
研究助成業績報告集

第 24 回（2016 年度）バイエル循環器病研究助成

『生活習慣病と血液凝固』

熊本地震 震災特別枠

『震災と血液凝固』

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	S100A9 をターゲットにした脳梗塞における 抗血栓ペプチドワクチンの開発	島村 宗尚	1
2	血液凝固因子による全身の代謝異常発症機構の解明	清水 逸平	7
3	循環器疾患における後天性フォンビレブランド症候群の診断と 治療法の開発	早川 正樹	10
4	新規接着因子、JCAD を介した生活習慣病と血栓性疾患の 関連性の解明	原 哲也	15
【熊本地震 震災特別枠】			
1	熊本地震血栓塞栓症予防プロジェクト	末田 大輔	18

S100A9 をターゲットにした脳梗塞における 抗血栓ペプチドワクチンの開発

大阪大学大学院医学系研究科神経内科/健康発達
医学講座・寄附講座准教授
島村 宗尚

I. 緒言

脳梗塞発症後の二次予防にとって、抗血小板薬および抗凝固薬の長期的な継続服用が重要であるが、本邦においては脳梗塞再発時に 40.3% (心原性 43.8%、非心原性 39.2%) の患者が抗血栓薬を内服しておらず¹、また、米国においては 34.1% の患者が 1 年後に内服を自己中止しており²、不良な服薬コンプライアンスが、脳梗塞の再発率増加を引き起こしている。

このような背景から我々は、ワクチンによる持続的な抗血栓作用の獲得が、服薬コンプライアンス不良に伴う脳梗塞の再発抑制に貢献できる可能性を考えた。しかし、ワクチンによる長期間の抗血栓作用に伴う出血リスクの抑制が、抗血栓ワクチン開発の上では大きな課題であった。

そこで我々は、出血リスクのない抗血栓作用を期待できる分子ターゲットとして、血小板の CD36 を介した血栓形成を促進する新規因子として近年報告された S100A9 に注目した³。この報告によると、S100A9⁺マウスでは、内皮細胞障害による血栓形成が抑制されるが、出血時間、APTT、血漿凝固能、血小板接着および遊走については、S100A9 欠損による影響を受けることがなく、リコンビナント S100A9 を投与することにより内皮細胞障害に伴う血栓形成が回復することが報告されていた。また、S100A9 は S100A8 とヘテロダイマーを形成するが、S100A9 が血栓形成には重要であることも示されている。

別の報告では S100A9⁺マウスでは、白血球の遊走低下に伴う易感染性の報告はあるものの^{4,5}、それに反する報告もあり⁶、フェノタイプに大きな異常は生じないことも報告されている。さらに、S100A9⁺マウスでは、癌の抑制効果⁷、血管傷害後の炎症抑制効果⁸ も報告されていることから、ワクチンによる S100A9 シグナルの長期的な抑制は、副作用や出血リスクを増加させることなく、長期的に安全に血管内皮障害に伴う血小板凝集を抑制できる可能性を想定した。また、S100A9 は、脳梗塞後の活性化ミクログリアやマクロファージに発現し、脳梗塞後の炎症を制御して

おり、S100A9 の抑制が脳梗塞の悪化を抑制することも報告されていることから^{9,10}、S100A9 ワクチンが、脳梗塞発症時の脳梗塞の悪化抑制にも寄与できる可能性を考慮した。

このような観点から我々は、S100A9 において CD36 との結合部位であり、B 細胞エピトープが想定されるアミノ酸部位を KLH に結合した S100A9 ワクチンを作成し、同ワクチンを投与したマウスにおいて、中大脳動脈において血栓形成を惹起し、脳梗塞を生じる、塩化鉄 (III) 塗布モデルを用い、ワクチンの効果を検討するとともに、ワクチンの安全性を止血系への影響、T 細胞活性化の観点から検討を行った。また、ワクチンの効果が抗体産生に伴う非特異的な反応によるものではないことを確認するため、S100A8 の B 細胞エピトープが想定されるアミノ酸部位をもとにワクチンを作成した。

II. 対象・方法

1. ペプチドワクチンの合成

S100A9 において CD36 との結合部位であり、B 細胞エピトープが想定されるアミノ酸部位の N 末端を KLH に結合した S100A9 ペプチドワクチンおよび、S100A8 の B 細胞エピトープが想定されるアミノ酸部位の N 末端を KLH に結合した S100A8 ペプチドワクチンを、株式会社ペプチド研究所に依頼し、作成した。なお、ペプチドは化学合成により作成した。

2. マウスにおけるワクチン投与

7 週齢の C57BL6/J 雄マウスに、ペプチド溶液と完全フロイントアジュバントを等用量混ぜた物を皮下投与し、2 週間後に不完全フロイントアジュバントと混合したものを皮下投与した。S100A9 ワクチンについては、さらに 2 週間後に再度、不完全フロイントアジュバントと混合したものを皮下投与した。各実験におけるワクチンの投与時期、抗体の測定時期の詳細は結果に標記する。なお、コントロールとして、KLH

のみを投与したマウスを用いた。

3. 中大脳動脈傷害モデル

イソフルレン吸入麻酔下において、側頭骨を電動ドリルにて開窓し、中大脳動脈を露出した。レーザー Doppler を中大脳動脈の遠位部の頭頂骨上に設置し、中大脳動脈に濾紙に浸した 20%塩化鉄 (III) を 3 分間塗布し、濾紙を外した。脳血流を 30 分間観測し、5 分間以上、40%以上の血流低下が持続した場合、血管閉塞と判断し、低下開始時間を閉塞時間とした。

また、3 日後に尻尾の遠位部をメスにて切断し、37 度にあたためた生食で満たしたファルコンチューブ内に入れ、止血するまでの時間を計測した。

その後、脳を取り出し、クレシルバイオレット染色を行い、染色されない部位を梗塞部位として、脳梗塞サイズを計測した。

4. クロピドグレルの投与方法

クロピドグレル 3 または 6 mg/kg を経口投与にて 2 日間投与後、中大脳動脈傷害モデルを作成、その後、3 日間クロピドグレルを継続投与し、出血時間を計測した。

5. TTAS を用いた解析

マウスの全血を用いて、Microchip flow-chamber システムである TTAS (藤森工業) により、血小板血栓の凝集能を解析した。

6. ELISA

血清中に産生された抗体を ELISA で計測するために、方法 1 で述べた S100A8 または S100A9 アミノ酸配列を有するペプチドを BSA に結合したものをペプチド研究所にて作成し、プレートをこのペプチドでコーティングした。免役したマウス血清を 5% スキムミルクで希釈し、4°C でオーバーナイトにてインキュベーションし、anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate にて反応させ、可視化し、OD450 を計測した。

また、IgG サブクラスの解析においては、anti-mouse IgG subclass-specific HRP-conjugated antibodies (IgG1, IgG2b, and IgG2c) を使用した。

7. Western blotting

ワクチンによって産生された抗体が、S100A8 および S100A9 に特異的なものか確認を行うために、リコンビナント S100A8 あるいは S100A9 を SDS/PAGE electrophoresis にて分離し、メンブレンにブロッティングしたものをマウス血清と反応させ、HRP-conjugated antibodies specific for mouse IgG と反応させ、化学発光を行い、LAS にて観察した。陽性コン

トロールとして、市販の抗 S100A8 あるいは抗 S100A9 抗体を用いた。

8. ELISPOT アッセイ

96 ウェルのエリスロットプレートを anti-mouse IFN- γ capture antibody あるいは anti-mouse IL-4 capture antibody にてコーティングし、S100A9 にて免役した脾臓の懸濁液をプレートに加え (10⁶ 細胞/ウェル)、S100A9 ペプチド、KLH、リコンビナント S100A9、ionomycin/PMA と反応させ、その後、抗 IFN- γ 抗体あるいは IL-4 抗体と反応させた後に、5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate P-toluidine salt and nitro blue tetrazolium solution にて可視化し、スポット数を計測した。

9. 統計処理

数値は平均値 \pm SEM で表した。2 群間の統計解析は、unpaired two-tailed Student's t-test にて行った。多群間の解析には、ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test にて行った。JMP11.2.1 を用いた統計解析を行った。

III. 結果

まず、S100A8 あるいは S100A9 ワクチンにて接種を行い、それぞれ最終ワクチン 2 週間後の血清を用いて、ELISA にて、S100A8 に対する抗体価、および S100A9 に対する抗体価を測定した (図 1)。

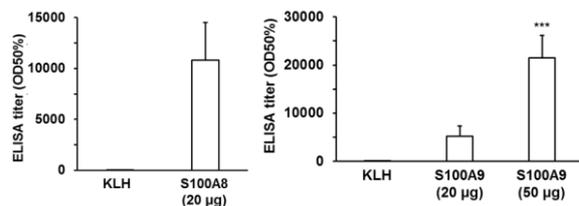


図1 S100A8 ワクチン (左)、S100A9 ワクチンによる抗体価 (右)

S100A9 ワクチンについては、20 μ g の投与では抗体価が S100A8 に比較し十分ではなかったため、50 μ g で投与したところ、十分な抗体価を得ることができた。なお、それぞれの投与回数については、予備試験にて、S100A8 ワクチンは 2 回の投与で十分な抗体価が得られたが、S100A9 ワクチンでは 3 回の投与が必要であったため、S100A8 は 2 回、S100A9 は 3 回投与とした。

これらの産生された抗体が、特異的に S100A8 あるいは S100A9 を認識できるか、Western blotting にて解析した (図 2)。陽性対象である市販 S100A8 抗体

(図2、S100A8Abのレーン)、あるいは市販S100A9抗体(図2、S100A9Abのレーン)では、それぞれ、recimbinant S100A8, A9が認識されるが、S100A8で免疫したマウスの血清では、S100A8を認識するバンドが検出され(S100A8vのレーン)、S100A9で免疫したマウスの血清では(S100A8vのレーン)、S100A9のみを認識するバンドが検出され、それぞれの血清において、S100A8,S100A9に特異的な抗体が産生されていることが明らかとなった。

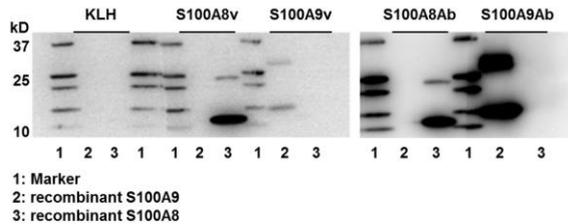


図2 免疫したマウス血清を用いた産生抗体の解析。S100A8vはS100A8、S100A9vはS100A9でワクチンしたマウス血清。S100A8Ab、S100A9Abは市販S100A8、S100A9抗体。

次に、最終ワクチンの3週間後に塩化鉄(III)塗布による中大脳動脈血栓閉塞モデルを用いて、中大脳動脈の閉塞時間を計測した(図3)。

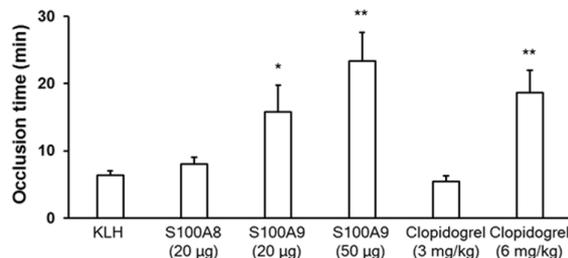


図3 中大脳動脈塩化鉄(III)血栓閉塞モデルでの血栓閉塞までの時間

その結果、S100A8ワクチンでは、血栓閉塞までの時間がコントロール(KLH)と同じであったが、S100A9ワクチンでは血栓閉塞までの時間が有意に延長しており、その効果は20µgよりも50µgで強く認められた。S100A8ワクチンでは十分な抗体産生が認められたにもかかわらず、抗血栓作用が無いことから、産生された抗体による非特異的な作用により抗血栓作用が生じるわけではなく、S100A9ワクチンによるS100A9に対する特異的な抗体が、投与量依存性に抗血栓作用を有することが示された。また、抗血栓作用は、クロピドグレルによる作用と同程度のものであった。

次に、尾動脈からの出血時間を計測したところ(図4)、クロピドグレル投与群では出血時間が顕著に延長

することに対し、S100A9ワクチンでは、コントロール群と比較し、出血時間の延長を認めなかった。

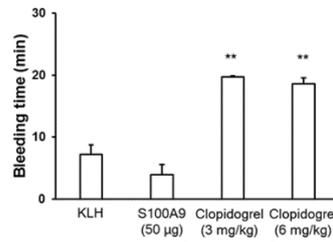


図4 尾動脈からの出血時間の計測結果

また、血小板数、PT、APTTについてもS100A9ワクチンによる影響は認められなかった(図5)。

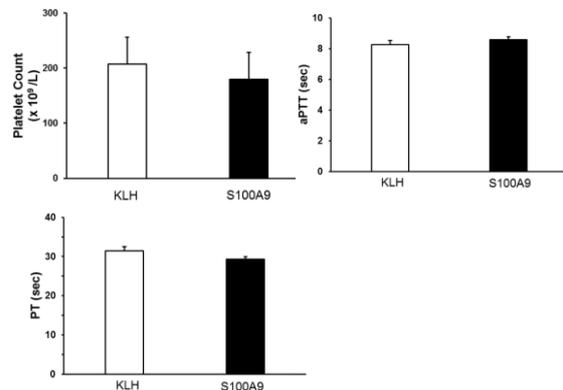


図5 S100A9ワクチンによる血小板数、PT、APTTへの作用

これらのことから、S100A9ワクチンはクロピドグレルと同程度の抗血栓作用を有している一方で止血機構には影響を及ぼすことが無いことが明らかとなった。

また、T-TASを用いた検討でも、S100A9ワクチンを投与したマウスの全血では、flow chamber内での血栓形成が有意に抑制されることも示され(図6)、S100A9ワクチンによる抗血栓作用が示された。

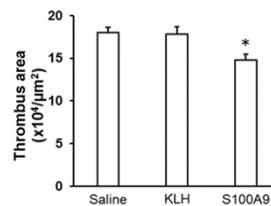


図6 T-TASによる血栓形成に対するS100A9ワクチンの効果の解析

次に、S100A9ワクチンの長期的な効果を検討した。まず、抗体価の長期発現を検討したところ、ワクチン開始後126日目でも抗体が維持されていることが明らかとなった(図7)。

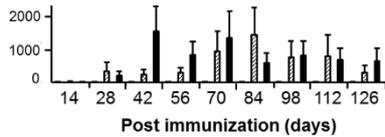


図7 S100A9 ワクチン投与後の抗体価の時間的推移

また、112 日目時点で、塩化鉄 (III) 血栓閉塞モデルを作成したところ、抗血栓作用は維持されながらも出血時間の延長も認められないことが明らかとなり (図 8)、S100A9 ワクチンの長期的な作用も明らかとなった。

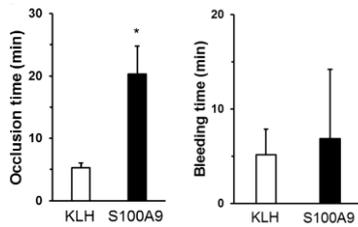


図 8 S100A9 ワクチンにて免疫後 112 日目での血栓形成抑制効果と出血時間への影響についての解析

次に、S100A9 ワクチンに脳梗塞サイズの縮小効果があるか、最終ワクチン後 3 週間目のマウスにて塩化鉄 (III) 血栓閉塞モデル作成後の脳梗塞サイズを解析したところ、予想に反して、明らかな縮小効果は認められなかった (図 9)。

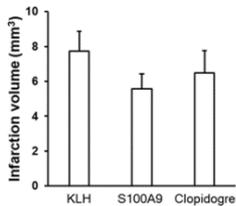


図 9 脳梗塞サイズの解析。塩化鉄 (III) にて血栓閉塞後 3 日後に脳梗塞サイズを計測。

次に、血清中の S100A9 濃度について検討を行った。S100A9 は、血管傷害にて血中濃度が高くなるが、S100A9 で免疫したマウスでは、S100A9 の発現が抑制される傾向にあることが明らかとなった (図 10)。

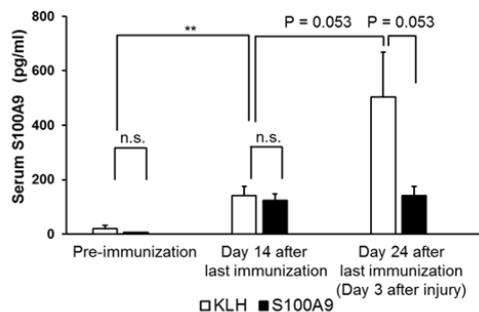


図 10 血清中の S100A9 濃度の解析

最後に、S100A9 ワクチンの安全性について検討を行った。過去のレニンワクチンでは腎臓における炎症細胞の浸潤¹¹、また、アミロイド A8 ワクチンでは、髄膜脳炎が報告されているため¹²、免疫後 147 日目の脳と腎臓の HE 染色、PAS 染色にて検討を行った (図 11)。その結果、いずれにも炎症細胞の浸潤などの組織学的な異常は認められなかった。

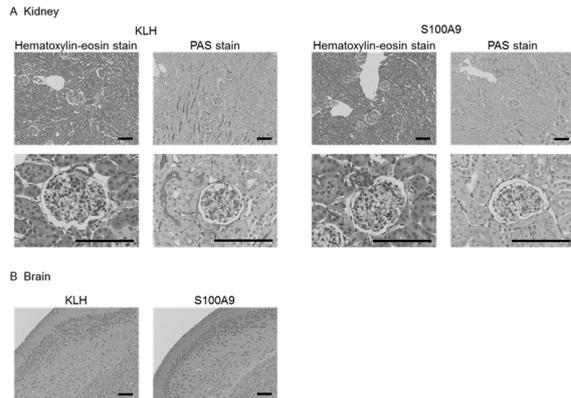


図 11 免疫後 147 日目の腎臓 (HE 染色、PAS 染色) と脳 (HE 染色) の組織像。明らかな形態異常、炎症細胞の浸潤は認めなかった。

さらに、免疫系に対するワクチンの影響を検討した。血清中の IgG サブクラスの解析では、S100A9 ワクチンでは IgG1 優位であり、Th2 優位となっていることが示唆された (図 12)。

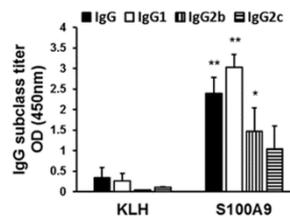


図 12 最終免疫後 14 日目の血清での IgG サブクラスアッセイ。S100A9 ワクチン群では IgG1 優位であった。

また、ELISPOT assay では、免疫したマウスの脾臓から採取した細胞において、リコンビナント S100A9 あるいは S100A9 ペプチドに対する IL-4 あるいは IFN- γ の産生が認められず、有害な自己免疫反応は本ワクチンでは発現しないことが明らかとなった (図 13)。

これらの結果から、免疫学的な点においても、本ワ

クチンは安全性にすぐれていることが示唆された。

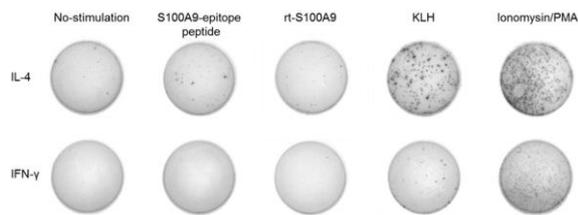


図 13 最終免疫後 14 日目の脾臓細胞を用いた ELISPOT アッセイ。S100A9 ペプチド、リコンビナント S100A9 の添加に対する反応は認められなかった。

IV. 考察

本研究結果より、S100A9 と CD36 の結合部位をターゲットに作成した S100A9 ワクチンは、長期間にわたって S100A9 に対する抗体価を維持することができ、止血機構に影響を及ぼすこと無く、血管傷害に伴う血栓形成をクロピドグレルと同程度に抑制できることが明らかとなった。また、ワクチンによる有害な自己免疫反応を惹起することがないことも明らかとなった。

今回の検討では、ワクチンによる S100A9/CD36 シグナル抑制が血栓形成を抑制することが明らかとなったことから、CD36 に対するワクチンでも同様の効果を期待できるかもしれない。しかし、過去の報告によると、CD36 は血小板だけでなく、様々な細胞、組織に発現しており、CD36 ノックアウトマウスでは、脂質異常症やインスリン抵抗性を示すこと¹³、また、ヒトにおいても CD36 欠損患者では、脂質異常症やインスリン抵抗性、高血圧を呈することも報告されている¹⁴。緒言にて述べたように、S100A9 の欠損マウスでは、フェノタイプに大きな異常はないことから、CD36 をターゲットとするよりも、S100A9 をターゲットとした方が、安全性により優れていると考えられた。

過去の報告では、S100A9 が脳梗塞後の活性化ミクログリア、マクロファージに発現しており、S100A9 のシグナル抑制が脳梗塞の悪化を防ぐことが報告されている¹⁰。また、CD36 も同様に活性化ミクログリア、マクロファージに発現し、その抑制が脳梗塞の悪化を抑制できることから¹⁵、本ワクチンによる脳梗塞悪化の抑制作用が期待された。しかし、結果的には、このワクチンでは、脳梗塞発症後の脳梗塞の悪化を抑制する作用は認められなかった。原因として、産生された S100A9 抗体が、脳実質には十分に浸透することができずに、S100A9 シグナルを十分に抑制できない

可能性と、S100A9 の受容体としては、CD36 以外にも RAGE¹⁶ や TLR¹⁰ が存在し、そのいずれもが脳梗塞の悪化に関与しており、本ワクチンでは、S100A9/RAGE あるいは S100A9/TLR シグナルを抑制できないため、脳梗塞の悪化抑制には効果が無かった可能性もある。また、本モデルは血栓閉塞後は永久閉塞モデルとなるため、虚血再灌流モデルでの再検討は必要と考えられる。これらの観点からは、脳梗塞の悪化抑制もターゲットとするのであれば、さらに高抗体価の抗体を得ることができるよう、ワクチンの方法を改良するか、RAGE や TLR との結合も抑制できるようエピトープを変更する、あるいは動物モデルを変更しての解析、などが必要と考えられた。

今後の課題としては、ワクチン開始 126 日目まで抗体価は維持されているが、抗体価は低下傾向となることから、ブースターにより、再度、抗体価が上昇するか、また、その際に効果があるかの確認は必要であり、血小板での S100A9/CD36 シグナルの抑制を確認するために、JNK や VAV のリン酸化が抑制されているか³の実験が必要であると考えられた。また、本実験は探索的研究のため、ヒトでは使用することができない、complete フロイントアジュバントを使用しており、ヒトへの応用を目指して、アラムなどによるワクチンが可能であるか、検討が必要であると考えられた。

以上のような課題を今後、克服する必要があるが、本研究は、血管内皮傷害に伴う血小板血栓形成をワクチンにより安全に抑制できることを初めて示したものであり、抗血栓ワクチンがコンプライアンス不良に伴う脳梗塞の再発を抑制できる新たな治療法となりうることを示された。

V. 結論

S100A9/CD36 シグナル抑制をターゲットとした S100A9 ワクチンは、頭蓋内血管の内皮傷害に伴う血栓形成を、出血リスクを増加させること無く、長期間にわたり抑制できることが示された。

VI. 研究協力者

中神啓徳・大阪大学医学系研究科健康発達医学講座・寄附講座教授

望月秀樹・大阪大学大学院医学系研究科神経内科学・教授

森下竜一・大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学・教授

河野友裕・大阪大学医学系研究科・大学院生

VII. 参考文献

1. Ito Y, Mitsufuji T, Yamamoto F, et al. Non-taking oral antithrombotic agents in patients with ischemic stroke. *Rinsho Shinkeigaku*. 2011;51:35–37.
2. Bushnell CD, Olson DM, Zhao X, et al. Secondary preventive medication persistence and adherence 1 year after stroke. *Neurology*. 2011;77:1182–1190.
3. Wang Y, Fang C, Gao H, et al. Platelet-derived S100 family member myeloid-related protein-14 regulates thrombosis. *J Clin Invest*. 2014;124:2160–2171.
4. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004;104:4260–4268.
5. Achouiti A, Vogl T, Van der Meer AJ, et al. Myeloid-related protein-14 deficiency promotes inflammation in staphylococcal pneumonia. *Eur Respir J*. 2015;46:464–473.
6. Achouiti A, Vogl T, Endeman H, et al. Myeloid-related protein-8/14 facilitates bacterial growth during pneumococcal pneumonia. *Thorax*. 2014;69:1034–1042.
7. Markowitz J, Carson WE. Review of S100A9 biology and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2013;1835:100–109.
8. Croce K, Gao H, Wang Y, et al. Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation*. 2009;120:427–436.
9. Shichita T, Ito M, Morita R, et al. MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nat Med*. 2017; [Epub ahead of print]
10. Ziegler G, Prinz V, Albrecht MW, et al. Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:1198–1204.
11. Michel JB, Sayah S, Guettier C, et al. Physiological and immunopathological consequences of active immunization of spontaneously hypertensive and normotensive rats against murine renin. *Circulation*. 1990;81:1899–1910.
12. Orgogozo J-M, Gilman S, Dartigues J-F, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*. 2003;61:46–54.
13. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, et al. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*. 1999;274:19055–19062.
14. Hajri T, Han XX, Bonen A, Abumrad NA. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J Clin Invest*. 2002 May 15;109(10):1381–9.
15. Kunz A, Abe T, Hochrainer K, et al. Nuclear factor-kappaB activation and postischemic inflammation are suppressed in CD36-null mice after middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci*. 2008;28:1649–1658.
16. Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J Neurosci*. 2008;28:12023–12031.

血液凝固因子による全身の代謝異常発症機構の解明

新潟大学大学院医歯学総合研究科 先進老化制御学講座 特任准教授
清水逸平

I. 緒言

私はこれまで、肥満や糖尿病、心不全時に白色内臓脂肪が老化することで全身のインスリン抵抗性が生じ、これらの加齢疾患の病態が負に制御されることを明らかにしてきた(1-4)。また最近、褐色脂肪不全を介して肥満や糖尿病の病態が促進することを明らかにした(5)。褐色脂肪組織は主に乳幼児に存在する熱産生器官として認識されてきたが、成人にも存在し、全身の代謝を制御する可能性を秘めた臓器であることがわかってきた(6-8)。褐色脂肪組織の恒常性を維持することで、次世代の糖尿病治療薬や治療コンセプトを創出し、肥満に合併する病態を抑制できる可能性が高い。これまで我々が肥満モデルマウスを用いて行った予備実験の結果、血液凝固第 X 因子(FX)が褐色脂肪に発現し、代謝ストレスにより組織因子(TF)と FXa レベルが褐色脂肪組織で上昇することを見出した。また、FXa の受容体である Proteinase-activated receptor(PAR)-1 が褐色脂肪組織で多く存在し、肥満により発現レベルが上昇することがわかった。FXa-PAR1 シグナルを抑制することで褐色脂肪不全と全身の代謝異常を抑制できることから、肥満時には FXa-PAR1-ミトコンドリア活性酸素上昇-褐色脂肪不全という経路により糖尿病が発症、進展する可能性が高いと考えられた。そこで本研究において、血液凝固因子を介して生じる褐色脂肪不全により、全身の代謝的リモデリングが生じる詳細なメカニズムの解明に挑むこととした。

II. 対象・方法

1)FXa 阻害による抗肥満効果の検討：

4 週齢の野生型マウスに高脂肪食(HFD)負荷を 8-12 週間行い肥満モデルを作製した。HFD 食に FXa 阻害薬を混餌投与したマウス(HFD +FXai マウス)を作製し、全身の糖代謝不全や熱産生能の低下が改善するか検討した。代謝ケージや、その他あらゆる分子細胞生物学的手法を用いて表現型を解析した。

2)遺伝子改変マウスの表現型解析：

これまでの予備実験において、FXa は褐色脂肪細胞に存在する PAR1 受容体を介したシグナルにより恒常性破綻をきたす可能性が示唆されていた。そこで、全身 PAR1 ノックアウト(KO)マウスを作製した(崎村ら、笹岡ら)。また、さらに詳細な検討を行うために floxed PAR1 マウスを作製(崎村ら)した。

3)細胞実験：

褐色脂肪細胞株を用いて、FXa が褐色脂肪細胞不全をきたす詳細な分子機序を検討した。

III. 結果

肥満モデルマウスを用いて行った検討の結果、血液凝固第 X 因子(FX)が褐色脂肪組織に発現し、代謝ストレスにより組織因子(TF)と血液凝固第 VII 因子(FVII)、FXa の発現レベルが褐色脂肪組織で上昇することを見出した。また、FXa の受容体である Proteinase-activated receptor(PAR)-1 が褐色脂肪組織で多く存在し、肥満により発現レベルが上昇することがわかった。FXa-PAR1 シグナルを FXa 阻害薬で抑制すると、褐色脂肪不全と全身の代謝異常を抑制することができた。肥満ストレスに伴う褐色脂肪の白色化は FXa 阻害薬により抑制され、電子顕微鏡を用いた検討の結果、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアの減少が改善することがわかった。肥満モデルマウスの血液の中では FXa の発現レベルが上昇しないことから、褐色脂肪における FXa シグナルが病的意義をもつ可能性が高いと考えられた。分化した褐色脂肪細胞を用いた検討の結果、FXa のリコンビナントタンパクを添加することでミトコンドリアの活性酸素レベルが上昇し、ミトコンドリアの膜電位が低下することがわかった。また、これらの変化は PAR-1 阻害薬によりいずれも抑制された。PAR1 アゴニストを用いても同様の変化が生じた。FXa、PAR-1 アゴニストによるこれらの変化は、いずれも ERK 阻害薬により抑制されるため、ERK を

介したシグナルによりミトコンドリアの活性酸素レベルが上昇すると考えられる。さらに我々は、代謝ストレス下で FVII、FXa、TF が上昇するメカニズムを検討することとした。分化褐色脂肪細胞に低酸素刺激を加えると FVII や PAR-1 の発現レベルの上昇を認めた。Hypoxia inducible factor-1a(Hif-1a)を発現するアデノウイルスを感染させると FVII や PAR-1 の発現レベルが上昇することから、低酸素刺激→Hif-1a→FVII or PAR-1 というシグナル経路によりこれらの分子の発現が制御される可能性が高いと考えられた。分化褐色脂肪細胞にパルミチン酸を添加すると TF の発現レベルが上昇することもわかった。現在 Crispr/Cas9 の系を用いて全身 PAR-1 ノックアウトモデルマウスを作製し、動物実験室で繁殖中である。さらに我々は Floxed PAR-1 マウスを作製し、動物実験室で繁殖中である。UCP-1 Cre マウスと交配し、褐色脂肪特異的 PAR-1 ノックアウトを作製し解析する予定である。

IV. 考察

本研究により、褐色脂肪組織に血液凝固因子が発現すること、代謝ストレスに伴い過剰な FXa-PAR-1 を介したシグナルにより、ミトコンドリア機能異常が生じ、褐色脂肪不全から全身の代謝異常が生じることがわかった。肥満褐色脂肪において、低酸素刺激、代謝ストレスが重要なシグナルであるが、前者により FVII や PAR-1 のレベルが上昇、後者により TF の発現レベルが上昇することが明らかとなった。褐色脂肪組織において血液凝固因子が発現する意義については未だ明らかではない。太古の時代では、飢えと寒冷に対する防御システムの構築が、生存する上で重要であったと考えられる。褐色脂肪は微小な血管ネットワークに富む臓器であり、出血を抑制して褐色脂肪の機能を維持することが重要であったのであろうか。遺伝子改変モデルマウスを用いた検討により、更なる検討を行う予定である。

V. 結論

本研究により、血液凝固因子がもつ負の代謝制御機構の一端が明らかとなった。FXa-PAR1-ミトコンドリア間に存在する負の連関が存在することが強く示唆された。FXa 阻害薬は心房細動症例に対してワーファリンに代わる抗凝固薬として広く使われるようになった。抗肥満は心房細動治療や再発予防にとって、非常に重要な治療戦略である。本研究をさらに発展させることで FXa が持つ負の代謝的側面が明らかになり、FXa 阻

害薬が持つ抗肥満効果が明らかになると確信する。

VI. 研究協力者

南野徹 新潟大学循環器内科学 教授
吉田陽子 新潟大学先進老化制御学講座/循環器内科学 特任助教
林由香 新潟大学循環器内科学 大学院生
奥田修二郎 新潟大学バイオインフォマティクス分野 准教授
早野俊哉 立命館大学生命科学部 教授
崎村建司 新潟大学細胞神経生物学分野 教授
阿部学 新潟大学細胞神経生物学分野 准教授
笹岡俊邦 新潟大学脳研究所 教授

VII. 参考文献

1. Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, Kobayashi Y, et al. Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell metabolism*. 2013;18(4):491-504.
2. Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Tateno K, Okada S, Moriya J, et al. p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell metabolism*. 2012;15(1):51-64.
3. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*. 2009;15(9):1082-7.
4. Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T. DNA damage response and metabolic disease. *Cell metabolism*. 2014;20(6):967-77.
5. Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(5):2099-112.
6. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. New powers of brown fat: fighting the metabolic syndrome. *Cell metabolism*. 2011;13(3):238-40.
7. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(1):215-23.

8. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Dagaard S, Homoe P, Loft A, et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell metabolism*. 2013;17(5):798-805.

循環器疾患における後天性フォンビレブランド症候群の

診断と治療法の開発

-肺血栓塞栓症は血栓性疾患か出血性疾患か？-

奈良県立医科大学 輸血部 助教

早川正樹

I. はじめに

止血機能は一次止血と二次止血に大別され、一次止血ではフォンビレブランド因子(VWF)と血小板を中心とした血小板血栓、二次止血では凝固因子が活性化されフィブリノゲンを中心とするフィブリン血栓が形成される。血小板血栓は、流速の速い動脈での重要な止血機構であると同時に、心筋梗塞や脳梗塞などの致命的動脈血栓症に重要な役割を果たしている。また、フィブリン血栓は流速の遅い静脈での重要な止血機構であると同時に、深部静脈血栓や播種性血管内凝固症候群(DIC)などの静脈性血栓症にかかわっている。よってVWFの機能を制御することが動脈性の出血症、血栓症いずれにとっても非常に重要であるが、現在は動脈系では「血小板」静脈系では「トロンビンを中心とする凝固因子」による病態説明、治療が主体となっており、VWF関連の疾患や治療はほとんど行われていない。

VWFは、早い血流に生じる高ずり応力下で活性化される一方、高ずり応力下ではVWF切断酵素であるADAMTS13によって切断され、絶妙に機能が制御されている。VWFは主として血管内皮細胞で産生され、分泌直後は非常に大きな分子量(2,000万ダルトン以上)の超高分子量VWF重合体(UL-VWFM)である。UL-VWFMは血液中ではADAMTS13により切断されて、50万~1500万ダルトンの様々

な分子量のVWFからなる集団(マルチマー)を構成する。VWFの高ずり応力下での血小板形成能は、分子量に依存し、UL-VWFMが存在することは血栓症のリスクなり、高分子マルチマーが欠損すれば出血傾向となる。

Heyde 症候群

大動脈弁狭窄症(AS)では、狭窄した弁口で非常に高い高ずり応力が発生するため、ADAMTS13によりVWFが過剰に切断され、高分子量VWFが欠損する後天性フォンビレブランド症候群(aVWS)を呈する。特にASに下血などの消化管出血を合併する病態をHeyde症候群と呼んでいる¹⁾。しかし診断確定に必要なVWFの解析が実施困難であることもあり、日本国内の臨床医にはほとんどその存在は知られていない。我々の検討では、重症ASのほとんどがaVWSであり、その患者数は数万人に及ぶ可能性がある²⁾と発表している²⁾。そのようなAVWSの患者にHeyde症候群がどれくらい含まれているかもまだ分かっていない³⁾。今回、循環器疾患に伴うAVWS代表的疾患であるASのように流速の非常に速い左心系ではなく、右心系にもAVWSが存在するかについて検討を試みた。

年齢	性別	発症時期	基礎疾患	出血症状	DVT	治療
1	65 女性	自宅で失神、救急搬送	変形性股関節症		有	tPA Heparin
2	78 女性	1週間前からの進行性呼吸苦	肺癌 肺高血圧症	咯血	有	Heparin
3	70 女性	1週間前からの進行性呼吸苦			有	Heparin
4	75 女性	リハビリ中の突然の呼吸苦			有	Heparin
5	78 女性	13日前からの進行性呼吸苦			有	tPA Heparin
6	51 男性	1ヶ月前からの進行性呼吸苦と失神	ADL低下		有	tPA Heparin
7	77 女性	突然の呼吸苦	II型糖尿病	血痰	有	Heparin
8	77 女性	造影CT時偶発的に発見、入院加療	骨髄性白血病	性器不正出血	有	tPA Heparin
9	80 男性	造影CT時偶発的に発見、入院加療	COPD 胆石		有	Heparin
10	63 女性	造影CT時偶発的に発見、入院加療	肺癌		有	Heparin

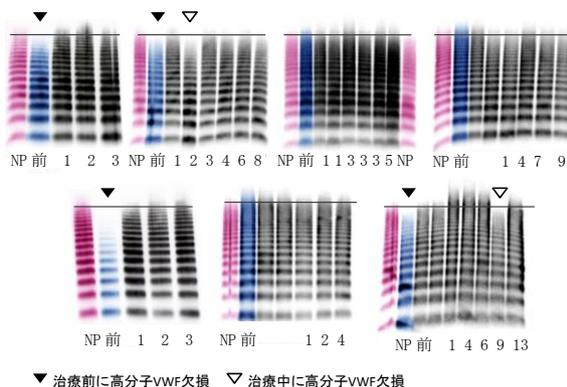
II. 方法・対象

2014年9月から2016年7月までに当院で加療した急性、慢性肺血栓塞栓症(PE)10例について、診断時、抗凝固療法中の経時的採血の残血よりADAMTS13活性、VWFマルチマー解析を行い、AVWSを呈しているかを確認した。対象は51歳から80歳、男性2名、女性8名であった。10例のうち急性のPE(症候性)は7例、無症候性(慢性)PEが3例であった。詳細は以下に示す。

(表1)対象患者背景

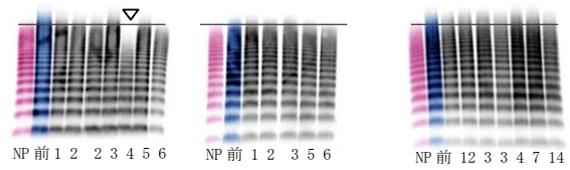
III. 結果

抗凝固療法前後の経時的採血 VWF マルチマー解析を以下に示す。



(図1)急性(症候性)肺血栓塞栓症のマルチマー解析

急性PE例では▼に示すように、7例中4例で診断時に高分子VWF欠損を認めた。



(図2)慢性(無症候性)肺血栓塞栓症のマルチマー解析

慢性PEでは治療前に欠損は認められなかった。また、抗凝固療法中に▽に示すように10例中3例で高分子VWFマルチマーの欠損を認めた。抗凝固療法前に高分子欠損を認めた4症例中2例で咯血や血痰など出血症状を認めた。また抗凝固療法前に高分子VWFマルチマー欠損を認めた4症例すべてにおいて、抗凝固開始後速やかに欠損は改善していた。

IV. 考察

現在高分子マルチマーが欠損する病態としては以下のものがあげられる。

1) 過剰にVWFが血小板と血栓を形成して、消耗性に高分子VWFマルチマーが減少する。

ex) 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)

2) ADAMTS13により高分子VWFマルチマーが過剰に切断される。

ex) Heyde 症候群

TTPに代表されるような1)の場合、消耗性の血小板数の低下が出現するため、高分子VWFの欠損と血小板数について解析を行った。

Heyde 症候群に代表される2)ではADAMTS13活性の差や、ASと同じく血栓塞栓による肺動脈血流速の上昇に基づくずり応力の上昇がVWFの過剰な切断に寄与すると考えられたため、高分子VWFの欠損とADAMTS13活性、三尖弁圧格差について解析を行った。

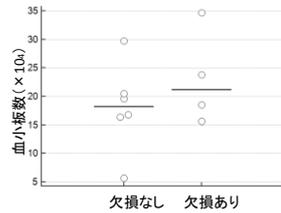
i) 高分子VWF欠損と血小板数

高分子VWF非欠損群、欠損群について診断時の血小板数を比較検討した。最低値で5万/u1まで低下した症例を認めたが、両群間で有意差は求めな

かった。(表 2)

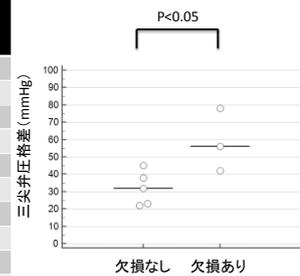
表 2 高分子 VWF 欠損と血小板数

症例 No	診断時の血小板数 (×10 ⁴)	高分子VWF欠損の有無
1	34.7	有
2	15.6	有
3	16.4	なし
4	16.8	なし
5	23.8	有
6	19.6	なし
7	18.5	有
8	5.7	なし
9	20.5	なし
10	29.7	なし



(表 4) 三尖弁圧格差と高分子 VWF 欠損の関係

症例 No	診断時の三尖弁圧格差 (TR-PG mmHg)	高分子VWF欠損の有無
1	42mmHg	あり
2	78mmHg	あり
3	45mmHg	なし
4	22mmHg	なし
5	56mmHg	あり
6	38mmHg	なし
7	ND	あり
8	32mmHg	なし
9	23mmHg	なし
10	ND	なし

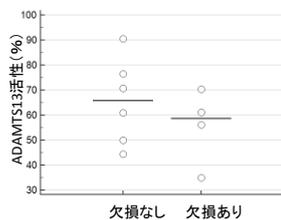


ii) ADAMTS13 活性と高分子 VWF 欠損の関係

高分子 VWF 欠損群、非欠損群について診断時の血小板数を比較検討した。非欠損・欠損群の ADAMTS13 活性の平均値は 65.53%、55.65%で両群間に有意差は認められなかった。欠損を認める群では ADAMTS13 の平均活性が低かった。(表 3)

(表 3) ADAMTS13 活性と高分子 VWF 欠損の関係

症例 No	診断時の ADAMTS13 活性 (%)	欠損の有無
1	61.1	あり
2	56.2	あり
3	70.7	なし
4	90.6	なし
5	70.3	あり
6	76.6	なし
7	35	あり
8	60.9	なし
9	50	なし
10	44.4	なし



iv) 高分子 VWF 欠損と出血症状との関連性

抗凝固療法前に出血症状を認めたのは 3 例、高分子 VWF 欠損を認めたものは 4 例であった。出血症状を認めた 3 例のうち、高分子 VWF 欠損を伴っていたものは 2 例(約 66.7%)であり、PE における AVWS が出血性素因に参与している可能性が大きく示唆された。しかし、高分子 VWF 欠損を認めるが出血症状を呈していない症例の 2 例も存在していたことから、必ずしも高分子 VWF が欠損するのみでは出血しないと考えられた。本来臨床的にはフォンビレブランド病とは関節などの損傷することの多い動脈からの出血、Heyde 症候群はぜい弱な消化管動脈からの出血症状を呈する疾患である。高分子 VWF 欠損とともに、何らかの破綻しやすい動脈の存在が必要である。今回の PE 患者において悪性腫瘍などの破綻しやすい動脈の有無などのより出血するかしないかが左右される可能性が考えられる。症例 2 は三尖弁圧格差の上昇と高分子 VWF 欠損、出血部位に悪性腫瘍を認めることから、AVWS による出血が強く疑われた。

(表 4) 高分子 VWF 欠損と出血症状の関係

症例 No	癌の合併	高分子VWF欠損の有無	治療前の出血症状
1		有	
2	肺癌	有	有(咯血)
5		有	
7		有	有(血痰)
8	白血病	無	有(性器出血)

iii) 三尖弁圧格差と高分子 VWF 欠損の関係

高分子 VWF 欠損群、非欠損群について診断時の三尖弁圧格差を比較検討した。ただし、症例 7, 10 については診断時の三尖弁圧格差は測定されていなかったため、8 例で検討した。非欠損・欠損群の三尖弁圧格差の平均値は 32.00mmHg、58.67mmHg で両群間に有意差が認められ、8 例と少ないサンプル数にも関わらず三尖弁圧格差の増大と高分子 VWF 欠損には相関性が示唆された。(表 3)

症例 2 について更に詳細な臨床データ、経過とマルチマー解析の結果を示す。

【現病歴】78 歳女性。肺小細胞癌（未治療）、肺高血圧、慢性腎機能障害で通院中。1 週間ほど前より労作時呼吸困難感と喀痰に少量の血痰を認めため、肺高血圧の悪化や肺血栓塞栓症疑い緊急入院を指示された。胸部 CT 上腫瘍増悪やリンパ節腫張認めず、下肢エコーにて深部静脈血栓を認めた。心臓エコー検査から三尖弁圧が上昇に伴う右心不全を示唆する所見であったため右心不全対策として酸素投与を開始したが入院日深夜、突然の低酸素血症、呼吸苦とともに、喀血を認めため NIPPV 管理を開始した。臨床経過から PE を疑うが、腎機能障害のため造影 CT は困難であった。単純 CT・MRI を試みるが血栓の確定を得られなかった。臨床症状からヘパリン投与を考慮するが、喀血が続くために投与に苦慮していた。

(表 5) 検査結果

血液検査			
【末梢血】		【止血・凝固系】	
RBC	411 万/ μ l	PT-INR	1.05 秒
HBG	13.2 g/dl	aPTT	28.1
HCT	38.7 %	FDP	87.8 μ g/ml
Plt	14.7 万/ μ l	D-dimer	27.1 μ g/ml
WBC	7600 / μ l		
【生化学】			
AST	32 IU/l		
ALT	9 IU/l		
LDH	374 IU/l		
γ GTP	27 IU/l		
BUN	20.0 mg/dl		
Cre	1.33 mg/dl		
T-bil	0.6 mg/dl		
Na	137 mEq/l		
K	4.6 mEq/l		

血液検査から D-dimer 上昇を認めるが、血小板数は維持されていた(表 5)。旧厚生省 DIC スコアでは 6 点であり、DIC による出血も疑われたが、プロトロンビン時間、活性部分プロトロンビン時間には異常は認められなかった。

当院輸血部にて VWF マルチマー解析を行った。その結果、高分子 VWF マルチマーが欠損していること、以前から止血困難などのイベントを認めず、フォンビレブランド病と診断されたことがなかったこと、呼吸苦が急性進行であったこと、心臓エコー検査で以前から認められていた以上の三

尖弁圧格差を認めることから、AVWS を合併した急性 PE を強く疑った。よって高ずり応力の原因となる血栓に対して抗凝固療法を開始した。抗凝固療法中の臨床経過、マルチマー解析、血液検査データを示す(図 3)

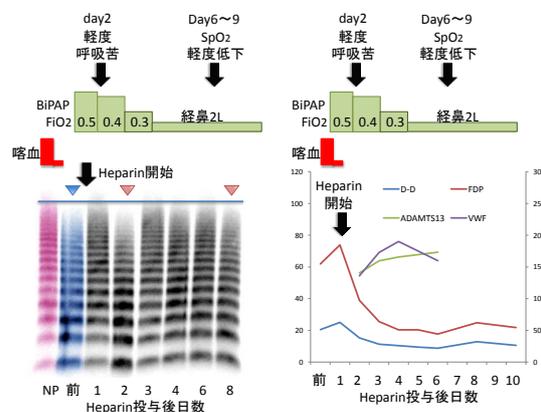


図 3 臨床経過とマルチマー解析

ヘパリン開始後翌日には高分子 VWF 欠損は改善していた。また、血液検査では FDP、D-dimer なども改善していた。臨床症状では抗凝固療法開始後喀血、呼吸苦も同時に改善していった。入院病日 3 日目には経鼻酸素投与のみで体内の酸素化を維持できるようになった。

この症例において入院病日 2 日目に突然高分子 VWF の欠損を呈していた。症例 2 のみならず、症例 7、8 でも同じく抗凝固療法中に突然の高分子 VWF の欠損を呈していた。加療途中に高分子 VWF 欠損を呈していた 3 例をカルテにて後方視的解析を行うと 3 例中 2 症例において、高分子 VWF 欠損した日に突然の経皮的酸素濃度 (SpO2) の低下や、一時的に酸素投与量増加を施されていた。しかし、どの症例も抗凝固療法中であるため、「肺血栓塞栓の再発」を疑うことなく、翌日には症状改善していた。

このような、状況から PE は抗凝固療法中に再発している可能性が示唆され、三尖弁圧格差が 40mmHg 以上であれば、VWF マルチマー解析でも、PE の補助的診断が可能かもしれない。

V. 結論（まとめ）

PE 抗凝固療法開始前に 10 例中 4 例で、高分子量 VWF マルチマーの欠損を認めた。高分子 VWF の欠損群と、非欠損では、血小板数、ADAMTS13 活性では有意差を認められなかったことから、VWF の欠損には血小板による消耗や ADAMTS13 活性の差による過剰な切断ではないと思われる。三尖弁圧格差との関係性では、圧格差が上昇すると有意に高分子 VWF が欠損することが示された。同時に、高分子 VWF 欠損を呈すると思われる圧格差は 40-50mmHg 前後ではないかと今回の解析から示唆された。肺動脈の血圧は、正常値は収縮期圧 30~15mmHg、拡張期圧 8~2mmHg、平均圧 18~9mmHg とされており⁴⁾、大動脈に比べその圧格差は 1/5~1/3 と小さい。そのため VWF を切断するために必要なずり応力がかからず、右心系では AVWS はあまり起きないということが定説となっていた。しかし今回 10 例ではあるが小規模な解析においても 4 例の AVWS を発見することができた。また、VWF 切断が亢進すると思われる肺動脈の圧力として三尖弁圧格差で 40-50mmHg とその閾値を算定した。今後さらにデータを拡充して閾値の特定を進めていくことが必要である。

しかし、高分子 VWF 欠損症例すべてに出血症状が認められたわけではなかった。本来高分子 VWF を欠損することで出血傾向を呈する代用的疾患であるフォンビレブランド病や Heyde 症候群では、破綻しやすい動脈が存在しその部位から出血しやすい特性がある。よって、今回の PE で AVWS であり、なおかつ出血する症例を解析すると、癌などのぜい弱な動脈を有する基礎疾患を有する症例で出血しやすくなるのではないかと推測された。

このようなことから、三尖弁圧格差が 40-50mmHg 以上の急性 PE においては、出血を来す基礎疾患を持つ症例では出血のリスクに注意が必要である。また、最近ではカテーテル治療の発展、ICU などの生体機能測定技術が発達して、動脈ラインから治療や測定を行うことが増えてきている。ぜ

い弱な血管のリスクを有していなくても、これらのカテーテル検査、血液ガスの測定、動脈ラインの留置など動脈への侵襲を伴う医療行為によって出血傾向を呈する可能性が予想されるので注意する必要があると思われる。

VI. 研究協力者

松本雅則 奈良県立医科大学 輸血部 教授
酒井和哉 奈良県立医科大学 輸血部 病院助教

VII. 文献

- 1) Loscalzo J. From clinical observation to mechanism – Heyde's syndrome. *N Engl J Med* 2013;368:579-80
- 2) Yamashita K, Yagi H, Hayakawa M, Matsumoto M, Taniguchi et al, S: Rapid restoration of thrombus formation and high-molecular-weight von Willebrand factor multimers in patients with severe aortic stenosis after valve replacement. *J Atheroscler Thromb*, 2016; 23: 1150-1158.
- 3) Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost.* 2012;10(12):2428-2437.
- 4) 難病情報センター.肺動脈性肺高血圧症（指定難病 86） [internet].東京:厚生労働省;2012 Apr 24. Available from: <http://www.nanbyou.or.jp/entry/253>. Japanese

新規接着因子、JCAD を介した生活習慣病と血栓性疾患の関連性の解明

神戸大学大学院医学研究科 内科学講座
循環器内科学分野・特命助教
原 哲也

I. 緒言

生活習慣病と呼ばれる高血圧、脂質異常症、糖尿病は動脈硬化性疾患の危険因子であることは広く知られているが、血液凝固異常の代表的疾患である「深部静脈血栓症」と生活習慣病の関連性はほとんど知られおらず、生活習慣病と血液凝固疾患をつなぐ分子機序は不明な点が多い。

そのような現況の中、近年のヒトゲノムワイド関連研究 (GWAS) によって、心筋梗塞に関連する新規の分子として JCAD (Junctional protein associated with coronary artery disease) が同定されたが(1,2)、JCAD が心筋梗塞に影響する分子機構は不明である。

(i)心筋梗塞は動脈血栓症であること、(ii)JCAD は血管内皮の接着因子であること、(iii)トロンビン刺激でリン酸化修飾を受けること (3)から、JCAD は血管内皮において血液凝固反応を制御しているのではないかと申請者は着想し、JCAD と DVT との関連性を前実験的に解析したところ、JCAD^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べ、大型の DVT が形成されることが分かった(図1)。

すなわち、心筋梗塞と臨床的に関連することが証明さ

することを目標とする。

1. 生活習慣病によって JCAD 分子がどのような変化、修飾をうけるかを明らかにする。
2. JCAD が血液凝固疾患である深部静脈血栓症の発症にどのような分子機序で影響を及ぼしているのかを、生体分子イメージング手技を駆使して、明らかにする。

II. 対象・方法

1. 培養細胞を用いたトロンビン刺激後の催血栓性変化における JCAD の役割の解明

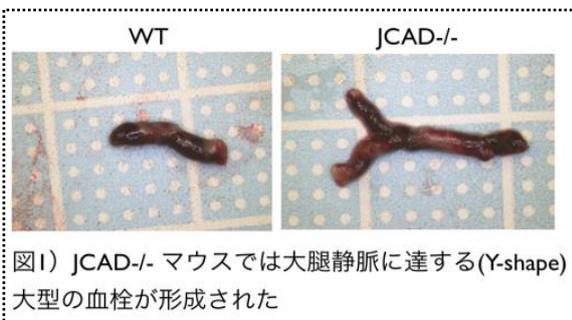
JCAD はトロンビン刺激によりリン酸化修飾をうけることが、近年の網羅的解析により明らかとなった (3)。培養ヒト内皮細胞において siRNA 等を用いて JCAD のノックダウンないし過剰発現を誘導し、トロンビン刺激後の組織因子やトロンボモジュリンなどの血栓関連因子の発現の変化を分子細胞学的手法を用いて(ウェスタンブロット、リアルタイム PCR 法など)検証する。これにより、トロンビン刺激による JCAD のリン酸化修飾が、血栓形成シグナルに関わるか否かが明らかとなる。

2. 脂質異常症モデル等における生体内での JCAD 発現の変化の解明

ApoE^{-/-}マウスによる脂質異常症モデルマウスにおいて、大動脈やその他組織での JCAD 発現レベルの経時的変化を明らかにし、野生型マウスと比較する。これによって、生活習慣病による生体内での JCAD への影響を明らかにする。

III. 結果

1. 培養細胞を用いたトロンビン刺激後の催血栓性変化における JCAD の役割の解明



れている JCAD 分子が血液凝固疾患である DVT の形成も制御していることが強く示唆された。それゆえ、生活習慣病による血管内皮障害が血管内皮細胞に発現する JCAD 分子の異常を引き起こし、それによって、血液凝固反応が亢進する、という仮説をたて、以下を明らかに

ヒト臍帯血静脈内皮細胞 (HUVEC) にトロンビン刺激を行い、それによるシグナル伝達経路における JCAD の役割を解明するために、JCAD を siRNA を用いた特異的ノックダウンを行い、WB による各種シグナル分子の分子動態を検討した。

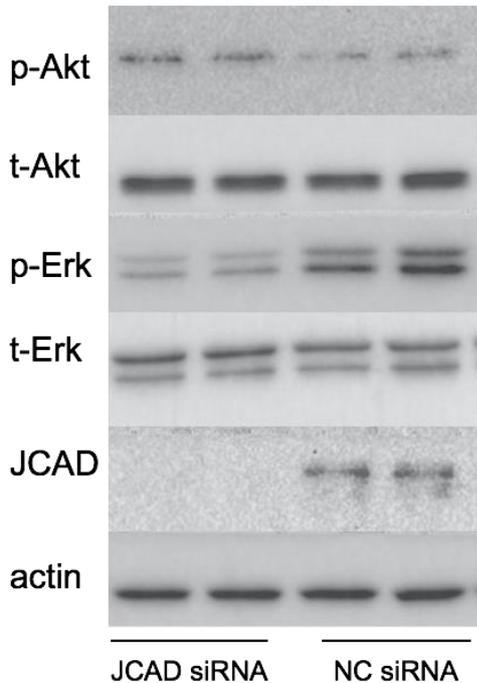


図2 JCAD 特異的ノックダウンによるトロンビン刺激後のシグナル伝達の変化

図2のようにJCADのsiRNAによる特異的ノックダウンが確認された。Aktシグナルはやや亢進しているようにも見えるが、そもそもトロンビンによるAktのリン酸化レベルが低く、差は明らかではなかった。一方、ERKのリン酸化はJCADのノックダウンにより明らかに抑制された。すなわち、JCADはトロンビン刺激によるシグナル伝達経路のうち、特にERKのリン酸化に関わることが明らかとなった。

また、JCADをノックダウンした状態でトロンビン刺激による組織因子の発現の変化を検討したところ、JCAD特異的ノックダウンにより、トロンビン刺激で誘導される組織因子の発現レベルが亢進した。

2. 脂質異常症モデル等における生体内でのJCAD発現の変化の解明

ApoE^{-/-}マウスによる脂質異常症モデルマウスにおいて、大動脈やその他組織でのJCAD発現レベルを野生型マウスと比較した。

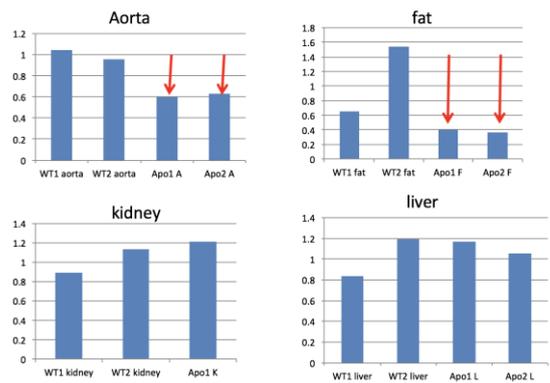


図2 WTマウスとApoE^{-/-}マウスにおける各種臓器でのJCAD発現

結果、図2のように大動脈や脂肪組織においてRT-PCR法でJCAD分子の発現レベルを解析すると、ApoEノックアウトマウスにおいて血管でのJCAD発現が抑制される傾向にあることがわかった。一方、腎臓や肝臓では発現に差は認めなかった。これはおそらく腎臓や肝臓内のmRNA内においては血管成分の影響は非常に低いためだと考えられる。

それゆえ、動脈硬化がおこるような炎症性刺激によってJCADの発現が抑制されているのか、もしくは単純に血中の脂質濃度が影響しているのかを明らかにするために培養血管内皮細胞 (HUVEC) にTNF刺激を行い、JCADの発現レベルの経時的変化をRT-PCR法を用いて検討した。

結果、下の図3の様に、TNF刺激によってJCAD発現が減少する傾向があった。

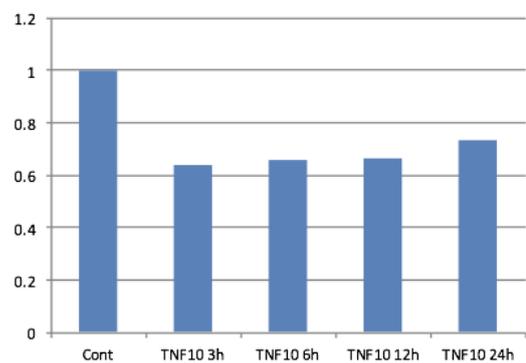


図3 HUVECにおけるTNF刺激後のJCAD発現の経時的変化

IV. 考察

今回、我々はトロンビン刺激後のシグナル伝達におけるJCADの役割において、特にERKのリン酸化経路に影響していることを明らかにし、動脈硬化モデルであるApoEノックアウトマウスにおけるJCAD発

現レベルの変化、すなわち脂質異常症による動脈硬化性変化において血管壁における JCAD 発現が減少することがわかった。さらにその機序を明らかにするために培養血管内皮細胞に炎症刺激 (TNF) を加えて、それによる JCAD 発現の変化も検討したが、炎症性刺激によって血管内皮細胞における JCAD 発現が減少することがわかった。

すなわち、JCAD は脂質異常症を始めとする、生活習慣病のような血管内皮に炎症性刺激が加わるような状況では血管内皮における発現が減少する。そして JCAD 発現の減少は、ノックダウンによる *in vitro* の実験結果によればトロンビン刺激による ERK のリン酸化を抑制し、組織因子の発現が亢進された。

これはおそらく、JCAD はトロンビン刺激による血管内皮細胞の向血栓性変化の *negative feedback* 機構に何らかの機序を介して関わっており、トロンビン刺激のブレーキ的な役割を果たしていることが予想される。このブレーキである JCAD が生活習慣病による炎症性刺激で発現が低下することが、動脈硬化による動脈血栓、すなわち心筋梗塞の発症に影響するという、GWAS (ヒトゲノムワイド研究) 結果を説明する機序であると推測された。今後はより詳細な分子機序の解明により、この JCAD 機能を制御することによる動脈硬化、血栓症の新規治療法の開発が望まれる。

V. 結論

JCAD 分子はトロンビン刺激における血管内皮細胞でのシグナル伝達経路のうち、ERK のリン酸化を介することによって刺激伝達を制御している。また、APOE ノックアウトマウスにおいて、血管壁における JCAD 発現が減少しており、培養血管内皮細胞においても TNF による炎症刺激によって減少したことから、生活習慣病による慢性炎症状態によって JCAD の発現が減少することが、心筋梗塞発症の機序の一つである可能性が示唆された。

VI. 研究協力者

石田達郎 神戸大学大学院医学研究科 内科学講座
循環器内科学分野 特命教授
杜隆嗣 神戸大学大学院医学研究科 立証検査医学
分野 特命准教授

VII. 参考文献

1. Coronary Artery Disease Genetics C. A genome-wide association study in

Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011;43:339-44.

2. Erdmann J, Willenborg C, Nahrstaedt J et al. Genome-wide association study identifies a new locus for coronary artery disease on chromosome 10p11.23. *Eur Heart J* 2011;32:158-68.

3. van den Biggelaar M, Hernandez-Fernaud JR, van den Eshof BL et al. Quantitative phosphoproteomics unveils temporal dynamics of thrombin signaling in human endothelial cells. *Blood* 2014;123:e22-36.

熊本地震血栓塞栓症予防プロジェクト

熊本大学医学部附属病院循環器内科・特任助教
末田大輔

I. 緒言

近年、大規模地震を含む自然災害と静脈血栓塞栓症（VTE）との関連が明らかになってきており、それらはマスメディアに大きく取り上げられ、社会問題ともなっている。この関連が注目を浴びる理由としては、一度被災すると誰にでも発症する可能性があり、また重篤化するリスクが高いことが挙げられる。

災害後の避難生活では①車中泊、狭い避難所、床生活(雑魚寝)などにより下肢静脈うっ滞、②ライフラインの途絶による水・食料不足およびトイレ不足による摂水制限による脱水、③避難する際のけがなどによる血管損傷など Virchow の 3 徴が重なることで、VTE が起きやすい。また大規模災害では様々な疾患発生が遷延し、VTE は最も長期にわたって発症する可能性がある。さらに VTE は震災直後の肺塞栓症による突然死のみでなく、その予防は長期的な 2 次的健康被害の予防にも重要である(1)

2016 年 4 月熊本地震(3 回のマグニチュード 7 級の地震ととそこに次ぐ余震)(2)が発生した。熊本は日本の南西に位置し、図 1 に熊本の位置を示した。熊本県は震災直後より現在に至るまで本震災に関連する VTE の発症数に関する調査を行っており、震災から 2 か月間の 6 月 13 日までに VTE により入院を要すると判断された患者が 51 名いるとの発表があった。同時にこの 51 名のうち 42 名に車中泊の経験があったことが発表された。本稿では主に車中泊の有無による臨床的特徴について述べ、①車中泊の危険性ならびに②行政・大学・基幹病院・マスメディアの連携の重要性について述べる。

II. 対象・方法

すべての工程はヘルシンキ宣言ならびにその改訂版に基づき実行された。また本研究は参加施設すべての倫理委員会の承認を得ている。

1)われわれは震災は発生した当日より県内 20 施設(熊本大学医学部附属病院、熊本中央病院、済生会熊本病院、国立病院機構熊本医療センター、熊本赤十字病院、熊本市市民病院、熊本機能病院、熊本地域医療センター、阿蘇医療センター、熊本労災病院、熊本総合病院、杉村病院、公立玉名中央病院、荒尾市民病院、人吉医療センター、天草地域医療センター、国保水俣市立総合医療センター、上天草総合病院、熊本再春荘病院、山鹿市民医療センター)に電話あるいは電子メール等を用い、熊本地震に関連し、VTE により入院を要すると判断された患者がどの程度いるか調査を連日行った。調査内容は人数、年齢、性別、車中泊の有無であった。その後各施設の倫理委員会の承認を経て、必要に応じて臨床記録を閲覧し、必要な情報を得た。調査は現在も継続されているが本稿では急性期・亜急性期にあたる震災から 2 か月間の 6 月 13 日までを調査対象とする。

深部静脈血栓症(DVT)は(1)造影 CT あるいは(2)下肢静脈エコー、肺塞栓血栓症(PTE)は(1)造影 CT、(2)肺動脈造影、(3)肺血流シンチグラフィあるいは(4)急性発症かつ心エコーなどで著明な右心系の拡大などが確認され臨床的に診断された場合とした。

本調査で得られた 51 症例を車中泊を経験していない群(9 症例)、経験した群(42 症例)の 2 群に分け、両群の臨床的特徴について考察した。

2)統計解析

すべての統計値は平均±標準偏差で示した。群間の比較に t 検定を用いた。P 値 0.05 未満を統計学的に有意であると判断した。すべての統計解析に the SPSS software version 23 (IBM 社)を用いた。

III. 結果

図 2 に本震災に関連して入院を必要とした患者数

の入院日別の推移を示した。われわれが後述するKEEPプロジェクトとして介入を開始した4月19日以降VTEの発症率が減少傾向にある。

表1に本調査で得られた51症例を車中泊を経験していない群(9症例)、経験した群(42症例)の2群に分け、両群の臨床的特徴を示した。結果、車中泊を経験した群の方が、年齢は低く、発災から入院までの日数が短く、肺塞栓を起こす率が高い。それにも関わらず、下大静脈フィルターを要した率は低かった。性別や既往などでは有意差を生じなかった。

IV. 考察

震災に限らず災害とVTEの関連性は数多く報告されているが、発災早期から発生する急性肺血栓塞栓症(いわゆるエコノミークラス症候群)などのVTEに対する予防活動体制は必ずしも確立されていない。

平成28年熊本地震では発災早期に車中泊の女性がエコノミークラス症候群で死亡し、マスメディアの報道が過熱するなか、平成28年4月20日、熊本県健康福祉部長名で日本循環器学会と日本静脈学会に対しエコノミークラス症候群に関する正式依頼が出された(具体的には、専門医師・技師・看護師派遣と弾性ストッキング依頼であったが、発災の非常に早期に行政から特定の主要学会に正式依頼があるのは異例であり当時の熊本県の決断は高く評価されるのではと思われる)。その依頼の被災地受け皿として、熊本大学循環器内科はエコノミークラス症候群に対する予防・啓発活動を開始致した。また、正式依頼とは個別に災害医療専門の新潟大学心臓血管外科呼吸器外科・榛沢和彦講師が4月19日に熊本入りされ、下肢静脈エコーを含めたDVT一斉検診を熊本市市民病院(橋本洋一郎先生、坂本憲治先生)、熊本赤十字病院(細川浩先生)、熊本大学スタッフと一緒に開始していた。熊本県から学会への依頼に対し4月21日に日本循環器学会からの要請で国立循環器病研究センターから専門スタッフが派遣され、また日本臨床衛生検査技師会の献身的なご協力と、その後、熊本市エコノミークラス症候群対策責任者の長井洋平先生の合流、神経疾患がご専門の中島誠先生、安東由喜雄教授にもご指導頂き、これまでの災害ではみられなかった一元化されたエコノミークラス症候群への対応が可能となり、活動を続けてきた。具体的には、下肢静脈エコーを避難所、車中泊の方々に施行し、DVTのスクリーニング、血栓の存在では、血中D-ダイマーを測定し、高値であれば、

基幹病院への紹介を行い、弾性ストッキング着用指導を含めた保健衛生活動も同時に行ってきた。また、熊本県庁のホームページを通じまして、全県下基幹病院との共同でエコノミークラス症候群発症状況を逐一報告することで、注意喚起を行った。

最終的に、

- 1) 大学、基幹病院、地元医院の地域医療機関、
- 2) 日本循環器学会、日本静脈学会、日本脳卒中協会、日本臨床衛生検査技師会、日本心エコー図学会、日本心臓病学会等の主要学会、福島県立医科大学、福井大学、新潟大学等の大学や県外医療機関からの団体・個人的支援
- 3) 行政(厚生労働省、熊本県、熊本市)
- 4) マスメディアとの連携

四位一体による活動となり、熊本地震血栓塞栓症予防プロジェクト：Kumamoto Earthquakes thrombosis and Embolism Protection (KEEP) Projectと命名することとした。

プロジェクトは、

- 1) エコノミークラス症候群の予防・啓発
 - 2) 現状把握(サーベイランス)
 - 3) 将来的な建設的提言
- 3つを軸とした。

活動にあたっては、日本循環器学会(プロジェクトリーダー：啓二郎福岡大学教授)、日本静脈学会、日本脳卒中協会、日本脳卒中学会、日本臨床衛生検査技師会(長沢光章副会長)、日本心エコー図学会(中谷敏理理事長)、日本心臓病学会、日本超音波医学会、等の主要学会、また弾性ストッキング関連の企業、製薬企業、検査薬企業、検査機器企業、マスメディア関連企業など、たくさんの方々のご支援があり、またKEEPプロジェクト発足当初から医療救護調整本部JMAT近藤祐史先生、厚生労働省現地対策本部高山啓先生、有賀玲子先生、国立循環器病研究センター小川久雄理事長、安田聡先生、新潟大学榛沢和彦先生、熊本県健康づくり推進課の皆様、倒壊危機で入院機能停止となり積極的に活動に従事されました熊本市市民病院の皆様(橋本洋一郎首席診療部長、坂本憲治循環器医長のリーダーシップで看護師さん、技師さんも含めまして)、熊本赤十字病院細川浩先生、熊本大学消化器外科長井洋平先生等には特に大変お世話になりました。この場をお借りしましてお礼申し上げます。

急性期を過ぎた後も、避難所、仮設住宅での深部静脈血栓症一斉検診を含めたエコノミークラス症候

群予防・啓発活動を継続し、脳卒中、けいれん、たこつぼ型心筋症、心不全、不整脈等の急性脳・心血管疾患の予防・啓発まで拡充し、また日本循環器学会、日本脳卒中学会、日本脳卒中協会との共同で、パンフレット、チラシを作成、配布し、二次的健康被害を最小化する努力を行う必要がある。

本調査の結果に関して、車中泊を経験した群の方が、年齢が若かったことに関しては車中泊を経験する母集団が若年であったことに起因すると考えられ、病的な問題ではないと考えられる。特筆すべきことは車中泊を経験した群の方が、発災から発症までの日数が短く、肺塞栓を起こしやすいという点である。このことから車中泊は単に VTE を起こしやすいという点のみならず重症化しやすいという点が今回の少ない症例数からでも顕著に示された。このことは今回の震災から得た教訓として今後の災害医療に活かす責任があると考えられる。

災害に関連して病気が発症、増悪することは認識されていたが、医療従事者、行政を含め広く知られるようになったのは1995年に発生した阪神・淡路大震災後である。これを期に2004年の新潟県中越地震(3.4)、2011年東日本大震災において震災に関連して発症する疾患が調査され、長期にわたる避難生活により様々な疾患が問題になることが分かってきた。特に脳・心血管系臓器はストレスの影響を受けやすく、しかも疾患の性質上緊急対応が必要になることが多い。しかし、被災状況や二次災害など災害毎に状況は異なるため、日本のみならず世界においても地震急性期に震災後に発生する疾患の予防が十分にできず、対応が後手に回りがちである。今回の熊本地震ではマグニチュード 6.5 以上の地震が連続して起こったことや収束する気配のない余震への恐怖から車中への避難を選択する被災者が多く、車中泊が長期化し、心身とも長期的なストレスにさらされている特徴がある。このため熊本地震ではこれまでの震災とは状況が異なり DVT をはじめとする脳・心血管系疾患がより長期にわたって発症し、病状も重症化することが予想される。したがって、熊本地震後に急性発症した脳・心血管系の疾患の発症数、発症状況、予後を正確に把握し、地震前と地震後での発症率の違いやこれまでの震災との違いを比較検討することで、将来の災害医療に対して重要かつ貴重な情報となると考えられる。被災地広域の疾病発生数を正確に把握するためには多施設によるデータの統合が重要である。熊本県では 20 施設に脳・心血

管系専門医が常駐しており、熊本県東西北地域を十分にカバーしている。仮に、患者が対応困難な施設を受診したとしても、必ず県内 20 施設のいずれかに搬送されている。特に熊本市内においては各施設独自にモバイル CCU を含むドクターカーを保有しており、連絡があればすぐに出勤できる体制ができています。また、離島や陸路が寸断された地域など車による搬送が困難な場合にはヘリコプターを使った搬送も行われている。よって基本的に熊本大学医学部附属病院と県内の熊本大学医学部附属病院関連 20 施設における患者数を算出することで県内の発症数がほぼ正確に把握できるものと考えられる。県内の熊本大学医学部附属病院関連 19 施設は以前から臨床のみならず研究においても、熊本大学大学院生命科学研究部循環器内科学、神経内科学を中心とした相互の協力体制ができあがっていることから、脳・心血管系の疾患の発症数などを含めた本研究は十分に実施可能なものと考えている。本研究ではエコノミークラス症候群(肺塞栓症)、脳卒中、心筋梗塞などすべての凝固異常を調査し、それが県内すべてを網羅されていることが重要であり、価値があると考えられる。本研究に際しては、第一人者である新潟大学・榛沢和彦先生にもご参画いただき地震発生直後よりの確かな助言をいただいている。厚生労働省、熊本県としても熊本地震被災者だけではなく日本国民へ震災後に発症しうる疾患の知識と予防啓発を進めていく必要があると考えていることから、本研究が今後の災害時の脳・心血管系疾患の対応に大きく貢献していくものと期待される。本研究の結果が、各病院にとって地域に根ざす一端となり、医師においても患者に情報を還元することで、患者に対して病気に関する重要な意識付けになると思われる。

今回の災害により、深刻な被害体験や、頻繁な余震の継続によって引き起こされる恐怖や精神的ストレスが血栓症をいかに容易に促進するかが認識された。脱水や車中泊による血液の停滞により発症が加速したと考えられる。病気の概念を啓蒙することによって VTE を完全に予防し治療することが急務であると考えられる。

V. 結論

車中泊を経験した群の方が、発災から発症までの日数が短く、肺塞栓を起こしやすく、車中泊は単に VTE を起こしやすいという点のみならず重症化しやすいことが分かった。今後の災害医療に活かす必

要がある。

VI. 研究協力者

掃本誠治・熊本大学循環器内科・准教授

橋本洋一郎・熊本市民病院・首席診療部長

中島 誠・熊本大学脳血管障害先端医療寄附講座・
特任教授

榛沢 和彦・新潟大学心臓血管外科呼吸器外科・講
師

小島 淳・熊本大学心不全先進医療共同研究講座・
特任准教授

坂本 憲治・熊本市民病院循環器内科・医長

藤末 昂一郎・熊本大学循環器内科・医員

VII. 参考文献

1) 榛沢和彦. 災害と静脈血栓塞栓症. 最新医学別冊
新しい診断と治療のABC. 最新医学社. 東京

2) Sueta D, Akahoshi R, Okamura Y, Kojima S,
Ikemoto T, Yamamoto E, et al. Venous
Thromboembolism Due to Oral Contraceptive
Intake and Spending Nights in a Vehicle-A Case
from the 2016 Kumamoto Earthquakes. *Internal
Medicine* 2017;56:409-412.

3) Sakuma M, Nakamura M, Hanzawa K,
Kobayashi T, Kuroiwa M, Nakanishi N, et al.
Acute pulmonary embolism after an earthquake
in Japan. In: *Seminars in thrombosis and
hemostasis*; 2006. Copyright© 2006 by Thieme
Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue,
New York, NY 10001, USA.; 2006. p. 856-860.
2008;129:152-154.

4) Watanabe H, Kodama M, Tanabe N,
Nakamura Y, Nagai T, Sato M, et al. Impact of
earthquakes on risk for pulmonary embolism.
International journal of cardiology
2008;129:152-154.

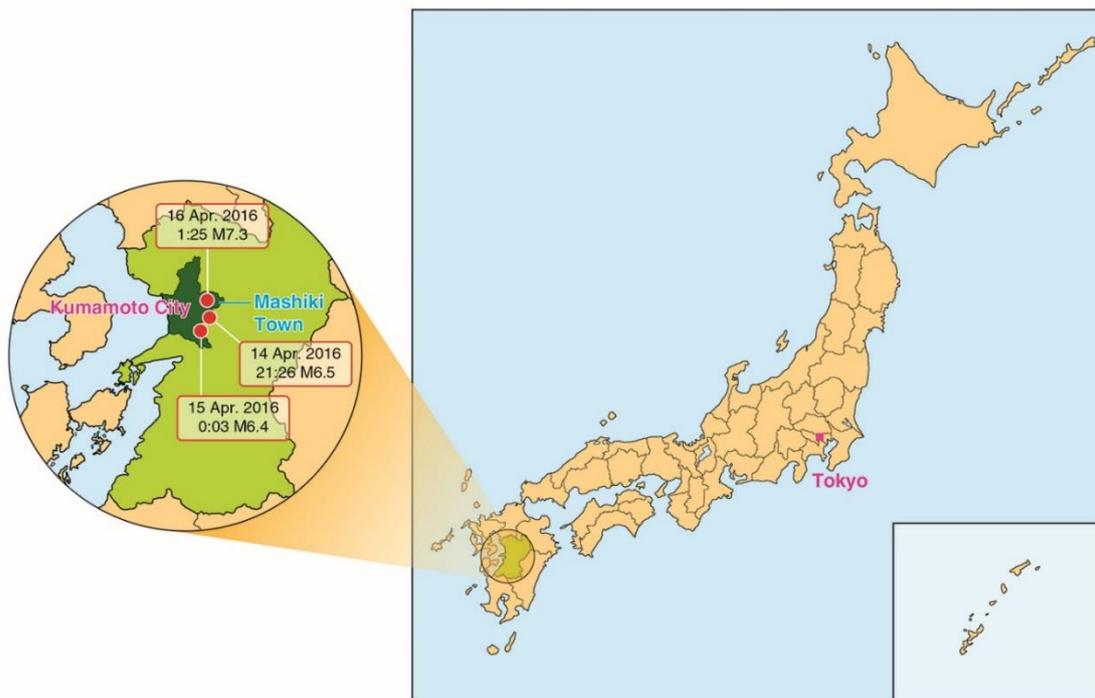


図1. 熊本の位置。赤丸は震源地を指す。時刻は現地時間。M, マグニチュード。

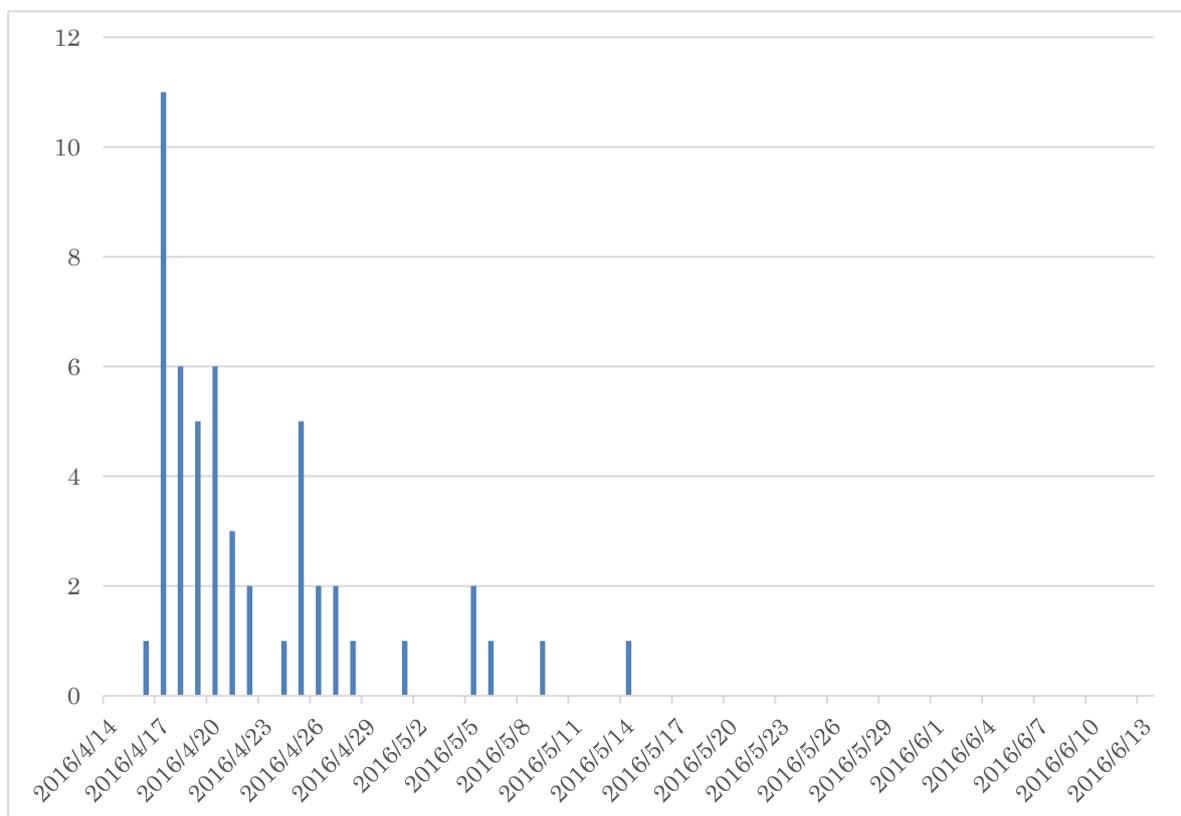


図2. 入院を要した静脈血栓塞栓症の患者数

表 1. 車中泊の有無による静脈血栓塞栓症入院患者の臨床的特徴

	総計 (51 例)	車中泊なし (9 例)	車中泊あり (42 例)	P 値
年齢	67.3±14.2	79.8±12.1	64.6±13.3	0.001
男性 (%)	13(25)	2(22)	11(26)	0.81
発災から入院までの日数 (日)	9.5±12.0	20.1±25.6	7.3±5.3	0.003
肺塞栓 (%)	38(75)	3(33)	35(83)	0.001
心不全既往	3(5.9)	2(11)	1(2)	0.24
肺疾患既往	1(2)	0(0)	1(2)	0.64
悪性腫瘍既往	7(13.7)	2(22)	5(12)	0.44
脈拍数>100 (bpm)	2(3.9)	0(0)	2(5)	0.51
収縮期血圧<100 (mmHg)	7(13.7)	1(11)	6(14)	0.81
呼吸数>30	4/49(8.2)	0(0)	4/40(10)	0.36
体温<36.0 (°C)	7/49(14.3)	1(11)	6/40(15)	0.77
D ダイマー値 (µg/mL)	14.1±13.1	21.8±23.7	12.5±9.3	0.07
抗凝固療法 (%)	35(68.7)	8(89)	27(64)	0.16
血栓溶解療法 (%)	0(0)	0(0)	0(0)	N/A
経カテーテル療法 (%)	0(0)	0(0)	0(0)	N/A
手術療法 (%)	0(0)	0(0)	0(0)	N/A
下大静脈フィルター (%)	8(15.7)	4(44)	4(10)	0.02
大動脈内バルーンポンピング療法 (%)	1(1.9)	0(0)	1(2)	0.65