

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16560

研究課題名(和文) 心筋梗塞発症リスクの高い危険なプラーク、血栓形成能の解析

研究課題名(英文) High risk coronary plaque for acute myocardial infarction: who is a culprit of increased thrombogenicity

研究代表者

前川 和也 (Maekawa, Kazunari)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：30754171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(1)冠動脈プラークの組織因子発現への低酸素の関与、(2)低酸素が血栓形成能を促進する場合、分子生物学的機序を明らかにすることを目的とし、次の結果を得た。

(1)剖検症例の冠動脈標本を用いた検討で、「不安定プラーク」では「安定プラーク」に比してマクロファージに富み、プラーク内の組織因子発現とヘキソキナーゼ2の発現及び局在にマクロファージとの相関がみられた。(2)培養マクロファージで、炎症刺激による細胞の凝固活性が低酸素で増大されることが明らかとなった。またその効果は、解糖の阻害により無効化された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性心筋梗塞の原因となる動脈硬化は喫煙、ストレス、高血圧、脂質異常や糖尿病により進展することが知られている。さらにプラークの血栓形成能を増大させる機序が明らかとなれば、予防的介入の選択肢が広がり、国民の健康に貢献できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is (1) the involvement of hypoxia in the expression of tissue factor in coronary artery plaques, and (2) the molecular biological mechanisms by which hypoxia promotes thrombus formation.

(1) In a study using coronary artery specimens from autopsy cases, macrophages were more abundant in “vulnerable plaques” than in “stable plaques,” and the expression and localization of tissue factor and hexokinase 2 in plaques were associated with macrophages. (2) In cultured macrophages, hypoxia increased the coagulation activity of cells induced by inflammatory stimulation. The effect was also abolished by inhibition of glycolysis.

Based on the above, hypoxia-induced glycolytic metabolism was considered to contribute to plaque thrombus formation.

研究分野：人体病理学

キーワード：動脈硬化 血栓症 マクロファージ 低酸素 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞は、冠動脈プラークの皮膜が破綻することによってプラーク内容が血液に直接接触し、そこで形成された血栓により血管内腔が閉塞することで発症する。1970年代以降、動脈硬化病変・プラークの進展には炎症性に活性化したマクロファージや平滑筋細胞が関与することが報告されてきた。また、プラークの不安定化には活性化したマクロファージにより産生される matrix metalloproteinase の関与が大きいことが分かってきた。形態学的にも線維性皮膜の薄い「thin cap fibroatheroma」が破綻しやすく脆いプラークとして認識されるようになり、心筋梗塞の発症リスクが高い、いわゆる「ハイリスクプラーク」は、脆弱で破綻しやすい「vulnerable」プラークとして注目されるようになった。このように、プラークのリスクは主にその脆弱性に着目して研究が進められてきた。

一方、我々の教室では、プラークの脆弱性とともプラークが内包する血液凝固活性・血栓形成能に着目した研究を進めてきた。特に、炎症性刺激がプラーク内のマクロファージや平滑筋細胞による組織因子の発現を亢進させ、プラーク内には大量の組織因子が蓄積されていることが分かっている。また、M1 サブタイプや M2 サブタイプでサイトカイン刺激への応答が異なることが報告されており、我々の施設でも組織因子の発現については M マクロファージでより強くみられることを報告した (Circ J 2015; 79: 11)。

さらに、申請者のこれまでの人体病理学的観察から、組織因子の発現は、壊死性コアが存在するようなプラーク中心部で特に強くみられることが分かっている。病的な肥厚内膜のプラーク中心部は新生血管に乏しく、低酸素状態であることが推察される。

しかし低酸素に関しては、がんの領域では腫瘍組織中の低酸素の存在が研究されているが、動脈硬化病変における低酸素の存在やその意義に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 急性心筋梗塞発症の原因となった冠動脈プラークでの、組織因子の生成における低酸素の関与、(2) マクロファージにおいて低酸素が組織因子生成を促進する機序、を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 急性心筋梗塞症例の冠動脈吸引血栓標本を用いた検討

急性心筋梗塞発症急性期に、冠動脈責任病変に対する血管内治療の際に得られた吸引血栓標本を対象とする。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた病理組織学的検討を行う。責任病変に形成された血栓と標本に含まれるプラーク成分を観察し、血栓形成に関与する細胞腫を同定する。また、血液凝固反応の開始因子である組織因子、低酸素環境下で発現が亢進する解糖系酵素であるヘキソキナーゼ2について、免疫組織化学反応を用いて、プラーク内の細胞における局在を調べる。

(2) 末梢血単球由来マクロファージの培養実験

健常人ボランティアから提供を受けた末梢血単球から分化させたマクロファージを用いた培養実験を行う。末梢血から単核球を分離した後、マクロファージコロニー刺激因子および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を用いて分化誘導を行い、シャーレ底面に接着し

たマクロファージを用いる。マクロファージの組織因子発現亢進に作用することが知られている炎症性サイトカインである tumor necrosis factor およびインターフェロン で刺激し、さらに低酸素条件を付加し、組織因子の mRNA およびタンパク発現、また細胞の凝固活性の変化を調べる。mRNA は、RT PCR による定量 PCR を行う。タンパク発現は、細胞溶解液をサンプルとし ELISA 法により定量的に評価を行う。培養細胞の凝固活性は、ウサギの血漿を用いて、アボット社の Thrombotrack で計測する。

(3) 統計学的解析

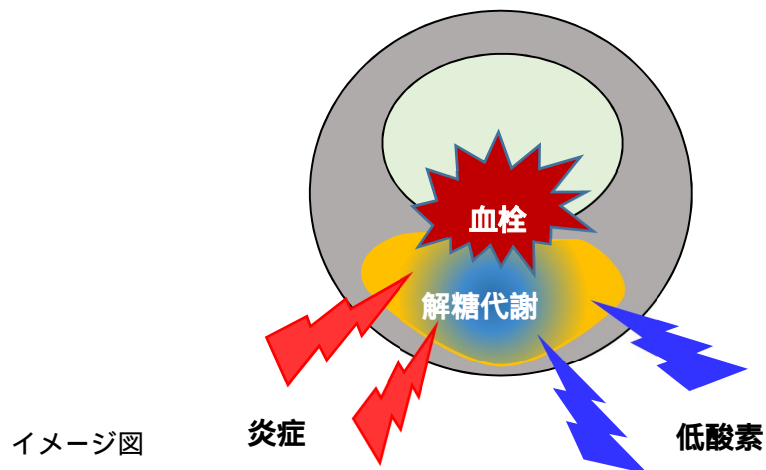
Prism8 を用いた自動解析による。

4. 研究成果

(1) 検討した全ての症例において、プラーク内のマクロファージはヘキソキナーゼ2 と組織因子を発現していた。また、それらのマクロファージはフィブリンや血小板からなる血栓と接しており、血栓形成に関与したものと考えられた。

(2) tumor necrosis factor およびインターフェロン による炎症性サイトカイン刺激、または低酸素刺激いずれも組織因子発現、細胞の凝固活性、培地中の乳酸産生を亢進させた。炎症性サイトカインと低酸素の共刺激により、組織因子の発現および細胞の凝固活性は相加的に増加した。2-deoxyglucose による解糖系阻害は、炎症性サイトカイン刺激、低酸素刺激それぞれ単独による刺激、およびその共刺激による TF 発現と細胞の凝固活性促進効果を抑制した。

以上の結果から、動脈硬化プラークにおいて炎症性刺激と低酸素状態が相加的にマクロファージの血栓形成能を促進させ、解糖系代謝の亢進がマクロファージの凝固活性に不可欠であることが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita Atsushi, Nishihira Kensaku, Gi Toshihiro, Maekawa Kazunari, Hatakeyama Kinta, Horiuchi Saki, Wada Kei, Shibata Yoshisato, Asada Yujiro	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 Thrombosis and Haemostasis	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 Nishimura Masanori, Yamashita Atsushi, Matsuura Yunosuke, Okutsu Junichi, Fukahori Aiko, Hirata Tsuyoshi, Nishizawa Tomohiro, Ishii Hirohito, Maekawa Kazunari, Nakamura Eriko, Kitamura Kazuo, Nakamura Kunihide, Asada Yujiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Upregulated Kynurenine Pathway Enzymes in Aortic Atherosclerotic Aneurysm: Macrophage Kynureninase Downregulates Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1214 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.58248	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 Maekawa Kazunari, Tsuji Atsushi B., Yamashita Atsushi, Sugyo Aya, Katoh Chietsugu, Tang Minghui, Nishihira Kensaku, Shibata Yoshisato, Koshimoto Chihiro, Zhang Ming-Rong, Nishii Ryuichi, Yoshinaga Keiichiro, Asada Yujiro	4. 巻 337
2. 論文標題 Translocator protein imaging with 18F-FEDAC-positron emission tomography in rabbit atherosclerosis and its presence in human coronary vulnerable plaques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 7 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2021.10.003	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 Koyama Shohei, Yamashita Atsushi, Matsuura Yunosuke, Saito Yusuke, Maekawa Kazunari, Gi Toshihiro, Kitamura Kazuo, Asada Yujiro	4. 巻 328
2. 論文標題 Intracellular glutamine level determines vascular smooth muscle cell-derived thrombogenicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 62 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2021.05.012	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 Maekawa K, Sugita C, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Furukoji E, Sakae T, Gi T, Hirai T, Asada Y	4. 巻 177
2. 論文標題 Higher lactate and purine metabolite levels in erythrocyte-rich fresh venous thrombus: Potential markers for early deep vein thrombosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thromb Res.	6. 最初と最後の頁 136-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2019.03.011.	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 1.Kuroiwa Y, Uchida A, Yamashita A, Miyati T, Maekawa K, Gi T, Noguchi T, Yasuda S, Imamura T, Asada Y	4. 巻 40
2. 論文標題 Coronary high-signal-intensity plaques on T1-weighted magnetic resonance imaging reflect intraplaque hemorrhage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovasc Pathol.	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carpath.2019.01.002.	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 前川和也、辻 厚至、山下 篤、須堯 綾、加藤千恵次、Minghui Tang、西平賢作、柴田剛徳、越本知大、Ming-Rong Zhang、西井龍一、吉永恵一郎、浅田祐士郎。
2. 発表標題 Translocator proteinを標的としたハイリスク冠動脈プラークの検出。
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamashita A, Nishihira K, Maekawa K, Gi T, Saki Horiuchi, Hatakeyama K, Shibata Y, Asada Y.
2. 発表標題 ontribution of fibrin and von Willebrand factor to platelet adhesion on ruptured atherosclerotic plaque in acute myocardial infarction.
3. 学会等名 28th Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 篤、西平賢作、前川和也、魏 峻洸、畠山金太、柴田剛徳、浅田祐士郎
2. 発表標題 破裂性冠動脈プラークの血小板粘着にフィブリンやフォンウィルブランド因子が関与する.
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita A, Nishihira K, Maekawa K, Gi T, Hatakeyama K, Shibata Y, Asada Y
2. 発表標題 Histological features of ruptured plaque and thrombus interface in acute myocardial infarction.
3. 学会等名 ATVB/PVD2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maekawa K, Yamashita A, Azuma M, Enzaki M, Yokogami K, Takeshima H, Wang Y, Hirai T, Asada A.
2. 発表標題 Quantitative susceptibility mapping on magnetic resonance imaging distinguishes intraplaque hemorrhage and iron deposition from calcification in carotid atherosclerosis.
3. 学会等名 ATVB/PVD2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 篤、渡邊裕貴、前川和也、北村和雄、浅田祐士郎
2. 発表標題 キヌレニン代謝酵素インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ1の急性冠症候群における関与.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川和也、東 美菜子、山下 篤、平井俊範、浅田祐士郎
2. 発表標題 頸動脈プラークの組織像と磁気共鳴画像における定量的磁化率マッピングとの対比.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita A, Nishihira K, Maekawa K, Gi T, Hatakeyama K, Shibata Y, Asada Y
2. 発表標題 Pathological features of ruptured atherosclerotic plaque and thrombus interface in acute myocardial infarction
3. 学会等名 27th Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuroiwa Y, Uchida A, Yamashita A, Miyati T, Maekawa K, Gi T, Noguchi T, Yasuda S, Imamura T, Asada Y
2. 発表標題 Coronary high-signal-intensity plaques on T1-weighted magnetic resonance imaging reflect intraplaque hemorrhage: A novel marker for plaque instability and thrombogenic potential.
3. 学会等名 27th Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 前川和也、浅田祐士郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 520
3. 書名 新臨床静脈学	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------