

## 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 25 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791206

研究課題名（和文） 静脈血栓症の分子標的治療

研究課題名（英文） Molecular-targeted therapy of venous thromboembolism

研究代表者

古小路 英二（FURUKOUJI EIJI）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00423723

研究成果の概要（和文）：本研究では、血小板上に特異的に発現している CLEC-2 蛋白を遺伝子導入により静脈壁に過剰発現させ、血小板凝集を惹起する Podoplanin 蛋白の機能を競合的に抑制することにより、局所での静脈血栓形成を抑制可能か否かを検討した。この結果、局所への遺伝子導入により、ラットの静脈血栓モデル血管において目的蛋白の持続的発現および抗血栓効果の可能性が示唆されたが、更なる検討の必要性も考えられた。

研究成果の概要（英文）：Platelet activation receptor CLEC-2 binds to podoplanin, thereby leading to platelet activation and thrombus formation. The present study examines whether local gene transfer suppress platelet aggregation and thrombus formation after adenovirus-mediated gene transfer to venous wall competitively. As a result, although further studies are needed, the possibility of persistent expression of target protein and antithrombotic effect were suggested in a rat model of venous thrombosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：深部静脈血栓症、遺伝子導入、静脈、Clec-2

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに数多くの静脈血栓塞栓症の血管内治療に携わってきたが、血栓吸引後に使用する血栓溶解剤や抗凝固剤の副作用による脳出血死亡例、薬剤継続困難のための血栓残存・増悪例など、薬剤の副作用に起因する

治療困難例を経験した。これらの経験から学んだことは、副作用を有するこれら血栓溶解、抗凝固剤の投与量を可能な限り減らして血栓吸引を行い、かつ、短期間に対象静脈に抗血栓環境を確立することの重要性である。

本研究では、これまでに遺伝子導入の手法

を用いて局所の血管壁における持続的な蛋白発現、抗血栓作用を検討した経験に基づいて、遺伝子導入が局所の静脈血栓形成を抑制可能であり、かつ全身の合併症発生を抑制可能であることに着目した。この研究では、血小板上に特異的に発現している分子を遺伝子導入により静脈壁に発現させることにより、局所での静脈血栓形成を抑制することを検討する。血栓吸引後の静脈壁には抗血栓因子が欠如しているため、現在では薬剤の使用が不可欠であるが、この方法により全身の合併症を起こすことなく、局所の静脈血栓を治療することが可能となる。また、本法は、術前に静脈血栓形成が危惧される例において、予防的に静脈壁に分子を発現させ、静脈血栓形成の予防に応用できる方法である。

## 2. 研究の目的

これまでの研究の結果、動脈壁では組換えアデノウイルスを用いた局所遺伝子導入により、全身の凝固系には影響することなく、目的の血管壁において目的の蛋白発現が見られ、強力な血栓抑制効果が見られることを報告した。これらの結果を踏まえて行った静脈壁での検討では、静脈壁の構造は動脈壁と異なり、中膜が薄く、遺伝子発現の量が弱いことが示唆された。また、静脈では血栓形成に関する血管の収縮機序の関与が少なく、動脈とは異なる血栓抑制機序が必要と考えられた。これらの点を考慮すると、これまではADP やフォンビルブラントファクターなど、血小板外の分子をターゲットとして検討してきたが、レセプターなど血小板上に発現している分子を標的とした、新たな抑制機序の必要性が考えられた。

最近になり血小板上に CLEC-2(C-type lectin-like receptor-2) というレセプターが存在し、血小板凝集を引き起こすことが報告された。CLEC-2 は膜蛋白であり、がん細胞上に発現している Podoplanin と結合することにより、血小板凝集を惹起するといわれている。さらに最近の研究では、動脈硬化性病変など血管壁の異常状況においては Podoplanin が過剰発現しており、これが血栓形成を引き起こすことが示されてきている。したがって本研究においては、静脈壁に CLEC-2 を過剰発現させ、静脈壁での Podoplanin の機能を競合的に抑制することにより、これらの異常状況下での血小板凝集を抑制しようとするものである。

静脈血栓塞栓症に対して上記の機序を考えると、CLEC-2 レセプターへの阻害抗体投与あるいは CLEC-2 そのものの投与でも血栓抑制効果があることが予想される。しかしこれらの投与方法では抑制効果は一過性であり、また、全身の副作用などの弊害を考えると、臨

床応用までには困難が予想される。遺伝子投与による分子標的治療は、その発現場所および期間をコントロール可能であり、臨床への応用が非常に期待されるものである。

これまでにヒトの動脈硬化性病変において、CLEC-2 および Podoplanin の発現状況が検討されている。これによると、病変の見られない動脈壁においてはこれらの分子の発現は見られないのに対し、動脈硬化性病変においては CLEC-2 および Podoplanin の発現が示唆されている。

また、培養細胞を用いた生体外実験にてこの2つの分子の発現状況を検討すると、相互に関連して発現が増減していることが示唆されたが、現在までに詳細な検討はなされていない。本研究では、CLEC-2 の血栓抑制効果を検討するとともに、これらの相互作用についても検討する予定である。

静脈血栓の主体は、血小板の関与は少なく、血液凝固因子の関与が主体とされてきたが、これまでの我々の検討により、血小板機能阻害は静脈血栓抑制に重要と考えられる。この研究の特徴は、副作用の問題が危惧される薬剤投与に代わりに、血小板上の分子を遺伝子導入により局所発現させ、静脈血栓の予防および治療に応用することである。分子の局所発現は、出血など全身的な合併症を抑えるために重要で、かつ強力な静脈血栓抑制効果を示すと考えられる。

今回の研究では、以下のごとく血小板膜上分子の遺伝子導入を用い、局所高発現下での抗血栓作用を検討する。

### (検討内容)

(1) CLEC-2 遺伝子を組換えたアデノウイルスベクターを作製し、これを培養血管内皮細胞に導入することにより、その活性、分泌能、遺伝子導入効率、血小板凝集反応への影響を *in vitro* にて検討する。

(2) 次に実験動物の静脈壁に遺伝子導入し、生体内での血栓形成の抑制能を画像的、組織学的、分子生物学的に検討する。

### (予想される結果と意義)

(1) これまでの研究結果から、血管壁に導入された遺伝子はある一定期間で蛋白発現と活性を示すと予想される。蛋白発現は目的静脈でのみ見られ、全身の凝固状態には影響はもたらさないと予想される。

(2) 静脈血栓に対しては、抗血小板薬の投与は効果が少ないとされているが、局所での蛋白高発現下では、抗血栓作用が期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子組換えアデノウイルスの作製

CLEC-2 遺伝子の組換えアデノウイルスを作製する。この蛋白質の cDNA を PCR 法にて shuttle vector へクローニングした後、その vector を用いてアデノウイルスの遺伝子組換え体を作成する。

#### (2) 培養細胞への導入実験

作製した遺伝子組換えアデノウイルスによる遺伝子導入効率を培養細胞にて検討する。培養細胞にはヒト血管内皮細胞を使用する。この細胞に対し遺伝子導入を行い、遺伝子導入の効率、目的蛋白質の発現、活性を測定する。

#### (3) 動物実験モデルの作製、遺伝子導入、評価

SD ラット (♂、生後 8 週前後) の下大静脈を露出・結紮した後、内部に組換えアデノウイルスを注入し、遺伝子導入を行う。遺伝子導入の後、経時的に安楽死させ、血管壁の CLEC-2、Podoplanin 蛋白質量および活性を評価する。

遺伝子導入の効率、期間を評価した後、遺伝子導入した下大静脈に対し血栓形成を惹起させ、深部静脈血栓モデルを作成する。静脈血栓の程度、範囲、性状、量を超音波、光学顕微鏡、分子生物学的、および組織学的に解析する。

### 4. 研究成果

組換えアデノウイルスは、Clec-2 遺伝子、および比較のため、生理活性を有しない遺伝子として、LacZ 遺伝子を組換えたものを作成した。これらの組換えアデノウイルスを用い、培養ヒト血管内皮細胞に対して両遺伝子の導入を行った。LacZ 遺伝子導入群と Clec-2 遺伝子導入群で比較した結果、Clec-2 遺伝子を導入した血管内皮細胞においては、有意な差をもって目的蛋白質の発現が認められた。

以上の結果を踏まえ、ラット静脈における抗血栓効果の評価をすることとした。静脈血栓モデルはラットの下大静脈を結紮することにより作成した。コントロール群である非遺伝子導入群では、下大静脈内腔を充満する血栓形成が確認された。血栓の性状はフィブリンと赤血球を主体とする血栓であった。

引き続き、組換えアデノウイルスベクターを用いてラットの下大静脈に遺伝子導入を行った。この静脈壁における蛋白質発現量、酵素活性測定を行った。遺伝子導入の結果、免疫組織染色において静脈壁での目的蛋白質発現が示唆された。この遺伝子導入後に下大静

脈を結紮し、血栓の量や範囲、性状の比較検討を行った。この結果、Clec2 遺伝子導入群においては静脈血栓量が少ない状況が示唆されたが、その差は当初の予想よりは少なかった (図 1: コントロール群を 100% とし、その対比を示した)。

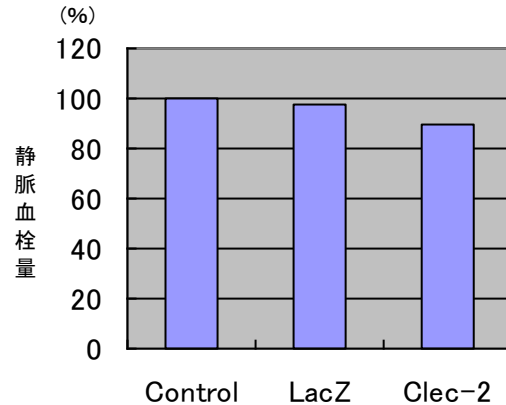


図1

#### 考察

本研究では、血小板上に特異的に発現している CLEC-2 蛋白質を遺伝子導入により静脈壁に過剰発現させ、血小板凝集を惹起する Podoplanin 蛋白質の機能を競合的に抑制することにより、局所での静脈血栓形成を抑制可能か否かを検討した。Clec2 遺伝子導入群においては静脈血栓量が少ない状況が示唆されたが、その差は当初の予想よりは少なかった。この実験結果には、静脈血栓の性状が影響したことが考えられる。今回の静脈血栓モデルにおける血栓の解析では、その主体はフィブリンと赤血球であった。静脈血栓形成には血流のうっ滞や血液性状の変化が要因と考えられているが、これまでの検討では、臨床症例も含め、静脈内皮の剥離などによる血小板の関与もあるものと考えられ、本研究では静脈血栓に対する抗血小板凝集因子として Clec2 の遺伝子導入を行った。しかし、上述のごとく今回の静脈血栓モデルでは血小板の関与が少ない可能性もあり、静脈モデルの再考も必要である。

その他、血管壁におけるラットとヒトとの Podoplanin の発現量、活性の差が影響した状況も考えられる。ヒトにおいて Podoplanin 蛋白質は動脈硬化巣において優位に発現していることが示されているが、ラットの動脈硬化巣モデルでは Podoplanin の発現が低い状況が今回別に施行した実験で見られており、ラットにおける Podoplanin の血小板凝集への影響が少ない可能性も考えられる。ただ、生体外実験ではラット Podoplanin とラット血小板は強い凝集反応を示しており、生体内

での挙動など、その詳細は現時点では不明である。

今回の研究により遺伝子導入が静脈血栓量に影響を与える可能性が示唆されたが、その程度にはラット静脈血栓モデルにおける血栓の性状や目的蛋白の活性、その他アデノウイルスに対する炎症反応等が影響した状況が考えられる。今回の蛋白に関しては静脈壁では強力な抗血栓効果を示す程度の発現量が得られない状況も考えられるが、静脈血栓モデルや投与法の検討も必要と思われる。

#### 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古小路 英二 (FURUKOUJI EIJI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00423723

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし