

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24590863
 研究課題名(和文) 骨髄由来 EPC の深部静脈血栓塞栓症への関与の解明と新しい血栓陳旧度判定法の確立

 研究課題名(英文) Elucidation of intrathrombotic bone-marrow-derived EPC contribute to deep vein thrombosis and its application to thrombus age estimation in mice

 研究代表者
 野坂 みずほ (Nosaka, Mizuho)

 和歌山県立医科大学・医学部・助教

 研究者番号：00244731

 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)：マウスを用いて下大静脈(IVC)結紮による深部静脈血栓症(DVT)モデルを作成して、血栓陳旧度にもなう血管内皮前駆細胞(EPC)の、血栓中における動態を検討した。
 GFP骨髄キメラマウスを用いてDVTモデルを作成したところ、その血栓の凍結切片に多数のGFP陽性細胞を認めた。これは骨髄細胞が血栓内に遊走してきたことの証明となった。さらに、野生型マウスの血栓のパラフィン包埋切片についてCD34とFlk-2の蛍光二重染色を行い、血栓陳旧度にもなうEPCの動態を解析したところ、EPCはIVC結紮後5日目に出現し、10日目までは増加した。その結果EPCは血栓陳旧度判定に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Deep vein thrombosis (DVT) is multifactorial and often results from a combination of risk factors such as obesity, pregnancy, aging and malignancy. On the GFP chimeric mice, the GFP-positive cells were detected in their thrombi. This phenomenon was a proof of the myeloid cells migrated from their bone marrow. Eight-week-old male wild type mice were employed in this study. DVT was induced by the ligation of inferior vena cava. At 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21 days, histological and immunohistochemical analyses were performed. In a thrombus age of less than 3 days, CD34+/Flk-2+ EPC were not detected. The intrathrombotic EPC were initially observed in thrombus aged 5 days, and their number increased with advances in thrombus age. Our observations indicate the participation of EPC in the thrombi inducing the accumulation of extracellular matrix components, and therefore, detection of EPC could be a useful marker for thrombus age determination.

研究分野：社会医学

キーワード：深部静脈血栓塞栓症 血管内皮前駆細胞 サイトカイン 血栓陳旧度

1. 研究開始当初の背景

法医学実務において、正確な死因および死後経過時間の判定は最重要課題である。そこでその課題を解決するために、我々は以前から、特に剖検時に発見された血栓に着目してきた。血栓の形成時期を明らかにすることは、死亡に至るまでの過程や原死因の判定を左右することもある、重要な因子だからである。実際に、血栓は発症メカニズムにおいてこのような複雑な背景を持ちながらも、剖検時に血栓が発見された場合、外傷と肺動脈血栓症との因果関係を判断する上で、その陳旧度の判定が求められる。法医学は臨床医学と同様に、応用医学である。したがって常に最新の医学研究成果が法医学実務に応用されなければいけない。

近年、骨髄には造血幹細胞のみならず、間葉系細胞に分化する細胞、いわゆる mesenchymal stem cell が存在することが明らかとなってきた。血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell, EPC) が創傷治癒に関与していることが示唆されていると同時に、治療応用への可能性が期待されている。EPC の治療応用としては、創傷治癒にとどまらず、虚血性疾患、動脈硬化症、癌等が挙げられる。しかし、血栓形成・溶解過程における EPC の動態は明らかにされておらず、本研究で、血栓陳旧度にとまなう EPC の動態を解明することは法医学分野のみならず、血栓の診断・治療方法の確立にも応用できると考えられた。

2. 研究の目的

マウスを用いて深部静脈血栓症モデルを作成し、その血栓形成及び溶解過程における血栓内 EPC の動態を、免疫組織化学的に明らかにすると同時に EPC の血栓陳旧度にとまなう変化を明らかにする。ヒトの血栓試料においても EPC を検索する方法を確立し、血栓陳旧度判定のための指標を検索する。最終的には、EPC が血栓陳旧度判定のための有用な指標となり得るか否かについて検討する。

3. 研究の方法

(1) GFP 骨髄キメラマウスの作成及び血栓内における骨髄由来細胞の存在

GFPトランスジェニックマウス(ドナーマウス)から骨髄細胞を無菌的に採取して、12Gyの放射線を照射された8~12週齢のC57BL/6マウス(レシピエント)に骨髄細胞(5×10^6 個)を経静脈的に投与して4週間飼育後、GFP 骨髄キメラマウスとする。このマウスを麻酔下で開腹し、下大静脈を3-0 絹縫合糸により結紮する。結紮後5、10、14日目に安楽死させ、血栓を含む下大静脈下大静脈組織の凍結切片を作成して、蛍光顕微鏡によって血栓およびその周辺部におけるGFP陽性細胞を観察する。

(2) 血栓内 EPC の経時的動態の検索

血栓を含む下大静脈のパラフィン包埋切片について、CD34 と Fli-1 抗体を用いた蛍光二重染色を行い、血栓内における EPC の経時的動

態を検索する。

(3) 血栓形成過程における病態生理学的変化の解析

野生型マウス及びサイトカインやレセプター欠損マウスの下大静脈を麻酔下で結紮する。結紮後1、3、5、7、10、14、21日目に安楽死させ、血栓を含む下大静脈部を採取する。これらの下大静脈は10%ホルマリンにより固定し、パラフィン包埋切片を作成する。また、下大静脈結紮5、10、14日後に各5匹を安楽死させる。下大静脈内から血栓を採取し、血栓の重量および長さ測定した後、-80℃にて冷凍保存する。

サイトカインやレセプター、fibrocyte が血栓形成・溶解過程に及ぼす影響を、免疫組織学的に検討するとともに、この過程に重要な役割を果たす因子の血栓中における遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR によって明らかにする。

4. 研究成果

(1) GFP 骨髄キメラマウスの下大静脈血栓

GFP 骨髄キメラマウスを用いて深部静脈血栓塞栓症モデルを作成したところ、その下大静脈

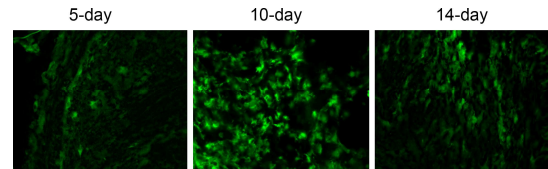


図1 血栓内に遊走する骨髄由来細胞(x400)

の凍結切片の血栓内に多数のGFP陽性細胞が観察できた。これは骨髄細胞が骨髄から遊走してきたことの証明になった(図1)。

(2) 血栓における EPC の検索

さらに、血栓陳旧度にとまなう野生型マウスの血栓パラフィン包埋切片について、CD34 と

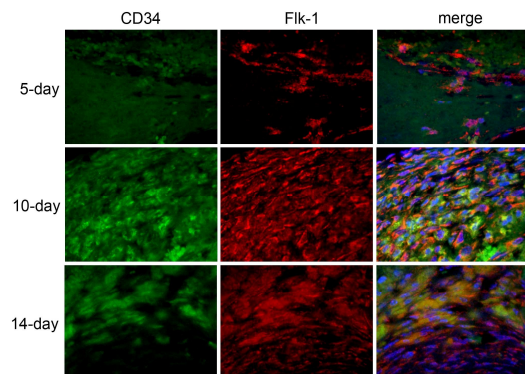


図2 蛍光二重染色による EPC の検索 (x400)

Fli-1 の蛍光二重染色により EPC の動態を解析した。その結果、EPC は血栓陳旧度にとまなう変化し、下大静脈結紮後14日後に最も増加することが分かった(図2、3)。

(3) 血栓内サイトカインおよびレセプターの動態と血栓陳旧度

野生型マウスに比較して IFN- γ ノックアウトマウスでは、血栓溶解が促進され、一方 TNF-Rp55 ノックアウトマウスでは、血栓の溶解

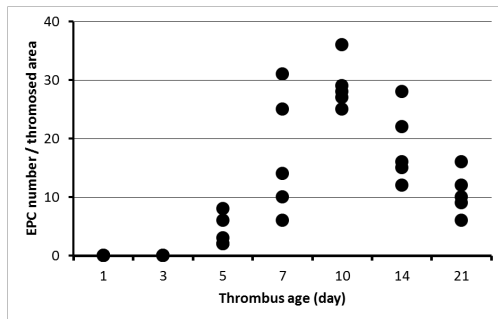


図3 血栓内 EPC 数の変化

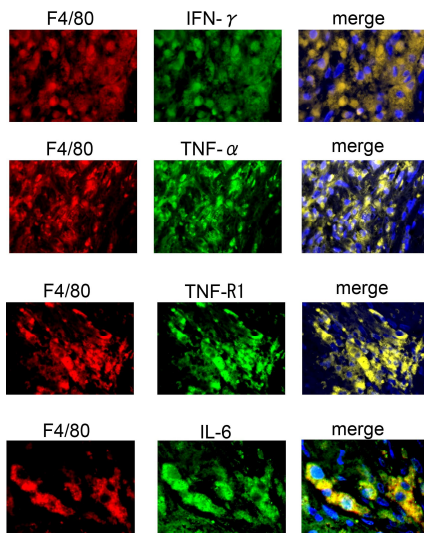


図4 サイトカインおよびレセプターとマクロファージの蛍光二重染色

が遅延することが明らかとなった。IFN- γ 抗体および TNF- α -TNF-Rp55 axis が血栓溶解の促進因子であることを見出したのである。同時に、血栓形成から溶解に至る過程における血栓内の IFN- γ 、TNF- α 、TNF-R1 の動態は、剖検例においても血栓の陳旧度判定に有用な指標となり得ると考えられ、さらに、これらのサイトカインの動態を把握することが血栓症の予防や治療方法の開発に有用であると考えられた。

また野生型マウスに比較して IL-6 ノックアウトマウスでは、血栓の溶解が遅延することが明らかとなり、IL-6 が血栓溶解の促進因子であることを見出した。同時に IL-6/STAT3 シグナル伝達系の欠損が、細胞外器質分解酵素群 (MMP) またウロキナーゼ型プラスミノゲン活性因子 (uPA) などの血栓溶解促進因子を阻害することを明らかにした。血栓内の IL-6 の解析は、剖検例においても血栓の陳旧度判定に有用な指標となり得る可能性も示唆されている。さらに、IL-6 の動態を把握することが血栓症の予防や治療方法の開発に有用であると考えられた。

血栓中にはこれらのサイトカインおよびレセプターの遺伝子発現が認められた。また血栓の蛍光二重染色により、これらのサイトカインおよびレセプターの産生細胞はマクロファージであることが明らかになった(図4)。そこで、これらの陽性細胞数と F4/80 陽性マクロファージ数との比を求め、血栓陳旧度との関連を検索した(図5, a-d)。いずれの比も血栓陳旧度にもなって増

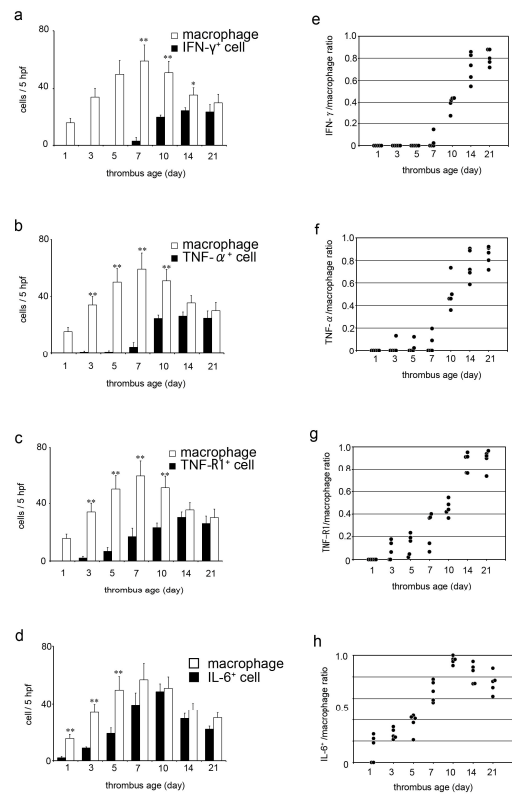


図5 血栓内の IFN- γ 、TNF- α 、TNF-Rp55、IL-6 の動態 (a, e: IFN- γ ; b, f: TNF- α ; c, g: TNF-Rp55; d, h: IL-6)

加し、10日または14日目でピークを示し、21日目には減少傾向を示し、血栓陳旧度判定の重要な指標をなることが示唆された(図5, e-h)。

(4) 血栓内における fibrocyte 検索と血栓陳旧度との関係

血栓器質化および溶解に関わる因子として、血栓内の fibrocyte の動態を明らかにした。野生型マウスの血栓パラフィン包埋切片の CD45 と collagen type 1 の蛍光二重染色により fibrocyte は血栓陳旧度にもなって変化し、下大静脈結紮後 14 日後に最も増加することが明らかにした(図6, 7)。この変化は Masson trichrome 染色結果や、myofibroblast および新生血管の免疫組織化学的染色結果とも一

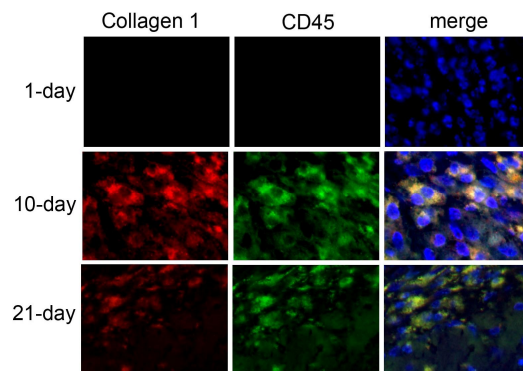


図6 蛍光二重染色による血栓内 fibrocyte の検索

致した。

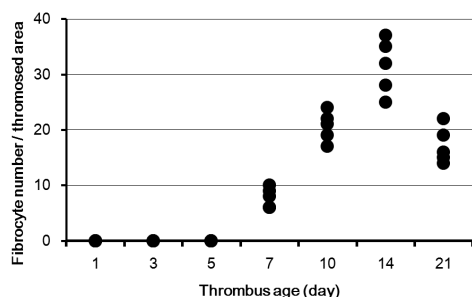


図 7 血栓内 fibrocyte 数の変化

(5) 血栓内 EPC の血栓陳旧度判定の有用性

以上の結果、血栓内 EPC の検索結果は、サイトカインおよびレセプターや、fibrocyte 等から検索した、血栓陳旧度との関連と同期していることが、確認できた。血栓内 EPC の検索により、血栓陳旧度の判定が可能であり、また EPC が血栓の予防や、治療に有用な因子であることも明らかになった。

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 7 件)

Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Kimura A, Kawaguchi T, Hama M, Sakamoto S, Shinozaki K, Eisenmenger W, Kondo T. Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination. Int J Legal Med, 査読有, 2015, DOI: 10.1007/s00414-015-1167-5

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Hama M, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kuninaka Y, Shimada E, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic IL-6 and its application to thrombus age estimation. Int J Legal Med, 査読有, 2015, DOI: 10.1007/s00414-015-1147-9

Kawaguchi T, Hama M, Abe M, Suenaga T, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Yoshikawa N, Kimura A, Kondo T. Sudden unexpected neonatal death due to late onset group B streptococcal sepsis—A case report. Legal Medicine, 査読有, 15, 2013, pp260-263, DOI:10.1016/j.legalmed.2013.02.002

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic macrophage-derived cytokines and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. Int J Legal Med, 査読有, 127(5), 2013, pp937-942, DOI:10.1007/s00414-013-0873-0

Lu P, Li L, Liu G, Baba T, Ishida Y,

Nosaka M, Kondo T, Zhang X, Mukaida N. Critical role of TNF- α -induced macrophage VEGF and iNOS production in the experimental corneal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有, 53(7), 2012, pp3516-3526, DOI:10.1167/iovs.10-5548

Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Immunohistochemical analysis on cyclooxygenase-2 for wound age determination. Int J Legal Med, 査読有, 126, 2012, pp435-440, DOI:10.1007/s00414-012-0685-7

Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical detection of uPA, tPA, and PAI-1 in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age estimation. Int J Legal Med, 査読有, 126, pp421-425, 2012. DOI:10.1007/s00414-012-0680-z

(学会発表) (計 14 件)

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of CCR5 accelerates thrombus formation through reduced VEGF, tPA and uPA expression in mice, 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014/12/10-12, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IL-6 accelerates thrombus formation through reduced MMPs and uPA expression in murine deep vein thrombosis model Second Annual Meeting of the International Cytokine and Interon Society (ICIS), 2014/10/26-29, Melbourne (Australia)

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Kondo T. Forensic pathophysiological study on IL-6 expression for age determination of intrathrombus thrombi. 9th International Symposium Advances in Legal Medicine/第 98 次日本法医学会学術全国集会, 2014/6/16-20, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IL-6 accelerates thrombus formation through reduced MMPs and uPA expression in mice, Interleukin 6; Biology-Pathophysiology-Therapy, 2014/5/14-17, Kiel (Germany)

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Mukaida N, Kondo T. Opposite roles of IFN- γ and TNF- in resolution of stasis-induced deep vein thrombosis. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014/4/14-17, みやこめっせ・京都市勤

業館(京都府・京都市)

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IL-6 accelerates thrombus formation through reduced MMPs and uPA expression in mice. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013/12/11-13, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Lack of TNF-Rp55 delays thrombus resolution in a stasis-induced DVT model through reduced MMPs and uPA expression. 15th International Congress of Immunology, 2013/8/22-27, Milan (Italy)

野坂みずほ, 石田裕子, 木村章彦, 近藤稔和. 深部静脈血栓塞栓症モデルにおける血栓の病態生理学的変化とその血栓陳旧度判定への応用(第3報). 第 97 次日本法医学会学術全国集会, 2013/6/26-28, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Lack of TNF-Rp55 delays thrombus resolution through reduced MMPs and uPA expression in mice. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012/12/5-7, 神戸国際会議場, 神戸国際展示場, ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Kimura A, Kondo T. Forensic pathology of Forensic pathological study on dynamics of intrathrombus IFN- γ for age determination of intravenous thrombi. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2012/7/5-8, Istanbul (Turkey)

Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Kimura A, Kondo T. Pathophysiological role of TNF-Rp55 on murine deep vein thrombosis model. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2012/7/5-8, Istanbul (Turkey)

石田裕子, 野坂みずほ, 木村章彦, 國中由美, 向田直史, 近藤稔和. The lack of TNF-Rp55 delays thrombosis resolution through reduced expression of MMPs and uPA. 第 33 回日本炎症・再生医学会, 2012/7/5-6, ホテル日航福岡(福岡県・福岡市)

Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of TNF-Rp55 delays thrombus resolution through reduced expression of MMPs and uPA. The 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012, 2012/6/15-16, 東京大学, 山上会館(東京都・文京区)

野坂みずほ, 石田裕子, 木村章彦, 國中由美, 川口真理子, 近藤稔和. 深部静脈血栓症モデルにおける TNF-Rp55 の病態生理学的役割解析. 第 96 次日本法医学会学術全国集会, 2012/6/7-9, アクシティ浜松(静岡県・浜松市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野坂 みずほ (NOSAKA Mizuho)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00244731

(2)研究分担者

石田 裕子 (ISHIDA Yuko)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10364077

木村 章彦 (KIMURA Akihiko)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60136611

近藤 稔和 (KONDO Toshikazu)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70251923