

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26460437
研究課題名(和文)アテローム血栓症におけるKalirinの関与

研究課題名(英文)Kalirin in atherothrombosis.

研究代表者

佐藤 勇一郎 (Sato, Yuichiro)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：90347055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：宮崎大学医学部附属病院および教育関連病院で採取された心筋梗塞患者の動脈硬化病変、またはヒト剖検症例の冠動脈標本を用いて、冠動脈の動脈硬化病変でカリリンが発現しているかどうか、発現している場合は臨床所見とどのような関係にあるかを検討した。その結果カリリンは、動脈硬化病変では発現が認められず、動脈硬化との関連は明らかではなかった。今回の検討の中で、全身の動脈硬化病変を評価したところ、72%の症例で、下肢動脈に高度の動脈硬化がみられた。

研究成果の概要(英文)：We studied the expression of kalirin in atherothrombosis. We could not detect kalirin in atherosclerotic or thrombotic lesions by immunohistochemically, in situ hybridization, or PCR examination. We found severe atherosclerosis in lower peripheral arteries in autopsies.

研究分野：病理

キーワード：病理

1. 研究開始当初の背景

アテローム血栓症は動脈硬化巣(アテローム)の破綻が契機となっておこる血栓症で、これらによる急性心筋梗塞や、脳梗塞が死因の上位を占め、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、血小板の活性化とともに凝固因子活性化が重要である。プラーク内には血液凝固系の引き金である組織因子が強く発現しており、プラーク破綻に伴って凝固活性が亢進され、これが血栓形成を促進し、アテローム血栓症の発症に大きく関与する。

申請者らはこれまでに、アテローム血栓症の発生病態における組織因子の検討を続けており、

- 組織因子がヒト動脈硬化巣に強く発現し、特にプラーク破裂部に多量に存在し、血栓の大きさや質に強く関与すること、また組織因子の発現にCRPが作用することを明らかにした。(Atherosclerosis 1997; Heart 2005; J Thromb Haemost 2011)
- また、動物モデルと培養細胞を用いて、組織因子とFVIIa因子の複合体が、平滑筋細胞の強力な遊走因子であり、この抑制因子であるTFPIが動脈硬化と血栓形成を抑制する分子機構を明らかにした。(Thromb Haemost 1997, 1998, 2004; Thromb Res 2002; Atherosclerosis 2009)

これらの結果は、血液凝固因子の引き金となる組織因子が、血栓形成のみならず、動脈硬化の進展にも大きく関係することを示唆しているが、動脈硬化における組織因子の調節機序はまだ明らかにされていない。

Kalirin (カリリン) は、Rho ファミリーに属する多機能蛋白で、神経組織の発生や成長に関与することが知られているが、中枢神経以外にも様々な細胞に存在し、細胞骨格や増殖に働くことが報告されてきている。近年、その遺伝子である KALRN が、冠動脈疾患の独立した危険遺伝子として報告され、動物モデルにおいて、カリリンが動脈硬化病変で強く発現し、平滑筋細胞の増殖に関連すること (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009, 2013) また、カリリンの上流に位置する PDGF は、組織因子の発現を増強することも報告されており (Hypertension 2004)、カリリンが組織因子の発現を介して、アテローム血栓症の発生病態に関与することが示唆される。

2. 研究の目的

ヒト動脈壁でのカリリンの遺伝子発現、また動物モデルによるタンパクの発現についての報告は現時点で2報みられるが (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009, 2013)、組織因子との関連、アテローム血栓症の発症 (特に血栓形成) との関連についての報告はない。

- (1) 動脈硬化巣でのカリリンの発現・局在、組織因子との関連を明らかにする。
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と血液を用いて、硬化巣及び血栓におけるカリリンの発現とその局在および組織因子との局在の差異を検討する。
- (2) カリリン発現の臨床的意義を明らかにする。
上記の組織で得られた結果と臨床所見 (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カリリンの関与について検討する。心筋梗塞の危険因子 (加齢、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) 培養細胞・動物モデルを用いて、カリリンの血管壁細胞への作用を明らかにする。
動脈硬化巣の構成細胞 (内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ) におけるカリリンおよび組織因子の発現と、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。また筆者らが確立したボイデンチャンバーを用いた平滑筋細胞の遊走能、In vitro血栓イメージング法 (フローチャンバー法) を用いて、血栓形成に対するカリリンの作用を検討する。さらに、家兎大腿動脈バルーン再傷害モデル (Atherosclerosis 2009) を用いて、動脈硬化性血栓に対するカリリンの作用を検討する。

3. 研究の方法

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 200 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 60 例およびヒト剖検症例冠動脈標本 50 例を用いて、冠動脈プラークと非プラークにおけるカリリン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 発現量および発現様式をリアルタイム PCR 法、マイクロダイセクション法および In situ hybridization 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。動脈硬化巣における組織因子活性を測定し、組織因子活性を抑制するかどうかを検討する。

プラーク内におけるカリリンの発現調節機構を解明するために、プラークを構成する平滑筋細胞、内皮細胞、マクロファージのヒト培養細胞におけるカリリン発現、および組織因子の発現・活性を検討する。カリリンの血栓形成における関連を検討するため、フローチャンバーを用いた In vitro 血栓形成イメージング法と家兎動脈血栓モデルを用い、さらに抗カリリン抗体による血栓予防効果について検討する。

4 . 研究成果

宮崎大学医学部附属病院および教育関連病院で採取された心筋梗塞患者の動脈硬化病変、またはヒト剖検症例の冠動脈標本を用いて、冠動脈の動脈硬化病変でカリリンが発現しているかどうか、発現している場合は臨床所見とどのような関係にあるかを検討した。その結果カリリンは、動脈硬化病変では発現が認められず、動脈硬化との関連は明らかではなかった。また、臨床経過とも対比して、検討したが、明らかな相関はみられなかった。

今回の検討の中で、剖検症例を用いて全身の動脈硬化病変を評価した。症例は平均 67

歳、男性が 63%であった。死因は 17%が心血管イベント(心筋梗塞、脳梗塞、大動脈破裂)、悪性腫瘍が 46%、その他(膠原病、肝硬変、間質性肺炎など)が 18%であった。症状のない、無症候性の下肢の高度動脈硬化が、72%の症例にみられた。石灰化、プラーク内出血、プラーク破綻に伴う血栓形成などが高頻度に観察された。またこれらの血管では内膜・中膜比が 7.5 と高かった。これら下肢の動脈硬化病変は、60 歳以上の高齢者、高血圧、糖尿病と関連していた。男性、喫煙歴のある症例で、高頻度に高度動脈硬化病変を併発している傾向にあったが、高脂血症とは関連がなかった。これら下肢の無症候性動脈硬化病変とその他の血管の動脈硬化(冠動脈、頸動脈、腎動脈)との関連を検討したところ、冠動脈、頸動脈との関連がみられた。

さらに下肢の動脈硬化病変と臨床所見・臨床診断との関連について検討したところ、無症候性の下肢の動脈硬化病変は、心血管イベント、心筋梗塞、脳梗塞、腎不全と関連することがわかった。

以上のことから、下肢の無症候性動脈硬化病変は、高齢者においては、高頻度に観察され、これらが、その他の動脈硬化病変や、心筋梗塞を含む心血管イベントに関連することが明らかとなった。

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 3 件)

1. Nakamura E, Sato Y, Iwakiri T, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Maekawa K, Gi T, Asada A. Asymptomatic plaques of lower peripheral arteries and their association with

- cardiovascular disease: An autopsy study. J. Atheroscler. Thromb (in press) (査読有)
2. Gi T, Sato Y, Tokumitsu T, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Takeshima H, Sato S, Asada Y. Microvascular proliferation of brain metastases mimics glioblastomas in squash cytology. Cytopathology 2017; 28: 228-234. (査読有)
 3. Tokumitsu T, Sato Y, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Kondo T, Nanashima A, Asada Y. Claudin-18 and Maspin immunoreactivity improves the diagnostic sensitivity of biliary brushing cytology for diagnosing pancreatobiliary malignancies. Cytopathology 2017; 28: 116-121. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 佐藤勇一郎、盛口清香、山下篤、鮫島浩、浅田 祐士郎: 真性癒着胎盤(Placenta accrete vera)の臨床病理学的検討。第24回日本胎盤学会 (2016年11月25-26日、ホテルアバローム紀の国、和歌山市)
2. 野口裕史, 徳満貴子, 大野招伸, 峰松映子, 森田勝代, 黒木栄輝, 盛口清香, 佐藤勇一郎: 眼付属器に発生した低悪性度B細胞性リンパ腫の4症例。第55回日本臨床細胞学会秋期大会(2016年11月18-19日、別府国際コンベンションセンター、大分県別府市)
3. 徳満貴子, 野口裕史, 大野招伸, 峰松映子, 森田勝代, 黒木栄輝, 福島剛、盛口清香, 佐藤勇一郎: Atypical teratoid/rhabdoid tumor の2例。第55回日本臨床細胞学会秋期大会(2016年11月18-19日、別府国際コンベンションセンター、大分県別府市)
4. 佐藤勇一郎、山下篤、盛口清香、前川和也、中村恵理子、魏峻洸、浅田 祐士郎 Stratified mucin-producing intraepithelial lesion (SMILE) 12例の臨床病理学的検討。第13回日本病理学会カンファレンス (2016年7月29日、30日、神戸六甲算ホテル、兵庫県神戸市)
5. 後藤裕磨, 大西淳仁, 西村美帆子, 福島和子, 川越靖之, 鮫島浩, 永井公洋, 佐藤勇一郎: 転移性多発性肺腫瘍をきっかけに PET-CT で見つかったバルトリン腺原発腺様嚢胞癌の1例。第58回日本婦人科腫瘍学会 (2016年7月8-10日、米子コンベンションセンター、鳥取県米子市)
6. 大栗伸行、佐藤勇一郎、松澤聡史、福島和子、鮫島浩、浅田祐士郎 子宮広間膜に生じたSolitary fibrous tumorの1例。第44回日本婦人科病理学会 (2016年6月11日、東京慈恵医科大学、東京都港区)
7. 山下 篤、盛口清香、佐藤勇一郎、浅田祐士郎: 冠動脈の血栓サイズに関連する血管性因子: 解糖系代謝と凝固活性の関連、第37回日本血栓止血学会学術集会 (甲府市総合市民会館、甲府、5/21-5/23, 2015)
8. 佐藤勇一郎、盛口清香、山下篤、福島剛、鮫島直樹、前川和也、魏峻洸、浅田祐士郎: 転移性脳腫瘍における腫瘍血管の形態学的検討。第105回日本病理学会総会 (2016年5月12日-14日、**仙台国際センター**、仙台市)
9. 中村恵理子、佐藤勇一郎、山下篤、盛口清香、鮫島直樹、前川和也、魏峻洸、浅田祐士郎、平戸純子: 上皮芽種性口ゼットを伴ったAtypical teratoid/Rhabdoid tumorの1例。第105回日本病理学会総会 (2016年5月12日-14日、**仙台国際センター**、仙台市)
10. 前川和也、鬼塚久充、坪内拓伸、山下篤、佐藤勇一郎、鮫島直樹、盛口清香、中村恵理子、魏峻洸、浅田祐士郎: Pulmonary capillary hemangiomas (PCH)の1例。第105回日本病理学会総会 (2016年5月12日-14日、仙台国際センター、仙台市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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

佐藤 勇一郎 (Sato Yuichiro)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号：90347055

(2) 研究分担者

山下 篤 (Atsushi Yamashita)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：90372797

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし

()