

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21790358

研究課題名（和文） アテローム血栓症の発症におけるペントラキシン 3 の関与

研究課題名（英文） Pentraxin 3 in atherosclerotic plaque reduces platelet thrombus formation under flow.

研究代表者

盛口 清香 (MORIGUCHI SAYAKA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90468041

研究成果の概要（和文）：急性心筋梗塞に代表されるアテローム血栓症は、動脈硬化性プラークの破綻による血栓形成により発症する。その過程において、炎症性因子は重要な役割を果たす。本研究では、新規炎症因子：ペントラキシン 3 (PTX3) の心血管イベント発症への関与を検討した。PTX3 は冠動脈吸引血栓に存在し、更に、心血管イベントである不安定狭心症症例において高率に存在した。また、リコンビナント PTX3 は、血小板凝集や血流下における血栓形成を抑制した。以上より、PTX3 はプラーク破綻後の血栓形成に対し、抑制的および防御的機能を発揮していると予測され、新規抗血栓薬の開発など、臨床面への応用も期待された。

研究成果の概要（英文）：Atherosclerotic plaque disruption with subsequent thrombus formation is a major cause of atherothrombosis, particularly in acute myocardial infarction. Inflammatory biomarkers play an important role, in atherothrombosis. In this study, we investigate the role of PTX3, a novel inflammatory biomarker: in cardiovascular event. PTX3 was localized in coronary plaque, and the expression was significantly increased in patients with unstable angina. PTX3 inhibited platelet aggregation, and significantly reduced platelet thrombus formation under flow condition. Thus, PTX3 may affect thrombus formation via a platelet antagonist after plaque disruption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理学

キーワード：循環器病理、血栓症

1. 研究開始当初の背景

(1) 心筋梗塞や脳梗塞などの心血管系疾患は、動脈硬化性プラークの破綻に伴う血栓形成により発症することから、アテローム血栓症と総称されている。本疾患は、本邦の死因

の約 3 分の 1 を占め、患者数も増多の一途で、病態の解明と予防法・治療法の確立は、急務の課題となっている。プラーク破綻から血栓形成過程において、マクロファージを中心とした炎症細胞や数多くの炎症関連因子の関

与が重要視されており、プラーク内の炎症性因子群による血小板凝集作用の重要性が明らかとなっている。

(2) アテローム血栓症には多くの炎症性因子の関与が報告されているが、中でも C 反応性蛋白 (CRP) は発症予測因子として注目されている。ペントラキシン 3 (Pentraxin3, PTX3) は、CRP と同属のペントラキシンファミリーに属する急性期蛋白の一つで、内皮細胞においてインターロイキン 1 (IL-1) 刺激に誘導される蛋白として新規にクローニングされ、その機能が注目されている。CRP と同様に、補体の活性化など自然免疫に働く分子であるが、CRP が主に肝臓で産生されるのに対して、PTX3 は主に血管壁で産生されることから血管性 CRP とも呼ばれており、炎症刺激依存性に産生が増強することが報告されている。しかし、産生機序や作用機構について詳細な報告はなく、心血管系疾患との関連についても数編の論文が報告されているにすぎない。これまでの報告では、心筋梗塞の重症度と血中 PTX3 濃度が相関すること、心筋梗塞患者の血栓内の好中球に PTX3 が存在することが示されているが、プラーク形成やその安定化・不安定化への関与、また血栓形成への作用についての報告はない。

(3) 申請者らによる人体病理標本の観察では、PTX3 が正常動脈では外膜にのみ発現するが、動脈硬化巣ではその初期病変よりプラーク内に存在する。また大部分の催炎症因子は血栓形成に促進的に働くが、PTX3 は血栓形成に抑制的に作用することも見出している。以上より、PTX3 は他の炎症性因子とは異なり、プラーク内で産生され、血栓形成に対して、防御的に作用している可能性が推測される。

2. 研究の目的

本研究では、新規催炎因子である PTX3 のプラーク破綻への関与について、人体病理標本 (冠動脈インターベンション治療時に採取された冠動脈プラークおよび血栓標本) を用いて PTX3 の局在と蛋白・遺伝子発現を解析し、病理組織所見ならびに臨床データとの関連を解析する。さらに、血栓形成への関与について人体病理標本と血液フローチャンバースystem・培養細胞・動物実験により、その作用機序を検討し、心血管イベント発症における新規催炎因子 PTX3 の作用を明らかにし、新規治療薬としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 人体病理標本を用いた解析
狭心症患者の冠動脈アテレクトミー (DCA) 標本、急性冠症候群患者の冠動脈から採取された吸引血栓を用いて、プラークおよび血栓内における PTX3 の局在と発現を、免疫組織化学的手法 (酵素抗体法、蛍光抗体法) を用いて明らかにする。

(2) 血栓形成における機能解析
血小板凝集計および血栓形成をリアルタイムに可視化できるフローチャンバースystemを用いて、血小板凝集ならびに流血下 (特に動脈を想定した流速下) での血栓形成における PTX3 の関与 (抑制作用) を明らかにする。特に血栓形成過程のどのステップで作用するのかを明らかにする。

(3) 培養細胞、動物モデルによる解析
人体病理標本の解析結果を基に、ヒト培養細胞 (平滑筋細胞、内皮細胞、マクロファージ) を用いて、炎症性サイトカイン (IL-1, 6, TNFa など) および凝固系因子による PTX3 発現調節と PTX3 によるこれらの細胞の増殖・遊走能を明らかにする。また申請者らが確立したアテローム血栓症動物モデルを用いて、In vivo における PTX3 の抗血栓機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 人体病理標本を用いた検討
免疫組織化学を用いて、冠動脈壁・プラーク・血栓組織における PTX3 蛋白の局在を検討した。冠動脈インターベンション治療時に採取された冠動脈プラーク標本、吸引採取された血栓標本、若年者剖検症例の冠動脈標本において、PTX3 は正常動脈では外膜にのみ陽性を呈した。狭心症患者のプラークでは、細胞外マトリックスおよびマクロファージで発現が観察され、血栓内にも局在を認めた (図1)。また、安定狭心症患者症例と比較し、不安定狭心症患者症例では PTX3 発現が有意に高かった (表1)。

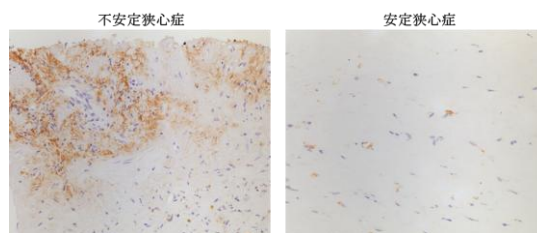


図1 冠動脈アテレクトミー標本における PTX3 の局在

表1 免疫組織化学を用いた不安定狭心症と安定狭心症の比較

	不安定狭心症 (n = 25)	安定狭心症 (n = 25)	p value
血栓 (%)	52%	72%	NS
CD68 (%)	4.5 (1.0-7.2)	1.2 (0.5-3.8)	0.039
CD3 (numer/mm ²)	21 (8-55)	10(2-25)	0.024
α-SMA (%)	7.9 (2.9-11.8)	6.99 (4.2-14.2)	NS
PTX3 (%)	0.94 (0.2-4.2)	0.25 (0-0.8)	0.005

(2) 血栓形成における機能解析

①健常ボランティアの血液を用いて、血小板凝集能におけるPTX3の抑制作用を検討した。PTX3添加群では、非添加群と比較し有意に血小板凝集率が低下し、その作用は濃度依存性であった。また、PTX3のN末端領域を含む変異体合成蛋白に血小板凝集抑制作用を認め、N末端領域に血栓調節作用がある可能性が示唆された(図2)。全血を用いた血液凝固能の測定では、PTX3添加群と非添加群間に有意差を認めなかった(図3)。

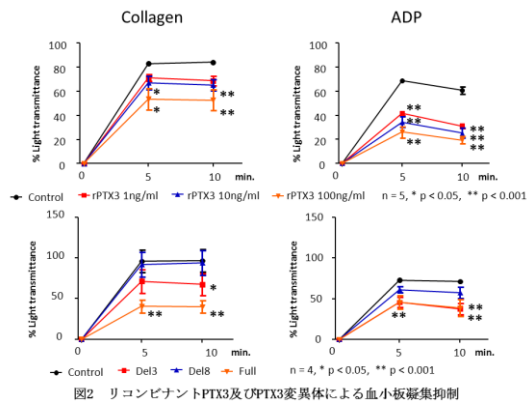


図2 リコンビナントPTX3及びPTX3変異体による血小板凝集抑制

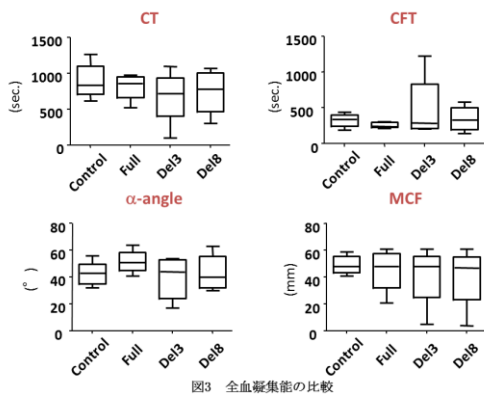


図3 全血凝集能の比較

②血栓をリアルタイムで観察・測定できる血液フローチャンバーを用いた実験を行った。動脈硬化巣に高発現するI型コラーゲンを塗付したガラス板上に血小板血栓を形成し(図4)、面積率を比較検討した。高ズリ応力領域および低ズリ応力領域ともに、PTX3添加群で優位に血小板面積率が低下していた(図5)。

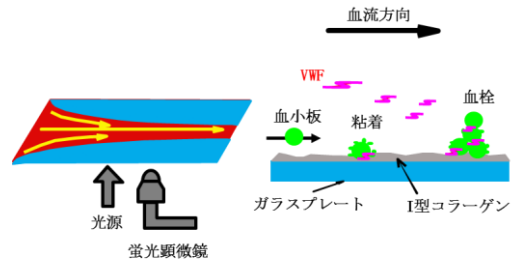


図4 血液フローチャンバーシステム

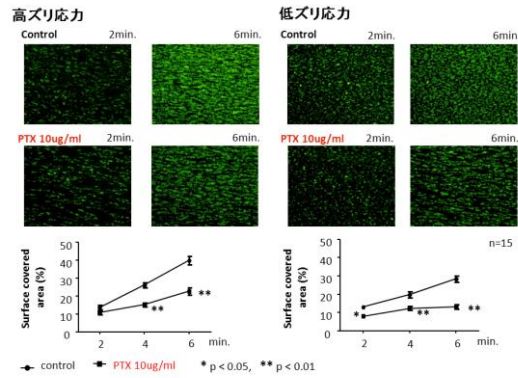


図5 血流下におけるリコンビナントPTX3の血栓形成抑制

以上より、PTX3はプラークに存在し、プラーク破綻後の血栓形成に対して、抑制的作用および防御的機能を発揮していると予測される。現在は、培養細胞や動物モデルを用いて、PTX3の抗血栓作用を検討中である。

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6件)

①Matsuda S, Yamashita A, Sato Y et al(15人, 7番目), Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. J Thromb Haemost. 査読有, 9: 2011, 201-208

② Takahashi M, Yamashita A, Moriguchi-Goto S et al, Inhibition of factor XI reduces thrombus formation in rabbit jugular vein under endothelial denudation and/or blood stasis. Thromb Res. 査読有, 125: 2010, 464-470

③ Takahashi M, Yamashita A, Moriguchi-Goto S et al, Critical role of von Willebrand factor and platelet interaction in venous thromboembolism. Histol Histopathol. 査読有, 24: 2009, 1391-1398

[学会発表] (計 2 件)

① 杉田千泰, Elevates plasma levels of factor VIII enhance thrombus formation though excess thrombin generation in rabbit jugular vein. XXIII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2011年7月27日, 日本(京都)

② 盛口清香, Pentraxin 3 in atherosclerotic plaque reduces platelet thrombus formation under flow. 6th Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis. 2010年10月16日, インドネシア (バリ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盛口 清香 (MORIGUCHI SAYAKA)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：90468041