

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590420

研究課題名(和文)アテローム血栓症におけるポドプランニン/CLEC-2の関与

研究課題名(英文)Involvement of Podoplanin/CLEC-2 in atherothrombosis

## 研究代表者

畠山 金太(Kinta, Hatakeyama)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60325735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞や脳梗塞などのアテローム血栓症は、粥状動脈硬化巣(プラーク)の破綻に伴う血栓形成により発症する。本研究では、アテローム血栓症の発症における血小板凝集促進因子Podoplanin/CLEC-2の関与について、剖検例の冠動脈と狭心症・心筋梗塞患者の冠動脈アテレクトミー標本および吸引血栓を用いて臨床病理学的検討を行う。さらに血栓イメージング法、動物実験により、Podoplanin/CLEC-2システムのIn vivoにおける血栓促進作用の検討を行い、アテローム血栓症の治療ターゲットとしての可能性を探る。

研究成果の概要(英文)：Podoplanin/CLEC-2 is a platelet aggregation factor. In this study, the role of Podoplanin/CLEC-2 system in the pathogenesis of atherothrombosis was investigated. Using directional atherectomy(DCA) samples of angina pectoris patients(n=220), aspirated thrombi from coronary arteries of acute myocardial infarction(AMI) patients(n=100) and coronary arteries(n=60) from autopsy samples, we demonstrated that Podoplanin/CLEC-2 was overexpressed in the atherosclerotic lesions, and involved in the pathogenesis of atherothrombosis/acute coronary syndromes.

研究分野：病理学

キーワード：人体病理 循環器 動脈硬化 心筋梗塞 免疫染色 吸引血栓 組織病理学 real time PCR

### 1. 研究開始当初の背景

アテローム血栓症は死因の上位を占め、その病態の解明と予防・治療法の確立は医学のみならず社会的にも急務の課題となっている。アテローム血栓症の発症における血栓形成には、血小板の活性化と組織因子の過剰発現が重要である。我々はこれまでに、血小板の凝集阻止に作用する Ecto-ATPase/CD39 や ADAMTS-13 のプラークあるいは血栓内での発現を検討し、アテローム血栓症の発症・予防について研究してきた (*Am J Cardiol* 2005, *Circulation* 2005, *Atherosclerosis* 2009)。しかし血管内腔で血小板凝集が促進し、血栓が成長していく機序についてはまだ解明されていない。

ポドプラニン(I型膜貫通型タンパク質)で、マウス結腸がん細胞上に発現し、血小板凝集を介してがん細胞の肺転移を促進する因子(Aggrus)として同定された分子である。現在、リンパ管内皮細胞のマーカーとして知られているが、腎の糸球体上皮細胞(ポドサイト;ポドプラニンという名称の由来)や肺のI型肺胞上皮細胞など生体内に広く分布しており、さらに肺や口腔の扁平上皮癌、セミノーマ、脳腫瘍(astrocytic tumor)などの腫瘍細胞あるいは腫瘍間質の線維芽細胞にも発現しており、腫瘍の悪性度や予後との相関性が報告されている。また阻害実験等により、ポドプラニンは癌転移抑制薬の有望なターゲット分子としても注目されている。最近になってポドプラニンに対する血小板上の受容体が同定(CLEC-2;C型レクチン様レセプターの一つ)され血栓の形成に関与することが報告された。しかし、ポドプラニン/CLEC-2と動脈硬化やアテローム血栓症との関連性についてはまだ検討されていない。

### 2. 研究の目的

これらの背景を踏まえ、以下の3つの

目標を掲げ、本研究を遂行する。

- (1) ヒトの病理組織標本を用いた解析: ヒト剖検症例冠動脈標本、狭心症患者の冠動脈アテレクトミー(DCA)標本および心筋梗塞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、非プラークおよび血栓におけるポドプラニン/CLEC-2発現とその局在を検討する。
- (2) 臨床データとの対比: これらの結果と臨床所見(心筋梗塞・不安定狭心症 vs. 安定狭心症、再狭窄の有無と狭窄度)を比較検討し、心筋梗塞発症におけるポドプラニン/CLEC-2の関与について検討する。心筋梗塞の危険因子(糖尿病、高脂血症、高血圧、喫煙など)との関連性についても検討する。
- (3) その他(培養細胞や動物実験など): プラークの構成細胞(平滑筋細胞、内皮細胞、マクロファージ)におけるポドプラニン/CLEC-2発現の有無およびその発現調節についてヒト培養細胞を用いて明らかにする。また *In vitro* 血栓イメージング法(フローチャンバー法)を用いて、血小板凝集および血栓形成に対する抗ポドプラニン抗体(NZ-1)とFc-CLEC-2(CLEC-2のFcキメラ)の作用を検討する。さらに、ラット頸動脈傷害モデルを用いて、動脈硬化症の発生・進展および動脈硬化性血栓に対するポドプラニン・CLEC-2システムの関与を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) 宮崎大学医学部附属病院および教育関連病院で施行されるDCA標本220例、心筋梗塞患者の冠動脈から採取される吸引血栓・血液

サンプル100例およびヒト剖検症例冠動脈標60例を用いて、冠動脈プラークと非プラークにおけるポドブラニン/CLEC-2 蛋白発現の局在を免疫組織化学的に検討し、同時に細胞レベルにおける mRNA 発現量をリアルタイムPCR 法により検討し、動脈硬化巣の組織所見との関連を明らかにする。

(2) DCA標本、吸引血栓・血液およびヒト剖検症例冠動脈標本でのポドブラニン/CLEC-2 蛋白/mRNA発現とその局在および蛋白定量の結果と臨床所見(不安定狭心症 vs. 安定狭心症、再狭窄の有無・程度との関連)を比較検討し、アテローム血栓症発症におけるポドブラニン/CLEC-2 の関与について検討する。また、糖尿病、高脂血症、高血圧、喫煙などの危険因子との関連性についても検討する。

(3) プラーク破綻後の血栓の成長におけるポドブラニン/CLEC-2 の関与を解明するために、ラット頸動脈傷害モデルを用いて血栓形成に対するポドブラニン/CLEC-2 と抗ポドブラニン抗体/Fc-CLEC-2 の作用を検討する。

#### 4. 研究成果

ポドブラニンの発現は平滑筋細胞とマクロファージに認め、動脈硬化の進行度に従い過剰発現する傾向を示した。また進行性プラークでは主にマクロファージに発現しており、また進行性プラークに発現するポドブラニンには糖鎖の付加が起こり血小板凝集能が亢進している可能性が示唆された。ポドブラニンの発現は炎症性サイトカイン(ING gamma)やMMP9の発現と関連し

ていた。したがって、種々の危険因子の集積による動脈壁の炎症反応亢進がポドブラニンの過剰発現につながり、また動脈硬化の進展と血栓傾向に關与する可能性が示唆された。CLEC2 の発現はマクロファージに認めると考えられプラークの進展におけるCLEC2の関与の検討が待たれる。また動脈壁にはCLEC2結合タンパク質が存在しその分子の同定を行った。CLEC2結合タンパク質は動脈壁の平滑筋細胞の分化マーカーであった。

#### 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 33 件)

- 1) Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, Kawahara K, Hatakeyama K, Hashiguchi T, Maruyama I, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kitamura K, Shibata Y, Asada Y. 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: 511-4.
- 2) Matsuura Y, Hatakeyama K, Imamura T, Tsuruda T, Shibata Y, Kodama T, Kitamura K, Asada Y. Different distribution of Pentraxin 3 and C-reactive protein in coronary atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb* . 2012; 19: 837-45.
- 3) Iwakiri T, Yano Y, Sato Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Fujimoto S, Kitamura K, Kario K, Asada Y. Usefulness of carotid intima-media thickness measurement as an indicator of generalized atherosclerosis: Findings from autopsy analysis. *Atherosclerosis*. 2012; 225: 359-62.
- 4) Nishihira K, Hatakeyama K, Kuriyama N, Nomura K, Fukushima Y, Inoue Y, Nakama

- T, Mine D, Sagara S, Ashikaga K, Matsuyama A, Kitamura K, Shibata Y, Asada Y. Presence of older thrombus in patients with late and very late drug-eluting stent thrombosis. *J Cardiol.* 2012; 59: 57-63.
- 5) Sato Y, Ishibashi-Ueda H, Iwakiri T, Ikeda Y, Matsuyama T, [Hatakeyama K](#), Asada Y. Thrombus components in cardioembolic and atherothrombotic strokes. *Thromb Res.* 2012; 130: 278-80.
- 6) Sato Y, Benirschke K, Marutsuka K, Yano Y, [Hatakeyama K](#), Iwakiri T, Yamada N, Kodama Y, Sameshima H, Ikenoue T, Asada Y. Associations of intrauterine growth restriction with placental pathological factors, maternal factors and fetal factors; clinicopathological findings of 257 Japanese cases. *Histol Histopathol.* 2013; 28: 127-32.
- 7) [Hatakeyama K](#), Kaneko MK, Kato Y, Ishikawa T, Nishihira K, Tsujimoto Y, Shibata Y, Ozaki Y, Asada Y. Podoplanin expression in advanced atherosclerotic lesions of human aortas. *Thromb Res.* 2012; 129: e70-6.
- 8) Tsuruda T, [Hatakeyama K](#), Nagamachi S, Sekita Y, Sakamoto S, Endo GJ, Nishimura M, Matsuyama M, Yoshimura K, Sato Y, Onitsuka T, Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Inhibition of development of abdominal aortic aneurysm by glycolysis restriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 1410-7.
- 9) Satomi-Kobayashi S, Kinugasa M, Kobayashi R, [Hatakeyama K](#), Kurogane Y, Ishida T, Emoto N, Asada Y, Takai Y, Hirata K, Rikitake Y. Osteoblast-like differentiation of cultured human coronary artery smooth muscle cells by bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER). *J Biol Chem.* 2012; 287: 30336-45.
- 10) Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, [Hatakeyama K](#), Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K. Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia.* 2012; 26: 1238-46.
- 11) Nagano M, [Hatakeyama K](#), Kai M, Nakamura H, Yodoi J, Asada Y, Chijiwa K. Nuclear expression of thioredoxin-1 in the invasion front is associated with outcome in patients with gallbladder carcinoma. *HPB (Oxford).* 2012; 14: 573-82.
- 12) Nishihira K, [Hatakeyama K](#), Shibata Y, Kitamura K, Asada Y. Organized thrombus in aspirated coronary materials can predict in-hospital mortality of patients with acute myocardial infarction. *Circ J.* 2013;77(5):1275-80.
- 13) Sato Y, Benirschke K, Marutsuka K, Yano Y, [Hatakeyama K](#), Iwakiri T, Yamada N, Kodama Y, Sameshima H, Ikenoue T, Asada Y. Associations of intrauterine growth restriction with placental pathological factors, maternal factors and fetal factors; clinicopathological findings of 257 Japanese cases. *Histol Histopathol* 2013;28:127-32.
- 14) Nishihira K, [Hatakeyama K](#), Shibata Y, Kitamura K, Asada Y. Organized thrombus in aspirated coronary materials can predict in-hospital mortality of patients with acute myocardial infarction. *Circ J.* 2013;77:1275-80
- 15) Nagata S, [Hatakeyama K](#), Asami M, Tokashiki M, Hibino H, Nishiuchi Y, Kuwasako K, Kato J, Asada Y, Kitamura K. Big angiotensin-25: A novel glycosylated

- angiotensin-related peptide isolated from human urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;441:757-62.
- 16) Iwakiri T, Sato Y, Matsuura Y, [Hatakeyama K](#), Marutsuka K, Yamashita A, Fujimoto S, Kitamura K, Asada Y. Association Between Renal Vasculature Changes and Generalized Atherosclerosis: An Autopsy Survey. *J Atheroscler Thromb.* , 2014 21(2):99-107
- 17) Ali H, Emoto N, Yagi K, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, [Hatakeyama K](#), Asada Y, Rikitake Y, Hirata K. Localization and characterization of a novel secreted protein, SCUBE2, in the development and progression of atherosclerosis. *Kobe J Med Sci.* 2013;1109
- 18) Matsuo K, Akakabe Y, Kitamura Y, Shimoda Y, Ono K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, [Hatakeyama K](#), Asada Y, Emoto N, Ikeda K. Loss of apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) protects blood vessels from atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2015 Feb 6;290(6):3784-92. doi: 10.1074/jbc.M114.605287. Epub 2014 Dec 22.
- 19) Sato J, Kinugasa M, Satomi-Kobayashi S, [Hatakeyama K](#), Knox AJ, Asada Y, Wierman ME, Hirata K, Rikitake Y. Family with sequence similarity 5, member C (FAM5C) increases leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells: implication in vascular inflammation. *PLoS One.* 2014 Sep 24;9(9):e107236. doi: 10.1371/journal.pone.0107236. eCollection 2014.
- 20) Sakamoto S, Tsuruda T, [Hatakeyama K](#), Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Impact of age-dependent adventitia inflammation on structural alteration of abdominal aorta in hyperlipidemic mice. *PLoS One.* 2014 Aug 25;9(8):e105739. doi: 10.1371/journal.pone.0105739. eCollection 2014.
- 21) Hao H, Fujii K, Shibuya M, Imanaka T, Kawakami R, [Hatakeyama K](#), Asada Y, Masuyama T, Hirota S. Different findings in a calcified nodule between histology and intravascular imaging such as intravascular ultrasound, optical coherence tomography, and coronary angiography. *JACC Cardiovasc Interv.* 2014 Aug;7(8):937-8. doi: 10.1016/j.jcin.2013.12.212. No abstract available.
- 22) Iwakiri T, Sato Y, Matsuura Y, [Hatakeyama K](#), Marutsuka K, Yamashita A, Fujimoto S, Kitamura K, Asada Y. Association between renal vasculature changes and generalized atherosclerosis: an autopsy survey. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(2):99-107. Epub 2013 Oct 5.
- 23) 畠山金太、鶴田敏博、島尾義也、中田 博、浅田祐士郎：大動脈周囲炎、後腹膜線維症、心血管系の慢性炎症、**別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患** 2012; 1: 52-8.
- 24) 畠山金太、浅田祐士郎：感染・炎症と動脈硬化—人体病理からみた動脈硬化と血栓症について—、**血栓止血誌** 2012; 23: 265-73.
- 25) 畠山金太、浅田祐士郎：動脈硬化の炎症—ヒトの病理からみた動脈硬化の進展機構について—、**血管医学** 2012; 23: 265-73.
- 26) 畠山金太：糖尿病に合併する冠動脈病変の特徴、**べんちのーと** 2012; 23: 7.
- 27) 浅田祐士郎、畠山金太、佐藤勇一郎、山下 篤、丸塚浩助：動脈血栓の電子顕微鏡像とアテローム血栓症の発症機序 病理と臨床 31; 1033-9, 2013
- 28) 畠山金太、山下篤、浅田祐士郎：動脈硬

化・血栓症病態と自然炎症の介在システムとしての凝固線溶・血小板系  
Thrombosis Medicine 3; 311-5, 2013

- 29) 畠山金太、浅田祐士郎：動脈硬化への炎症の関与と泡沫細胞 骨髄—末梢血による炎症の制御と修飾 別冊 BIO Clinica (バイオクリニカ) 慢性炎症と疾患 2; 22-7, 2013
- 30) 畠山金太、浅田祐士郎：特集 最新の動脈硬化診療 どう診断し、どう治療するか？ 急性冠症候群の病理 medicina 2013 Vol.50 No. 6; 954-7
- 31) 畠山金太、浅田祐士郎：特集 慢性炎症から血管疾患をみる 病理学的にみた冠動脈疾患における慢性炎症を知る Vascular Medicine 2013 Vol.9, NO. 1; 13-22
- 32) 畠山金太、浅田祐士郎：特集 動脈硬化のすべて 動脈硬化の発症メカニズム：炎症とのかかわり 医学のあゆみ 2013 Vol.245, No13;1101-1106
- 33) 畠山金太：研究集会 MPM2013、数学と現象：動脈硬化の成り立ちと合併症 報告集 pp30-40

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Hatakeyama K, Kaneko MK, Kato Y, Ishikawa T, Nishihira K, Tsujimoto Y, Shibata Y, Ozaki Y, Asada Y. Podoplanin expression in advanced atherosclerotic lesions of human aortas. 第44回日本動脈硬化学会総会 (福岡、2012)
- 2) Nishihira K, Hatakeyama K, Shibata Y, Kitamura K, Asada Y. Organized thrombus in aspirated coronary materials can predict in-hospital mortality of patients with acute myocardial infarction. 第45回日本動脈硬化学会総会 2013.7.18-19 (東京)
- 3) 畠山金太、佐藤勇一郎、山下 篤、盛口清香、鮫島直樹、丸塚浩助、浅田祐士郎：アテローム血栓症における補体 C1q の

関与 第102回日本病理学会総会 2013年6月6 - 8日 (札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 浅田祐士郎、畠山金太：心・血管、8-27 (2014), 病理組織マップ&ガイド、深山正久 編集、文光堂 (東京)。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奈良県立医大病理診断学講座・准教授・  
畠山金太 研究者番号：60325735

(2) 研究分担者

宮崎大学医学部内科学講座・准教授・  
今村卓郎 研究者番号：60203329

(3) 研究分担者

宮崎大学医学部病理学講座・助教・  
佐藤勇一郎 研究者番号：90347055

(4) 研究分担者

宮崎大学医学部内科学講座・助教・  
鶴田敏博 研究者番号：10389570