
研究助成業績報告集

第 20 回（2012 年度）バイエル循環器病研究助成
『日本人における血栓止血の特異性』

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	脳梗塞病態における酸化ストレスによる血液凝固反応亢進機構の 解明	吾郷 哲朗	1
2	「日本人は血栓ができにくいのか？」 新規開発の血栓形成能診断システムによる検証	伊藤 隆史	3
3	新規抗凝固薬による出血合併症の減少を目的とした モニタリング手法の開発	大森 司	7
4	モデルマウスを利用した日本人の静脈血栓症の遺伝的特異性の 解明	坂野 史明	15

脳梗塞病態における酸化ストレスによる 血液凝固反応亢進機構の解明

九州大学病院・腎高血圧脳血管内科・助教
吾郷 哲朗

I. 緒言

脳梗塞は日本人にとっての国民病である。欧米人では冠動脈疾患の比率が脳血管疾患よりも高いが、日本人ではこの比率が逆転する。日本人は欧米人に比べ、脳梗塞3大病型の一つであるラクナ梗塞、および、脳出血の発生頻度が高い。つまり、欧米人に比し、日本人は穿通枝(=細小動脈)血管が障害されやすい民族であるといえる。

穿通枝血管を障害する代表的な危険因子が高血圧・糖尿病であることに異論の余地はない。これらの因子を有することで脳血管障害発症の危険度は有意に増加する。一方で、脳梗塞発症時に血圧や血糖のコントロールが悪い症例では、神経機能が増悪しやすく、機能予後も不良となりやすいことを我々は報告した(1)。つまり、高血圧・糖尿病は、脳梗塞発症のリスクであると同時に、脳梗塞発症後の増悪因子でもある、と考えることができる。

高血圧・糖尿病などの生活習慣病が長期に持続した状況では、血管壁における酸化ストレスが亢進していることが知られている。酸化ストレスの亢進は、活性酸素種の産生増加もしくは活性酸素種消去系酵素の発現・機能低下によってもたらされる。生理的条件下における主たる活性酸素種産生源はミトコンドリア呼吸鎖であると考えられているが、病的状況下においては、活性酸素種産生酵素 NADPH oxidase の役割が近年注目されている(2)。我々は、血管壁細胞とくに血管内皮細胞において NADPH oxidase family タンパク質の一つである Nox4 が高度に発現し、主たる活性酸素種産生源として作用していることを明らかにした(3)。また、Nox4 の発現は脳血管において高いことも報告している(4)。

本研究課題では、血管壁内皮細胞における Nox4 の発現がどのように制御され、これを介した酸化ストレスの亢進が、血液凝固反応にどのような影響を及ぼすか、また、脳梗塞の病態悪化に関連するか

という点に注目して検討を行った。

II. 対象・方法

ヒト培養脳微小血管内皮細胞(Cell Systems Corporation)を購入し、通常培養ならびに低酸素下(1% O₂)での培養を行った。アデノウイルスを用いて Nox4 を脳血管内皮細胞に過剰発現させ、遺伝子発現変化を microarray により網羅的に解析した。本研究では、とくに血液凝固関連分子に注目し、これらの分子の発現変化については、real-time PCR, Western blot などによる検討を加えた。

マウス中大脳動脈永久閉塞脳梗塞モデル(MCAO)を用いて、脳における Nox4 の発現変化を免疫組織染色により検討した。また、我々が作製した血管内皮細胞特異的 Nox4 過剰発現マウス(Tg-EC-Nox4, Tie2 プロモーターを使用)を用いて、MCAO における表現型変化について検討した。

III. 結果

まず、ヒト培養脳微小血管内皮細胞において、NADPH oxidase family タンパク質(Nox1~Nox5)のうち、Nox4 が特異的に発現していることを確認にした。

Nox4 による活性酸素種産生量はその発現量に依存することが知られており、Nox4 の発現に影響を及ぼす因子について、Ang II (10⁻⁵~10⁻⁷M)負荷、高血糖負荷 (500 mg/dl)、低酸素負荷 (1% O₂)などを行い検討した。Nox4 の発現変化に有意な影響(=増加)を及ぼしたのは、調べた限りにおいては低酸素負荷のみであった。そこで、低酸素負荷によって活性化される代表的転写因子である Hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α)と Nox4 の関連について調べた。siRNA を用いて HIF-1α のノックダウンを行った上で、低酸素負荷を行ったが Nox4 の発現上昇は抑制されなかった。逆に Nox4 を過剰発現させると、

HIF-1 α タンパク質の発現が増加した。つまり Nox4 は低酸素負荷により、HIF-1 α 非依存性に発現が上昇し、HIF-1 α を安定化することによって、低酸素応答を増強させる可能性が示唆された。

次に、アデノウイルスを用いて Nox4 を脳血管内皮細胞に過剰発現させ、遺伝子発現変化をマイクロアレイにより網羅的に解析した。興味深いことに、様々な分子の発現変化が生じていた。中でも、炎症性サイトカインや血管栄養因子、解糖系酵素など、低酸素や HIF-1 α によって制御されていることが知られている分子群の発現が有意に増加していた。さらに、血液凝固に関連するタンパク質に注目すると、Tissue factor, plasminogen activator-1(PAI-1)の有意な発現上昇、ならびに、抗凝固タンパク質 Protein C の内皮細胞受容体 endothelial protein C receptor の有意な発現低下を認めた。すなわち、Nox4 の発現が上昇した内皮細胞では血液凝固反応を促進するように作用する可能性が示唆された。

最後に、脳における Nox4 の発現について蛍光免疫組織染色を用いて検討した。正常マウス脳組織において、Nox4 は弱いながらも血管内皮細胞に発現していた。MCAO により脳梗塞を生じさせると、脳梗塞巣ならびにその周囲領域の微小血管内皮細胞、周皮細胞において Nox4 の発現が有意に増加していた。さらに、脳組織 homogenate を用いた定量 PCR により、対側・非虚血組織と比較して虚血組織における Nox4 の有意な発現増加を認めた。

最後に Tg-EC-Nox4 マウスの MCAO における表現型変化について検討した。Tg-EC-Nox4 マウスは、正常マウスに比し、脳梗塞サイズが有意に拡大していた。

IV. 考 察

Nox4 を介した酸化ストレスの増加は、細小血管レベルの内皮細胞において強いようである。その理由として、1) Nox4 の発現量そのものは低酸素によって最も制御をうけていること、および、2) 末梢細小血管は正常状態においてもそもそも酸素分圧が低いこと、などが考えられる。故に、微小血管が豊富に存在する脳においては、Nox4 の発現が高いと考えられる。虚血領域の微小血管の血管壁ではさらに Nox4 の発現が増加する。微小循環における酸化ストレスの発生においては、Nox4 が重要な役割を担っている可能性がある。我々の検討から考察すると、脳梗塞などの虚血病態では、内皮細胞における

Nox4 の発現が上昇し、凝固促進タンパク質の発現上昇ならびに凝固抑制因子の発現抑制を誘導されており、凝固反応が亢進する可能性がある。これらにより、脳虚血時の微小循環障害は益々助長されるものと思われ、このような病態下では、脳梗塞が悪化する可能性がある。Tg-EC-Nox4 において脳梗塞巣が拡大した理由の一つとして、Nox4 を介した血管内皮細胞の酸化ストレス増加とそれに引き続く血液凝固反応亢進が関与している可能性が示唆された。

V. 結 論

脳血管内皮細胞における Nox4 を介した酸化ストレスの亢進は、血液凝固反応を亢進させることにより、脳梗塞の発症、さらには脳梗塞病態の悪化と関連する可能性がある。Nox4 を介した酸化ストレス亢進の是正は、急性期脳梗塞の治療ターゲットになる可能性があると考えられる。

VI. 研究協力者

鴨打正浩・九州大学病院脳血管内科・講師
黒田淳哉・九州大学病院脳血管内科・助教
松尾龍・九州大学病院脳血管内科・医員
牧原典子・九州大学病院脳血管内科・大学院生
有村公一・九州大学病院脳血管内科・大学院生
中村麻子・九州大学病院脳血管内科・大学院生
西村中・九州大学病院脳血管内科・大学院生

VII. 参考文献

- 1) Kamouchi M, Matsuki T, Hata J, et al.: Stroke 2011; 42: 2788-2794
- 2) Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, et al.: Circulation Journal 2011; 75: 1791-1800
- 3) Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, et al.: C irculation 2004; 109: 227-233
- 4) Ago T, Kitazono T, Kuroda J, et al.: Stroke 2005; 36: 1040-1046

「日本人は血栓ができにくいのか？」 新規開発の血栓形成能診断システムによる検証

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任講師
伊藤隆史

I. 緒言

これまでの臨床的観察により、アフリカ系人種は急性冠症候群の高リスク群であり、逆に日本人を含めたアジア系人種は抗血栓療法による出血の高リスク群であることが明らかになっている。これには、血小板の接着因子、凝固因子、リポタンパク質、薬物代謝酵素の遺伝子多型といった先天的要因、食生活、肥満のような後天的要因、さらには治療法やその質などの社会的要因が関係する。このため、「血栓のできやすさに人種差はあるか？」という疑問に対して、疫学的検討のみによって明確な答えを出すことは困難であり、検査医学的検討が求められていた。しかしながら、現今の検査医学的手法は出血傾向の診断には有用だが、血栓傾向を定量的に診断することにはほとんど無力であった。

我々はこの数年、JSTの支援を受け、血栓傾向を科学的、定量的に診断する方法の開発に取り組み、この度、マイクロチップ式血栓形成能解析システム（TTAS）を完成させた（JST プレスリリース <http://www.jst.go.jp/pr/info/info862/index.html>）。本システムでは、キャピラリーに細動脈でのずり応力に相当する速度で血液を流し、血栓が形成されてキャピラリーが閉塞していく過程を、圧力センサーで定量的に評価するとともに、マイクロカメラで視覚的に評価する（図1）。

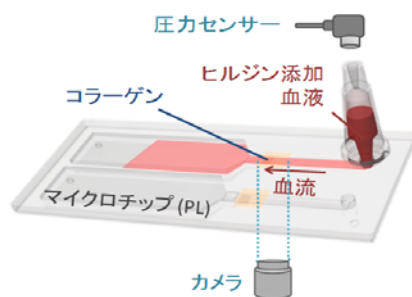


図1 TTASによるリアルタイム血栓モニタリング

これにより、血流下で血小板と凝固因子が活性化される生理的な血栓形成過程を総合的かつ定量的に評価することが可能となった[1]。我々はこのTTASを用い、健常人とアスピリン内服患者の血栓形成パターンを解析した結果、健常人では10分間の検査時間の間に全例が60 kPaに達して流路が閉塞したのに対し、アスピリン内服患者では75%の症例で流路の閉塞が抑制され、薬効が示されていることを確認した[2]。しかしながら、残りの25%の症例はアスピリンを内服していない健常人と同程度の血栓形成能を認め、アスピリン抵抗性患者だと考えられた（図2）。

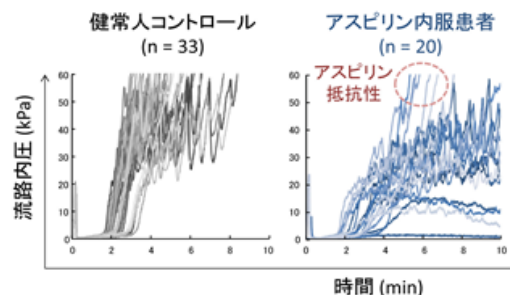


図2 TTASによるアスピリンの薬効モニタリング

本システムは、個々人の総合的な血栓形成能を可視化するとともに定量的に診断することができる優れた検査法であり、多施設での応用展開が可能なシステムである。現在、健常人を対象として、血栓形成能の個人差を検証中であるが、本申請課題においては、この計画を日本だけでなく、オランダでも同時に展開することによって、血栓形成能の人種差を検定する。また、高血圧や脂質異常症などの生活習慣病は、動脈硬化を促進することによって、血栓症のリスクを高めていると考えられているが、これらの生活習慣病が血液の血栓形成能を高めている可能性についても、動物モデルを用いて検討する。

II. 対象・方法

【被験者選択基準】

- (1) 同意取得時の年齢が 20 歳以上 45 歳以下の者
- (2) 担当医師が、本研究に適格な健康成人と判断した者
- (3) 本研究への参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、本人の自由意思による文書同意が得られた者

【被験者除外基準】

- (1) 本研究の採血日前 4 箇月以内に他の臨床試験又は治験に参加し被験薬の投与を受けた者
- (2) 本研究の採血日前に献血 (1 箇月以内に 200 mL 以上、3 箇月以内に 400 mL 以上) を行った者
- (3) 本研究の採血日前 1 ヶ月以内に医療用医薬品・一般用医薬品を使用した者
- (4) 本研究の採血日前 7 日以内に栄養補助食品 (サプリメント) を使用した者
- (5) 担当医師により本研究への参加が不適当と判断された者

【目標被験者数】

- (1) 日本人 120 名
- (2) オランダ人 (Caucasian) 20 名

【方法】

- (1) 文書による同意を取得した被験者に対して担当医師が診察 (問診、視診、聴打診、触診) を行い、選択基準・除外基準により被験者が適格であるかを確認する。
- (2) 適格と判定された被験者に対し、6 時間以上の絶食下、採血し、TTAS による血栓形成能測定を実施する。
- (3) TTAS では、PL チップを用いた血小板機能評価と、AR チップを用いた血小板および凝固系機能評価を施行する。PL チップのキャピラリーにはコラーゲンコーティング部位があり、ヒルジンで抗凝固した血液を流すことで、同部位で血小板が粘着、凝集して血栓が形成される。AR チップのキャピラリーにはコラーゲンと組織因子をコーティングした部位があり、コーントリプシンインヒビターで処理した血液を流すことで、同部位で血小板が粘着、凝集すると

ともに凝固因子が活性化され、血小板とフィブリンの混合血栓が形成される。本研究では、PL チップでは 1000, 1500, 2000 sec⁻¹ のズリ速度で血液を流し、AR チップでは 240, 600 sec⁻¹ のズリ速度で血液を流し、X 軸に時間 (分)、Y 軸にキャピラリー内圧 (kPa) をプロットした際の曲線下面積を解析する。

III. 結果

日本人 119 名 (28.6±6.7 歳、男性 71%) とオランダ人 23 名 (34.2±6.6 歳、男性 48%) が本研究にエントリーされた。まず、日本人の健常人データを解析すると、TTAS での曲線下面積を指標として血栓形成能を評価した場合、被験者の年齢による差異は認められなかった (図 3)。

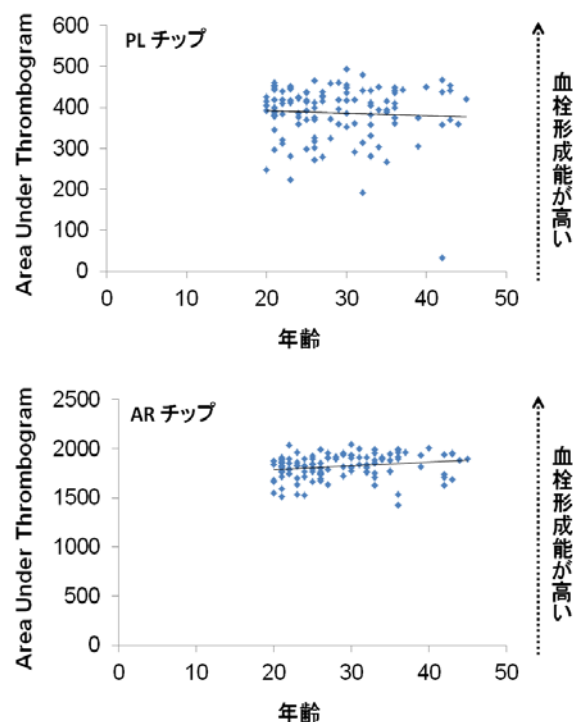


図3 TTAS での曲線下面積と被験者の年齢 (日本人)

次に、性差を検討したところ、日本人では男性の方が PL チップでの血栓形成能が高く、女性と比べて血小板機能が高い人が多いと考えられた (図 4 上)。一方、AR チップで解析すると、日本人では女性の方が血栓形成能が高く、PL チップで男性優位だった結果と合わせて考えると、女性の方が凝固系が亢進しているか、もしくは凝固系と血小板系の相互作用が発達している人が多いと考えられた (図 4 下)。次に、オランダ人の健常人データを解析したところ、

男性 11 名、女性 12 名と被験者数は少ないが、PL チップ、AR チップともに性差は認められなかった。

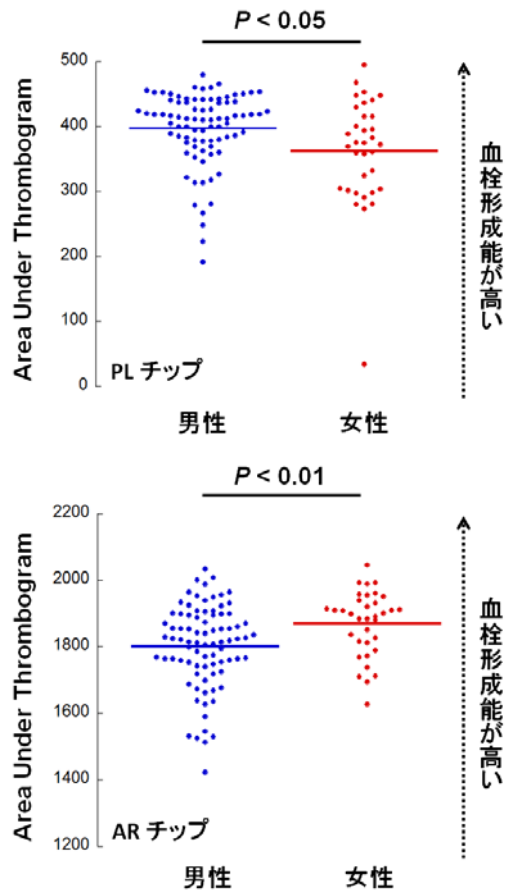


図4 T-TAS での曲線下面積と性差 (日本人) 水平線: 平均値

次に、日本人とオランダ人の血栓形成能を比較したところ、PL チップにおいては、ズリ速度 1000 ならびに 1500 sec^{-1} では、人種差は認められなかったが、2000 sec^{-1} の高ズリ速度環境下では、オランダ人の方が有意に血栓形成能が高かった (図5)。

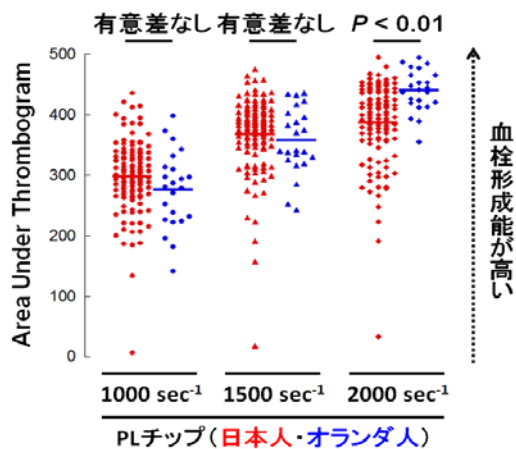


図5 T-TAS での曲線下面積と人種差 水平線: 平均値

また、この人種差は男性においても女性においても同様に、オランダ人の方が有意に血栓系性能が高かった (図6)。

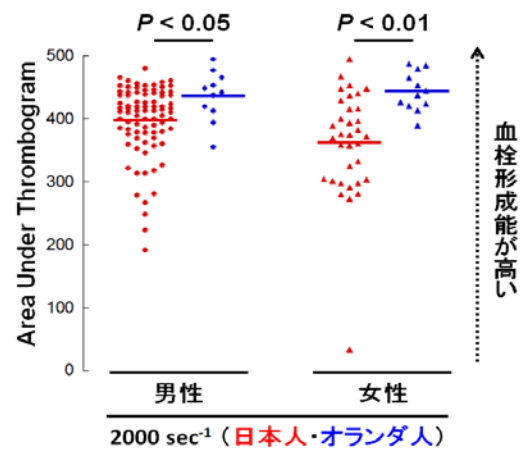


図6 T-TAS での曲線下面積と性差と人種差 水平線: 平均値

一方、AR チップにおいては、ズリ速度 240、600 sec^{-1} ともに、人種差は認められなかった (図7)。

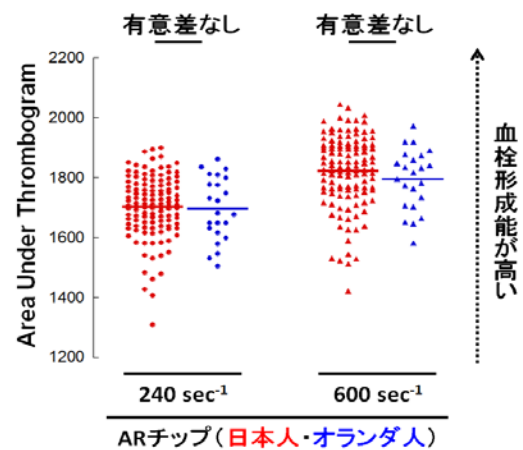


図7 T-TAS AR チップでの曲線下面積と人種差 水平線: 平均値

次に、生活習慣病が血液の血栓形成能を高めている可能性について、動物モデルを用いて検討した。通常の餌を摂取したマウスと比較して、高脂肪食を摂取したマウスは、AR チップでの血栓形成が有意に亢進していた (図8)。

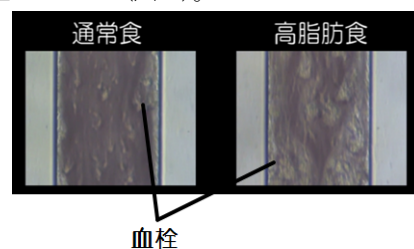


図8 高脂肪食による血栓傾向 (マウス)

また、高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rats: SHR) も、正常対照群のラットと比較して、AR チップでの血栓形成が有意に亢進していた (図9)。



図9 高血圧による血栓傾向 (ラット)

IV. 考 察

血流下で形成される血栓と、静的環境下で形成される血栓とでは、血栓の質が大きく異なる。速い血流下での血栓形成には、ズリ応力依存性のフォンウィルブラント因子 (VWF) の伸展と血小板の粘着が重要な役割を担っているのに対し、静的環境下では、血液凝固系の活性化に伴うフィブリン形成の重要度が増す。急性冠症候群の場合、速い血流下で血栓が形成されるため、そのリスクを評価するには、ズリ応力依存性の血小板機能を解析しうる検査方法が望ましい。我々は新規開発のマイクロチップ式血流下血栓形成能解析システム (T-TAS) を用い、健康な日本人とオランダ人の血栓形成能を比較したところ、ズリ速度 240 ならびに 600 sec^{-1} での AR チップ、1000 ならびに 1500 sec^{-1} での PL チップでは人種差は認められなかったが、 2000 sec^{-1} という高ズリ速度環境下ではオランダ人の方が有意に血栓形成能が高かった。 2000 sec^{-1} というズリ速度は、健康な血管では見られず、高度狭窄部位や血栓形成部位でのみ見られる病的な高ズリ速度環境であり、冠動脈のプラークが破裂して閉塞性の血栓が形成されるような状況においては、オランダ人の方が完全閉塞に至りやすい可能性が考えられた。

T-TAS での血栓形成能を男女別に見てみると、オランダ人では性差がほとんど認められないのに対し、日本人では男性の方が血小板機能が高く、女性の方が凝固機能が高い傾向にあった。欧米と異なり、日本では女性の方が静脈血栓塞栓症のリスクが高いとの報告もあり [3]、今回の T-TAS のデータはそれを裏付けるものかもしれない。

高血圧や脂質異常症などの生活習慣病モデル動物は、正常対照群と比べて、AR チップでの血栓形成が有意に亢進していた。このことより、高血圧や脂質異常症などの生活習慣病は、動脈硬化を促進する

だけでなく、血液の血栓形成能を高めることで、血栓症のリスクを高めている可能性が示唆された。今後は、ヒトにおいても同様の現象が認められるか、検討していく必要があると考えられる。

V. 結 論

血栓傾向の科学的、定量的評価を目的に開発したマイクロチップ式血流下血栓形成能解析システム (T-TAS) を用いて、血栓形成能の人種差を検定したところ、高ズリ速度環境下では、日本人と比べてオランダ人の方が有意に血小板血栓形成能が高かった。動物モデルにおいては、高脂肪食摂取や高血圧によって、血栓形成能が亢進した。

VI. 研究協力者

丸山征郎・鹿児島大学・特任教授

細川和也・鹿児島大学・客員准教授

深瀬広幸・シーピーシー治験病院・院長

Joost Meijers・University of Amsterdam・Prof.

VII. 参考文献

1. Hosokawa K, Ohnishi T, Kondo T, et al: A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. *J Thromb Haemost* 2011, 9(10):2029-2037.
2. Hosokawa K, Ohnishi T, Sameshima H, Miura N, Ito T, Koide T, Maruyama I: Analysing responses to aspirin and clopidogrel by measuring platelet thrombus formation under arterial flow conditions. *Thrombosis and Haemostasis* 2013, 109(1):102-111.
3. Sakuma M, Konno Y, Shirato K :Increasing mortality from pulmonary embolism in Japan, 1951-2000. *Circ J* 2002, 66:1144-1149.

新規抗凝固薬による出血合併症の減少を目的とした モニタリング手法の開発

自治医科大学分子病態治療研究センター分子病態研究部・講師
大森 司

I. 緒 言

従来用いられてきたヘパリンやワルファリンに変わる薬剤として経口の抗トロンビン薬や活性化血液凝固第 X 因子(FXa)阻害薬が臨床の場で使用され始めている。これらの薬剤は1) 薬剤相互作用や食事による影響を受けにくい, 2) 比較的薬剤の作用が予測できモニタリングが不要, 等の利点が挙げられる。大規模臨床試験の結果から, これら新規抗凝固薬の抗血栓効果はワルファリンと同等以上の効果をしめすが, 出血合併症, 特に脳出血に関しては有意に発症率が低いと報告された[1-3]。この結果を受けて国内でもワルファリンからダビガトラン (プラザキサ®) への変更が一時的に広がったが, 致死的な出血を来した症例が報告されており, その使用について注意が促されている。従来, 日本人においては脳卒中でも脳出血の頻度が高いことが報告されており, またその人種や体格の違いから薬剤用量が欧米人のそれでよいかどうかという点は常に問題になる。薬効を臨床検査にてモニタリングを行いその効果を推察することができれば, 出血合併症が減少し, 新規抗凝固薬をさらに効果的に使用することができるかもしれない。

本研究では, 現在臨床で用いられている新規抗凝固薬を, 臨床の場で, より安全, かつ効果的に使用出来るためのモニタリング手法の開発を最終目標として検討を開始した。非弁膜症性心房細動患者での重大な出血合併症の比率は, これまでの大規模臨床試験の結果からも, 2%前後のため[1-3], 出血合併症と血液検査値との関係を観察するには, 数千人規模での検討が必要と推測される。一方, 観血的処置患者を対象とすれば, 術中・術後の出血量, ヘモグロビン (Hb) の変動を評価することで, より少数の患者を対象とした検討においても, 出血傾向・出血量を定量することで出血傾向の評価が可能となる。以上より, 本研究目的の達成ために, 外科的処置が行

われる患者を対象とする臨床研究を予定した。まず, 抗凝固療法を行わない整形外科手術患者における出血予測因子の評価を行った。本臨床研究では, 本報告書作製の段階で 122 症例がエントリーされ, 抗凝固療法を行わない患者群での出血リスク因子の同定を中間解析として試みた。さらに, 経口抗 FXa 阻害薬であるエドキサバンの抗 FXa 阻害効果を自動分析器にて効率的に直接測定することが可能となった。血漿への *in vitro* での薬剤添加実験から, 臨床における薬剤モニタリングのための検査項目の意義・重要性についての考察が得られた。これらの結果をもとに, 倫理委員会の承認を得て, エドキサバンを投与する患者群での出血リスクを同定のための臨床試験を計画し, 現在患者のエントリーを開始している。

II. 対象・方法

1. ヒトを対象とした臨床試験の計画と実施

1-1 抗凝固療法を行わない手術患者における出血リスクの同定

対象：自治医科大学附属病院整形外科で変形性脊椎症, 等で椎弓切除術を行う患者 (エントリー中, 現段階で 122 例での中間解析)。

方法：術当日朝に空腹時採血を行い血漿・血清を得た。術中及び術後のドレーンからの出血量を定量した。

評価項目：血小板機能検査 (PA-200, 興和, 東京), PT, APTT, アンチトロンビン (AT), プロテイン C, PAI-1, D-dimer, FDP, E-セレクトイン, 可溶性フィブリン (SF), $\alpha 2$ -プラスミンインヒビター ($\alpha 2$ PI), プラスミノゲン (表 2)。

統計学的解析：上記の検査値と共に, 患者背景, 一般生化学検査などから, 術中, 術後の出血量を規定

する因子について統計学的に評価を行った。単相関は Pearson の相関分析を用い、多変量解析は重回帰解析を行った。

1-2 エドキサバン投与中の出血量解析

本研究計画が循環器病研究振興財団への研究助成に受理された後に、自治医科大学と山梨県立中央病院との共同研究として、研究計画を立案し、各施設の倫理委員会への申請を行った。修正の後、平成 24 年 10 月 9 日に自治医科大学 (A12-57 号)、平成 24 年 12 月 1 日に山梨県立中央病院 (臨床 24-15) の倫理委員会からの承認を得た。現在は患者のリクルートを開始した段階であり、データ解析は行なっていない。

対象：山梨県立中央病院、自治医科大学附属病院で整形外科手術を行い、深部静脈血栓症 (DVT) 予防にエドキサバン等の抗凝固薬を投与する患者。

イベント設定：術後 2 週間までの出血、または、術後 1 年間までの症候性深部静脈血栓症、または肺塞栓症の発症、死亡。

評価項目：PT, APTT, フィブリノゲン, 抗 FXa 活性測定, AT, プラスミノゲン, $\alpha 2$ PI, PAI-1, FDP, D-dimer, SF, PIC, プロテイン C, プロテイン S 活性, これらのデータについて以下の術後 2 週間まで合計 5 ポイントでの採血を行い、出血量・血栓症合併例との解析を行う (1 度は内服後 2-3 時間後に検査で薬剤血中濃度のピーク値を測定する)。

2. 新規経口抗凝固薬の *in vitro* における薬効評価：

臨床試験で主に用いるエドキサバンをジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解後に、様々な濃度で正常ブール血漿に添加して、様々な凝固マーカーの測定を行った。同様に正常血漿をオーレンベロナール緩衝液にて一定の割合で希釈して同様の測定を行った。プロトロンビン時間 (PT) や活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は血液凝固自動分析装置である ACLTOP300 (以下, ACLTOP) (三菱化学メディエンス株式会社, 東京), または CA500 (シスメックス株式会社, 神戸) を用いて測定した。それぞれ PT 試薬と APTT はヒモスアイエル PT・APTT (三菱化学メディエンス), またはトロンボチェック PT・

APTT を用いた (シスメックス株式会社)。エドキサバンの抗 FXa 活性は、ヘパリン測定試薬 (ヒモスアイエル ヘパリン リキッド; 三菱化学メディエンス株式会社) を用いて、ACLTOP にて測定をおこなった。抗 FXa 活性はヘパリンの抗 FXa 活性に換算する形で算出した。

III. 結 果

1. 周術期の出血量規定因子の同定

1-1 患者背景 - 抗凝固療法や抗血小板療法を術後に行わない脊椎手術患者を対象に研究を開始した。現段階でエントリーされた集団の主な特徴を表 1 に示す。

表 1 対象患者背景 連続変数は平均 $\pm$ 標準偏差で表す。BMI = body mass index; RA = rheumatoid arthritis; OPLL = ossification of the posterior longitudinal ligament.

Variables	
Age, years	66.54 $\pm$ 11.12
Men, n (%)	75 (61.5)
BMI, kg/m ²	24.3 $\pm$ 4.536
Current NSAIDs, n (%)	46 (37.7)
Hypertension, n (%)	56 (45.9)
Diabetes mellitus, n (%)	19 (15.6)
Dialysis, n (%)	6 (4.9)
RA, n (%)	6 (4.9)
OPLL, n (%)	28 (23.0)
Operation time, min	165.0 $\pm$ 57.81
Bleeding for operation, ml	104.7 $\pm$ 131.2
Drain bleeding, ml	526.6 $\pm$ 318.4

抗凝固療法や抗血小板療法を行っていない段階での出血リスクを検討するため、術当日に採血を行い、血小板機能と様々な凝固・線溶因子関連検査を測定した (表 2)。

表 2 対象患者の検査測定値 連続変数は平均 ± 標準偏差で表す。

WBC = white blood cell; ESR = erythrocyte sedimentation rate;
PA = platelet aggregation; Coll = collagen; PAR-1 =
protease-activated receptor-1 agonist; PAI-1 = plasminogen
activator inhibitor-1; PIC = plasmin- α 2-Pi complex.

Variables	
WBC, $\times 10^9/\text{mm}^3$	6.209 $\pm$ 1.748
Hemoglobin, g/dl	13.36 $\pm$ 1.484
Platelets, $\times 10^4/\text{mm}^3$	22.14 $\pm$ 6.018
APTT, sec	33.17 $\pm$ 7.352
PT, %	96.77 $\pm$ 13.16
ESR, mm/hr	17.29 $\pm$ 16.76
CRP, mg/dl	0.2219 $\pm$ 0.5029
Total protein, g/dl	7.317 $\pm$ 1.286
Creatinine, mg/dl	0.9695 $\pm$ 1.515
GOT, U/l	24.19 $\pm$ 13.4
Cholesterol, mg/dl	200.1 $\pm$ 36.17
PAADP 2 μM , %	42.49 $\pm$ 20.75
PAADP 5 μM , %	62.52 $\pm$ 17.79
PA Coll 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, %	59.4 $\pm$ 25.39
PA Coll 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, %	79.4 $\pm$ 11.37
PA PAR1 20 μM , %	43.87 $\pm$ 27.73
PAI-1, ng/ml	28.68 $\pm$ 13.78
E-selectin, ng/ml	19.09 $\pm$ 9.14
D-dimer, $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.911 $\pm$ 1.146
FDP, $\mu\text{g}/\text{ml}$	4.625 $\pm$ 5.267
Antithrombin, %	84.04 $\pm$ 12.61
α 2-Pi, %	83.24 $\pm$ 13.73
Plasminogen, %	84.04 $\pm$ 12.61
PIC, $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.9168 $\pm$ 0.3476
Soluble fibrin, $\mu\text{g}/\text{ml}$	6.002 $\pm$ 0.3476

1-2 出血リスクの評価 (単相関) - 母集団の中から、現段階で症例数の多い頸椎手術患者 82 名を選定し、Pearson の相関係数を用いて、種々の測定値・患者背景と出血量との関係を検討した。術中出血は、手術時間と GPT と正の相関、PT 活性、 α 2-Pi、PAR-1 血小板凝集能と負の相関を認めた (表 3)。術後のドレーンからの出血量は BMI、手術時間と正相関し、血小板数、PT 活性、ADP 凝集能、コラーゲン血小板凝集能、アンチトロンビン、可溶性フィブリン、PIC と負の相関を認めた (表 4)。

表 3 術中出血と相関する患者背景・検査値 (pearson 相関係数)

PA = platelet aggregation; PAR-1 = protease activated receptor-1 agonist.

Variables	R (P value)
GPT	0.2987(0.0064)
PT (%)	-0.3793(0.0005)
Operation time	0.3715 (0.0006)
PA PAR1	-0.2245(0.0426)
α 2-Pi	-0.2248(0.0423)

表 4 術後ドレーン出血と相関する患者背景・検査値 (pearson 相関係数) BMI = body mass index; PA = platelet aggregation; Coll = collagen; PIC = plasmin- α 2-Pi complex.

Variables	R (P value)
Operation time	0.304 (0.0055)
BMI, kg/m^2	0.3082(0.0048)
Platelets	-0.3 (0.0283)
PT (%)	-0.2319 (0.0372)
PAADP 2 μM	-0.2253 (0.0418)
PAADP 5 μM	-0.2934 (0.0075)
PA Coll 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-0.26615(0.0157)
PA Coll 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-0.359 (0.0011)
Antithrombin	-0.244 (0.0272)
PIC	-0.2419 (0.0285)
Soluble fibrin	-0.2883(0.0086)

1-3 出血リスクの評価 (多変量解析) - 上記の単相関にて相関が認められた変数を用いて、多変量解析を行った。術中出血には PT 活性 ($t = -2.65$, $P = 0.0097$), 手術時間 ($t = 2.95$, $P = 0.0042$), および PAR-1 血小板凝集能 ($t = -2.56$, $P = 0.0125$) が有意であった。ドレーンからの出血では PT 活性 ($t = -2.78$, $P = 0.0071$), 可溶性フィブリン ($t = -2.68$, $P = 0.0091$), 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激時のコラーゲン凝集能 ($t = -2.15$, $P = 0.035$) が有意であった。

1-4 術前 PT 測定値の意義 - 以上より、血小板凝集能の低下、及び PT 活性の低下が抗凝固療法を行わない手術患者での出血リスクとなる可能性が

ある。対象患者群での術前 PT, APTT 値をプロットすると (図 1), ほぼ全例が正常値であるものの, 特に %PT の個人差が認められる (PT (%): 96.77 ± 13.16 ; APTT (sec) 33.17 ± 7.352)。

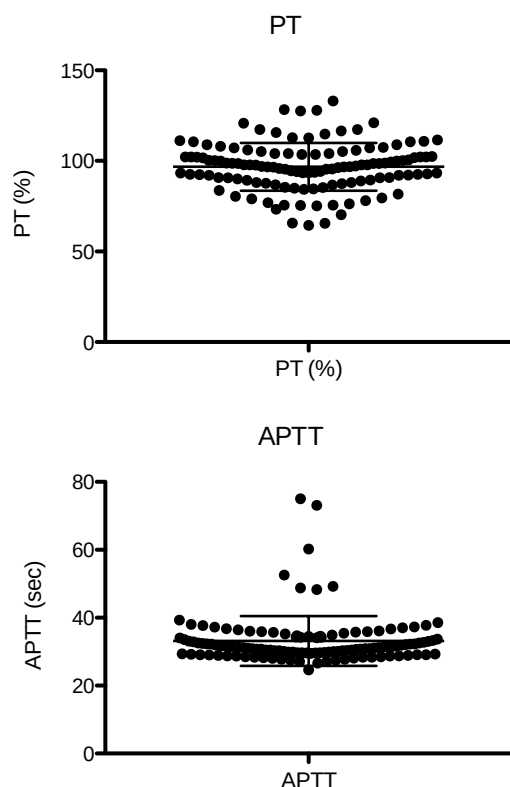


図1 術前 PT, APTT の分布図。母集団の PT (%) (上), および APTT (秒) (下) をそれぞれプロットした。

2. 新規経口抗凝固薬の *in vitro* における薬効評価
 2-1 抗 FXa 活性の測定 – 臨床試験の開始に先立ち, 薬剤による抗 FXa 活性の測定ができるか検討した。正常ヒトプール血漿に DMSO で溶解した新規経口抗 FXa 阻害薬エドキサバン[4]を添加し, 抗 FXa 活性をヘパリンキリッド試薬により測定した。健康人を対象とした試験では, 薬剤 30 mg 内服時の薬剤血中濃度のピークは 1-2 時間後であり, 200 ng/ml 程度と報告されている (医薬品インタビューフォームより)。本試薬をもちいた検討でも薬剤濃度依存的に抗 FXa 活性がほぼ直線的に測定できた (図 2)。本手法により, 内服時の抗 FXa 活性が測定可能と考えられる。

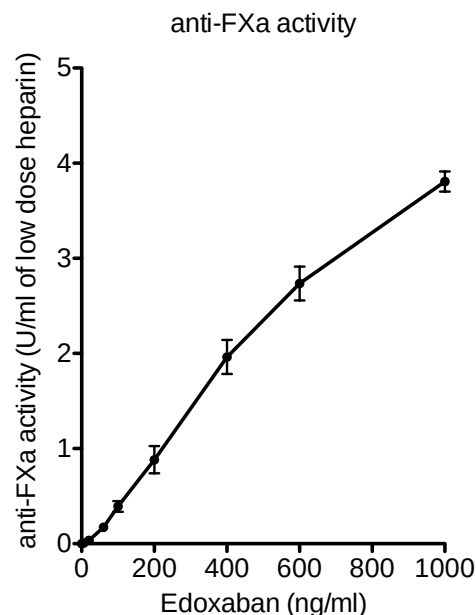


図2 エドキサバンによる抗 FXa 活性の測定。正常血漿にエドキサバンを種々の濃度で添加し, 抗 FXa 活性をヘパリンキリッド試薬を用いて測定した。データは平均 $\pm$ 標準偏差 (n=3-7)。

2-2 PT, APTT への影響 – 同様にヒトプール血漿にエドキサバンを添加し, 最も用いられる凝固検査である PT, APTT の測定を行った (図 3)。実際の測定は以下の 2 種類を検討した。1) 測定装置: シスメックス社の CA500, 試薬: トロンボチェック APTT, PT, 2) 測定装置: 三菱化学メディエンス社の ACLTOP, 試薬はヒーモスアイエル APTT・PT。図 3 に示すように, PT, APTT 共にエドキサバンの濃度依存性に延長した。また, トロンボチェック PT, APTT 試薬の方が, エドキサバンによる凝固時間延長効果が強かった。

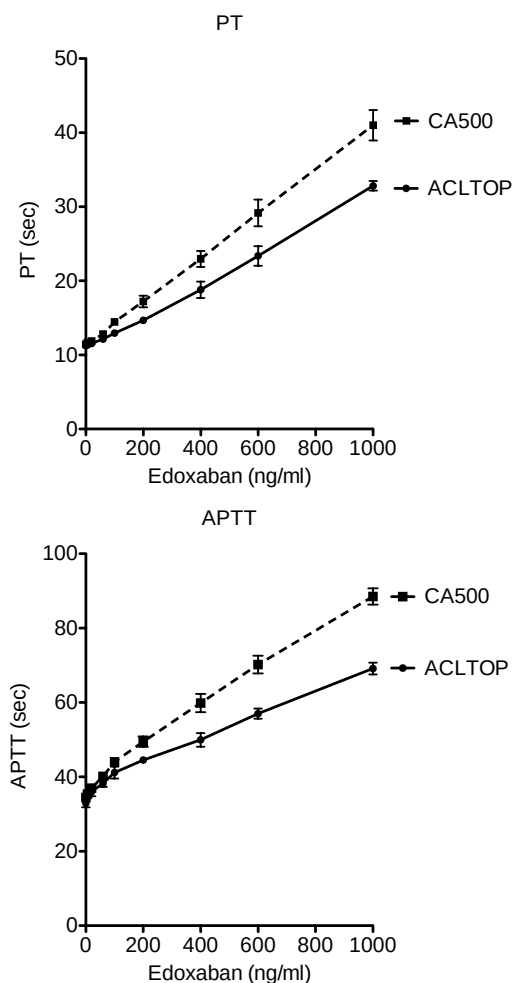


図3 エドキサバンによる PT, APTT への影響. 正常血漿にエドキサバンを種々の濃度で添加し, PT (上), APTT (下)を自動分析器である CA500, または ACLTOP で測定した. データは平均 ± 標準偏差 (n=3-6).

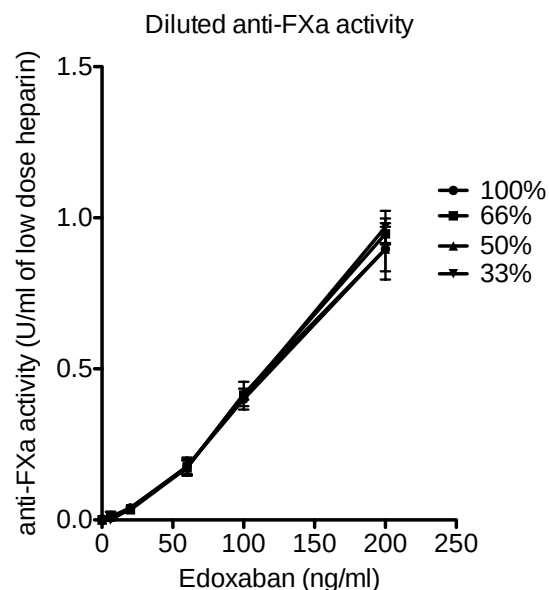


図4 希釈血漿に対するエドキサバンの抗 FXa 阻害効果. 正常血漿 (100%), をオーレンベロナール緩衝液で 66%, 50%, 30%となるように希釈し, エドキサバンを種々の濃度で添加し, 抗 FXa 阻害活性を測定した. データは平均 ± 標準偏差 (n=6).

一方で PT, APTT の測定値は, 薬剤添加がなくとも測定値が希釈に依存して延長し, 特にヒモスアイエル APTT・PT (ACLTOP)で顕著であった (図 5, 図 6). 薬剤添加により, PT, APTT は延長したが, 薬剤添加による直線の傾き (薬剤感受性) は 50%希釈 (正常血漿の 50%の凝固因子) 程度までは大きく変化しなかった (図 5, 図 6).

2-3 希釈検体への影響 — 日常臨床では, 様々な基礎疾患をもつ患者が存在し, 各凝固因子の予備能も異なることが予測される. 凝固因子の予備能低下状態を *in vitro* で再現するために, 一定の割合で正常血漿を緩衝液で希釈し PT, APTT, 及び抗 FXa 活性を測定した. 正常血漿を段階的に希釈しても, 血漿中の抗 FXa 活性は影響を受けなかった (図 4).

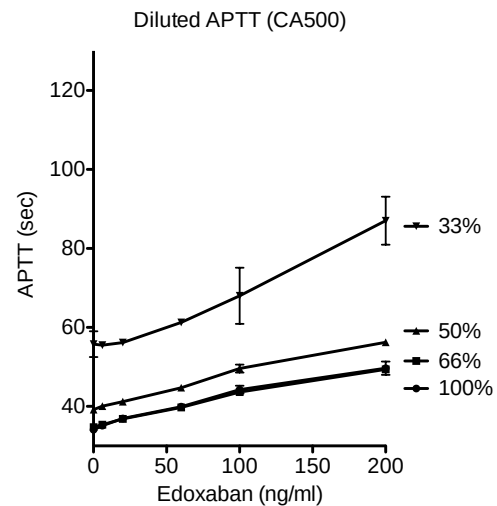
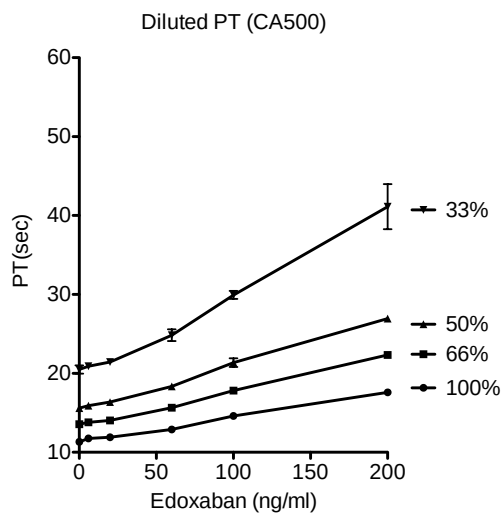
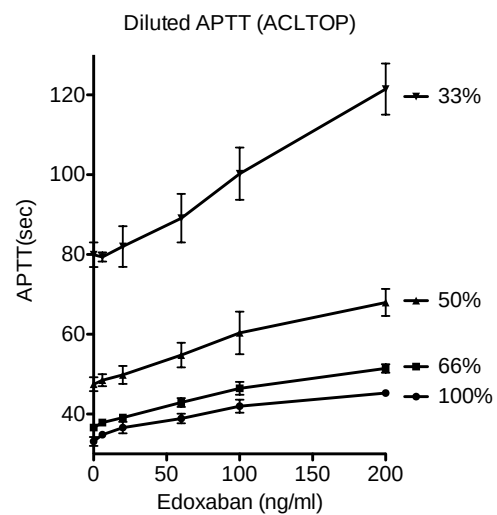
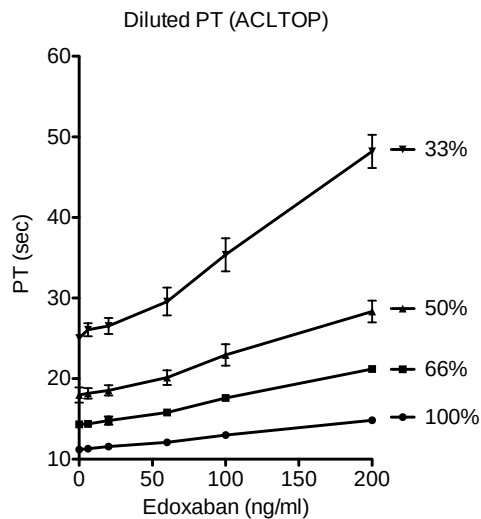


図5 希釈血漿に対するエドキサバンのPTに対する効果。正常血漿(100%)，をオーレンペロナル緩衝液で66%，50%，30%となるように希釈し，エドキサバンを種々の濃度で添加し，PT活性を測定した(上，ACLTOP；下，CA500)。データは平均±標準偏差(n=6)。

図6 希釈血漿に対するエドキサバンのAPTTに対する効果。正常血漿(100%)，をオーレンペロナル緩衝液で66%，50%，30%となるように希釈し，エドキサバンを種々の濃度で添加し，APTT活性を測定した(上，ACLTOP；下，CA500)。データは平均±標準偏差(n=6)。

IV. 考 察

最近の血栓止血学領域における大きな進歩として，新規経口抗凝固薬の登場があげられる．2011年に直接トロンビン阻害薬であるダビガトラン，また整形外科領域で抗FXa薬としてのエドキサバンが，2012年からは，FXa阻害薬であるリバーロキサバンとアピキサバンが相次いで承認された．従来は経口抗凝固薬としてワルファリンしか選択肢がなく，これらの薬剤の開発により，臨床の場での抗凝固療法の実施が格段に広がっている．

新規経口抗凝固薬と従来のワルファリンとの違いは大きく2つに分けられる。1つはその作用機序である。ワルファリンがビタミンK依存性凝固因子の総量を調節して“凝固因子の出来高”を制御するのに対して、新規抗凝固薬は直接活性型凝固因子の酵素活性を阻害する[5]。もう1つは、薬剤血中濃度の変動である。ワルファリンは半減期が長く、時間的に均一な抗凝固作用を示すのに対し、新規抗凝固薬は内服後1-3時間のピークを持ち、次回内服前には血中濃度は、内服前値近くまで低下する[5]。非弁膜症性心房細動を対象とした臨床試験では、何れの薬剤も脳血栓塞栓症の予防効果はワルファリンと同等、もしくはそれを上回る結果である[1-3]。特筆すべきは、脳出血の合併例が明らかに少ないことである。一方で、実診療においては、出血合併症の増加も懸念されており、事前に出血合併症のリスクが高い患者群を何らかの手法で見出す必要がある。

日常臨床で一般的に用いられる凝固関連検査にはプロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)がある。本研究では、経口抗FXa薬であるエドキサバンの添加をおこない、PT、APTTの変化を観察した。既報通り[6, 7]、PT、APTT共に薬剤の濃度依存性に延長した。今回は異なる2種のPT、APTT試薬を用いたが、試薬による薬剤の感受性が異なった。また有効薬剤血中濃度と思われる濃度の範囲内(〜200 ng/ml)ではPT、APTTの延長は軽度にとどまった。さらに、PTやAPTTは凝固因子希釈による影響を受け、さらに抗凝固薬を使用していない患者群のPTの値もある程度の個人差をみとめた。以上より、PTやAPTTの測定値のみで、各個人の抗凝固療法の効果をモニタリングすることは困難と思われる。一方で、直接抗FXa因子の阻害活性を測定する検査(本研究の場合はヘパリンリキッド試薬)は血漿希釈の影響を受けないため、正確な薬剤血中濃度の推測ができる。ダビガトランに関しても、直接プロトロンビンを活性化させるヘビ毒エカリンを用いた凝固時間法(エカリン凝固時間)や希釈患者検体と正常血漿を混合しトロンビンを直接添加し凝固時間を測定するトロンビン時間法を用いた方が薬剤の治療効果判定の面では優れていると報告されている[8]。以上より、これらの単一の凝固因子活性阻害を標的とした新規薬剤の血中濃度、および治療判定の推測には、患者凝固因子活性の影響を受けないように、トロンビン、またはFXaと混合した上で、それぞれの特異的な合成基質を用いてそ

の活性阻害を直接測定する手法が優れていると考えられる。

一方、これらの特異的検査も血中濃度を間接的に評価しているのみであり、この検査値を持って実臨床での出血合併症の予測は困難である。特異的なアッセイでは薬剤の血中濃度を反映するものの、患者自身の他の凝固因子量が反映されないため、高齢者など凝固因子産生の予備能が低下している患者において薬剤の安全性を推定、つまり出血合併症の予見には優れていない可能性がある。抗凝固療法を行っていない患者でも、実際の術前PT活性には正常値であっても個人差が生じており、事実、今回の我々の検討でもPT活性値が術中や術後の出血量と多変量解析において関連した。新規経口抗凝固薬を使用する患者では、FXa阻害活性と同時に、PT、またはAPTTの測定により、凝固因子予備能を合わせて評価することで出血合併症の予見が可能となるかもしれない。ただし、各試薬の薬剤感受性が異なることから、試薬の標準化や各施設毎の検討が必要である。また、抗凝固療法を行っていない患者において、血小板機能も術中や術後出血に関与することから、抗FXa阻害薬投与を行う患者では非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)などの抗血小板作用をもつ薬剤の使用は可能な限り避けた方が無難であろう。現在、進行中の抗凝固薬投与患者を対象とした臨床研究において、これらの点を明らかにしたい。

さらに、本研究で注目すべきは、同一条件での比較ではないものの、エドキサバンの治療域とされているピーク値の抗FXa阻害効果が、ヘパリンや低分子量ヘパリンの一般的な投与による血中濃度よりも明らかに高いことである。低分子量ヘパリンであるエノキサパリンを治療量である2,000単位を成人男子に単回投与した時にそのピーク抗FXa活性は 0.25 ± 0.03 U/mlである。また、ダルテパリンをDIC患者に3,900単位/日で持続投与した時の血中抗FXa活性は $0.09 - 0.11$ U/mlである。未分画ヘパリンを50単位/kgを3時間で投与(24時間、体重50kgで20,000単位/日)で 0.35 ± 0.09 U/mlとなる(各、薬剤インタビューフォームより引用)。実臨床では、添付文書上のエドキサバン30mgを用いると、術後の出血合併症が増加するため(研究協力者の私見)、研究協力者の施設では主に15mgの減量投与を行っている。15mg投与においても、最高血中濃度が100 ng/mlと推測すると、それでもピークの抗FXa阻害活性はエノキサパリンよりも高い。もちろ

ん、新規経口抗凝固薬はアンチトロンビンを必要とせず、その作用機序が異なるが、各薬剤の阻害効果をモニタリングしながら過剰量の薬剤を投与することを避けること、また薬剤間のモニタリング値と臨床所見・治療効果の比較による新たな治療量の設定を行うことが今後は肝要と思われる。

V. 結 論

本研究では、日本人において新規抗凝固薬である経口抗トロンビン薬やFXa阻害薬を効果的、かつ安全に使用できるための基礎的な検討を行った。従来用いられるPTやAPTTでは抗凝固療法の治療域を確認することは困難である。一方で、患者凝固因子予備能も考慮した上記の検査は治療の安全域を担保する可能性がある。現在、実際に新規抗凝固薬を投与されている患者を対象とした臨床試験を進行させており、安全かつ、効果的な薬剤の投与手法の開発を目指したい。過去に出血合併症の発症抑制を目的として様々なモニタリング測定を行い比較した報告はなく、本研究は日本人の抗血栓療法に対して新たなデータを提供すると考えられる。

VI. 研究協力者

木村 敦・自治医科大学整形外科科学講座・講師
坂田飛鳥・自治医科大学分子病態治療研究センター
分子病態研究部 / 内科学講座循環器内科部門・大学院生
岩瀬弘明・山梨県立中央病院整形外科・医長
窓岩清治・自治医科大学分子病態治療研究センター
分子病態研究部・講師
笹沼秀幸・自治医科大学整形外科科学講座・助教
関矢 仁・自治医科大学整形外科科学講座・准教授
苅尾七臣・自治医科大学内科学講座循環器内科部門・教授

VII. 参考文献

1. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, *et al.* Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* 2011; **365**: 981-92.
2. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, *et al.* Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* 2011; **365**: 883-91.
3. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, *et al.*

Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* 2009; **361**: 1139-51.

4. Camm AJ, Bounameaux H. Edoxaban: a new oral direct factor xa inhibitor. *Drugs* 2011; **71**: 1503-26.
5. Turpie AG. New oral anticoagulants in atrial fibrillation. *European heart journal* 2008; **29**: 155-65.
6. Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, *et al.* Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *Journal of thrombosis and haemostasis* : *JTH* 2011; **9**: 133-9.
7. Lindahl TL, Baghaei F, Blixter IF, *et al.* Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thrombosis and haemostasis* 2011; **105**: 371-8.
8. van Ryn J, Stangier J, Haertter S, *et al.* Dabigatran etexilate--a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thrombosis and haemostasis* 2010; **103**: 1116-27.

モデルマウスを利用した日本人の静脈血栓症の 遺伝的特異性の解明

国立循環器病研究センター 分子病態部・研究員
坂 野 史 明

I. 緒 言

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天性異常は血栓症のリスクとなるが、原因となる遺伝子変異は人種間で大きく異なる。白人では凝固第 V 因子 (FV) R506Q 変異 (マウスでは R504Q 変異) が血栓症の遺伝的背景となっており、変異を保有するモデルマウスも確立されているが¹⁾、この変異は日本人には存在しない²⁾。当研究室では、日本人静脈血栓症患者の遺伝的背景として凝固制御因子プロテイン S (PS) の K196E 変異を同定した³⁾。静脈血栓症発症に対してオッズ比 4.7~5.6 を示す。本変異は日本人の約 55 人に 1 人に認められ、約 1 万人がホモ接合体であると推計される。PS は活性化プロテイン C (APC) の補酵素として機能する約 75kDa の血漿タンパク質であり、リン脂質膜上で APC と複合体を形成して、活性化 FV および活性化凝固第 VIII 因子の分解、不活性化を促進する。K196E 変異は、PS の APC 補酵素活性を低下させるため⁴⁾、凝固亢進傾向をもたらすと考えられる。

また、日本人には線溶因子プラスミノゲン (Plg) の A620T 変異 (マウスでは A622T 変異) も広く存在し、当研究室にて一般住民を対象に行った検討でもアレル頻度 2% (約 25 人に 1 人がヘテロ接合体) と高頻度に認められた⁵⁾。全国で約 5 万人がホモ接合体であると推計される。Plg はフィブリン分解反応の鍵となる酵素プラスミンの前駆体であり、組織型やウロキナーゼ型 Plg 活性化因子により、プラスミンに変換され、血栓を溶解する。A620T 変異はプラスミン活性を著減させるため⁶⁾、変異保有者では血栓溶解能が低下する。現在まで、本変異と血栓症との関連は示されておらず、一次的なリスクとはならないと予想されるが、変異保有者は感染や外傷、手術等に引き続いて血栓症を発症する例があり、血栓形成を助長する要因が重なった場合には、血栓症が引き起こる可能性がある。

PS-K196E 変異および Plg-A620T 変異は、日本人に特有かつ高頻度な血栓性遺伝子変異であり、白人には見られない。このため、本邦で独自に両変異の影響を確立する必要がある。本研究では、PS-K196E 変異および Plg-A622T 変異をもつ遺伝子改変マウスを用いて日本人の血栓症の遺伝的特徴、特に欧米との違いを明確化し、これらのマウスを日本人に適した選択的抗血栓療法を開発する上での動物モデルとして確立することを目的とした。このため、静脈血栓症モデル、脳虚血再灌流モデルおよび皮膚創傷モデルを用いて PS-K196E および Plg-A622T マウスの応答を白人型血栓症モデルである FV-R504Q マウスと比較解析した。

II. 対象・方法

【実験動物】

野生型マウス、PS-K196E 変異ヘテロ接合体マウス ($PS^{+/E}$)、PS-K196E 変異ホモ接合体マウス ($PS^{E/E}$)、PS 欠損ヘテロ接合体マウス ($PS^{+/}$)、Plg-A622T 変異ホモ接合体マウス ($Plg^{A/T}$) および、FV-R504Q 変異ホモ接合体マウス ($FV^{Q/Q}$)¹⁾ の合計 6 系統を解析対象とした。

PS-K196E 変異マウスは *Pros1* 遺伝子のエキソン 6 に一塩基置換 c.586A>G を導入したターゲティングベクターを用いて、PS 欠損マウスは *Pros1* 遺伝子のエキソン 3 を欠失させるベクターを用いて、Plg-A622T 変異マウスは *Plg* 遺伝子のエキソン 15 に一塩基置換 c.1864G>A を導入したベクターを用いて、それぞれ作製した。FV-R504Q 変異マウスはジャクソン研究所から購入した。

動物実験は国立循環器病研究センター動物実験委員会の承認を得て実施した。

【血漿 PS 補酵素活性・PS 抗原量測定】

野生型、 $PS^{+/E}$ 、 $PS^{E/E}$ 、 $PS^{+/}$ マウスから全採血後、

1000 x g、10 分間遠心分離して血漿を回収した。マウス血漿に段階希釈した組換え体マウス APC を添加して 37℃、1 分間反応後、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬を加えて凝固時間を測定し、APC 添加による凝固時間延長を指標に PS 補酵素活性を群間で比較した。また、抗ヒト PS ポリクローナル抗体を用いた ELISA により、血漿 PS 抗原量を測定した。

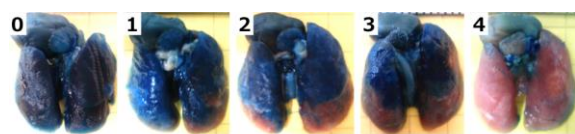
【血漿 Plg 活性・Plg 抗原量測定】

野生型および $Plg^{d/f}$ マウス血漿に 0.1N 塩酸を加えて酸性化後、等量の 0.1N NaOH で中和した。この血漿にヒトウロキナーゼを添加して Plg をプラスミンに活性化した後、合成基質 (S-2403) 切断活性を血漿 Plg 活性として測定した。また、血漿 Plg 抗原量を Mouse Plasminogen Total Antigen EIA Kit (Oxford Biomedical Research) を用いて測定した。

【組織因子誘発肺塞栓モデル⁹⁾】

【無機ポリリン酸誘発肺塞栓モデル¹⁰⁾】

マウスに外因系凝固を活性化する組織因子あるいは、内在性の内因系凝固促進物質である長鎖無機ポリリン酸を下大静脈から投与することで肺塞栓を惹起し、呼吸停止までの時間を 20 分間測定して生存率を調べた。また、呼吸停止 2 分後に右心室から青色色素 Evans blue を注入し、肺全体の染色像から 5 段階の肺血管閉塞スコアを判定した (図 1)。



判定基準

0 : Evans blueが100%灌流 (血管閉塞無し) , 1 : Evans blueが75%以上灌流,
2 : Evans blueが50%以上灌流, 3 : Evans blueが25%以上灌流,
4 : Evans blueの灌流がほぼ0% (完全閉塞)

図1 肺血管閉塞スコアの判定

【電気分解による下大静脈障害深部静脈血栓症 (DVT) モデル¹¹⁾】

トリブロモエタノール麻酔下、マウス下大静脈にステンレス電極を挿入して 200 μ A・10 分間通電した。電極の電気分解の結果生じるフリーラジカルにより、血管内皮細胞が活性化し、血栓形成が誘発される。生じる血栓が最大となる処置 2 日目に採血し

て末梢血血小板数を測定後、実体顕微鏡下で下大静脈内血栓を取り出し、その湿重量を測定した (図 2)。

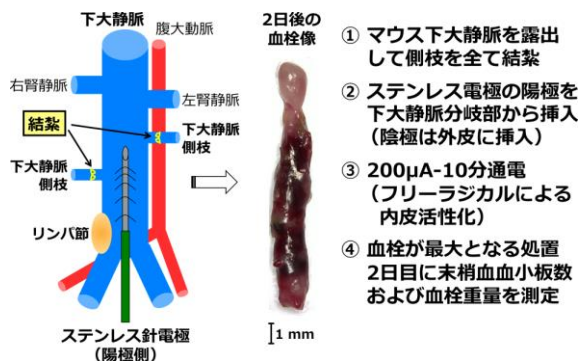


図2 電気分解による DVT モデル

【三血管閉塞法による局所脳虚血再灌流モデル¹²⁾】

イソフルレン麻酔下、マウスの頭蓋骨にドリルで穴を開け、左中大脳動脈 M1 末端部を電気焼灼して閉塞した。両側総頸動脈を血管クリップで一過性に閉塞することで、左中大脳動脈支配領域に局所虚血を誘導し、15 分後にクリップを外して再灌流させた。虚血負荷 24 時間後に神経学的スコアの判定を行った後、脳を摘出してトリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) による生細胞染色を用いて脳梗塞巣体積、浮腫率を判定した (図 3)。

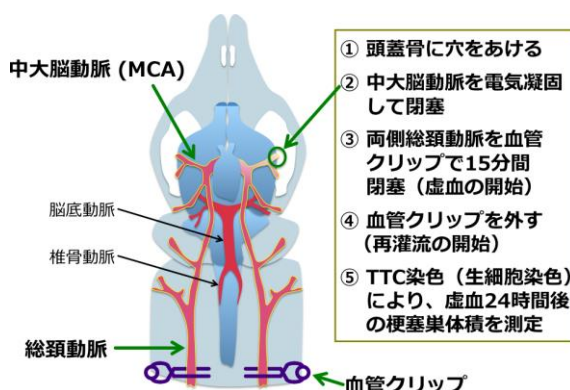


図3 三血管閉塞法による一過性局所脳虚血の誘導

【皮膚創傷モデル¹³⁾】

トリブロモエタノール麻酔下、マウス背部を剃毛し、生検トレパンを用いて直径 5 mm の皮膚全層欠損創を一匹あたり 4 ヶ所作製した。各創部の面積を経的に 2 週間測定し、治癒過程の進行度に違いが見られるかどうか解析した。

III. 結果

PS-K196E 変異マウス・PS 欠損マウス

PS-K196E 変異マウスは $PS^{+/E}$ 、 $PS^{E/E}$ マウス共に正常に誕生し、繁殖能力も維持していた。少なくとも通常の SPF 飼育条件下では、野生型マウスと見かけ上の差異は見られなかった。一方、PS 欠損のホモ接合体マウスは既報と同様に胎生致死であり、 $PS^{-/-}$ マウスのみ正常に誕生した。

【血漿 PS 活性・抗原量】

血漿 PS 補酵素活性を測定した結果、3 系統の PS 遺伝子変異マウス群において、いずれも野生型マウス群に比べて活性低下が認められた。一方、血漿 PS 抗原量は、 $PS^{-/-}$ マウスでは野生型マウスの約 50% に低下していたが、 $PS^{+/E}$ および $PS^{E/E}$ マウスの抗原量は正常であった。ヒトと同様にマウスにおいても PS-K196E 変異は PS 発現量には影響せず、機能異常をもたらすことが明らかとなった。

【組織因子および無機ポリリン酸誘発肺塞栓モデル】

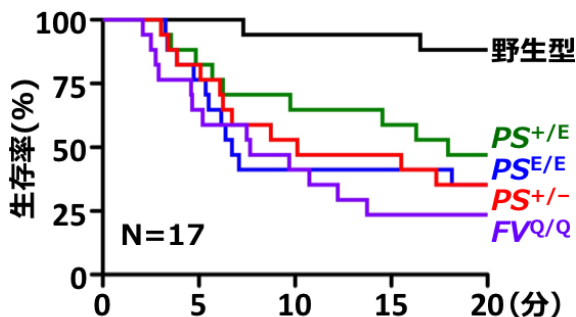
組織因子投与および無機ポリリン酸投与により、

肺塞栓を誘発後の生存率は、 $PS^{+/E}$ 、 $PS^{E/E}$ 、 $PS^{-/-}$ および $FV^{Q/Q}$ マウスで、いずれも野生型マウスに比べて低下した (図 4)。これら 4 系統の遺伝子変異マウスでは、肺血管閉塞スコアも野生型マウスに比べて上昇しており (組織因子誘発: 野生型 = 1.1 ± 1.4 , $PS^{+/E}$ = 2.2 ± 1.7 , $PS^{E/E}$ = 2.5 ± 1.5 , $PS^{-/-}$ = 2.7 ± 1.5 , $FV^{Q/Q}$ = 3.7 ± 0.6 ; 無機ポリリン酸誘発: 野生型 = 0.1 ± 0.4 , $PS^{+/E}$ = 1.5 ± 1.4 , $PS^{E/E}$ = 1.4 ± 1.3 , $PS^{-/-}$ = 1.8 ± 1.5 , $FV^{Q/Q}$ = 2.7 ± 1.5 ; 平均値 $\pm$ SD)、肺塞栓症状の重症化が認められた。

【電気分解による DVT モデル】

DVT モデル実験の結果、 $PS^{E/E}$ 、 $PS^{-/-}$ および $FV^{Q/Q}$ マウスでは野生型に比べて、下大静脈障害後に形成される血栓重量が増加し (図 5)、消耗性と考えられる血小板減少 (野生型 = 116 ± 29 , $PS^{+/E}$ = 76 ± 34 , $PS^{E/E}$ = 47 ± 32 , $PS^{-/-}$ = 37 ± 10 , $FV^{Q/Q}$ = $34 \pm 24 \times 10^4/\mu\text{L}$; 平均値 $\pm$ SD, N=12) も重篤化した。 $PS^{+/E}$ マウスの血栓重量は野生型と有意差は見られなかったが、血小板減少はより亢進していた。以上の結果から、PS-K196E 変異は PS ヘテロ欠損や FV -R504Q 変異と同様に、マウス静脈系血栓症の増悪要因となることが明らかとなった。

(A) 組織因子誘発



(B) ポリリン酸誘発

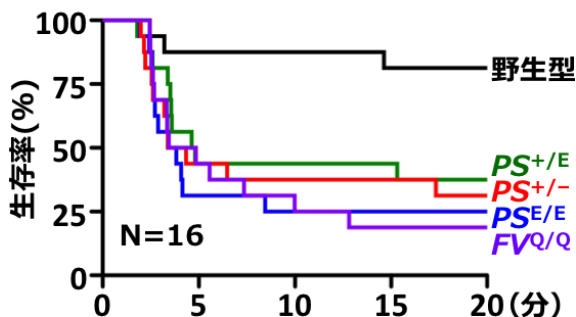


図 4 肺塞栓誘発後の生存曲線 (A) 組織因子誘発肺塞栓モデル $P < 0.05$ (野生型 vs. $PS^{+/E}$), $P < 0.005$ (野生型 vs. $PS^{E/E}$, $PS^{-/-}$, $FV^{Q/Q}$) (B) 長鎖無機ポリリン酸誘発肺塞栓モデル $P < 0.05$ (野生型 vs. $PS^{+/E}$), $P < 0.005$ (野生型 vs. $PS^{E/E}$, $PS^{-/-}$, $FV^{Q/Q}$)

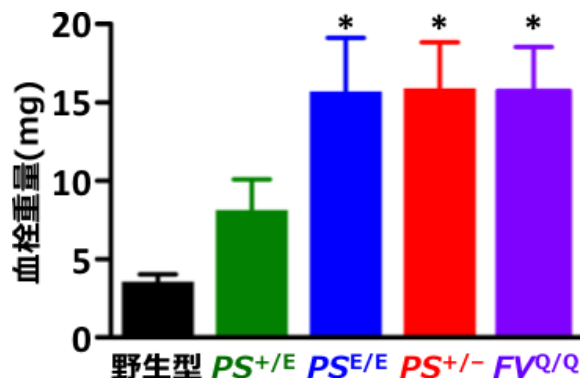


図 5 DVT 誘発 2 日後の下大静脈内血栓重量 (平均値 $\pm$ SEM, N = 12, * $P < 0.01$ vs. 野生型)

【局所脳虚血再灌流モデル】

三血管閉塞法による局所脳虚血再灌流障害モデルを用いた検討を行った。虚血負荷 24 時間後の脳梗塞巣体積は、 $PS^{+/E}$ 、 $PS^{E/E}$ および $PS^{-/-}$ マウスのいずれにおいても野生型マウスと違いは認められなかった (図 6)。脳浮腫率および神経学的スコアも 3 系統の PS 遺伝子変異マウスと野生型マウスで違いはなかった。一方、同じ脳虚血再灌流障害モデルを用いて FV -R504Q 変異マウスを解析した場合、 $FV^{Q/Q}$

マウスだけでなくヘテロ接合体マウスでも、野生型マウスと比べて著明な脳梗塞症状の悪化が認められた¹⁴⁾。このように PS-K196E 変異と FV-R504Q 変異はマウス虚血性脳梗塞に対して異なる症状をもたらすことが明らかとなった。

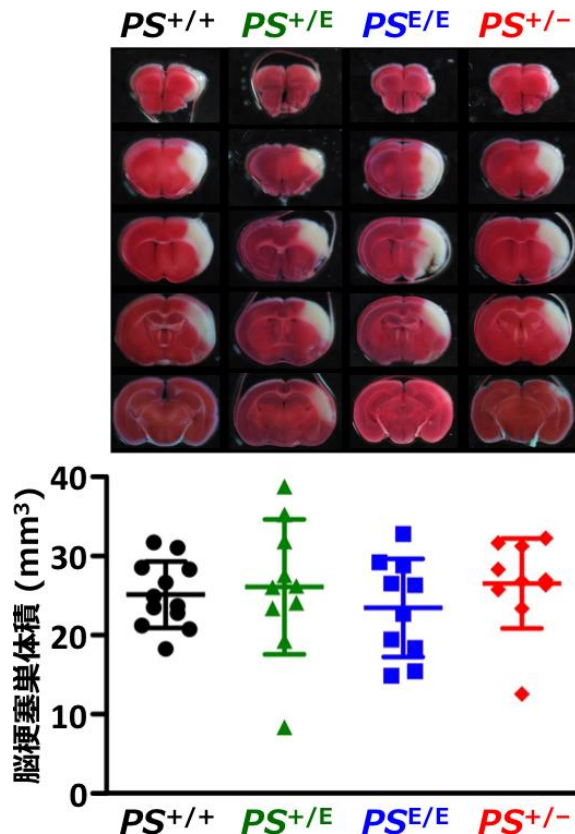


図6 局所脳虚血再灌流 24 時間後の脳梗塞巣 (上図) 脳切片の TTC 染色像 (白い部分が梗塞巣) (下図) 脳梗塞巣体積 (N = 10~12, 群間に有意差無し)

Plg-A622T 変異マウス

Plg-A622T マウスはヘテロ、ホモ接合体ともに正常に出生し、発育や生殖能力にも異常は見られなかった。

【血漿 Plg 活性・抗原量】

血漿プラスミノゲン抗原量は、*Plg^{ΔT}* マウスで野生型マウスの約 50%に低下した。ヒト *Plg-A620T* 変異保有者に明らかな *Plg* 抗原量低下はみられないため、マウス *Plg-A622T* 変異に特有の現象かもしれない。測定に使用した ELISA 系では抗マウス *Plg* モノクローナル抗体を用いているため、変異によって抗体への結合親和性が低下した可能性もあり、結論を得るには別の測定系を用いた再確認が必要である。*Plg^{ΔT}* マウスの血漿 *Plg* 活性は、野

生型マウスの約 20%に低下しており、*Plg-A622T* 変異がマウスでも線溶活性低下を引き起こすことが確認された。

【肺塞栓・DVT・脳虚血再灌流・皮膚創傷モデル】

肺塞栓モデルおよび DVT モデル実験の結果、PS 遺伝子変異マウスとは異なり、*Plg^{ΔT}* マウスの症状には野生型マウスとの差は見られなかった。局所脳虚血再灌流後の脳梗塞症状も *Plg^{ΔT}* マウスで悪化は認められなかったことから、*Plg-A620T* 変異はこれらの血栓性疾患の主病因とはならないと考えられる。

皮膚創傷モデル実験の結果、作製した皮膚創は野生型マウス、*Plg^{ΔT}* マウスで共に 12~14 日でほぼ完全に修復された。創面積の経日変化にも、両群間で違いは無く、プラスミノゲン-A620T 変異は創傷治癒遅延の原因にもならないと考えられた。

IV. 考 察

3 種類の静脈血栓症モデルを用いた検討の結果、PS-K196E 変異マウスでは、PS ヘテロ欠損マウス、FV-R504Q 変異マウスと同様に、野生型マウスに比べて著明な静脈血栓形成亢進が認められた。この結果はヒト観察研究の結果に合致しており³⁾、PS-K196E 変異保有者での静脈血栓症リスク上昇が、変異に基づいていることが確認できた。一方、局所脳虚血再灌流モデル実験では、FV-R504Q マウスでのみ野生型マウスに比して脳梗塞巣の拡大が認められ、PS-K196E 変異マウスや PS ヘテロ欠損マウスに症状の悪化は見られなかった。FV-R506Q 変異は白人の若年性脳梗塞のリスク要因として報告されているが¹⁵⁾、PS-K196E 変異と脳梗塞との関連を示す報告はない。PS-K196E マウスはこれと矛盾しない表現型を呈しており、日本人型血栓症の治療応答性を解析するための優れた動物モデルであることが確認できた。

Plg-A622T 変異マウスでは、血漿プラスミノゲン活性低下が認められ、ホモ接合体マウスの活性は野生型マウスの約 20%まで低下していた。プラスミノゲン欠損マウスでは、成長遅延や寿命の短縮、生殖能の低下などの異常が報告されているが¹⁶⁾、*Plg-A622T* 変異マウスにこうした異常は見られなかったことから、本変異による線溶活性低下は胚発生および個体の成育上の問題とはならないと考えられる。肺塞栓、DVT、脳虚血再灌流モデルを用いた

検討において、Plg-A622T 変異マウスに野生型マウスと比べて症状の悪化は見られなかった。日本人を含む東アジア人に広く分布する Plg-A620T 変異はこれらの動静脈血栓症を悪化させる主要因とはならないと推定される。この結果は日本人にとって朗報であるが、他の血栓性素因と Plg-A620T 変異が重なることで症状を修飾する可能性が残っており、事実、本変異と PS-K196E を有する重症静脈血栓症患者が存在する（未発表データ）。今後、Plg-A622T と PS-K196E の二重変異マウスの解析を通じて、Plg-A622T 変異が PS-K196E 変異による血栓傾向を助長するか否か確認したい。

Plg の活性化は血栓溶解だけでなく、細胞外マトリックスの分解を介した組織の再構築にも寄与しており、Plg 欠損マウスでは、皮膚創傷治癒の著しい遅延が認められる¹⁷⁾。しかし、Plg-A622T 変異マウスに同様の皮膚創傷治癒遅延は認められなかったことから、プラスミノゲン-A620T 変異体は創傷修復に必要な活性を残存しており、本変異は組織再構築異常にはつながらないと考えられる。

V. 結 論

本研究により、PS-K196E 変異マウスが日本人型血栓症の適切なモデル動物であることが明らかとなった。これにより、日本人の静脈血栓症に対する抗血栓薬の薬効評価を動物個体レベルで進めることが可能になった。

Plg-A622T 変異マウスには、肺塞栓、DVT、脳梗塞および創傷治癒の症状悪化は見られないことが判明した。引き続き、PS-K196E 変異との二重変異マウスを解析することで、血栓症修飾要因としての作用の有無を検証し、日本人の血栓症における Plg-A620T 変異の位置づけをはっきりさせる必要がある。

VI. 研究協力者

宮 田 敏 行

国立循環器病研究センター 分子病態部・部長

小 亀 浩 市

国立循環器病研究センター 分子病態部・室長

田 嶋 優 子

国立循環器病研究センター 分子病態部・流動研究

員

VII. 参考文献

- 1) Cui J, Eitzman DT, Westrick RJ, et al.: Spontaneous thrombosis in mice carrying the factor V Leiden mutation. *Blood* 2000 ; 96 : 4222-4226
- 2) Fujimura H, Kambayashi J, Monden M, et al.: Coagulation factor V Leiden mutation may have a racial background. *Thromb Haemost* 1995 ; 74 : 1381-1382
- 3) Kimura R, Honda S, Kawasaki T, et al.: Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 2006 ; 107 : 1737-1738
- 4) Hayashi T, Nishioka J, Suzuki K.: Molecular mechanism of the dysfunction of protein S (Tokushima) (Lys155→Glu) for the regulation of the blood coagulation system. *Biochim Biophys Acta* 1995 ; 1272 : 159-167
- 5) Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, et al.: Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* 2006 ; 83 : 217-223
- 6) Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, et al.: Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 2010-2013
- 7) Saller F, Brisset AC, Tchaikovski SN, et al.: Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood* 2009 ; 114 : 2307-2314
- 8) Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, et al.: Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* 1995 ; 92 : 2585-2593
- 9) Weiss EJ, Hamilton JR, Lease KE, et al.: Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood* 2002 ; 100 : 3240-3244
- 10) Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al.: Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant

- mediators in vivo. *Cell* 2009 ; 139 : 1143-1156
- 11) Diaz JA, Hawley AE, Alvarado CM, et al.: Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava. A novel mouse model. *Thromb Haemost* 2010 ; 104 : 366-375
 - 12) Yanamoto H, Nagata I, Niitsu Y, et al.: Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *Exp Neurol* 2003 ; 182 : 261-274
 - 13) Krampert M, Kuenzle S, Thai SN, et al.: ADAMTS1 proteinase is up-regulated in wounded skin and regulates migration of fibroblasts and endothelial cells. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 23844-23852
 - 14) Kita T, Banno F, Yanamoto H, et al.: Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost* 2012 ; 10 : 1453-1455
 - 15) Hamedani AG, Cole JW, Mitchell BD, et al.: Meta-analysis of factor V Leiden and ischemic stroke in young adults: the importance of case ascertainment. *Stroke* 2010 ; 41 : 1599-1603
 - 16) Rømer J, Bugge TH, Pyke C, et al.: Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 1996 ; 2 : 287-292
 - 17) Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, et al.: Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* 1996 ; 87 : 709-719