

特定疾患対策研究事業

平成11年度 研究報告書

平成12年3月31日

原因不明の血栓が病因となる難治性疾患の横断的研究

班長：丸山 征郎

(鹿児島大学医学部臨床検査医学)

特定疾患対策研究事業

# 平成 11 年度 研究報告書

原因不明の血栓が病因となる難治性疾患の横断的研究

## まえがき

血液凝固系は最も基本的で、代表的な生体防御システムである。従ってこの凝固系は、その他の生体制御系ともリンクして大きなネットワークを作っている。そしてお互いに呼応しあって、時々刻々と多様に変貌する外界に対応している。凝固系がリンクするその他の生体防御システムとしては、免疫系、脂質代謝系、神経内分泌系などがある。

一方社会が複雑化、西欧化、高齢化してくると上述の生体防御系も当然それに対してシフトして来ている。これらは複雑に絡み合って本邦の疾病構造を急激に変化させつつある。

本班会議では、原因不明の血栓が疾患の難治化に関わっていると想定される疾患の中から、大腿骨頭壊死、特発性肺高血圧症、難治性腎炎、ウイルス輪動脈閉塞症、膠原病（抗カルジオリピン抗体症候群）などを選び、重層的、横断的に研究し、上記疾患に新たな治療のストラテジーを立案することを目的としてスタートした。血栓が出来れば当然当該臓器の機能不全、そして薬剤のターゲティングが出来なくなり、疾患は難治化するのである。研究の成果が上がり、上述の疾患の「難治化」に大きな風穴があくことを期待している。

平成 12 年 3 月 31 日

厚生省特定疾患対策研究事業班  
班 長 丸山 征郎

## 目 次

- 1) まえがき . . . 班長 丸山征郎
- 2) 平成 11 年度研究班構成員名簿
- 3) 平成 11 年度総括研究報告書 . . . 班長 丸山征郎
- 4) 平成 11 年度分担研究報告書 . . . 班員 丸山征郎  
. . . 班員 小池隆夫  
. . . 班員 久保俊一  
. . . 班員 小嶋哲人  
. . . 班員 北本康則  
. . . 班員 池田栄二  
. . . 班員 坂巻文雄
- 5) 平成 11 年度研究成果の刊行に関する一覧表

# 研究班構成員名簿

平成11年度 特定疾患対策研究事業 研究者名簿

研究課題名：原因不明の血栓が病因となる難治性疾患の横断的研究 (課題番号) H11-特疾-59						
区分	氏名	ふりがな	所属施設名及び職名(役職)	所属施設所在地	電話番号	FAX番号
主任	丸山 征郎	まるやま いくろう	鹿児島大学医学部臨床検査医学講座(教授) rinken@khosp2.kufm.kagoshima-u.ac.jp	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	099-275-5437	099-275-2629
分担	小池 隆夫	こいけ たかお	北海道大学医学部第二内科学講座(教授) tkoike@med.hokudai.ac.jp	〒060-0815 札幌市北区北15条西7丁目	011-716-2111	011-736-0958
分担	久保 俊一	くぼ としかず	京都府立医科大学整形外科科学講座(助教授) tkubo@koto.kpu-m.ac.jp	〒602-0841 京都市上京区 河原町広小路上の梶井町465	075-251-5549	075-251-5841
分担	小嶋 哲人	こじま てつひと	名古屋大学医学部保健学科(助教授) tkojima@med.nagoya-u.ac.jp	〒466-0065 名古屋市東区大幸南1-1-20	052-719-3153	052-719-3153
分担	北本 康則	きたもと やすのり	熊本大学医学部第三内科学講座(講師) yasunori@kaijuu.kumamoto-u.ac.jp	〒860-0811 熊本市本庄1-1-1	096-373-5164	096-366-8458
分担	池田 栄二	いけだ えいじ	慶應義塾大学医学部病理学講座(助手) eikeda@mc.med.keio.ac.jp	〒160-8582 東京都新宿区信濃町35	03-3353-1211	03-3353-3290
分担	坂巻 文雄	さかまき ふみお	国立循環器病センター心臓内科(医師) fsakamak@hsp.ncvc.go.jp	〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1	06-6833-5012	06-6872-7486

経理事務担当者

区分	氏名	ふりがな	所属施設名及び職名(役職)	所属施設所在地	電話番号	FAX番号
経理	酒匂 和子	さこう かずこ	鹿児島大学医学部臨床検査講座(秘書) hanako@med2.kurm.kagoshima-u.ac.jp	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	099-275-5437	099-275-2629

# 総括研究報告書

## 原因不明の血栓が病因となる難治性疾患の横断的研究

丸山 征郎

（鹿児島大学医学部臨床検査医学・教授）

**研究要旨**本プロジェクトでは、血栓形成と疾患の難治化の問題に、横断的かつ、重層的に取り組んだ。横断的（横糸）には凝固・線溶系、血管内皮機能、血流、などの面から、縦断的には肺高血圧、腎炎、大腿骨頭壊死、モヤモヤ病などを選び研究した。

まず大腿骨頭壊死では、MRI を用いた早期診断法の確立に成功した。またステロイド投与による本疾患のモデルの作成をウサギのに成功したが、本モデルでは血管内皮細胞の拡大とトロンボモデュリンの減少が証明された。慢性肺高血圧では肺内血管内皮細胞の障害と血液凝固系の活性化が明らかになった。これには臨床的に PGI<sub>2</sub> 製剤が有効であった。腎炎ではメサンジウム増殖型の腎炎において、尿中に活性トロンピンが証明されたことから、腎局所でのトロンピンの生成が推定された。モヤモヤ病の場合には血栓に引き続く新生血管が出血に関与すると想定されたが、その新生血管は虚血病巣での VEGF とその受容体の発現増強によるものと考えられた。

横断的な研究では、内皮細胞の抗血栓活性は糖化タンパク、酸化変性 LDL、エンドトキシンで損なわれた。エンドトキシンに対する感受性は加齢とともに増強した。

キーワード：肺高血圧、腎炎、大腿骨頭壊死、モヤモヤ病、血管内皮細胞、トロンピン、血管新生

### A. 研究目的

本プロジェクトの目的は、血栓が病因となって原疾患が難治化することの仕組みを明らかにして、その防御策を立案し、疾患の難治化を防ぐことである。疾患としては、モヤモヤ病、肺高血圧、腎炎、大腿骨頭壊死、膠原病を選び、これらに対し、血栓が関与しているか否か、血栓が関与していたらそのメカニズムはどのようなになっているのか？ 等について血管内皮細胞機能、血液凝固・線溶系、血液流動性などの諸点から検討した。

### B. 研究方法

疾患として、モヤモヤ病、肺高血圧、腎炎、大腿骨頭壊死を選んだ。これは縦軸である。これらについて内皮細胞機能、凝固・線溶系から検討した（横糸、横断的）。また膠原病が血栓によりしばしば難治化することから、膠原病で血栓形成に大きな役割を果たすと見なされている抗カルジオリピン抗体の作用機序について解析した。

### C. 研究結果

本研究班の成果は、

#### 1. 内皮細胞の機能不全と血栓形成の分子メカニズム

丸山らは、内皮細胞の機能不全により血栓に至るメカニズムについて検討を加えた。内皮細胞は周知のごとく、1) PGI<sub>2</sub>, NO, ADPase を産生、放出して、血小板機能を抑制し、2) トロンボモデュリン (TM)、Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)、ヘパリンーアンチトロンピン III で凝固を抑え、3) tissue plasminogen activator (t-PA) を産生、放出して線溶を賦活する、などで多重性に抗血栓性発揮している細胞である。しかし丸山らは糖化タンパク (AGE) や酸化変性 LDL、エンドトキシン培養内皮細胞を処理すると、NF- $\kappa$  B が活性化され、TM や t-PA がダウンレギュレートされ、TM とは正反対の機能を有するトロンピン受容体、t-PA inhibitor (PAL-1) がアップレギュレーションすることを証明した。トロンピン受容体からのシグナルは MAP



キナーゼ活性化をへて、NF- $\kappa$ B を活性化し、proinflammatory, procoagulant なベクトルの発現を増強することが判明した。またトロンピンからのシグナルはCBP/P 300にも入り、これによって核内蛋白がアセチル化されることが判明した。

## 2. 膠原病の難治化と血栓の関係について

膠原病も血栓が生じ易く、一度血栓が生じると原疾患の難治化する。そこで小池らは膠原病の難治化と血栓形成の関係について研究した。膠原病の血栓形成には抗カルジオリピン抗体が重要な役割を果たすので、小池らはこの抗体の本態を研究した。結果、本抗体は活性化細胞膜に結合して立体構造の変化した $\beta$ 2 GPI-1を認識すること、その結果としてリン脂質とも反応するものと考えられた。このプロセスは内皮細胞の機能を傷害して、血栓傾向につながるものと想定される。

## 3. 血栓形成と大腿骨頭壊死

大腿骨頭壊死はしばしばステロイド投与に伴って発症し、近年移植や免疫抑制剤の多用で増加しつつある疾患である。久保らはMRIを用いたその早期診断法を確立した。また本症の発症メカニズムを解明する目的で、家兎(n=5)にメチルプレドニゾロン(4mg/kg/週を4週間)投与して、大腿骨の組織増を解析した。メチルプレドニゾロン投与群では、正常コントロール群(n=5)に比して、sinusoidの拡張と、その血管内皮細胞におけるトロンボモデュリンの減少を証明した。

## 4. 血流維持機構障害と特発性血栓

小嶋らはエンドトキシン(LPS)の活性を調べた。LPS投与マウスではPAI-1, 組織因子などの発現が強まったが、これは加齢とともに増強し、LPS感受性が加齢で増強する事が明らかになった。

## 5. 腎疾患の進展におけるトロンピンの関与

北本らは腎炎の進展とトロンピンの関係を研究した。先ず北本らはトロンピンの微量測定系を確立して、各種腎炎患者の尿中の微量トロンピンを測定した。正常者では尿中にはトロンピンは検出されなかったが、メサンジウム増殖性腎炎では検出されたことから、メサンジウムの増殖と腎内トロンピン生成の間に何らかの関連がうかがわれた。この腎内凝固亢進にはサイトカインの関与が考えられた。尿中のトロンピンはワーフ

ァリンの投与で減少したことから、これらの抗凝固療法の可能性が示唆された。

## 6. 慢性肺高血圧の発症機構と肺内微小血栓形成

坂巻らは原発性肺高血圧を始めとする慢性高血圧の発症機構とその病態を明らかにする目的で、可溶性P-selectin, von Willebrand 因子(vWF)、可溶性トロンボモデュリンなどを測定して、肺内での凝固の活性化、肺内血管内皮細胞の活性化などについて検討した。結果、原発性肺高血圧では可溶性トロンボモデュリンの低下や、vWF抗原の上昇が認められ、肺内での内皮細胞性凝固制御機序が想定された。PGI<sub>2</sub>製剤投与は検査上でも、臨床的にも有効であった。

## 7. モヤモヤ病における血管新生の分子機構

モヤモヤ病は、血栓と出血を併発する難治性疾患である。本症における血管新生(それに引き続く出血)の機構を明らかにする目的で、池田らはウズラ-ニワトリ間異種移植系を用いて、血管新生→脳血管関門(BBB)形成について検討した。脳に移植した脳以外の組織ではBBBが形成され、それにはVEGFの関与が考えられた。虚血病巣ではVEGFもその受容体も発現が増強したことから、これがモヤモヤ病における血管新生に関係するものと考えられた。

## 8. 全体の総括

今回は2年目である。1年目に引き続き、確実な実績をあげることが出来た。大腿骨頭壊死、肺高血圧、腎炎の発症と病態に凝固の活性化が深く関与すること、が明らかになり、それらに対して治療法の展望が開けたことは大きな収穫であった。モヤモヤ病における血栓や出血の病態が血管新生、脳血管関門という全く新たな視点から展開可能である、ということが判明した。また抗カルジオリピン抗体症候群での内皮機能障害の分子メカニズムに抗 $\beta$ 2 GPI 抗体が関係しているが、その分子機構はまだ不明である。

しかしこれらの内皮細胞の障害にTMが有効なこと、その機序はTMの抗酸化作用であるという全く新規のことが明らかになってきた。

## D. 考察

内皮細胞は通常は抗血栓活性を発揮し、円滑な血液の循環に大きな役割を果たしている。その中でも特に血液の流れに対して抵抗の大きな部位；微小循環系ではトロンボモデュリン-プロテインCが大きな役割を

果たす。IL-1, TNF- $\alpha$ 、生体内修飾物質；酸化変性 LDL, 糖化タンパク (AGE) が対外異物の代表であるエンドトキシン (LPS) と同様内皮細胞の抗血栓活性を低下されることが判明した。うち LPS に対する感受性は加齢とともに増強することが判明した。はたして同じことが IL-1, TNF- $\alpha$ 、酸化変性 LDL, 糖化タンパク (AGE) で起こるか否かが注目される場所である。いずれにしろ、これらは一部 TM の発現を抑制することに因るが、今回 rTM が凝固の是正のみでなく、細胞保護作用をも有することが明かになったことは、上記疾患に rTM が有効であることをしきしきするものと考えられる。

再生新生血管と内皮機能の関係が判明すれば、これはモヤモヤ病における血栓や出血の病態の一端が判明するものと考えられる。今回は虚血巣では VEGF とその受容体の発現が増強されることが明らかになった。このことはモヤモヤ病における血管新生にメカニズムに大きなヒントを与えるものと考えられる。また体内、外物質による内皮機能の障害は、基礎疾患のある患者を「向血栓性」にする重要な全身性ファクターになるものと考えられる。今回メサンジウム増殖型腎炎に腎局所での凝固の活性化が示唆されたが、この場合にも腎局所での炎症性サイトカインが一定の役割を果たしている可能性が考えられた。また肺高血圧でも内皮細胞の障害と凝固系の活性化が示唆されたが、この場合、内皮細胞の障害の結果凝固系の活性化が起きている可能性がある。上記腎炎にワーファリンが、肺高血圧に PGI<sub>2</sub> が有効なことが明らかになったことの臨床的意義は大きいものと考えられる。

今回ステロイド投与による実験的大腿骨頭壊死の動物モデルの作成に成功し、このモデルウサギでは大腿骨頭の微小循環系のジヌソイドの拡張とトロンボモデュリンの減少が証明された。今後このメカニズムの解明が重要であるが、大腿骨頭壊死の防止や治療に大きな進歩となるものと思われる。

#### E. 結論

大腿骨頭壊死や慢性肺高血圧では内皮細胞機能障害が根底にあるものと考えられた。これらには抗凝固剤、あるいは PGI<sub>2</sub> 製剤が有効であった。モヤモヤ病では過剰 VEGF とその受容体発現に伴う新生血管が出血に関係しているものと想定された。血管内皮細胞の抗血栓活性機能は糖化タンパク、酸化変性 LDL など生体内修飾物質、炎症性サイトカイン (IL-1, TNF- $\alpha$ ) など、エンドトキシンなどでダウンレギュレーションされた。

これは全体的に基礎疾患のある患者においては血栓の大きな原因の一つになるものと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sawada, K., Koizumi, K., Tarumi, T., Takano, H., Ieko, M., Nishio, M., Fukada, Y., Yasukouchi, T., Yamaguchi, M., **Koike, T.** Role of physiologic concentrations of stem cell factor in leukemic type growth of myelodysplastic CD34<sup>+</sup> cells. *Leukemia Reserach.* 23:1-11, 1999

2) Ieko, M., Ichikawa, K., Triplett, D.A., Matsuura, E., Atsumi, T., Sawada, K., **Koike, T.**  $\beta_2$ -Glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis & Rheum.* 42(1):167-174, 1999

3) Nishio, H., Suda, T., Sawada, K., Miyamoto, T., **Koike, T.**, Yamaguchi, Y. Molecular Cloning of cDNA encoding human Rab3D whose expression is upregulated with myeloid differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 144:283-290, 1999

4) Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Matsuura, E., **Koike, T.** 1-3). Antiphospholipid syndrome. *Int. Med.* 38(2):170-173, 1999

5) Nojima, J., Suehisa, E., Kuratsune, H., Machii, T., **Koike, T.**, Kitani, T., Kanakura, Y., Amino, N. Platelet activation induced by combined effects of anticardiolipin and lupus anticoagulant IgG Antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost.* 81:436-441, 1999

6) Tsuchida, K., Makita, Z., Yamagishi, S., Atsumi, T., Miyoshi, H., Obara, S., Ishida, M., Ishikawa, S., Yasumura, K., **Koike, T.** Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end

- product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia*. 42:579-588,1999
- 7) Tarumi, T., Sawada, K., Koizumi, K., Takano, H., Fukuda, Y., Nishio, M., Fujie, T., Ohnishi, K., Kohno, M., Sato, N., Sekiguchi, S., **Koike, T.** A pilot study of a response oriented chemotherapeutic regimen combined with autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in aggressive non-hodgkin's lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*. 34:361-371,1999
- 8) Shimizu, C., Kubo, M., Kijima, H., Uematsu, R., Sawamura, Y., Ishizu, A., **Koike, T.** A rare case of acromegaly associated with pachydermoperiostosis. *J. Endocrinol.* 22:386-389,1999
- 9) Takeuchi, M., Makita, Z., Yanagisawa, K., Kameda, Y., **Koike, T.** Detection of noncarboxymethyllysine and carboxymethyllysine advanced glycation end products (AGE) in serum of diabetic patients. *Molecular Medicine*. 5:393-405,1999
- 10) Krause, I., Blank, M., Levi, Y., **Koike, T.**, Shoenfeld, Y. Anti-idiotype immunomodulation of experimental anti-phospholipid syndrome via effect on Th1/Th2 expression. *Clin Exp Immunol*. 117:190-197,1999
- 11) Atsumi, T., Tsutsumi, A., Amengual, O., Khamashita, M.A., Hughes, G.R.V., Miyoshi, Y., Ichikawa, K., **Koike, T.** Correlation between  $\beta$ 2-glycoprotein I valine/leucine<sup>247</sup> polymorphism and anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome. *British Society for rheumatol.* 38:721-723,1999
- 12) Tsutsumi, A., Horita, T., Atsumi, T., Ichikawa, K., Tashiro, K., **Koike, T.** Reflex Sympathetic dystrophy in a patient with the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 8:471-473,1999
- 13) Haseyama, Y., Sawada, K., Oda, A., Koizumi, K., Takano, H., Tarumi, T., Nishio, M., Handa, M., Ikeda, Y., **Koike, T.** Phosphatidylinositol 3-Kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells apoptosis. *Blood*. 94(5):1568-1577,1999
- 14) Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Atsumi, T., Matsuura, E., Kobayashi, S., Hughes, G.R.V., Khamashta, M.A., **Koike, T.** A chimeric antibody with the human  $\gamma$  1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG  $\beta$ 2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis & Rheumatism*. 42:2461-2470, 1999.
- 15) Shoenfeld, Y., Segovia, D.A., Buskila, D., Shakra, M.A., Lorber, M., Sherer, Y., Meroni, P.L., Valesini, G., **Koike, T.**, Riquelme, E.A. Frontiers of SLE: Review of 5<sup>th</sup> international congress of systemic Lupus Erythematosus, Cancun, Mexico, April 20-25, 1998. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 29:112-130,1999.
- 16) Katsumata, K., Ikeda, H., Sato, M., Ishizu, A., Kawarada, Y., Kato, H., Wakisaka, A., **Koike, T.**, Toshiki, T. Cytokine Regulation of env Gene Expression of Human Endogenous Retrovirus-R in Human Vascular Endothelial Cells. *Clin. Immunol*. 93(1):75-80,1999.
- 17) Koizumi, K., Sawada, K., Sato, N., Yamaguchi, M., Nishio, M., Tarumi, T., Takano, H., Fukada, Y., Ieko, M., Yasukouchi, T., Sekiguchi, S and **Koike, T.** Large scale purification of human blood CD34<sup>+</sup> cells using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. *Cytotherapy*. 4:319-327,1999
- 18) Wilson, W.A., Gharave, A., **Koike, T.**, Lockshin, M. D., Branch, D.W., Piette, J-C., Brey, R., Derksen, R.,

Harris,E.N.,Hughes,G.R.V.,Triplett,D.A.,Khamashta,  
M.A. International consensus statement on  
preliminary classification criteria for definite  
antiphospholipid syndrome. *Arthritis &  
Rheumatism*. 42(7):1309-1311,1999

19) Tsutsumi,A.,**Koike,T.** Hepatic Manifestations  
of the Antiphospholipid Syndrome. *Internal  
Medicine*. 39(1):6-7,2000

20)Blank,M.,Waisman,A.,Edna,M.,**Koike,T.**,  
Shoenfeld,Y. Characteristics and pathogenic role of  
anti- $\beta$ 2-glycoprotein I single-chain Fv domains:  
induction of experimental antiphospholipid syndrome.  
*The Japanese Society for Immunology*.  
11(12):1917-1926,1999

21)Hashimoto,H.,Sawada,K.,Koizumi,K.,Nishio,M.,  
Endo,T.,Takashima,T., Kobayashi,H.,**Koike,T.**  
Effective CD34<sup>+</sup> -selected autologous peripheral blood  
stem cell transplantation in a patient with subcutaneous  
panniculitic T cell lymphoma (SPTCL) transformed  
into leukemia. *Bone Marrow Transplantation*.  
24:1369-1371,1999

22)Ieko,M.,Sawada,K.,**Koike,T.**,Notoya,A.,Mukai,  
M.,Kohno,M.,Wada,N.,Itoh,T., Yoshioka,N. The  
Putative Mechanism of Thrombosis in  
Antiphospholipid Syndrome: Impairment of the Protein  
C and the Fibrinolytic Systems by Monoclonal  
Anticardiolipin Antibodies. *Seminars in  
thrombosis and hemostasis*. 25(5):503-  
507,1999

23)Yamada,H.,Tsutsumi,A.,Ichikawa,K.,Kato,E,H.,**Koike,T.**,Fujimoto,S. IgA-class anti- $\beta$ <sub>2</sub>-  
glycoprotein I in women with unexplained recurrent  
spontaneous abortion. *Arthritis &  
Rheumatism*. 42(12):2727-2728,1999

24) 久保俊二、上島圭一郎：特発性大腿骨頭壊死症  
の治療。リウマチ病セミナーX. 133-142、永井書店、  
大阪、1999.12.18

25) 久保俊一：外傷性骨壊死症。整形外科最新の治  
療(平澤泰介、高岡邦夫、星野雄一編集) 115-114、南  
江堂、東京、1999.4.25

26) 久保俊一：特発性骨壊死症。整形外科最新の治  
療(平澤泰介、高岡邦夫、星野雄一編集) 112-114、南  
江堂、東京、1999.4.25

27) 久保俊一：特発性大腿骨頭壊死症。今日の整形  
外科治療指針(第4版) 668-672、医学書院、東京、  
2000.1.15

28)Mizuno,H.,Emi,H.,Abe,A.,Takahashi,I.,**Kojima,T.**,  
Saito,H.,Sumi,Y.,Hata,K., Ueda,M. Successful  
Culture and Sustainability in Vivo of Gene-Modified  
Human Oral Mucosal Epithelium. *Human Gene  
Therapy*. 10:825-830,1999

29)Ishiguro,K.,**Kojima,T.**,Taguchi,O.,Saito,H.,Mura  
matsu,T.,Kadomatsu,K. Syndecan-4 expression is  
associated with follicular atresia in mouse ovary.  
*Histochem Cell Biol*. 112:25-33,1999

30)Yamamoto,K.,Shimokawa,T.,**Kojima,T.**,Joskutoff,  
D.J.,Saito,H. Regulation of Murine Protein C Gene  
Expression In Vivo: Effects of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ,  
Interleukin-1,and Transforming Growth Factor- $\beta$ .  
*Thromb Haemost* .  
82:1297-1301,1999

31)Kunishima,S.,**Kojima,T.**,Tanaka,T.,Kamiya,T.,Oz  
awa,K.,Nakamura,Y.,Saito,H. Mapping of a gene for  
May-Hegglin anomaly to chromosome 22q.  
*Hum Genet*. 105:379-383,1999

32)Katsumi,A.,Matsushita,T.,Yamazaki,T.,Sugiura,I.,

- Kojima, T.**, Saito, H. Severe Factor VII Deficiency Caused by a Novel Mutation His348 to Gln in the Catalytic Domain. *Thromb Haemost.* 83:239-243, 2000
- 33) Ishiguro, K., Kadomatsu, K., **Kojima, T.**, Muramatsu, H., Tsuzuki, S., Nakamura, E., Kusagami, K., Saito, H., Muramatsu, T. Syndecan-4 Deficiency Impairs Focal Adhesion Formation Only under Restricted Conditions. *The Journal of Biological Chemistry.* 275(8):5249-5252, 2000
- 34) 北本康則、徳永 寛、富田公夫. 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) による糸球体の形成. 腎と透析. 2000年: 48 (2) 219-225.
- 35) Hosoda, Y., **Ikeda, E.** Pathology of spontaneous occlusion of the circle of Willis (cerebrovascular Moyamoya disease). *Neuropathology.* 19:137-138, 1999
- 36) **Sakamaki, F.**, Hoffmann, H., Munzing, S., Krombach, F., Messmer, K., Schildberg, F.W. Effects of lung preservation solutions on PMN activation in vitro. *Transpl Int.* 12:113-121, 1999
- 37) Nagaya, N., Uematsu, M., Satoh, T., Kyotani, S., **Sakamaki, F.**, Nakanishi, N., Yamagishi, M., Kunieda, T., Miyatake, K. Serum uric acid levels correlate the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 160(2):487-492, 1999
- 38) **Sakamaki, F.**, Satoh, T., Nagaya, N., Kyotani, S., Nakanishi, N., Ishida, Y. Abnormality of Left Ventricular Sympathetic Nervous Function Assessed by <sup>123</sup>I-Metaiodobenzylguanidine Imaging in Patients With COPD\*. *CHEST.* 116:1575-1581, 1999
- 39) Nagaya, N., Uematsu, M., Okano, Y., Satoh, T., Kyotani, S., **Sakamaki, F.**, Nakanishi, N., Miyatake, K., Kunieda, T. Effect of Orally Active Prostacyclin Analogue on Survival of Outpatients With Primary Pulmonary Hypertension. *The American College Cardiology.* 34(4):1188-1192, 1999
- 40) 坂巻文雄、中西宣文: 原発性および二次性肺高血圧と肺血管内皮細胞機能. 血管と内皮. 9(5): 508-513, 1999
- 41) Nagaya, N., Satoh, T., Nishikimi, T., Uematsu, M., Furuichi, S., **Sakamaki, F.**, Oya, H., Kyotani, S., Nakanishi, N., Goto, Y., Masuda, Y., Miyatake, K., Kangawa, K. Hemodynamic, Renal, and Hormonal Effects of Adrenomedullin Infusion in Patients With Congestive Heart Failure. *Circulation.* 101(5):498-503, 2000
- 42) Nakata, M., Yata, J., Soejima, N., **Maruyama, I.** Leptin potentiates platelet function via leptin receptor. *Diabetes.* 48:426-429, 1999
- 43) Kishida, A., Nakashima, M., Sakamoto, N., Serizawa, T., **Maruyama, I.**, Akashi, M. Study on Complex Formation Between Recombinant Human Thrombomodulin Fragment and Thrombin Using Surface Plasmon Resonance. *American Journal of Hematology* 63:136-140, 2000
- 44) Sarker, P.K., Abeyama, K., Nishi, J., Nakata, M., Tokioka, T., Nakajima, T., Kitajima, I., **Maruyama, I.** Inhibition of Thrombin-induced Neuronal Cell Death by Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin Receptor Signaling Inhibitor. *Thromb Haemost* 82:1071-7, 1999
- 45) Nakata, M., Uto, N., **Maruyama, I.**, Yada, T. Nitric Oxide Induces Apoptosis via Ca<sup>2+</sup>-Dependent Processes in the Pancreatic b-cell Line MIN6. *Cell STRUCTURE*

2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# 分担研究報告書

## 内皮細胞の機能不全と血栓形成の分子機構

丸山 征郎

（鹿児島大学医学部臨床検査医学・教授）

### 研究要旨

血管内皮細胞は抗血栓性を有しており、これが血管内での凝血を制御して、円滑な血液の循環に役立っている。しかしこの血管内皮細胞は血液とのインターフェースとして存在するため、血液からの種々のストレス下であり、そのうちのひとつが酸化ストレス、あるいはラディカル刺激であり、これらにより内皮細胞は機能的、あるいは器質的障害に陥り、場合によっては血栓の原因となる。内皮細胞上には抗血栓分子トロンボモデュリン（TM）が存在し、トロンピンを凝固酵素から抗凝固酵素へと変換しているが、今回の研究で我々はTMが抗酸化作用を有していることを見出した。遺伝子組換え型のTM（rTM）は、銅によるLDLの酸化を抑制し、またフォルボールエステル刺激内皮細胞の細胞障害性をレスキューした。

キーワード：トロンボモデュリン、トロンピン、酸化ストレス、血管内皮細胞、血栓症

### A. 研究目的

血管内皮細胞は抗血栓活性を有した細胞である。この活性発現にはトロンボモデュリン（TM）が大きく関与している。すなわちTMはトロンピンの凝固活性を消失せしめ、逆にトロンピンによるプロテインCの活性化を著しく増強する。従ってTMはトロンピンを凝固酵素から抗凝固酵素へと変換する膜蛋白である。

今回の研究はこのTMの上記以外の機能を明らかにすることである。

### B. 研究方法

- 1) TMは遺伝子組換え型rTMを用いた。
- 2) ヒト血管内皮細胞（HUVEC）はヒト臍帯静脈より分離培養した。これをフォルボールエステル（PMA）で刺激して、その細胞毒性をDNAを測定することで調べた。また細胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生量をフルオロスキャンで調べた。
- 3) 硫酸銅によるLDLの酸化に対するrTMの抑制作用を、TBARS法と酸化LDL認識抗体（帝京大板部博士より供与）を用いて調べた。

### C. 研究結果

- 1) rTMはHUVECをPMAで刺激した時のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産

生を濃度依存性に抑制した（rTMの0.2μMで20%、0.5μMで29%、1μMで40%の抑制）。

- 2) HUVECをPMAで刺激した時の細胞障害は1μMのrTMで53%抑制された。

- 3) 上記濃度のTMで、硫酸銅によるLDLの酸化もTBARS法でも酸化LDL抗体を用いたELISA法でも濃度依存性に抑制された。

### D. 考察

rTMは抗酸化作用を有することが明らかになった。rTMの生物活性は天然のそれと全く同じであるので、内皮細胞表面のTMも抗酸化作用を持っているものと考えられる。TMの主たる局在が“ウォーターフロント”の血管内皮細胞であり、ここでこの細胞は種々の酸化ストレスを受けることを考えると、TMが抗酸化作用、細胞保護作用をもつことは生理的にも意義があることと考えられる。レプチン濃度が上昇していることが知られているが、今回肥満者の血中でありうる濃度の100 mg/mlで血小板機能がポテンシエートされることが判明したことから、肥満に伴う「動脈血栓」の発症には高レプチン血症が大きな役割を果たしているものと考えられる。



## E. 結論

TM に抗酸化作用、細胞保護作用があることが判明した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Nakata, M., Yata, J. Soejima, N. **Maruyama, I.**  
Leptin potentiates platelet function via leptin receptor.  
*Diabetes.* 48:426-429,1999

2) Kishida, A., Nakashima, M., Sakamoto, N., Serizawa, T., **Maruyama, I.**, Akashi, M. Study on Complex Formation Between Recombinant Human Thrombomodulin Fragment and Thrombin Using Surface Plasmon Resonance. *American Journal of Hematology* 63:136-140,2000

3) Sarker, P.K., Abeyama, K., Nishi, J., Nakata, M., Tokio ka, T., Nakajima, T., Kitajima, I., **Maruyama, I.**  
Inhibition of Thrombin-induced Neuronal Cell Death by Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin Receptor Signaling Inhibitor.  
*Thromb Haemost* 82:1071-7,1999

4) Nakata, M., Uto, N., **Maruyama, I.**, Yada, T. Nitric Oxide Induces Apoptosis via Ca<sup>+2</sup>-Dependent Processes in the Pancreatic b-cell Line MIN6. *Cell STRUCTURE AND FUNCTION* 24:451-455,1999

## G. 知的所有権の取得状況

特になし

## 先天性 $\beta$ 2-グリコプロテイン I 欠損症の意義

小池 隆夫  
(北海道大学医学部第二内科・教授)

渥美 達也、保田 晋助、竹内 理恵(1)、家子 正裕(2)、市川 健司、堤 明人(1)  
(北海道大学医学部第二内科 (1)・北海道医療大学 (2))

本研究は先天性 $\beta$  2GPI 欠損症 1 家系（同胞）の遺伝子異常およびその北海道地方における頻度を検討し、 $\beta$  2GPI 欠損の意義について考察した。【方法】先天性 $\beta$  2GPI 欠損者のゲノム解析によりその遺伝子異常を解析した( $\beta$  2GPI-Sapporo)。北海道在住の健常人 222 人の血清 $\beta$  2GPI 濃度と $\beta$  2GPI-Sapporo の頻度をしらべ、その意義を考察した。また $\beta$  2GPI-Sapporo の homozygote 姉弟の凝固・線溶活性を評価した。【結果】 $\beta$  2GPI 欠損者では $\beta$  2GPI 遺伝子のエクソン 4、379 位の thymine が欠落しており、その下流でフレームシフトがおこってエクソン 6 のはじめに停止コドンが出現していた。健常人の 6.3% に $\beta$  2GPI-Sapporo が認められ、頻度の高い遺伝子異常であることが示された。homozygote の $\beta$  2GPI 欠損者に血栓症、出血傾向の既往はなく、生体内トロンビン生成亢進、線溶活性亢進を示す所見は得られなかった。【結論】先天性 $\beta$  2GPI 欠損の原因となる遺伝子異常を同定した。しかし $\beta$  2GPI の完全欠損であっても過凝固や線溶異常はみられず、in vitro での $\beta$  2GPI の凝固・線溶系におよぼす機能の生体内での意義は確認されなかった。

キーワード：血栓症、抗リン脂質抗体症候群、トロンビン、プラスミン

### A. 研究目的

抗リン脂質抗体はリン脂質あるいはリン脂質結合蛋白に結合する一連の自己抗体の総称である。これらの抗体の存在は血栓傾向とつよい相関がみられ、動・静脈血栓症、胎盤血栓症が原因と考えられる流・死産などの臨床症状を伴う場合、抗リン脂質抗体症候群 (APS) として扱われている。APS は現在最も頻度の高い後天性血栓傾向のひとつとして重要視されている。

リン脂質結合蛋白のひとつ、 $\beta$  2-グリコプロテイン I ( $\beta$  2GPI) は血栓症と関連した抗リン脂質抗体のもっとも主要な対応抗原である [1]。 $\beta$  2GPI がリン脂質と結合すると抗カルジオリピン抗体（または抗 $\beta$  2GPI 抗体）の対応エピトープが分子表面に露出し、抗原-抗体反応がおこる [2]。 $\beta$  2GPI はもともと DNA やリポタンパクなど種々の負電荷物質と結合する性質をもっていることが知られていた。約 40% がリポタンパクと結合して存在していることから、他のアポリポタン

パクとは構造上まったく異なっているにもかかわらずアポリポタンパク H とよばれることもある。とくに興味深いことは、 $\beta$  2GPI は陰性リン脂質と強く結合し、リン脂質依存性の凝固反応を抑制的に制御していることである。in vitro での凝固反応における $\beta$  2GPI の作用については多くの検討がなされている。 $\beta$  2GPI は第 XII 因子の活性化、第 X 因子の活性化を抑制、したがって内因系凝固/線溶反応を抑制する。プロトロンビナーゼの抑制、またプロテイン C の活性化や活性化プロテイン C (APC) の第 Va 因子不活化抑制をも陰性制御する。したがって $\beta$  2GPI はプロコアグラントとアンチコアグラントの両者の制御機能をはばひろくもっていることがわかる [3]。このことより APS の発症機序は抗 $\beta$  2GPI 抗体による $\beta$  2GPI の機能不全と考えてよいかどうかとの疑問が生じる。APS 患者における血漿 $\beta$  2GPI 濃度の測定についていくつか報告があるが、予想に反して APS 患者では血漿 $\beta$  2GPI 濃度は正常かむしろ

る上昇していた。

今回、先天性 $\beta$  2GPI欠損症の1家系を見出した。homozygoteの姉弟の血清 $\beta$  2GPI濃度は検出感度以下であった。本研究では先天性 $\beta$  2GPI欠損症の原因となる遺伝子異常を同定し( $\beta$  2GPI-Sapporo)、この遺伝子異常の頻度と血清 $\beta$  2GPIレベルとの関連を検討した。またAPSの発症機序を考察するためにhomozygote $\beta$  2GPI-Sapporoである姉弟の血漿を解析し、 $\beta$  2GPI欠損が血栓のリスクとなるかどうかを詳細に検討した。

## B. 研究方法

先天性 $\beta$  2GPI欠損者のゲノムDNAから $\beta$  2GPIの各エクソンをPCRで増幅し[4]、各PCR産物をクローニングベクターへ挿入後、標準的な方法でエクソンの塩基配列を決定し、遺伝子異常( $\beta$  2GPI-Sapporo)を同定した。

同定された遺伝子異常を簡便に検出できるPCR-RFLP法を樹立し、北海道在住の健常人222において $\beta$  2GPI-Sapporoの頻度を検討した。またこの222人を含む健常人812人の血清 $\beta$  2GPI濃度をサンドイッチELISA(エピトープの異なる二種類のモノクローナル抗 $\beta$  2GPI抗体による)で測定した。白人健常人131人についても $\beta$  2GPI-Sapporoの頻度をしらべた。

先天性 $\beta$  2GPI欠損症姉弟から0.105Mクエン酸加静脈採血を施行し、0.22 $\mu$ mフィルターを通して血小板フリー血漿を調整し、凍結保存した。生体内トロンビン生成/線溶活性化のマーカーとして、血漿プロトロンビンフラグメント1+2(F1+2)、トロンビン-アンチトロンビン複合体(TAT)、プラスミノゲン-プラスミンインヒビター複合体(PIC)、D-ダイマーを測定した。プロテインC系の評価として、 $\beta$  2GPI欠損血漿に活性化プロテインCを加えたときの凝固時間の変化を記録し、活性化プロテインCに対する反応性を評価した。内因系線溶能は、カオリンの存在下でユーグロブリン分画を調整し、プラスミノゲン添加フィブリンプレートの溶解面積により算定した。血小板のADP凝集におよぼす影響を検討した。

## C. 研究結果

先天性 $\beta$  2GPI欠損者では $\beta$  2GPIエクソン4のthymine(cDNAで379位に相当)の欠落が示された。それによりフレームシフト変異がおこり、エクソン6に停止コドンが出現していた。この異常を $\beta$  2GPI-Sapporoとした。

$\beta$  2GPI-Sapporoの検出のため、 $\beta$  2GPI遺伝子のエクソン4をPCRで増幅し、制限酵素ApaL-1で処理後、

9%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動してバンドのパターンにより $\beta$  2GPI-Sapporoの存在を確認した。すなわち正常の $\beta$  2GPIの場合109bpと99bpの二本のバンド、 $\beta$  2GPI-Sapporoのhomozygoteの場合208bpの一本のバンド、heterozygoteの場合はそれらのすべてのバンドが観察される(PCR-RFLP)。

222人の健常人の $\beta$  2GPI-Sapporoの頻度は6.3%(14/222)で、そのうち1人はhomozygote、13人がheterozygoteであった。この222人を含む812人の健常人から測定した血清 $\beta$  2GPI濃度は $243 \pm 99$   $\mu$ g/mlであったが、この13人のheterozygoteでは $86 \pm 31$   $\mu$ g/mlと低下していた。homozygoteでは測定感度(5 $\mu$ g/ml)以下であった。なお、 $\beta$  2GPIの濃度は血漿中と血清中では差はなかった。なお、白人では $\beta$  2GPI-Sapporoは認められなかった。

homozygote $\beta$  2GPI-Sapporo姉弟について、凝固線溶系の検討をおこなった。この姉弟血漿には、上述したサンドイッチELISAのほかにポリクローナル抗体を用いたオクタロニー法、ウエスタンプロット法でも $\beta$  2GPIは検出されなかった。

先天性 $\beta$  2GPI欠損症姉弟いずれも血栓・出血の既往はなかった。生体内トロンビン生成/線溶活性化のマーカーはすべて正常範囲内であった。活性化プロテインC添加により延長するaPTTは、正常血漿と $\beta$  2GPI欠損血漿との間で差がなかった。内因系線溶能(カオリンの存在下および非存在下で調整したユーグロブリン分画のフィブリンプレート溶解面積の差)も正常範囲内であった。血小板のADP凝集は $\beta$  2GPI欠損血漿の存在下と正常血漿の存在下で差がなかった。

## D. 考察

本研究では日本人で先天性 $\beta$  2GPI欠損の原因となる遺伝子異常、 $\beta$  2GPI-Sapporoを同定した。この遺伝子異常の頻度は健常人でも6.3%と高く、heterozygoteで血清 $\beta$  2GPIは正常人の約1/3、homozygoteでは検出できなかった。さらに $\beta$  2GPI-Sapporo変異によるmutated $\beta$  2GPIはポリクローナル抗体を使用した方法でも検出できなかったため、血漿中には存在しないものと考えられる。白人でも先天性 $\beta$  2GPI欠損症は報告されているが[5]、白人の健常人には同じ遺伝子異常は確認できず、白人と日本人で $\beta$  2GPI欠損の原因遺伝子異常は異なっていると考えられる。

$\beta$  2GPI自体は古くから知られていたが、注目をあびるようになったのは抗リン脂質抗体症候群にみられる抗カルジオリピン抗体の対応エピトープが $\beta$  2GPI上に

存在することがわかってからである。極めて多くの $\beta$  2GPIの生理活性についての検討がおこなわれ、とりわけ *in vitro* の凝固・線溶反応に関しては様々な報告があり、凝固・線溶に関しては $\beta$  2GPIの作用は多様であると考えられた [6]。しかし、*in vivo* でそれらの反応が有意義かどうかはこれまで明らかでなかった。生体内では $\beta$  2GPIとリン脂質との親和性は低く、 $\beta$  2GPIの実際の生理活性はその *in vitro* 活性とは解離があるはずだとも報告された [7]。一方、心筋梗塞等の血栓症の急性期ではアンチトロンビン III やプロテインCなどの他の抗凝固因子と平行して血漿 $\beta$  2GPI濃度は消費により低下しており、*in vivo* でも凝固反応制御をおこなっている可能性も推定された [8]。

本研究では $\beta$  2GPI-Sapporoが少なくとも日本人の先天性 $\beta$  2GPI欠損のメジャーな責任遺伝子異常であることをあきらかにした。しかしながら、 $\beta$  2GPI-Sapporoのhomozygoteにおいても凝固・線溶系のマーカーはおおむね正常であり、トロンビン過剰生成や線溶系活性化については少なくとも平常時には存在しないと考えられる。最近 $\beta$  2GPIノックアウトマウスが作成されたが、マウスは正常に発育し、血栓症や出血はおこさなかったと報告されている。

以上より、 $\beta$  2GPI欠損のみでは必ずしも凝固・線溶異常の原因とはならないことが確認された。これまで報告されてきた *in vitro* の $\beta$  2GPI活性は生体内では重要な役割をもっていないか、あるいは別の代償機構が $\beta$  2GPI欠損を補っている両者の可能性が考えられた。ただし、他の血栓症の危険因子が存在する場合、 $\beta$  2GPI欠損がそれを増長する可能性があり、今後さらに検討をすすめる必要がある。

#### E. 結論

先天性 $\beta$  2GPI欠損症の原因となる遺伝子異常、 $\beta$  2GPI-Sapporoを同定した。

$\beta$  2GPI-Sapporoは日本人健常人の6.3%と高頻度に見られた。しかし先天性 $\beta$  2GPI欠損症には血栓傾向、出血傾向は認めなかった。以上よりAPSの血栓形成機序は、抗カルジオリピン抗体(抗 $\beta$  2GPI抗体)による $\beta$  2GPIの二次的欠損が原因であると単純に考えることができないことが示唆された。

(参考文献)

1. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize  $\beta$  2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994;179:457-62.

2. Koike T, Matsuura E. Immunology of antiphospholipid antibodies. in "Systemic Lupus Erythematosus". ed R. Lahita, Academic Press, 1999:813-27.

3. Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K et al. Beta2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum* 1999;42:167-74.

4. Steinkasserer A, Estaller C, Weiss EH, Sim RB, Day AJ: Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I. *Biochem J* 277:387-91, 1991

5. Bancsi LF, van der Linden IK, Bertina RM:  $\beta$  2-glycoprotein I deficiency and the risk of thrombosis. *Thromb Haemost* 67:649-53, 1992

6. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1444-54.

7. Harper MF, Hayes PM, Lentz BR, Roubey RA: Characterization of beta2-glycoprotein I binding to phospholipid membranes. *Thromb. Haemost.* 80:610-4, 1998

8. Brighton TA, Hogg PJ, Dai YP, Murray BH, Chong BH, Chesterman CN. Beta 2-glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. *Br J Haematol* 93:185-94, 1996

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yasuda S, Tsutsumi A, Chiba H, Yanai H, Miyoshi Y, Takeuchi R, Horita T, Atsumi T, Ichikawa K, Matsuura E, Koike T.  $\beta$  2-glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. *Atherosclerosis* (in press)

##### 2. 学会発表

1. 保田晋助、堤明人、堀田哲也、三好義範、竹内理恵、笠原英樹、渥美達也、浄土智、中林透、市川健司、小池隆夫.  $\beta$  2glycoprotein I 欠損家系に関する遺伝子学的検討. 第42回日本リウマチ学会総会. 東京、1998年5月7-9日

リウマチ 38, 269, 1998

2. Yasuda S, Tsutsumi A, Takeuchi R, Horita T, Kasahara H, Miyoshi Y, Atsumi T, Ichikawa K, Matsuura E, Yanai H, Chiba H, Koike T. Prevalence of  $\beta$  2-glycoprotein I deficiency and its influence in lipid metabolism. 8th International symposium on antiphospholipid antibodies, Sapporo, 6-9 October 1998

*Lupus* 7, S191, 1998