された。

3) プラークの代謝状態

これまでの結果より動脈硬化巣において糖代謝の変化が生じていることが予想された。グルコースの下流の代謝産物の変化を検討するために、キャピラリー電気泳動質量分析法で家兔動脈硬化血管のメタボローム解析を行った。家兔下肢動脈に、バルーン傷害と通常食もしくは 0.5% コレステロール食負荷により、平滑筋細胞もしくはマクロファージに富む動脈硬化病変を作成した。糖代謝やエネルギー代謝に関連する 56 極性代謝産物を測定したところ、マクロファージに富む病変では、非傷害血管や平滑筋細胞に富む病変と比較して、解糖系中間代謝産物や乳酸およびクエン酸回路の代謝産物が増加していた。次に、FDG と低酸素マーカーであるピモニダゾールを投与し、血管壁の FDG 集積と低酸素領域との関連を検討した。ピモニダゾールで認識される低酸素領域は、マクロファージに富む動脈硬化血管でのみ検出され、血管壁の FDG 集積と正の相関を呈した。ピモニダゾール陽性部位にはマクロファージの集積と hypoxia inducible factor(HIF)-1 α の陽性核や HK-II の発現を認め、マクロファージの低酸素応答や解糖系の代謝応答が示唆された。これらの結果から動脈硬化血管の解糖系代謝の亢進と低酸素領域のマクロファージの代謝の関与が示唆された。

4) プラークの低酸素と血栓能の関連

家兔動脈硬化性血栓モデルとヒト冠動脈プラークを用いて、動脈壁の低酸素と血栓形成との関連を検討した。0.5% コレステロール食とバルーン傷害により作製したウサギ動脈硬化性プラークで、ピモニダゾールで認識される低酸素領域は、TF 陽性面積および HIF-1 α ・NF- κ B 陽性核数、及びプラーク傷害部に形成された血栓の面積と正の相関を示した。狭心症患者のプラークにおいて、HIF-1 α 陽性核数は不安定狭心症や血栓を伴うプラークで多く、NF- κ B 陽性核数と正相関を示した。これらの結果から、プラークの低酸素状況が血栓関連因子の発現を介して血栓形成を促進することが示唆された。低酸素応答はプラークの代謝と血栓能を関連づける重要な因子の一つと考えられた。

5) 動脈硬化血管に特異的な代謝産物の同定

動脈硬化病変を有する家兔大腿動脈、コントロールの大腿動脈、心筋組織の極性代謝産物(約 200 種類)を解析した。主成分分析や

階層的クラスター解析で 3 群間の代謝に相違があることが確認された。Quinolinic acid, O-succinylhomoserine, betain aldehyde, 5-hydroxylysine は動脈硬化血管のみで検出され、N-acetylglucosamine 1-phosphate を含む 15 代謝産物はコントロールと動脈硬化血管で検出され、かつ動脈硬化血管で増加していた。Guanine を含む 2 代謝産物は動脈硬化血管で最も多く検出された。一部の代謝産物濃度は血管壁の TNF- α や MMP9 の発現と相関していた。

以上の結果より、TF、HK-II、グルコースの取込み、低酸素状態、HIF-1、NF- κ B がプラークの血栓能を反映する因子の候補と考えられた。また動脈硬化血管に特異的な代謝産物を同定した。

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 10 件)

1. Okuyama N, Matsuda S, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, et al. Human Coronary Thrombus Formation Is Associated With Degree of Plaque Disruption and Expression of Tissue Factor and Hexokinase II. *Circ J.* 2015;79:2430-8. 査読有り
2. Matsuura Y, Yamashita A, Iwakiri T, Sugita C, Okuyama N, Kitamura K, Asada Y. Vascular wall hypoxia promotes arterial thrombus formation via augmentation of vascular thrombogenicity. *Thromb Haemost.* 2015;114:158-72. 査読有り
3. Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y, Yamasaki K, Moriguchi-Goto S, et al. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. *PLoS One.* 2014;9:e86426. 査読有り
4. Nakada H, Yamashita A, Kuroki M, et al. A synthetic tryptophan metabolite reduces hemorrhagic area and inflammation after pulmonary radiofrequency ablation in rabbit nonneoplastic lungs. *Jpn J Radiol.* 2014;32:145-54. 査読有り
5. Sameshima N, Yamashita A, Sato S, Matsuda S, Matsuura Y, Asada Y. The values of wall shear stress, turbulence kinetic energy and blood pressure gradient are associated with atherosclerotic plaque erosion in rabbits. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21:831-8. 査読有り
6. Maekawa K, Moriguchi-Goto S, Kamiunten A, et al. Primary Central Nervous System Lymphoma in Miyazaki, Southwestern Japan, a Human T-Lymphotropic Virus Type-1 (HTLV-1)-Endemic Area: Clinico-pathological Review of 31 Cases. *J Clin Exp Hematop.* 2014;54:179-85. 査読有り

7. Iwakiri T, Sato Y, Matsuura Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Yamashita A, et al. Association between renal vasculature changes and generalized atherosclerosis: an autopsy survey. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21:99-107. 査読有り
8. Yamashita A, Zhao Y, Zhao S, et al. Arterial (18)F-fluorodeoxyglucose uptake reflects balloon catheter-induced thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor- κ B in rabbit atherosclerotic lesions. *Circ J*. 2013;77:2626-35. 査読有り
9. Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, et al. Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor. *Thromb Haemost*. 2013;110:62-75. 査読有り
10. Iwakiri T, Fujimoto S, Kitagawa K, Furuichi K, Yamahana J, Matsuura Y, Yamashita A, et al. Validation of a newly proposed histopathological classification in Japanese patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. *BMC Nephrol*. 2013;14:125. 査読有り

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 山崎一諒, 山下 篤, 他: 14C-酢酸の家兎動脈硬化病変への集積機序: 11C-酢酸による動脈硬化イメージングのための基礎的検討. 第 55 回日本核医学会学術集会、ハイアットリージェンシー東京(東京都) 11/5-11/7, 2015.
2. Yamashita A, et al.:Vascular wall hypoxia promotes arterial thrombus formation. The 3rd Conference of the Japanese Association for hypoxia biology. Tokyo (Japan), 7/25, 2015.
3. Matsuda S, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Sameshima N, Iwakiri T, Yunosuke Matsuura Y, Sato Y, Asada Y. Pathological determinants of human coronary thrombus formation: distinct procoagulant activity and lactate production of M1/M2 polarized macrophages. XXV Congress, International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto (Canada), 6/20-25, 2015.
4. 山下 篤, 盛口清香, 他: 冠動脈の血栓サイズに関連する血管性因子: 解糖系代謝と凝固活性の関連, 第 37 回日本血栓止血学会学術集会、甲府市総合市民会館(山梨県甲府市) 5/21-5/23, 2015.
5. Yamashita A, Asada Y. Determinants of coronary thrombogenicity: Distinct tissue factor activity and lactate production in M1/M2 polarized macrophages. IXth Aso International Meeting. Aso (Japan), 5/14-16, 2015.
6. 黒岩靖淳, 油屋真仁, 山下 篤, 他: 拡散強調画像を用いた深部静脈血栓の検出. 第 42 回日本磁気共鳴医学会、ホテルグランヴィア京都(京都府京都市), 9/18, 2014.
7. 鮫島直樹, 山下 篤, 他: プラークびらんの発生における血行力学的因子の検討: 家兎内膜肥厚モデルを用いたコンピュータシミュレーションによる解析. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術学会大会、京王プラザホテル(東京都) 7/10-7/11, 2014.
8. 山下 篤, 他: 動脈硬化血管とマクロファージの代謝解析: 低酸素による解糖系・ペントースリン酸回路の代謝産物の増加. 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、京王プラザホテル(東京都) 7/10-7/11, 2014.
9. 山下 篤, 趙 芫, 松浦祐之介, 山崎一諒, 盛口清香, 他: 動脈硬化血管及びマクロファージの代謝状態と低酸素の影響, 第 36 回日本血栓止血学会学術集会、大阪国際交流センター(大阪府大阪市) 5/29-5/31, 2014.
10. 盛口清香, 山下 篤, 他: 静脈血栓の代謝解析, 第 36 回日本血栓止血学会学術集会、大阪国際交流センター(大阪府大阪市) 5/29-5/31, 2014.
11. Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y, Yamasaki K, Moriguchi-Goto S, et al. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2014, Scientific Sessions. Toronto (Canada), 5/1-3, 2014.
12. 山下 篤, 趙 芫, 松浦祐之介, 山崎一諒, 盛口清香, 他: 動脈硬化血管の代謝解析, 第 103 回日本病理学会総会、広島国際会議場(広島県広島市) 4/24-4/26, 2014.
13. 杉田千泰, 山下 篤, 他: 血液凝固 VIII 因子の血中活性の増加は家兎静脈血栓形成を促進させる. 第 134 回日本薬学会年会、ホテル日航熊本、他(熊本県熊本市) 3/27-3/30, 2014.
14. Yamashita A, et al. Metabolic changes in rabbit atherosclerotic arteries: Increased glucose uptake and metabolite levels of glycolysis, pentose phosphate pathway, tricarboxylic acid cycle and nucleotides. XXIVth congress of the international society on thrombosis and haemostasis. Amsterdam (Netherlands), 6/30-7/4, 2013.
15. Matsuda S, Okuyama N, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, et al. Human coronary thrombus formation is associated with degree of plaque disruption and expression of tissue factor and hexokinase II in atherosclerotic plaques. XXIVth congress of the international society on thrombosis

- and haemostasis. Amsterdam (Netherland), 6/30-7/4, 2013.
16. Sugita C, Yamashita A, et al. Elevated plasma level of factor VIII enhances venous thrombus formation and propagation in rabbit: Contribution of thrombin, factor XI, von Willebrand factor, and tissue factor. XXIVth congress of the international society on thrombosis and haemostasis. Amsterdam (Netherland), 6/30-7/4, 2013.
17. 小島美緒、山下 篤、他: 深部静脈血栓における構成細胞成分とその経時的変化. 第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌(北海道札幌市) 6/6-8, 2013.
18. 山下 篤、他: 動脈硬化巣の低酸素は血栓形成を促進する、第35回日本血栓止血学会学術集会、山形国際ホテル(山形県山形市) 5/30-6/1, 2013.
19. Yamashita A. Glucose metabolism reflects thrombogenicity of atherosclerotic plaques. The 8th Aso International Meeting. Aso (Japan), 5/16-18, 2013.

〔図書〕(計 1 件)

1. Yamashita A, Asada Y : Pathology and pathophysiology of atherothrombosis: Thrombus growth, vascular thrombogenicity, and plaque metabolism, 1-25 (2015), Thrombosis, atherosclerosis and atherothrombosis: New insights and experimental protocols, Božič-Mijovski M (ed), Intech (Rijeka) 査読あり

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

- (1)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
- (2)研究分担者
盛口 清香 (MORIGUCHI SAYAKA)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号 : 90468041
- (3)連携研究者
()
研究者番号 :