

3. Takeuchi R, Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Takeya H, Horita T, Kasahara H, Miyoshi Y, Ichikawa K, Tsutsumi A, Suzuki K, Koike T. Coagulation and fibrinolytic characteristics in a β 2-glycoprotein I deficiency. 8th International symposium on antiphospholipid antibodies, Sapporo, 6-9 October 1998

Lupus S191, 1998

G. 知的所有権の取得状況

特に無し

整形外科領域における血栓が原因として起こる疾患の 臨床的、実験的研究

久保 俊一

（京都府立医科大学整形外科・助教授）

牧之段 敦(1)、上島 圭一郎(1)、加畑 多文(2)、北島 勲(3)

（京都府立医科大学整形外科(1)、金沢大学医学部整形外科(2) 鹿児島大学医学部臨床検査医学(3)）

本研究では、特発性大腿骨頭壊死症における血栓形成の可能性と人工関節置換術の血栓形成に注目しているが、本年度は昨年度に引き続き、ステロイド骨頭壊死症における血栓形成関与の可能性について、臨床的には腎移植後のステロイド壊死症を対象とし、実験的にはウサギ骨壊死モデルを対象として、検討を行った。

腎移植患者は、informed consents が得られた 10 名を対象とした。移植前、移植後 2 週で血栓形成（TAT, fibrinogen, FDP, PIC）に関する因子を測定し、骨壊死発生群と骨壊死非発生群で比較検討した。

血栓形成因子の変動については個人差によるばらつきがあったものの、骨壊死群と非骨壊死群で、明らかな差は見いだせなかった。

一方、実験的研究からは、ステロイド投与が血管内皮における thrombomodulin 発現を低下させていることが明らかになり、内皮レベルにおける抗血栓性が低下していることが示された。ステロイド投与により、骨内血管において一種の血栓準備状態を形成させる原因となっていることは十分考えられ、骨頭壊死症の病態を考える上できわめて重要な所見である。

A. 研究目的

整形外科領域では四肢、脊椎などの運動器における様々な疾患を取り扱っている。その中でも関節疾患や骨折は大きな weight を占めている。

関節疾患の内、特発性大腿骨頭壊死症（以下、骨頭壊死症）は難病として取り扱われている。大腿骨頭の荷重部に阻血性壊死が発生することにより関節面の陥没や破壊が起こり、股関節の機能障害が惹起される疾患である。両側性に発生しやすいこと、日常生活活動には著しい障害が生じること、そして、比較的若年者で発症頻度が高いことなどの特徴がある。また、本疾患はステロイド治療によりしばしば経験するものであり、ステロイドの使用量の増大とともにその頻度は増加してきている（ステロイド骨頭壊死症とも呼ばれている）。骨頭壊死症の病態に関しては、各種の要因があげられてはいるものの、詳細な機序は明確にされてい

ない。血液凝固・線溶系異常による血栓形成の可能性も大切な要因であると考えられる。この要因の関与を明らかにしておくことは、本疾患の予防にもつながる。

一方、関節疾患と骨折は人口の高齢化に伴い、その数が年々増加するとともに手術を要する例が増えている。変形性関節症や大腿骨頸部骨折は代表的な疾患である。近年の人工材料の発達と早期関節運動の重要性の認識のもと、人工骨頭・人工関節置換術などがよく選択されている。しかしながら、術中・術後に生じる血栓による障害が報告されるようになってきた。すなわち、肺梗塞や血栓性静脈炎である。重篤な場合は、生命予後は不良であり、診断、治療、予防法を開発しておくべき疾患である。

本研究では、特発性大腿骨頭壊死症における血栓形成の可能性と人工関節置換術の血栓形成に注目しているが、本年度はステロイド骨頭壊死症における血栓形成

関与の可能性について、臨床的には腎移植後のステロイド壊死症を対象とし、実験的にはウサギ骨壊死モデルを対象として、検討を行った。

B. 研究方法

1. 臨床的研究

京都府立医科大学移植外科で治療された腎移植患者で、informed consents が得られた 10 名を対象とした。移植前、移植後 2 週で血栓形成 (TAT, fibrinogen, FDP, PIC) に関する因子を測定した。骨頭壊死の発生は MRI を用い、診断特異性の高い所見である T1 強調画像における band 像の有無で判定した。

2. 実験的研究

体重約 3.5kg の日本白色家兎 20 羽 を、コントロール 5 羽 (group A) と、メチルプレドニゾロン 4mg/kg を週 1 回 筋注し、4 週、8 週、16 週間投与したステロイド投与家兎モデル (group B, group C, group D) に分け、比較検討した。これらを安楽死させた後、直ちに大腿骨を摘出して 10%ホルマリンで固定し、EDTA で脱灰、パラフィン包埋の後、H-E 染色を施行し、大腿骨近位の骨髄および骨内血管を観察した。また同一の標本において、血管内皮細胞上の膜蛋白であり、血液凝固阻止因子である thrombomodulin を ABC 法による免疫組織化学法で染色し、大腿骨近位の骨内血管における発現を観察した。使用抗体は ADI 社の抗ウサギ thrombomodulin 抗体を用いた。

C. 研究結果

1. 臨床的研究 (図 1)

MRI の検索では骨壊死を認めた症例は 3 例であった。骨壊死群と非骨壊死群に分けてみると、fibrinogen は両群ともに移植後で低下傾向を認めた。FDP では、非壊死群では移植後、12 例中 2 例に $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上の上昇を認めたが、10 例は変化がないか低下していた。壊死群では 3 例中 2 例で増加を認めたが、両群に明らかな相違は見いだせなかった。PIC では非壊死群での 1 例を除き変化は $0.6 \mu\text{g/ml}$ 以内に留まっていた。TAT では、非壊死群の 11 例中 5 例で低下傾向がみられ、 $1.0 \mu\text{g/l}$ 以上の低下は 2 例あった。壊死群でも 3 例中 2 例で $1.0 \mu\text{g/l}$ 以上の低下がみられた。血栓形成因子の変動については個人差によるばらつきがあったものの、骨壊死群と非骨壊死群で、明らかな差は見いだせなかった。

2. 実験的研究 (図 2)

H-E 染色標本では、group A に比べ group B-D では、骨髄に占める造血細胞の割合が低下し、脂肪細胞の割合

が増加していた。また group B-D では、sinusoid は拡張し、間質への血漿成分の漏出がみられた。これは骨髄内のうっ血を反映した所見と考えられる。しかし、細動脈や毛細血管、sinusoid に明らかな変性所見や血栓形成は認められなかった。抗ウサギ thrombomodulin 抗体による免疫組織染色の観察によると、大腿骨近位の metaphysis から diaphysis において、group A では細動脈や sinusoid の血管内皮細胞が十分に染色されているのに対し、group B-D ではいずれの検体でも血管内皮細胞の染色性が著しく低下していた。ステロイド投与した群では、全例でこの傾向が認められた。

D. 考察・E. 結論

(臨床的研究) 腎移植患者を対象として、移植直後 (ステロイド投与開始) から、定期的に、MRI で monitor した prospective study では、骨頭壊死発生が従来考えられていたよりも、きわめて早期に発生することが明らかにされている。すなわち、MR 画像上、骨頭壊死に特異性のある band 像がもっとも早期のものでは移植後 5-6 週において検出されている。また、実験的に骨頭壊死発生から MRI の band 像発現までに、約 4 週間の interval があるとされている。これらを考慮すると、移植後かなり早期に血栓形成による阻血性壊死の生じている可能性がある。さらに、免疫抑制剤として用いられるステロイド投与量と骨頭壊死発生は相関関係にあることが判明している。こられの事実に基づいて、今回の臨床研究では、ステロイド投与開始を把握しやすい腎移植患者を対象として、各種の凝固系に関連する因子を、移植前と移植後 2 週で比較した。その結果、凝固系の各因子で個人差がみられたが、壊死群と非壊死群の間で明らかな相違点を見いだすことはできなかった。また、移植後、fibrinogen が下がり、TAT が低下傾向にあった。従来から汎用されている血液凝固のパラメータでは、直接的な血液凝固亢進状態を示す data は得られなかった。

一方、実験的研究から、あくまで定性的な評価ではあるが、ステロイド投与が血管内皮における thrombomodulin 発現を低下させていることが明らかになり、内皮レベルにおける抗血栓性が低下していることが示された。このような作用が、ステロイドによる直接の内皮細胞への作用なのか、それとも、二次的作用なのかは明らかではないが、ステロイド投与により、骨内血管において一種の血栓準備状態を形成させる原因となっていることは十分考えられ、骨頭壊死症の病態を考える上できわめて重要な所見である。

臨床結果と実験結果の相違については、全身的な血液パラメーターでは検出できないが、大腿骨頭部の障害された血管内皮細胞局所では血液凝固異常が生じている可能性があり、より鋭敏で局所の異常を反映する新たな血液凝固マーカーによる検索の必要性があると考えている。また、臨床例が蓄積すれば、細かい統計学的検討が可能になると考えている。

F. 研究発表

●久保俊一、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

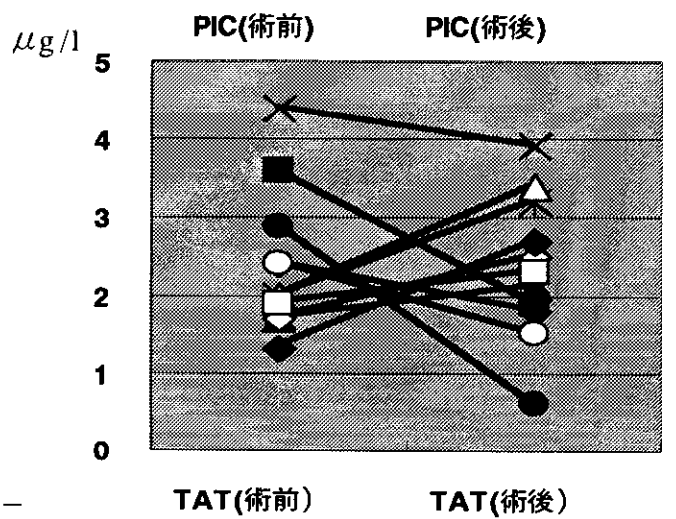
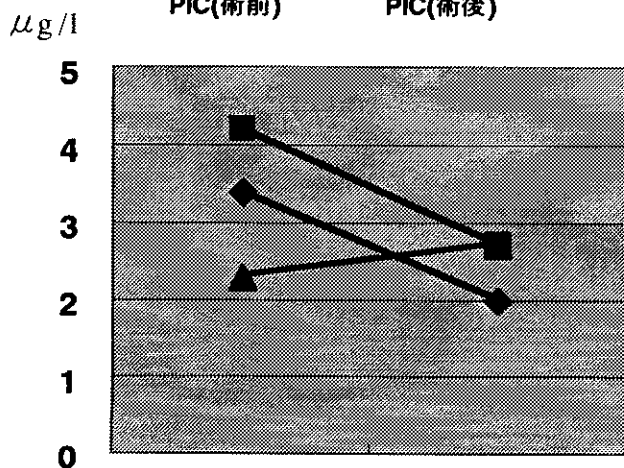
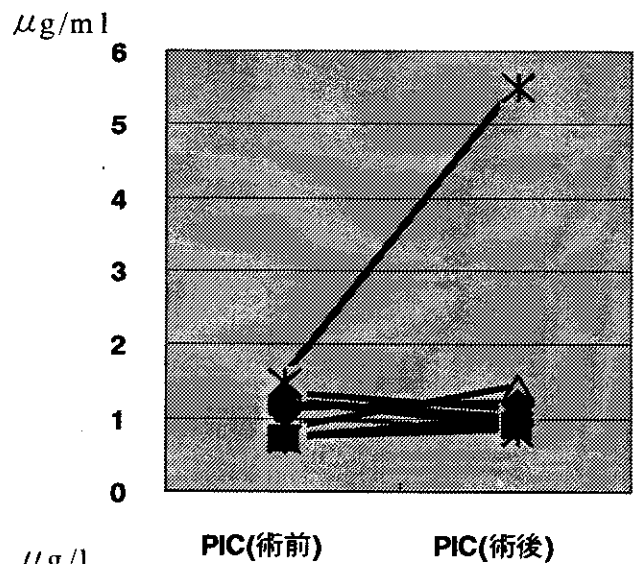
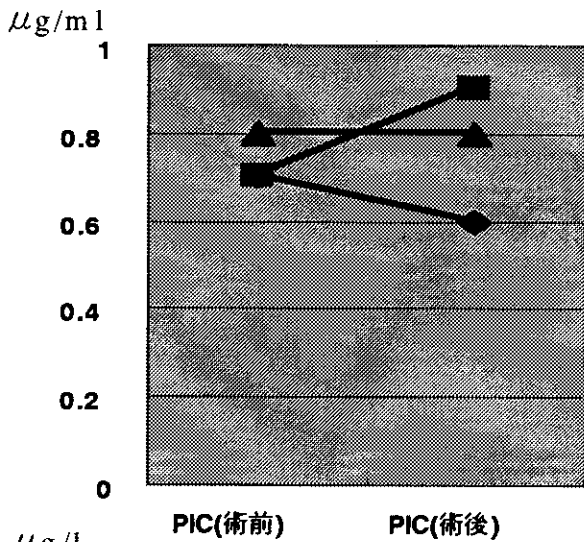
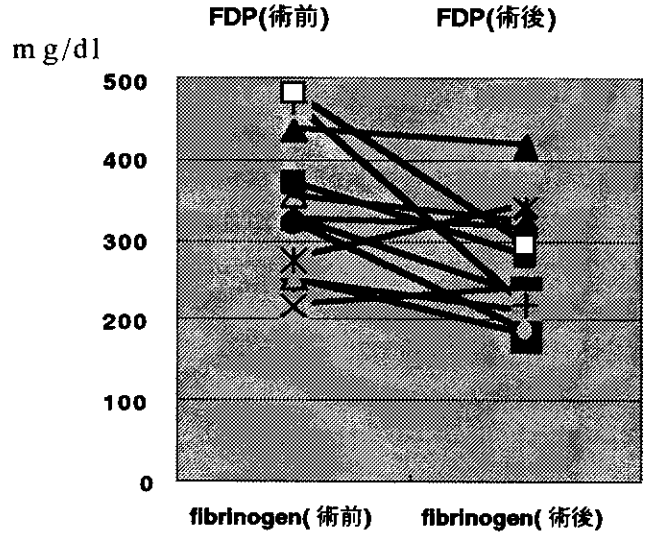
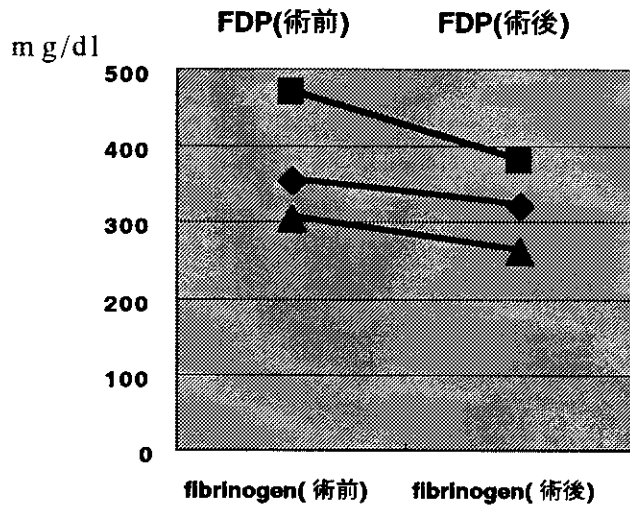
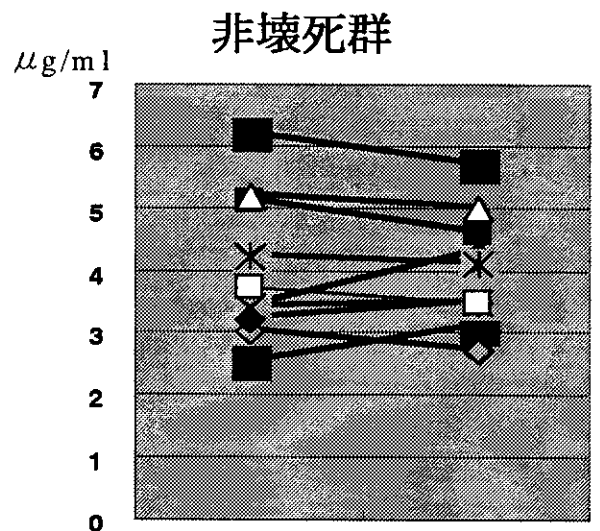
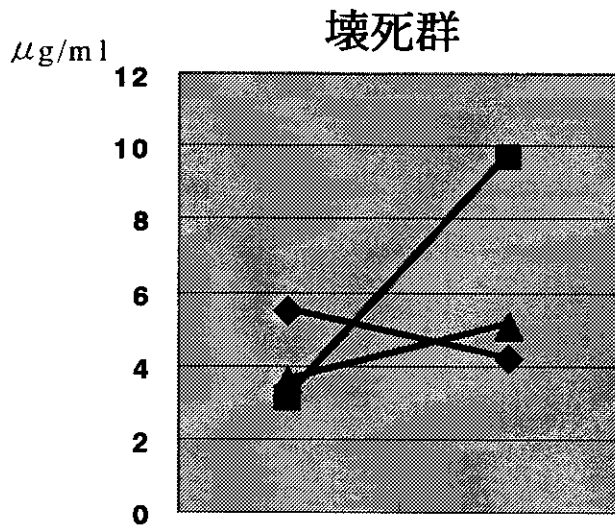
●久保俊一：外傷性骨壊死症。整形外科最新の治療（平澤泰介、高岡邦夫、星野雄一編集）115-114、南江堂、東京、1999.4.25

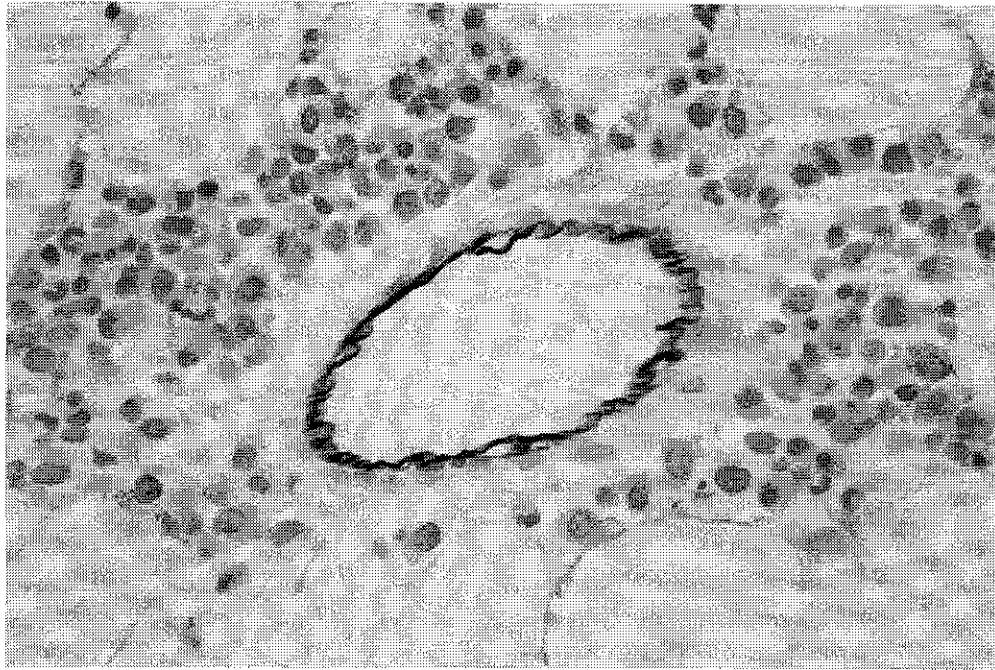
●久保俊一：特発性骨壊死症。整形外科最新の治療（平澤泰介、高岡邦夫、星野雄一編集）112-114、南江堂、東京、1999.4.25

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

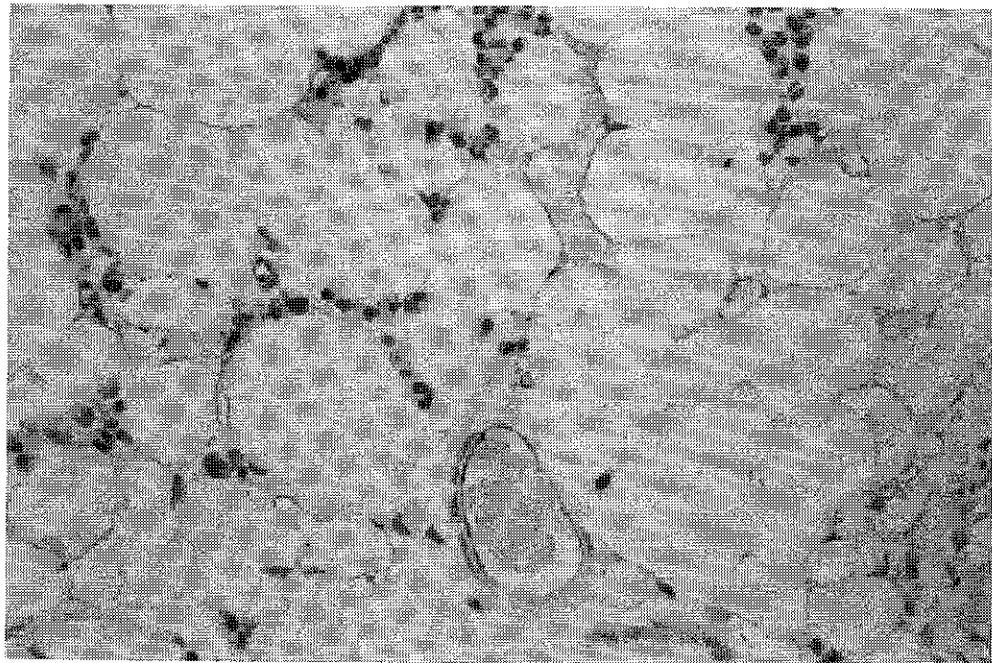
G. 知的所有権の取得状況

特に無し





a. コントロール：血管内皮が良好に染色されている（×150）



b. 16週骨壊死モデル：血管内皮の染色性が低下している（×100）

図 2. Thrombomodulin の染色性

血液流動性維持機構障害と特発性血栓症

小嶋 哲人

（名古屋大学医学部保健学科・助教授）

血管内皮細胞のほか、上皮細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞などはそれぞれ組織特異的に血液凝固線溶因子を産生し、血液流動性維持機構に関与している。今回、加齢現象に伴う易血栓性の原因を調べるため、若年および老齢マウスにエンドトキシンを投与後、各組織での血液凝固線溶諸因子の変動を解析した。その結果、若年マウスと比較して老齢マウスにおいては、主要な線溶制御因子である活性型 PAI-1 抗原量と、肝、腎などの組織における PAI-1 mRNA 発現量のより顕著な増加を観察した。この加齢現象に伴う組織レベルの血液凝固線溶能の変化は、特発性血栓症発症の誘因となりうると推察された。

A. 研究目的

血液流動性維持機構には血管内皮細胞の果たす役割が大きいとされるが、生体内では内皮細胞だけでなく上皮細胞、平滑筋細胞、神経細胞、脂肪細胞などがそれぞれ組織特異的なメカニズムによって血液凝固線溶因子を産生しており、血中レベルのみならず組織レベルでの血液凝固線溶能の変化を把握する必要があると考えられる。我々は加齢現象に伴う易血栓性の原因を個体、組織、細胞レベルで調べるため、若年マウスおよび自然老化による老齢マウスを用い、エンドトキシン (lipopolysaccharide: LPS) 投与後の各組織におけるプラスミノゲンアクチベーター (t-PA, u-PA) およびそのインヒビター (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、組織因子 (TF)、プロテイン C (PC) 等の遺伝子発現変化を分子生物学的な手法により定量解析し、血栓形成傾向との関連について比較検討を行った。

B. 研究方法

敗血症のモデルとして、若年 (8 週齢) および老齢 (12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢) のオス C57BL6/J マウス数匹ずつに中等量 (5 μ g = 0.2 mg/kg) の LPS を腹腔内投与し、間隔 (0, 2, 4, 8, 16, 24 時間) をおいて血漿および肝、腎、副腎、肺、心臓、脳の各組織を摘出した。各組織より total RNA を抽出した後、高感度定量的 RT-PCR 法により標的とする各凝固線溶因子の mRNA 発現量を組織ごとに定量した。まず、マウスの各凝固線溶系因子に対する competitor を含む plasmid の in vitro transcription による合成 control RNA を段階希釈

し、各組織 RNA 1 μ g と混ぜて同時に reverse transcription を行う。そして、ラジオアイソトープ (32P) でエンドラベルしたプライマーを用いた競合的 RT-PCR を行い、PCR 産物中に含まれる放射活性から目的とする mRNA の定量を行った。また、各凝固線溶因子 mRNA の組織における局在についても、35S ラベルしたプローブを用いた in situ hybridization 法によって比較検討を行った。

C. 研究結果

各組織における各凝固線溶因子 mRNA の発現量は、LPS 投与前には若年、老齢マウス間で有意な差を認めなかった。しかし LPS 投与後の腎では、各月齢マウスとも投与数時間後をピークに TF、PAI-1 mRNA の著明な発現増加と、PC、u-PA mRNA の有意な発現減少が認められ、TF、PAI-1 mRNA の発現増加の割合はいずれも老齢マウスにおいて、より顕著であった。また、肝においても LPS 投与 8 時間後をピークに著明な PAI-1 mRNA の発現増加を認め、この増加も老齢マウスにおいてより顕著であった。LPS 投与後の血中活性型 PAI-1 値の上昇についても老齢マウスで有意に高度で、時間的に PAI-1 高値の持続、遷延傾向が認められた。一方、in situ hybridization 法による上記各 mRNA の組織および細胞内発現分布を検索したところ、LPS 投与 2 ~ 4 時間後の腎系球体内および尿細管周囲の血管内皮細胞での PAI-1 mRNA シグナルの増加、また LPS 投与 4 ~ 8 時間後の肝細胞、肝類洞内皮細胞での PAI-1 mRNA シグナルの増加は、いずれも老齢マウス

でより顕著であり、腎皮質尿細管上皮細胞における TF mRNA シグナルの増加についても同様な傾向であった。

D. 考察

LPS 投与により惹起される敗血症病態下では、老齢マウス組織において血栓形成・維持を促進するような血液凝固線溶因子の発現変化 (TF および PAI-1 mRNA の著明な発現増加) が若年マウスと比較してより顕著に認められ、これは加齢現象に伴う易血栓性の原因の一つであることが推察された。

E. 結論

今回観察された、加齢現象に伴う組織レベルの血液凝固線溶能の変化による血液流動性維持機構障害は、原因不明の血栓症発症の誘因となりうるということが推測され、その予防的手段を考える上で重要な情報と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Mizuno, T. Kojima, et al.: Successful Culture and Sustainability In Vivo of Gene modified Human Oral Mucosal Epithelium. *Human Gene Therapy* 10: 825-830, 1999
- 2) K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Syndecan-4 expression is associated with follicular atresia in mouse ovary. *Histochem. Cell Biol.* 112(1): 25-33, 1999
- 3) K. Yamamoto, T. Kojima, et al.: Regulation of murine protein C gene expression in vivo: effect of tumor necrosis factor- α , interleukin-1, and transforming growth factor- β . *Thromb. Haemost.* 82 (4): 1297-1301, 1999
- 4) S. Kunishima, T. Kojima, et al.: Mapping of a gene for May-Hegglin anomaly to chromosome 22q. *Hum. Genet.* 105 (6): 379-383, 1999
- 5) A. Katsumi, T. Kojima, et al.: Severe Factor VII Deficiency Caused by a Novel Mutation His348 to Gln in the Catalytic Domain. *Thromb. Haemost.* 83 (2): 239-243, 2000
- 6) K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Syndecan-4 Deficiency Impairs Focal Adhesion Formation Only under Restricted Conditions. *J. Biol. Chem.* 275 (8), 5249-5252, 2000

2. 学会発表

- 1) 下川高賢、小嶋哲人ら：マウス Protein S mRNA の組織内発現分布と LPS、TNF- α 、IL-1 投与による変化 第 61 回日本血液学会、東京、平成 11 年 4 月
- 2) K. Yamamoto, T. Kojima, et al.: Extra hepatic expression and regulation of protein C in the mouse. XVIIth Congress

of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Washington, U.S.A, 平成 11 年 8 月

3) T. Kojima, E. Kanbe, et al.: Hypoxia treatment up-regulates ryudocan gene expression. International Conference on Molecular Interactions of Proteoglycans, Shonan, Japan, 平成 11 年 8 月

4) K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Analysis of ryudocan/syndecan-4 function by means of gene targeting. International Conference on Molecular Interactions of Proteoglycans, Shonan, Japan, 平成 11 年 8 月

5) 小嶋哲人、山本晃士ら：血液疾患に対する臨床検査の進歩 4. 凝固・止血検査について—特に DIC の診断と治療の進歩 第 18 回日本臨床病理学会東海・北陸支部例会のシンポジウム、名古屋、平成 11 年 8 月

6) 柳田正光、小嶋哲人ら：出血が初発症状となった原発性アミロイドーシスの一例 第 41 回日本臨床血液学会、秋田、平成 11 年 10 月

7) 高木 明、小嶋哲人ら：血小板膜糖蛋白 I b α の遺伝子多型解析 第 22 回日本血栓止血学会学術集会、宇都宮、平成 11 年 12 月

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

H. 研究協力者

柳田正光、中山亨之、竹下享典、中山由紀子、清水敦哉、山本晃士、松下正、齋藤英彦：名古屋大学医学部第一内科

腎疾患の進展におけるトロンビンの関与

北本 康則

（熊本大学医学部第3内科・教授）

尿中のトロンビン活性を評価するために、これを抗原量および活性化フラグメントと比較した。活性は他の2者とよく相関し、最も感度が高かった。尿中トロンビン活性はメサンギウム増殖性腎炎と膜性腎症で検出されたが、後者では炎症細胞の浸潤が見られないことから、これらの腎炎では凝固の活性化機序が互いに異なると考えられた。

A. 研究目的

糸球体腎炎ではマクロファージやメサンギウム細胞に組織因子が発現することが知られており、病変部での凝固の活性化が腎炎の病態形成に深く係わると考えられている。しかしながら糸球体での凝固活性を直接リアルタイムで示す適当な指標がないため、その意義については不明な点も多い。このような背景から、凝固活性を直接担うトロンビンの尿中濃度の測定法を確立し、各種腎炎病巣での凝固の活性化を解析した。

B. 研究方法

トロンビン抗原、活性、およびトロンビン活性化フラグメント F1+2 を測定した。抗原量は2種のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法で測定した。活性は特異的な基質を用いて水解活性を測定した後にヒルジンを加えて再度活性を測定し、その差をトロンビン活性とした。また F1+2 は ELISA のキットを用いて測定した。対象として、メサンギウム増殖性腎炎 23 例、膜性腎症 9 例、微小変化群 3 例、健常者 10 例から新鮮尿を採取した。また急性心筋梗塞と再発例の 19 例で来院時の膀胱貯留尿のトロンビン活性を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究の遂行にあたっては特別な検査や特殊な薬物の使用を必要となかった。腎生検、尿の採取、薬剤の投与などについてはインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

トロンビン活性は抗原量、F1+2 の両者とよく相関し感度がこれらに比べて高いため、これを用いて尿中のトロンビン活性を測定した。健常者と微小変化群では全例で活性は陰性であった。また膜性腎症ではトロンビン

は平均 6.7 ± 18.0 U/g・creatinine で 4 例で陽性、5 例が陰性となった。メサンギウム増殖性腎炎（メ腎炎）では平均 4.75 ± 6.78 U/g・creatinine で 15 例が陽性、8 例が陰性であった。メサンギウム増殖性変化が強い例はすべて陽性となった。膜性腎症ではトロンビン活性と尿蛋白の間に相関関係はなかったが、メ腎炎では両者は相関した。メ腎炎で尿トロンビン活性とヘモグロビン濃度（血尿）に相関はなかった。心筋梗塞では全例とも尿トロンビン活性は陰性であった。

D. 考察

1. 尿トロンビン活性は糸球体での凝固活性のリアルタイムマーカーとして有用と考えられる。2. メ増殖性糸球体腎炎と膜性腎症では糸球体病変部での凝固活性が亢進すると考えられる。3. メ増殖性糸球体腎炎では凝固の亢進とメサンギウム増殖および蛋白尿の間に密接な関係があり、炎症性サイトカインによる組織因子の発現亢進、細胞増殖、血管透過性の亢進が共存すると考えられる。4. 膜性腎症では炎症細胞の浸潤は見られず、上皮下に沈着した免疫複合体による内因系凝固の活性化などの機序が推測される。

E. 結論

尿トロンビン活性を発色性基質を用いて測定した。この活性は他の方法による結果とよく相関し、感度は最も高かった。尿トロンビン活性の測定は、腎炎病巣での凝固活性の評価や、適正な抗凝固療法の設定に大変有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasunori Kitamoto, Motohiro Takeya, Hiroshi Tokunaga & Kimio Tomita: Glomerular architecture is maintained by

vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the adult mouse (submitted)

2. 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.

2. 学会発表

1. Yasunori Kitamoto, Motohiro Takeya, Hiroshi Tokunaga & Kimio Tomita: VEGF Is an essential molecule to maintain glomerular structure. J Am Soc Nephrol 10:381A,1999

2. 宮本賢治、北本康則、富田公夫. Thy1 腎炎をモデルとした糸球体傷害に対する VEGF の予防と治療効果：日本腎臓学会誌 2000年；41(3)271.

3. 北本康則、宮本賢治、富田公夫. VEGF は糸球体構築を維持し糸球体障害の進行を阻止する：日本腎臓学会誌 2000年；41(3)272.

4. 北本康則、今村隆寿、福井博義、富田公夫. 尿中トロンビンによる糸球体病変部での凝固活性の評価：臨床病理 1999年；47(suppl)179.

5. 北本康則、福井博義. 尿中のシグナルから読みとる生体のメッセージー臨床検査の分子、細胞、生物学的展開：臨床病理 1999年；47(suppl)69

6. 北本康則、富田公夫. 尿中の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)からみた腎の病態：臨床病理 1999年；47(suppl)71

7. 北本康則、竹屋元裕、徳永 寛、Napoleone Ferrara、富田公夫. 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)による腎糸球体構築の維持機構：第22回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 1999年；p228

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

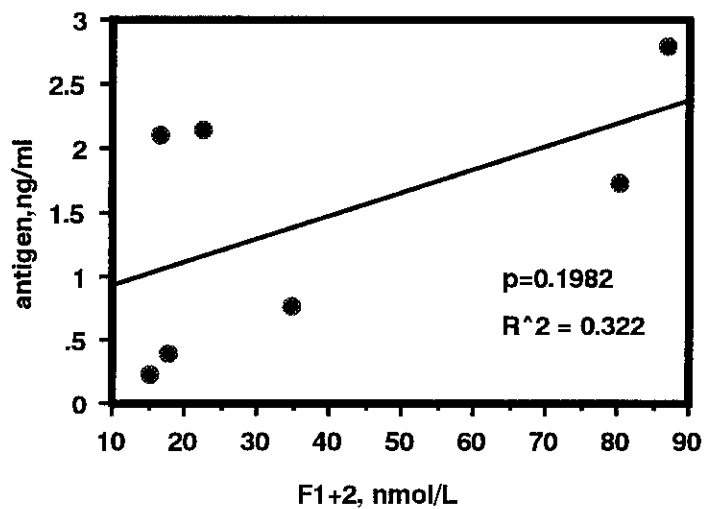
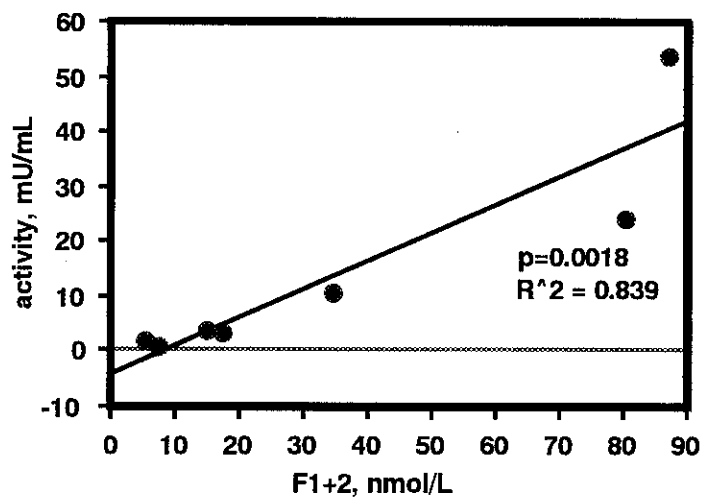
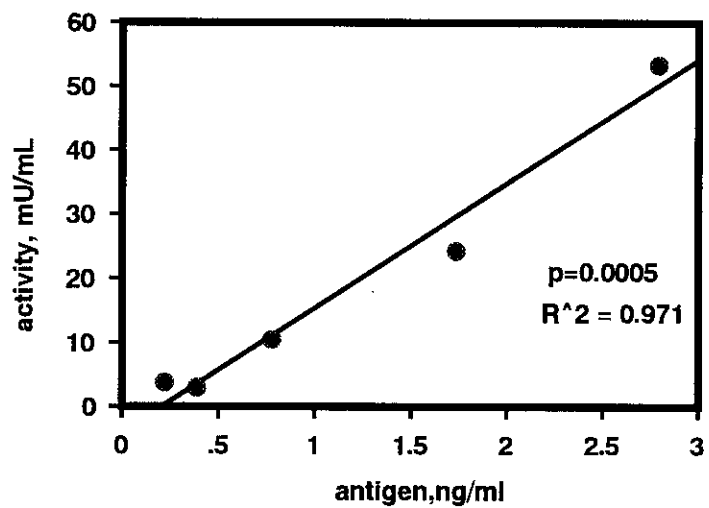


Fig. 1 Thrombin activity, antigen & F1+2

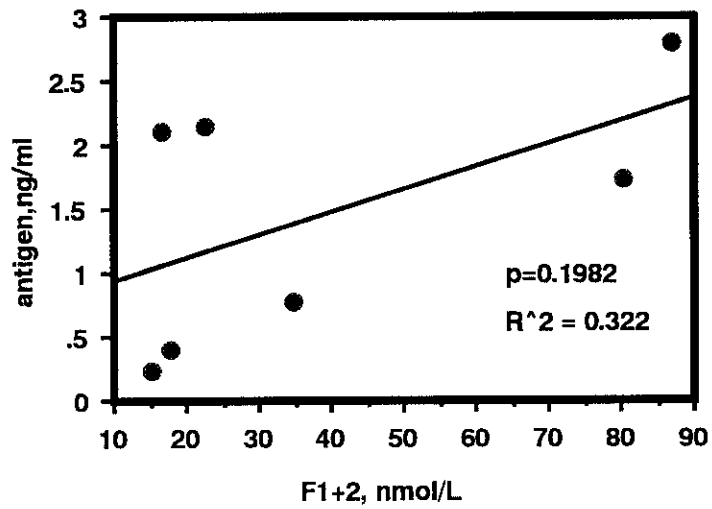
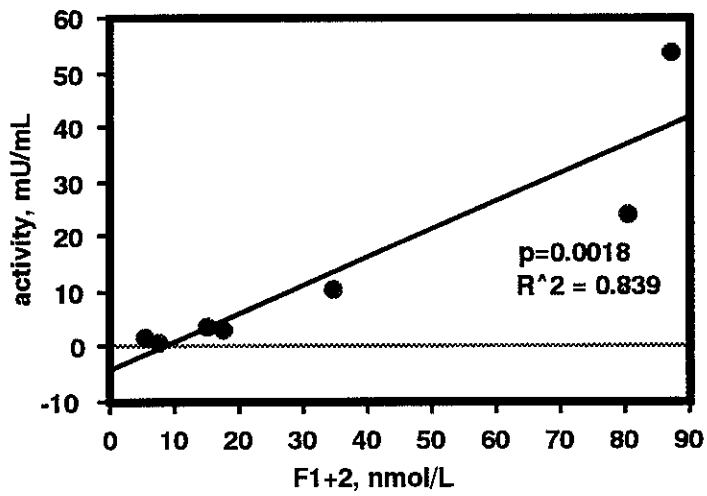
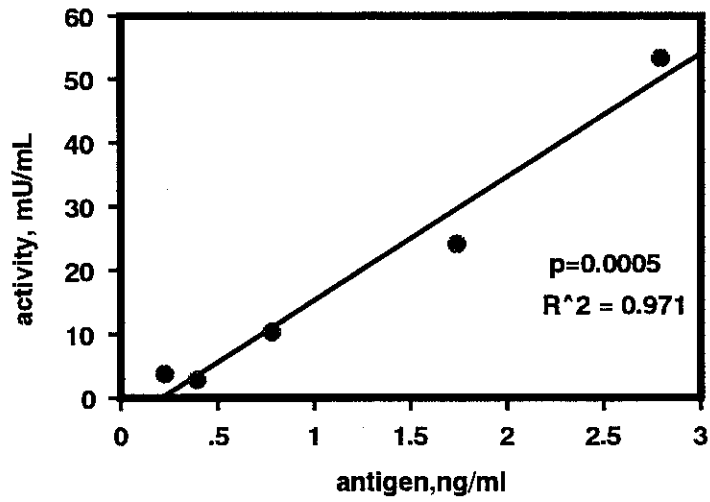


Fig. 2 Thrombin activity, antigen & F1+2

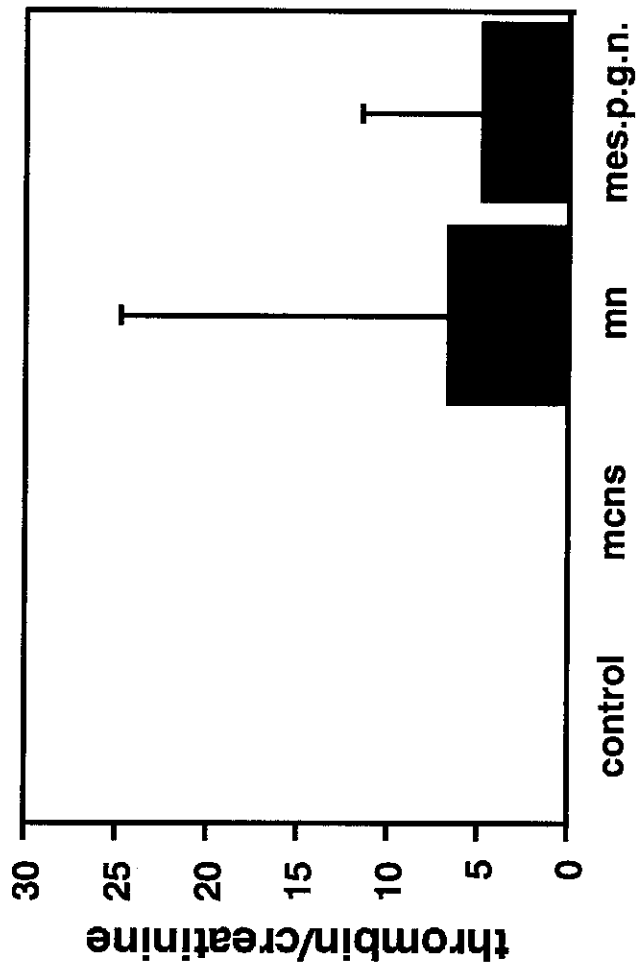


Fig. 3 Thrombin activity in urine

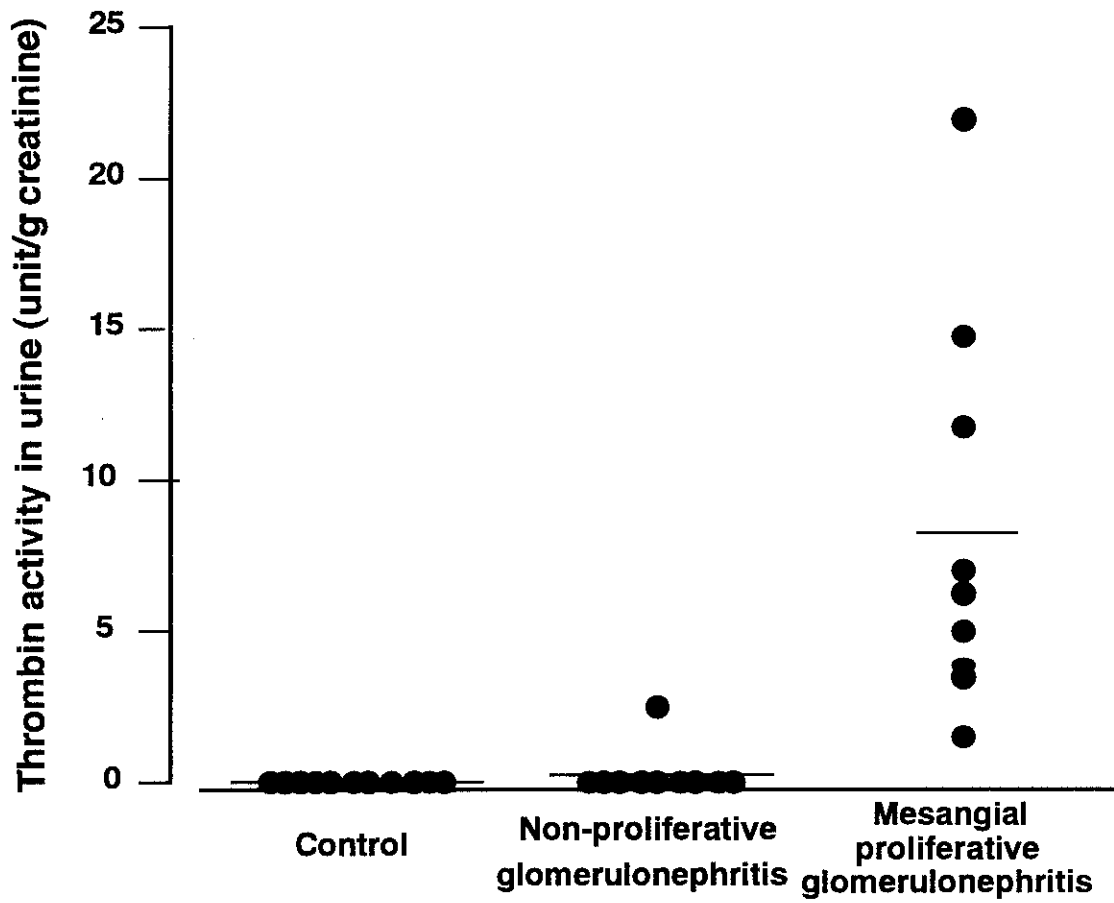


Fig. 4 Thrombin activity in the urine

虚血部組織における血管新生の分子機構

池田 栄二

（慶應義塾大学医学部病理学教室・専任講師）

ウィリス動脈輪閉塞症（脳血管モヤモヤ病）、糖尿病性網膜症等の血栓性閉塞性血管疾患では、虚血に陥った組織において代償機構として血管新生が起こる。この血管新生は虚血部組織を保護すると同時に、新生血管の脆弱性のため局所での出血の原因ともなり、血管新生はこれらの疾患の病態に大きく関与する。本研究はこの虚血部組織における血管新生の分子機構解明を通じ、これら難治性疾患に対する新たな治療法の確立を目指す。本年度は、糖尿病患者の眼内血管新生を対象としその分子機構を解析した。増殖糖尿病網膜症患者眼より手術的に採取された線維血管膜につき、VEGFをはじめとした各種血管新生因子およびそれらの受容体の発現を検索し、その血管新生にかかわる因子の特定を行った。その結果、網膜虚血に続発する血管新生には VEGF 受容体 VEGF-R2・neuropilin-1 を介した isoform VEGF165 よりのシグナルが重要であることが示唆された。

A. 研究目的

ウィリス動脈輪閉塞症（脳血管モヤモヤ病）、糖尿病性網膜症等の血栓性閉塞性血管疾患では、虚血に陥った組織において代償機構として血管新生が起こり虚血部組織を保護する。従って、これらの疾患の病態には血管新生が大きく関与する。本研究はこの虚血部組織における血管新生の分子機構解明を通じ、これら難治性疾患に対する新たな治療法の確立を目指す。本年度は、糖尿病患者を対象とし、その眼内虚血部血管新生の分子機構を解析した。

B. 研究方法

1. 線維血管性膜

増殖糖尿病網膜症患者では、網膜より硝子体方向に血管新生が起こり形成される線維血管膜がその病態に大きく関与する。硝子体手術を施行された増殖糖尿病網膜症 22 例 22 眼より摘出された線維血管性組織を対象とした。摘出された組織を半割し、一方を免疫組織化学および *in situ hybridization* による病理組織学的検索、もう一方を RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) による検索のために用いた。

2. 免疫組織化学的検討

4% paraformaldehyde 固定 paraffin 包埋切片に対し、CD34、GFAP (glial fibrillary acidic protein)、VEGF 対

する免疫染色を施行した。一次抗体としては抗ヒト CD34 マウスモノクローナル抗体 (Novocastra)、抗ヒト GFAP ウサギポリクローナル抗体 (DAKO)、抗ヒト VEGF ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz) を用い、二次抗体は CD34 染色にはペルオキシダーゼ標識デキストランポリマー結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体 (DAKO)、GFAP 染色には HRP 標識ブタ抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (DAKO)、VEGF 染色にはペルオキシダーゼ標識デキストランポリマー結合ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (DAKO) を用いた。

3. 線維血管膜内血管新生の評価

血管新生の程度を評価するため、CD34 に対する免疫染色標本を用い、線維血管膜内血管密度を測定した。

4. RT-PCR

摘出された線維血管膜より total RNA を抽出し、RT-PCR にて VEGF、VEGF 受容体 (VEGF-R1, VEGF-R2, neuropilin-1) および対照として β -actin の発現につき検索を加えた。VEGF に関しては、発現 isoform の特定も行った。プライマーは、VEGF には 5'-TGC CTT GCT GCT CTA CCT CC-3' (exon 1) および 5'-TCA CCG CCT CGG CTT GTC AC-3' (exon 8)、VEGF-R1 には 5'-GAT GTT GAG GAA GAG GAG GAT T-3' および 5'-AAG CTA GTT TCC TGG GGG TAT A-3'、VEGF-R2 に

は 5'-GAT GTG GTT CTG AGT CCG TCT-3' および 5'-CAT GGC TCT GCT TCT CCT TTG-3', neuropilin-1 には 5'-CAA CGA TAA ATG TGG CGA TAC T-3' および 5'-TAT ACT GGG AAG AAG CTG TGAT-3', β -actin には 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3' および 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG-3' を用いた。Annealing temperature は 64°C (VEGF), 64°C (VEGF-R1), 63°C (VEGF-R2), 63°C (neuropilin-1), 67°C (β -actin)とした。

5. In situ hybridization

4% paraformaldehyde 固定 paraffin 包埋切片を用い in situ hybridization にて 線維血管膜内における VEGF 産生細胞の同定を行った。プローブとしては、ヒト VEGF121 cDNA を鋳型としたジゴキシゲニン標識 RNA プローブを使用した。

C. 研究結果

1. 線維血管膜における VEGF および VEGF 受容体の発現

RT-PCR による検索の結果、線維血管膜には、isoform VEGF121 の発現を 22 例全例、isoform VEGF165 を 22 例中 7 例に認めた (図 1)。また、線維血管膜における VEGF 産生細胞はグリア細胞であった。受容体に関しては、VEGF-R1 は 22 例中 12 例、VEGF-R2 は 22 例中 14 例、neuropilin-1 は 22 例中 14 例に発現が認められた (図 1)。VEGF-R2 と neuropilin-1 の発現は同一の 14 例にみられ、そのうち 7 例が VEGF165 を発現していた。

2. VEGF および VEGF 受容体の発現と血管新生

VEGF および VEGF 受容体の発現と線維血管膜内血管新生の程度につき検討を加えた。その結果、線維血管膜内の血管内皮細胞における VEGF-R2 とその co-receptor である neuropilin-1 の発現が血管新生の程度と相関することが明らかになった (図 2)。

D. 考察

増殖糖尿病性網膜症における血管新生の程度は、線維血管膜内血管に VEGF-R2 と neuropilin-1 が共発現している症例において高いことが示された。Neuropilin-1 は isoform VEGF165 特異的受容体として知られており、血管内皮細胞膜上に VEGF-R2 とともに発現すると VEGF-R2 に対する VEGF165 の親和性を高め、結果として VEGF-R2 を介した VEGF165 の血管新生作用を増強することが報告されている。従って、糖尿病性網膜症の眼内血管新生には neuropilin-1 より増強される VEGF-R1 を介した VEGF165 からのシグ

ナルが重要な役割を演ずるものと考えられる。硝子体方向に進展した血管新生病変、即ち、線維血管膜自体に VEGF165 の発現の見られない例においても高度の血管新生が認められることから、ligand である VEGF165 は主として血管閉塞を伴う虚血部網膜組織から産生され眼内に蓄積しているものと考えられる。さらに今回の検索で、VEGF165 の発現を伴う線維血管膜が認められたが、それらは有意に若年群のものであった。若年発症の増殖糖尿病性網膜症が急速に進行することは臨床の現場でしばしば経験されことであり、これらの症例では、VEGF-R2 と neuropilin-1 を発現し VEGF165 に対する反応性が亢進している線維血管膜自身が VEGF165 を供給するという自己増殖機構により、網膜症が急速に進行するのではないかと推測される。

VEGF-R2・neuropilin-1 を介した isoform VEGF165 よりのシグナルを阻害することが、虚血部血管新生に伴う合併症の予防を含め、疾患の難治化を妨げる有用な治療法につながる可能性が示唆された。

E. 結論

血栓性血管閉塞性疾患の病態に大きく関与する虚血部組織における血管新生過程につき、今回は増殖糖尿病性網膜症に見られる眼内血管新生を中心に検索を加えた。その結果、虚血部組織から産生される VEGF、特に isoform VEGF165 が血管内皮細胞膜上に発現された受容体 VEGF-R2 および neuropilin-1 を介し細胞内に伝達するシグナルが重要な役割を演ずることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hosoda Y, Ikeda E: Pathology of spontaneous occlusion of the circle of Willis (cerebrovascular Moyamoya disease). *Neuropathology* 19:137-138, 1999
- 2) Nakada M, Nakamura H, Ikeda E, Fujimoto N, Yamashita J, Sato H, Seiki M, Okada Y: Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am J Pathol* 154(2):417-428, 1999
- 3) Nagamatsu M, Terao S, Misu K, Li M, Hattori N, Ichimura M, Sakai M, Yamamoto H, Watanabe H, Riku S, Ikeda E, Hata J, Oda M, Satake M, Nakamura N, Matsuya S, Hashizume Y, Sobue G: Axonal and perikaryal involvement in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66(6):727-733, 1999

4) Nakamura M, Fujishima S, Sawafuji M, Ishizaka A, Oguma T, Soejima K, Matsubara H, Tasaka S, Kikuchi K, Kobayashi K, Ikeda E, Sadick M, Hebert CA, Aikawa N, Kanazawa N, Yamaguchi K: Importance of interleukin-8 in the development of reexpansion lung injury in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* (in press)

5) Takizawa M, Ohuchi E, Yamanaka H, Nakamura H, Ikeda E, Ghosh P, Okada Y: Production of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is selectively enhanced by calcium pentosan polysulfate in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* (in press)

6) Ikeda M, Hosoda Y, Hirose S, Okada Y, Ikeda E: Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *J Pathol* (in press)

7) Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E: Co-expression of VEGF receptors VEGF-R2 and neuropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (in press)

8) Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, Otsuki T, Ikeda E: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors Correlates Closely with Formation of the Plexiform Lesion in Human Pulmonary Hypertension. *Pathol Int* (in press)

2. 学会発表

1) 池田栄二、岡田保典：脳血管特異的血管構築の分子機構。

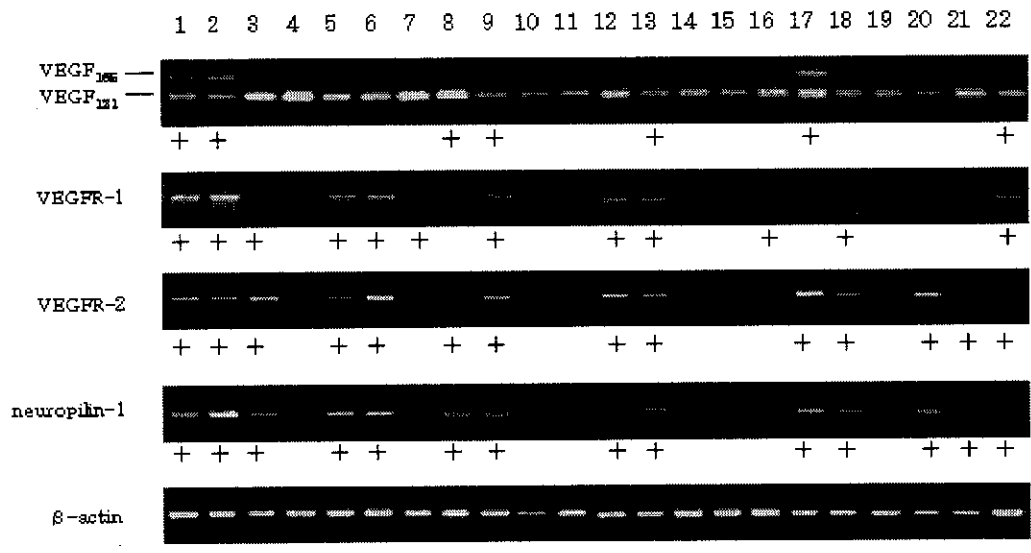
第88回 日本病理学会総会 平成11年4月 東京ワークショップ I 臓器の発生、分化の分子機構と病理

2) 池田栄二、岡田保典：慢性関節リウマチ滑膜血管新生と VEGF .

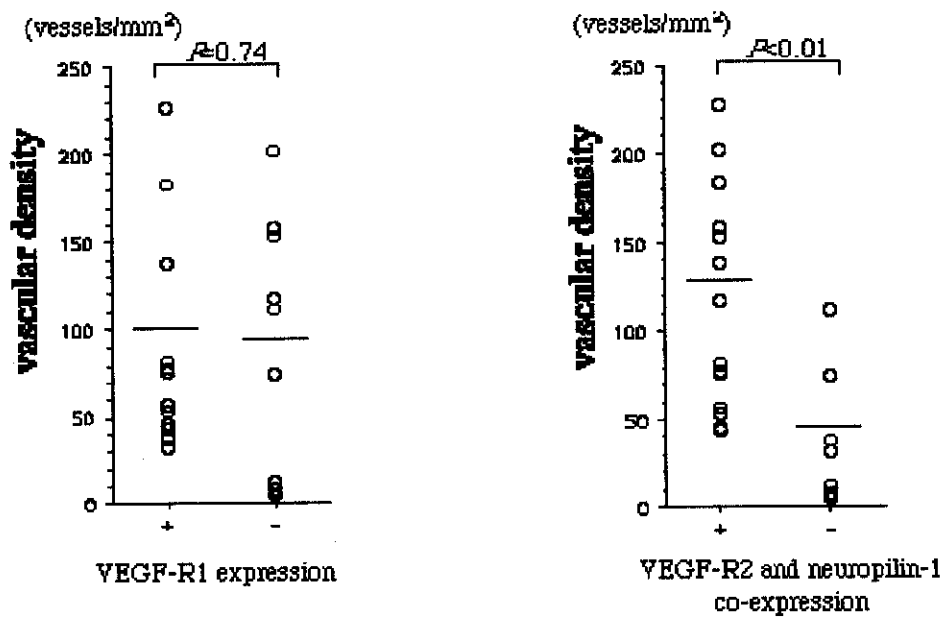
第88回 日本病理学会総会 平成11年4月 東京

G. 知的所有権の取得状況

特に無し



(图 1)



(图 2)

慢性肺高血圧における微小血栓の関与について

坂巻 文雄

（国立循環器病センター内科・医師）

- 1、肺高血圧を伴う慢性肺血栓塞栓症(CPTE)において血管内皮細胞障害と血小板活性化および凝固線溶異常の指標となる血漿中の諸因子を測定し、健常対照群および急性肺血栓塞栓症(APTE)との病態の違いを検討した。APTE患者においてTMが上昇していたのに対し、CPTE患者では血漿中のトロンボモジュリン(TM)の低下を認めた。von Willebrand 因子(vWF)、可溶性 P-selectin を含む他の凝固線溶系の指標の異常のパターンは APTE、CPTE 両群で類似していた。CPTE 群において TM の低下は平均肺動脈圧の悪化と相関した。肺高血圧を伴う慢性肺血栓塞栓症においては血管内皮機能の低下に伴う抗血栓性の低下が病態の悪化因子として考えられ、これらは臨床症例において TM の低下に反映されると考えた。
- 2、原発性肺高血圧症(PPH)に代表される慢性高度肺高血圧症において有効な治療法であるプロスタサイクリン治療前後での可溶性 P-selectin、TM の比較を行い同療法の肺血管拡張作用以外の作用機序としての血管内皮の抗血栓作用の改善を検討した。PPH における可溶性 P-selectin の増加、TM の減少はプロスタサイクリンの持続注入療法により改善する傾向を示した。プロスタサイクリン投与後のこれらの指標の改善は同剤の血管拡張作用以外の血小板凝集抑制や内皮機能の改善等の抗血栓効果を示唆すると考えた。

I. 肺高血圧を伴う慢性肺血栓塞栓性症例における血漿中血管内皮細胞障害および微小血栓形成のマーカー測定の意義

A. 研究目的

慢性肺血栓塞栓症 (Chronic pulmonary thromboembolism: 以下 CPTE)には重症の肺高血圧 (Pulmonary hypertension: 以下 PH) を伴う場合があり、これらは急性肺血栓塞栓症 (Acute pulmonary thromboembolism: 以下 APTE)と比べ、年齢分布の違い、深部静脈血栓症や先天性血栓素因が存在しない、内科的血栓溶解療法による改善が乏しいなどの臨床像の違いがある¹⁾。APTE と CPTE の病態の間には肺血管内皮機能に関連した凝固線溶異常に差異があることが考えられる。しかし臨床症例においてこれらの血管内皮機能に関連した凝固線溶異常の存在を鋭敏にとらえることは一般的に行われている血液凝固系の検査では困難である。本研究では肺血管内皮障害による抗血栓機能異常を CPTE 症例において評価することを目的とし、血漿トロンボモジュリン(Thrombomodulin: 以下TM)濃度を血管内皮障害とそれに伴う血管内皮細胞の抗血栓

作用を評価するために測定した。また他の血管内皮障害あるいは凝固線溶の指標も併せて測定した。これらの指標を CPTE 症例において正常人および APTE 症例と比較し、また肺血行動態により表される臨床的重症度と比較した。

B. 研究方法

当院に入院した PH を有した CPTE 患者 37 例 (男 19 例、女 25 例; 52 ± 15 歳) を対象とした。CPTE の定義は本院入院前の約 3 ヶ月間以上明かな臨床症状の変化が認められなかった例、あるいは同期間内に右心不全の悪化など病状の変化が存在しても血栓溶解療法により肺血流シンチグラムや動脈血液ガス、凝固線溶系分子マーカーに変化が見られなかった例とした。肺血栓塞栓症の診断は肺換気-血流シンチグラムで換気/血流ミスマッチの存在を前提とし、肺動脈造影で本症に特有の intimal irregularity, pouching defects などの所見を認めるか、胸部造影超高速 CT により肺動脈内血栓の存在を検出することにより行った。PH の定義は右心カテーテル検査にて平均肺動脈圧 20mmHg 以上とした。

比較する疾患群として APTE 患者 13 例 (男 9 例、女 4 例; 50 ± 17 歳) を対象とした。APTE の診断は入院前 1 週間以内に呼吸困難、胸痛、失神発作などの症状が出現しており、肺血流シンチグラムまたは胸部造影 CT にて上述の CPTE に準じた所見を呈し、かつこれらの症状および検査所見が抗凝固療法または血栓溶解療法にて臨床上有意な改善傾向を示したものとした。

臨床上明かな循環器および呼吸器疾患を有さない 19 例 (男 15 例、女 4 例; 47 ± 13 歳) を対照群とした。検体採取および右心カテーテル検査に際しては患者本人および家族に本研究の意義を説明し同意を得た。

対象とした患者群には糖尿病、膠原病、血清クレアチニン値 1.6 mg/dl 以上の腎機能障害、活動性の感染症を認めなかった。また 3 群の間に末梢血液中の血小板数、血清コレステロール、中性脂肪値に有意差を認めなかった。CPTE および APTE 患者群はすべて入院後 2 週間以上経過し循環不全や右心不全の所見を認めない安定期と思われる時期に検体採取をおこなった。両群とも全例抗凝固療法としてワーファリンがすでに投与されていた。われわれの予備的検討では今回重点的に検討した TM と P-selectin および vWF はワーファリンの投与により有意な測定値の変化はきたさなかった。

血漿 TM 濃度を帝人 (株) 社製血中 TM 測定キットを用い EIA 法にて測定した。血漿 sPS 濃度を宝酒造社製キット (GMP-140 (P-selectin) EIA Kit) を用い、EIA 法にて測定した。他の凝固諸因子も以前報告した方法に準じて行った。

以上より求められた血漿中の諸因子濃度を対照群、APTE 群、CPTE 群、の 3 群間で比較した。また APTE、CPTE の 2 群においては右心カテーテルから平均肺動脈圧 (mean pulmonary arterial pressure: mPAP)、肺動脈楔入圧、心拍出量を測定した。

すべての結果は平均値 \pm 標準偏差で表した。分散分析 (ANOVA) を行い、Fisher の有意差検定により各群間の比較を行った。p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。APTE、CPTE 患者群において血漿中の諸因子と mPAP の関係を単回帰分析にて解析した。

(倫理面への配慮) 検体採取および右心カテーテル検査に際しては患者本人または家族に本研究の意義を説明し、本研究への参加が自由意志によるものであること、参加への同意をいつでも撤回できること、参加を断っても診療上何ら不利益にならないことも説明し、同意を得た。

C. 研究結果

CPTE 群の平均肺動脈圧 (mPAP)、総肺抵抗 (TPR)、肺動脈血管抵抗 (PVR) は対照群、APTE 群に比べ高値を示していた (表 1)。

図 1 に 3 群間の血漿中 TM 濃度の比較を示した。対照群と比べ APTE 群の TM 濃度は高値であった (対照群: $4.0 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$; APTE 群: 5.1 ± 2.7 ; $p < 0.05$)。これに対し CPTE 群の TM 濃度 (2.5 ± 0.7) は対照群に比べ低値であった ($p < 0.01$)。

図 2 に 3 群間の von Willebrand 因子 (vWF) 抗原、vWF 抗原/活性比、血漿 P-selectin、トロンビン/アンチトロンビン III 複合体 (TAT) の比較を示した。vWF 抗原、vWF 抗原/活性比、血漿 P-selectin は APTE 群と CPTE 群との間に有意な差異を認めず、TAT は対照群と CPTE 群との間に有意な差を認めなかった。

図 3 に CPTE 群の血漿 TM 濃度と mPAP の関係を示した。CPTE 群においては血漿中の TM 濃度が低値の症例ほど mPAP、TPR、PVR が増加し重症化する傾向があった。

D. 考察

慢性肺血栓塞栓症 (CPTE) には器質化血栓が広範囲に肺動脈を狭小化し PH を合併する例が多く存在する。これら PH 合併の CPTE は急性肺血栓塞栓症 (APTE) とは異なった臨床経過をとり、血栓溶解療法が無効な例がほとんどで、継続的な抗凝固療法にもかかわらず肺高血圧、ガス交換障害が進行し最終的には右心不全から死に至る例が少なくない。しかし一般的に行われている血液止血系検査では PH を合併した CPTE における凝固/線溶異常の特徴を APTE の安定期と区別するのは困難である。

本研究では CPTE においては血管内皮細胞障害による抗血栓機能の低下が本症の病因として、あるいは持続する肺高血圧の結果として存在するために病態の悪循環を形成し重症化をきたしている可能性があると考え、これらを血栓止血学的マーカーでとらえることができるかを検討した。

トロンボモジュリン (TM) は血管内皮細胞表面に存在するプロテオグリカンで血液中のトロンビンと結合し不活化させるとともにプロテイン C の活性化を通じて血管内皮細胞の抗血栓性因子として重要な役割を果たす 2)。血漿中の可溶性 TM は腎機能および肝機能障害が存在しなければ血管内皮障害を反映すると考えられ、実際に播種性血管内血液凝固、急性呼吸促進症候群、膠原病などで上昇することが報告されている 3)。