

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790410

研究課題名（和文）アテローム血栓症に繋がる低酸素性応答と血栓形成に関する研究

研究課題名（英文）Hypoxia in atherosclerotic plaque and thrombus formation

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、動脈硬化巣（プラーク）の低酸素状態と血栓性因子に注目し、心筋梗塞を引き起こす血栓症の病態を解析した。ヒト冠動脈において血栓性プラークで低酸素反応性の転写因子の発現が亢進しており、家兎動脈硬化性血栓モデルにおいて、低酸素領域と血栓サイズに正の相関を認めた。よって、プラークの低酸素状況が血栓形成に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Nuclear translocation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  increased in human thrombotic coronary plaques compared with that in non-thrombotic plaques. Hypoxic area in rabbit atherosclerotic plaques correlated with balloon catheter induced thrombus size. The results suggest that hypoxia in atherosclerotic plaque contribute to vascular thrombogenicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：動脈硬化症、低酸素、血栓

## 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞に代表されるアテローム血栓症は、動脈硬化巣（プラーク）が破綻し、血栓が血管内腔を塞ぐことで発症する。しかしながら、アテローム血栓症における血栓サイズの制御機構は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究ではプラークの低酸素状態と血栓能の関連を明らかにするために、人体病理標本とアテローム血栓症の動物モデルを用いて、プラーク内の低酸素性応答による血栓能の

制御機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)不安定狭心症と安定狭心症の切除プラークを用いて、hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ の発現や細胞成分について免疫組織化学を用いて検討する。

(2)家兎動脈硬化性血栓モデルを用いて、動脈の低酸素領域と血栓サイズの関連や血栓性因子の発現を検討する。

(3)家兎動脈硬化性血栓モデルを用いて、動脈における <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (FDG)の集積と血栓サイズや血栓性因子の発現を検討する。

### 4. 研究成果

(1)不安定狭心症症例の冠動脈プラークでは、安定狭心症と比較して、マクロファージや T リンパ球等の炎症細胞浸潤や HIF-1 $\alpha$ の陽性核数が増加しており、平滑筋細胞は減少していた。また、血栓性プラークにおいて、HIF-1 $\alpha$ の陽性核数が増加していた。

(2)家兎動脈硬化血管には様々な程度に低酸素領域（ピモニダゾール陽性）が存在し、ピモニダゾール陽性面積は、血管面積、マクロファージ面積、組織因子（血液凝固の開始因子）陽性面積と正の相関を示した。家兎動脈硬化性血栓モデルにおいて、ピモニダゾール陽性面積は血栓面積と正の相関を示した。家兎動脈硬化巣を低酸素下で培養すると、組織因子やプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1の発現が増加した。それらの増加は HIF-1 $\alpha$ の阻害により抑制された。

これらの結果から、プラークの低酸素性応答が血栓性因子の発現増加や血栓形成に関与していることが示唆された。

低酸素応答性因子が新規血栓予防薬の標的

になりうること、低酸素の検出によりプラークの血栓性が評価しうることを示唆される。

(3) Positron emission tomography (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、摘出後の動脈硬化血管は有意に高い放射活性を示した。オートラジオグラフィで測定した血管壁の放射活性は血管壁におけるマクロファージの集簇、TF 発現、nuclear factor (NF)- $\kappa$ B 陽性核数と正の相関を示した。また動脈硬化血管に形成された血栓は健常血管と比べて有意に大きく、血小板糖タンパク IIb/IIIa とフィブリンの陽性面積は血管壁の放射活性、TF 発現、NF- $\kappa$ B 陽性核数と正の相関を示した。ウサギ動脈硬化巣の培養において、NF- $\kappa$ B 阻害薬は TF 発現を有意に抑制した。

動脈壁における FDG 集積の程度は炎症性応答や凝固因子発現と関連し病巣の血栓能を反映すると考えられた。FDG-PET により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。

### 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 8 件）

- 1) Funatsu T, Yamashita A, Kaku S, et al (5). Plasma factor Xa inhibition can predict antithrombotic effects of oral direct factor Xa inhibitors in rabbit atherothrombosis models. *Thromb Haemost.* 2012; 108: 896-902. 査読有, doi: 10.1160/TH12-04-0267.
- 2) Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, et al (14). Paucity of CD34-positive cells and increased

- expression of high-mobility group box 1 in coronary thrombus with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2012; 224: 511-514. 査読有, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.027.
- 3) Kuroki M, Nakada H, Yamashita A, et al (9). Loss of cellular viability in areas of ground-glass opacity on computed tomography images immediately after pulmonary radiofrequency ablation in rabbits. *Jpn J Radiol*. 2012; 30: 323-330. 査読有, doi: 10.1007/s11604-012-0054-y.
  - 4) Matsuda S, Yamashita A, Sato Y, et al.(15) Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. *J Thromb Haemost*. 2011;9:201-8. 査読有, doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04086.x.
  - 5) Yamashita A, Asada Y. A rabbit model of thrombosis on atherosclerotic lesions. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:424929. 査読有, doi: 10.1155/2011/424929.
  - 6) Nakamura E, Tanaka N, Kuwabara M, Yamashita A, et al.(10) Relative contributions of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes in 5-HT-induced vasoconstriction of the distended human saphenous vein as a coronary artery bypass graft. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:82-6. 査読有
  - 7) Sato S, Sato Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Yamashita A, et al. (7) Quantitative analysis of vessels with smooth muscle layer in astrocytic tumors: correlation with histological grade and prognostic significance. *Histol Histopathol*. 2011;26:497-504. 査読有
  - 8) Kuroiwa Y, Yamashita A, Miyati T, et al.(11) MR signal change in venous thrombus relates organizing process and thrombolytic response in rabbit. *Magn Reson Imaging*. 2011;29:975-8. 査読有 doi: 10.1016/j.mri.2011.04.015.
- [学会発表] (計 11 件)
- 1) Sugita C. Yamashita A, et al. Elevated 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. July 23-28, 2011, Kyoto.
  - 2) Kuroiwa Y, Yamashita A, et al. Sequential magnetic resonance signal change of venous thrombus relates to organizing processes and thrombolytic responses in rabbits. XXIII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis. July 23-28, 2011, Kyoto.
  - 3) Yamashita A, Kuroiwa Y, Asada Y. Sequential magnetic resonance signal change of venous thrombus relates to organizing processes and thrombolytic responses in rabbits. Aso International Meeting. July 29-31, 2011.
  - 4) Yamashita A. Thrombus formation on disrupted plaques. XXIII Congress of International Society on Thrombosis

- and Haemostasis July 23-28, 2011, Kyoto.
- 5) Yamashita A. Disturbed blood flow induces plaque erosion and thrombus formation. 57th annual SCC meeting. July 23-28, 2011, Kyoto.
  - 6) 山下 篤, 他: 動脈血管壁への <sup>18</sup>F-フルオロデオキシグルコース集積は血栓形成能を反映する. 第34回日本血栓止血学会学術集会. 2012年6月7-9日. 東京
  - 7) 松田俊太郎, 山下 篤, 他: 症候性血栓と無症候性血栓を伴う冠動脈病変の比較. 第34回日本血栓止血学会学術集会. 2012年6月7-9日. 東京
  - 8) Yamashita A, Asada Y. What determine arterial thrombus size on disrupted plaques? 1<sup>st</sup> Japan-China joint Rabbit Bioscience Forum, Aug 1-3, 2012, Miyazaki.
  - 9) 黒岩 靖淳, 山下 篤, 他、血栓成分の違いが MR 所見の不均一性に関連する、第40回日本磁気共鳴医学大会. 2012年9月6-8日, 京都
  - 10) Yamashita A, Zhao Y, Zhao S, et al. <sup>18</sup>F-FDG uptake reflects thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor-κB in rabbit atherosclerotic lesions. American Heart Association Scientific Sessions 2012. Nov.3-7, 2012, Los Angeles, USA.
  - 11) Vascular hypoxia augments thrombogenic potential of atherosclerotic plaque: Interactive contribution of HIF-1α and NF-κB. Matsuura Y, Yamashita A, Iwakiri T, et al. American Heart Association Scientific Sessions 2012 Nov.3-7, 2012, Los Angeles, USA.

[図書] (計 1 件)

Yamashita A, Asada Y. Pathology and pathophysiology of atherothrombosis: Virchow's triad revisited. In: Traditional and novel risk factors in atherothrombosis. Gaxiola (ed). Intech, 1-20 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 動脈硬化の検査法

発明者: 浅田祐士郎、北村和雄、山下 篤、松浦祐之介

権利者: 国立大学法人宮崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-084684 号

出願年月日: 2012年3月31日

国内外の別: 国内

○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

<http://www.miyazaki-med.ac.jp/pathol/index.htm>

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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )