

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07437

研究課題名（和文）肺血栓塞栓症における血液凝固XI因子の作用と安全な抗凝固薬開発への展開

研究課題名（英文）Role of factor XI on pulmonary thromboembolism: development for novel anticoagulant

研究代表者

山下 篤 (Yamashita, Atsushi)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：90372797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肺血栓塞栓症や深部静脈血栓症の予防・治療に経口抗凝固薬が使用されているが、出血性副作用が問題となっている。本研究では、先天的欠損により自然出血をきたしにくい血液凝固XIに注目して、血液凝固XI因子が静脈血栓の器質化部と比して、非器質化部により多く存在すること、フローチャンパーによる解析で、フィブリン形成への関与が血液凝固X因子よりも少ないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺血栓塞栓症の予防・治療に血液の凝固を抑える経口抗凝固薬が使用されています。一定の効果を得られていますが、血液凝固反応を抑えるため出血性副作用が問題となっています。本研究では止血作用への関与が少ないとされる血液凝固XI因子に注目しました。血液凝固XI因子が静脈血栓に存在し、抗血栓作用が現在の薬剤よりも強力ではないこと明らかにした本研究成果は、血液凝固XI因子を標的とした新規抗凝固薬の開発において重要な情報を提供すると考えられます。

研究成果の概要（英文）：Current oral anticoagulant is widely used for prevention and treatment of pulmonary thromboembolism. However, bleeding complications remain a critical problem. We found that factor XI is predominantly localized in non-organizing area of deep vein thrombus, and that factor XI play a minor role in fibrin formation in a flow chamber system, compared with factor X.

研究分野：血栓症

キーワード：factor XI venous thromboembolism pathology

## 1. 研究開始当初の背景

深部静脈血栓・肺血栓塞栓症は、下肢や骨盤内の深部静脈に形成された血栓(深部静脈血栓)が遊離し、肺動脈を塞栓として閉塞する疾患で、その重症度は血栓のサイズに依存する。本邦では稀な疾患と考えられてきたが、診断率の向上に伴って、患者数は年々増加してきている。年間約15,000名の発症が報告されており、震災被災地での発症は社会的にも大きな問題となっている。

静脈血栓の形成では、外因系凝固反応が重要と理解されており、外因系凝固因子を中心とした研究が進められてきたが、発症病態を含めて詳細な機序はまだ明らかにされていない。また抗血栓療法には従来より、抗凝固薬ワルファリンが使用されてきた。しかし出血リスクや薬剤・食物との相互作用などが課題となっていた。これらを補う目的でトロンビン阻害薬や活性化第X因子(FX)阻害薬が登場してきたが、年間2-3%の重篤な出血リスクがあり、より安全な予防薬の開発が切望されている。

申請者は、内因系凝固因子である第XI因子(FXI)の欠損症は出血傾向が軽微なことに着目し、血栓症動物モデルでの検討を重ね、FXIは止血作用は小さいが、血栓の成長に寄与することを見出した。しかしヒトの深部静脈血栓・肺血栓塞栓にFXIが関与しているのか明確ではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症の発症病態におけるFXIの役割を解明し、安全な抗血栓療法への展開を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 深部静脈血栓症例の吸引血栓の解析

深部静脈血栓症の閉塞部位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=15)。免疫組織化学で、血小板、フィブリン、赤血球、内皮細胞、平滑筋細胞、FXIの局在や染色陽性面積率を画像解析ソフトで半定量的に計測した。

### (2) in vitro 血栓形成フローチャンバー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ガラスプレート上にFXI阻害薬やFX阻害薬を経口投与したウサギ血液を蛍光ラベルして灌流させ、血栓形成を動画撮影し、血小板面積を計測した。灌流後に形成されたフィブリン面積や付着する白血球数を測定した。

### (3) in vitro 血栓形成フローチャンバーを用いた血栓形成における凝固反応の動態

コラーゲンと組織因子をコーティングしたガラスプレート上にヒト静脈血液を蛍光ラベルして灌流させた。灌流前後の血液のFXI活性、プロトロンビンフラグメント1+2、血小板面積率を測定し、FXI阻害薬の添加の有無で比較した。また、灌流後に形成されたフィブリン面積や付着する白血球数を測定した。

### (4) 卵巣癌における血栓性因子の発現と静脈血栓塞栓症の関連を解析

血栓症の合併率が高い卵巣癌における血栓症との関連を明らかにするために、手術で摘出された卵巣癌(30例)と子宮内膜嚢胞(16例)の病理標本の免疫組織化学で血栓性因子である組織因子、ポドプラニン、pセレクチンの発現や腫瘍におけるCD4、CD8陽性細胞数を計測した。静脈血栓塞栓症の有無で上記因子発現の相違を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 深部静脈血栓症例の吸引血栓標本を用いて、血栓組成の不均一性やFXIの局在を解析した。それぞれの血栓には形成早期と考えられる血球成分が保たれた部分、時間経過により細胞が溶解性変化を呈している部分、器質化反応により内皮細胞が覆っている部分、筋線維芽細胞/平滑筋細胞が増殖している部分が混在しており、静脈血栓の多段階な形成過程が示唆された。FXIは全ての血栓に存在し、赤血球や血小板よりもフィブリンに富む部分に局在していた。また、内皮細胞の存在で定義した器質化部分と非器質化部分を比較したところ、非器質化部分での陽性率が高値であった。これらより、FXIが静脈血栓形成に関与すること、器質化への関与は限定的であることが示唆された。

(2) in vitro 血栓形成フローチャンバーに、溶媒、活性化FXI阻害物や活性化FX阻害物を経口投与したウサギ血液を灌流させた。いずれも対照となる溶媒投与群の血液と比較して灌流後に形成されたフィブリン面積を有意に減少させ、活性化FX投与群でより強力にフィブリン形成を抑制した。しかし血小板面積や灌流後に付着した白血球数に影響を与えなかった。壁在血栓の形

成において、FXI はフィブリン形成へ関与が FX よりも少ないことが示唆された。

(3) *in vitro* 血栓形成フローチャンバーに、蛍光標識したヒト静脈血を灌流させ FXI の作用を検討した。灌流前後で FXI 活性は増加しプロトロンビンフラグメント 1+2 が増加した。活性化 FXI 阻害物の添加により、プロトロンビンフラグメント 1+2 の増加が抑制され灌流後のフィブリン形成は抑制された。血小板面積や付着する白血球数に影響を与えなかった。これらより FXI は血栓形成時に活性化されトロンビン産生を促すことでフィブリン形成に関与することが示唆された。

(4) 卵巣癌の手術標本を用いて、血栓性因子の発現や静脈血栓塞栓症との関連を検討した。卵巣癌では様々な割合で組織因子やポドプラニン、p セレクチンを発現した。中でも明細胞癌では組織因子発現が亢進していた。ポドプラニンも明細胞癌で発現が高値の傾向を示した。P セレクチンは漿液性癌で高値の傾向を示した。卵巣癌において血液凝固因子である組織因子の発現や CD8 陽性細胞の浸潤は静脈血栓塞栓症症例で高値であった。組織因子過剰の際に FXI の作用は限定的となることが報告されており、卵巣癌における血栓症予防としての FXI 阻害薬は効果が出にくいことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Gi T, Yamashita A, Aman M, Kuwahara A, Asada Y, Kawagoe Y, Onishi J, Sameshima H, Sato Y.	4. 巻 71
2. 論文標題 Tissue factor expression and tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian carcinomas and their association with venous thromboembolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 261-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kuga N, Kuroiwa Y, Sakamoto T, Yamashita A, Gi T, Doi Shogo, Kinoshita T, Tanaka T, Kihara Y, Asada Y, Imamura T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Signal change of jugular vein thrombus on diffusion-weighted magnetic resonance imaging.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circ Rep.	6. 最初と最後の頁 455-456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circrep.CR-20-0039.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita A, Nishihira K, Gi T, Maekawa K, Hatakeyama K, Horiuchi S, Wada K, Shibata Y, Asada Y.	4. 巻 121
2. 論文標題 Pathological features of ruptured coronary plaque and thrombus interfaces: fibrin and von Willebrand factor as platelet scaffolds on rupture sites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 234-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0040-1716539	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Gi Toshihiro, Kuroiwa Yasuyoshi, Yamashita Atsushi, Mizutani Yuko, Asanuma Taketoshi, Miyati Tosiaki, Maekawa Kazunari, Aman Murasaki, Imamura Takuroh, Asada Yujiro	4. 巻 120
2. 論文標題 High Signal Intensity on Diffusion-Weighted Images Reflects Acute Phase of Deep Vein Thrombus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1463 ~ 1473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0040-1714280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	古小路 英二  (Furukoji Eiji)  (00423723)	宮崎大学・医学部・講師   (17601)	
研究 分 担 者	田島 卓也  (Tajima Takuya)  (80549056)	宮崎大学・医学部・講師   (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------