

20000673

厚生科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

原因不明の血栓が病因となる難治性疾患の横断的研究

平成 12 年度 研究報告書

平成 13 年 3 月

主任研究者 丸山 征郎

特定疾患対策研究事業

平成 12 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 12 年度研究班構成員名簿
- 3) 平成 12 年度総括研究報告書 . . . 班長 丸山征郎
- 4) 平成 12 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 12 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12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)	〒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)	〒060-0815 札幌市北区北 15 条西 7 丁目	011-716-1161	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学講座(助教授)	〒602-0841 京都市上京区 河原町広小路上る梶井町 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)	〒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)	〒860-0811 熊本市本荘 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)	〒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)	〒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	森園 友美	もりぞの ともみ	鹿児島大学医学部臨床検査講座(秘書)	〒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（横系）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 PGI₂ 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（横系、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) PGI₂, 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- κ 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 (PAI-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- κ 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。またトロンビンからのシグナルは CBP/P300 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 β 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 (4 mg/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ビンの関与

北本らは腎炎の進展とトロンビンの関係を研究した。まず北本らはトロンビ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ビン測定した。正常者では尿中にはトロンビ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ビ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構が想定された。PGI₂ 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 β 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、その機構は 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- α 、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- α 、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らかになったことは、上記疾患に rTM が有効であることをしきしい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 PGI₂ 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 PGI₂ 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- α) 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) Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Sawada, K., **Koike, T.**, Kuwabara, M., Ikeda, H., Ikebuchi, K.: Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood prozitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Exp Hematol* 2001 29:174-182.

2) Bertlaccini, M.L., Atsumi, T., Lanchbury, J. Scaliz, A. R., Katsumata, K., Vaughan, R. W., Kondeatis, E., Kamashta, M.A., **Koike, T.**, Huges, G.R.V.: Plasma tumor necrosis factor α levels and the -238* a promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2001;85. 198-203

3) **Koike T.**: Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis. *Ann Med* 2000;32 Suppl 1; 27-31

4) Tsutsumi, A., Ichikawa, K., Matura, E., Sawada, K., **Koike, T.** Heterogeneous behavior anti- β 2-glycoprotein. *J. Rheumatol.* 2000; 22. 391-397.

5) Bertolaccini, M.L., Atsumi, T., Caliz, A.R., Amengual, O., Khamashta, M.A., Huges, G.R.V., **Koike, T.**: Association of antiphospholipid antibodies with HLA class II genes. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 683-688..

6) Matura, E., **Koike T.**: Accelerated atheroma and anti- β 2-glycoprotein I antibodies. *Lupus.* 2000; 9:210-216.

- 7) Ieko, M., Ichikawa, K., Atsumi, T., Takeuchi, R., Sawada, K., Yasukouchi, T., **Koike, T.** : Effects of β 2glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. *Seminars Thrombosis Hemostasis*. 2000; 26: 85-90.
- 8) Atsumi, T., **Koike, T.** Cardiac valve diseases and antiphospholipid syndrome. *Int.med.* 2000; 39:446-447..
- 9) Takeda, t., Mizugaki, Y., Matsubara, L., Imai, S., **Koike, T.**: Lytic epstein-barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis.Rheum.* 2000; 43: 1218-1225..
- 10) Tsutsumi, A., **Koike, T.**: Antiphospholipid syndrome in the elderly. *Int .Med.* 2000; 39:529-530.
- 11) Koike, T., Ichikawa, K., Atsumi, T., Kasahara, H., Mastuura, E.: β 2-blycoprotein I -anti- β 2-blycoprotein I Interaction.. *J Autoimm.* 2000; 15: 97-100.
- 12) Sasaki, K., Tsutsumi, A., Wakamiya, K., Ohtani, K., Suzuki, Y., Watanabe, Y., Nakayama, N., Koike, T.: Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus Infection. *Scand J Gastroenterol.* 2000; 9: 961-965.
- 13) Nishio, M., Koizumi, K., Endo, T., Haseyama, Y., Fujimoto, K., Ymamamoto, S., Kobayashi, H., Koike, T., Sawada, K. : Effective high+dose chemotherapy combined with CD34+-selected autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous CD30-negative Large T cell Lymphoma. *Bone Marrow Transplantation.* 2000; 25. 1315-1317
- 14) Matsuura E, Kobayashi K, Kasahara J, Shoenfeld Y, Koike T: Oxidized autoantigens in atherosclerosis.. Y Shoenfeld, D. Harats, G Wick ed. In *Atherosclerosis and Autoimmunity.* Elsevier Science B.V 143-150, 2001
- 15) Tsutsumi A, Koike T: Measurement of anti- β 2glycoprotein I antibodies. M Khamashta ed in *Hughes Syndrome;Antiphospholipid Syndrome.* Springer . 238-244. 2000
- 16) Mastuura, E., Inagaki, J., Kasahara, H., Ymamamoto, D., Atsumi, T., Kobayashi, K., Kaihara, K., Zhao, D., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Yasuda, T., Triplett, A. D., **Koike, T.** : Proteolytic cleavage of β -glycoprotein I: reduction of antigenicity and the structural relationship. *Int Immunol.* 2000; 12:1183-1192.
- 17) Takeuti, R., Atsumi, T., Ieko, M., Takeya, H., Yasuda, S., Ichikawa, S., Tsutsumi, A., Suzuki, K., Koike, T. : Coagulation and fibrinolytic activities in 2siblings with β 2-glycoprotein I deficiency. *Blood.* 2000; 96:4.
- 18) Yasuda, S., Tsutsumi, A., Chiba, H., Yanai, H., Miyoshi, Y., Takeuchi, R., Horita, T., Atsumi, T., Ichikawa, K., Mastuura, E., Koike, T. : β 2-blycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. *Atherosclerosis.* 2000; 152 : 337-346.
- 19) tsumi, T., Ieko, M., Bertolaccini, M. L., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Matsuura, E., Koike, T. : Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-proteronbin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 1982-1993.
- 20) Koizumi, K., Nishio, M., Endo, T., Takashima, H., Haseyama, Y., Fujimoto, K., Ymamamoto, S., Sato, N., Ikebuchi, K., Ikeda, H., Koike, T., Sawada, K. : Large scale purification of human blood CD34+ cells from

cryopreserved peripheral blood stem cells, using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. *Bone Marrow Transplantation*. 2000; 26: 787-793.

21) Takeuchi, M., Bucala, L., Suzuki, T., Ohkubo, T., Yamazaki, M., Koike, T., Kameda, Y., Makita, Z. : Neurotoxicity of advanced glycation end-products cultured cortical neurons. *J. Neuropathol Exp. Neurology*. 2000; 59: 1094-1105.

22) Takeuchi, M., Makita, Z., Bucala, L., Suzuki, T., Koike, T., Kameda, Y. : Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Molecular Medicine*. 2000; 6: 114-125.

23) Subang, R., Levine, J.S., Janoff, A.S., Davidson, S.M. K., Taraschi, T.F., Koike, T., Minchey, S.R., Whiteside, M., Tannenbaum, M., Rauch, J.: Phospholipid-bound β 2 glycoprotein I induces the production of anti-phospholipid antibodies. *J. Autoimm.* 2000; 15:21-32.

24) **T. Kojima**: Molecular biology of ryudocan, an endothelial heparan sulfate proteoglycan. *Semi. Thromb. Hemost.* 26 (1): 67-73, 2000.

25) T. Sugihara, **T. Kojima**, et al.: Identification of plasma antibody epitopes and gene abnormalities in Japanese hemophilia A patients with factor VIII inhibitor. *Nagoya J. Med. Sci.* 63 (1): 25-39, 2000

26) 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

27) 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

28) K. Iba, **T. Kojima**, et al.: The cysteine-rich domain of human ADAM12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that leads to b1-dependent cell spreading. *J. Cell. Biol.* 149 (5): 1143-1155, 2000.

29) I. Takahashi, **T. Kojima**, et al.: Detailed characterization of an anti-factor IX monoclonal antibody that neutralizes the prolonged ox brain prothrombin time of hemophilia BM by synthetic peptides. *Peptides* 21 (5): 603-753, 2000.

30) M. Sakata, **T. Kojima**, et al.: Ryudocan expression by luteinized granulosa cells is associated with the process of follicle atresia. *Fertil. Steril.* 74 (6): 1208-1214, 2000

31) K. Ishiguro, **T. Kojima**, et al.: Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J. Clin. Invest.* 106 (7): 873-878, 2000.

32) K. Ishiguro, **T. Kojima**, et al.: Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. *Dev. Dynam.* 219 (6): 539-544, 2000.

33) T. Nakayama, **T. Kojima**, et al.: Short report: A case of purpura fulminans is caused by homozygous delta8857 mutation (protein C-nagoya) and successfully treated with activated protein C concentrate. *Br. J. Haematol.* 110 (3): 727-30, 2000.

34) Y. Nakayama, **T. Kojima**, et al.: Cloning and Characterization of the Murine Antithrombin Gene. *Thromb Res* 100 (3): 179-183, 2000.

- 35) T. Shimokawa , **T. Kojima**, et al.: Down-regulation of murine tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor- α in vitro and in vivo. *Thromb* 100 (3): 211-221, 2000.
- 36) Shinji Kunishima, **T. Kojima**, et al.: Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombo-cytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). *Blood* 97 (4): 1147-1149, 2001.
- 37) **Kubo T**, Tsuji H, Yamamoto T, Nakagawa M, Nakahara M, Hirasawa Y. Antithrombin III deficiency in a patient who have multifocal osteonecrosis. *Clin. Orthop.* 2000 in press
- 38) Tamon Kabata, **Toshikazu Kubo**, Tadami Matsumoto, Mitsuru Nishino, Katsuro Tomita, Shogo Katsuda, Takeshi Horii, Nobue Uto, and Isao Kitajima. Apoptotic cell death in steroid-induced osteonecrosis: An experimental study in rabbits. *Jouranal of Rheumatology*, 27; 2166-2171, 2000
- 39) **Toshikazu Kubo**, Takuaki Yamamoto, Shigehiro Inoue, Motoyuki Horii, Keiichiro Ueshima , Yukihide Iwamoto, Yasusuke Hirasawa. Histological Findings of Bone Marrow Edema Pattern on MR in Osteonecrosis of the Femoral Head - a case report -. *Journal of Orthopaedic Science*, 5 ; 520-523, 2000
- 40) **Toshikazu Kubo**, Masafumi Kobayashi, Toshihiro Ishida, Shoichi Yamazoe, Mikihiro Fujioka, Shigehiro Inoue, and Yasusuke Hirasawa. A case of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head treated with transtrochanteric anterior rotational osteotomy combined with vascularized iliac bone grafting, *Journal of Orthopaedic Science*, 5 ; 610-613, 2000
- 41) **Toshikazu Kubo**, Keishi Kamata, Masahiko Noguchi, Shigehiro Inoue, Motoyuki Horii, Mikihiro Fujioka, Yasusuke Hirasawa. Predictive value of MRI in avascular necrosis following talar fracture. *Journal of Orthopaedic Sugery*, 8 : 59-63, 2000
- 42) **Toshikazu Kubo**, Akihiro Kojima, Shoichi Yamazoe, Keiichiro Ueshima, Takuaki Yamamoto, Yasusuke Hirasawa. A case of osteonecrosis of femoral head which was developed after long-term topical steroid application. *Journal of Orthopaedic Science*, 6 : 92-94, 2001
- 43) Yukio Torii, Yukiharu Hasegawa, **Toshikazu Kubo**, Yoshihisa Kodera, Minami Yoshihisa, Yamada Yoshiaki, Hisashi Iwata: Osteonecrosis of the femoral head after allogenic bone marrow transplantation. *Clin. Orthop.* 2001, in press
- 44) Sugano N, Ohzono K, Nishii T, Sakai T, Haraguchi K, Yoshikawa H, **Kubo T**: Early MRI findings of rapidly destructive coxopathy. *Magnetic Resonance Imaging*. 2001, in press
- 45) **Toshikazu Kubo**, Isao Kitajima, Tadanobu Niratsuka, Atsushi Makinodan, Keiichiro Ueshima, Yasusuke Hirasawa. Fibrin monomer would be a useful predictor of pulmonary embolism following total hip arthroplasty. *Journal of Orthopaedic Science*, in press
- 46) **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
- 47) **久保俊一**、堀井基行：股関節軟骨と寛骨臼関節唇のMRI評価。股関節外科（新整形外科MOOK）2001印刷中
- 48) **久保俊一**、藤岡幹浩：大腿骨頭壊死症の病態と自然経過。股関節外科（新整形外科MOOK）2001印刷中

- 49) 久保俊一 : MRI. ゴールデンスタンダード, 南光堂、2001 印刷中
- 50) 久保俊一 : 骨壊死症. ダイナミックメディスン. 西村書店、2001 印刷中
- 51) 久保俊一 : レッグ・カルペ・ペルテス病・単純性股関節炎. 今日の治療指針. 医学書院、2001 印刷中
- 52) Kitamoto Y, Matsuo K, Tomita K. Different response of urinary excretion of VEGF between chronic and acute renal failure *Kidney Int* 59, 385-386, 2001
- 53) Kitamoto Y, Matsuo K, Tomita K. Different response of urinary excretion of VEGF between chronic and acute renal failure *Kidney Int* 59, 385-386, 2001
- 54) 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* 41:1649-1656, 2000
- 55) Otani A, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Matsumura M, Ikeda E, Honda Y: Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1192-1199, 2000
- 56) 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* 43:812-820, 2000
- 57) 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* 161:1030-1036, 2000
- 58) Watanabe M, Yu S-K, Sawafuji M, Kawamura M, Horinouchi H, Ikeda E, Kobayashi K: Experimental lung transplantation using non-penetrating vascular clips for anastomosis of the pulmonary artery. *Thorac Cardiovasc Surg* 48: 120-122, 2000
- 59) 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* 50:472-479, 2000
- 60) 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* 191:426-433, 2000
- 61) Jinzaki M, Tanimoto A, Mukai M, Ikeda E, Kobayashi S, Yuasa Y, Narimatsu Y, Murai M: Double-phase helical CT of small renal parenchymal neoplasms: correlation with pathologic findings and tumor angiogenesis. *J Comput Assist Tomogr* 24:835-42, 2000
- 62) S. Miyamoto, N. Nagaya, T. Satoh, S. Kyotani, F. Sakamaki, M. Fujita, N. Nakanishi, K. Miyatake. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 487-492; 2000.

- 63) N. Nagaya, T. Satoh, T. Nishikimi, M. Uematsu, S. Furuichi, **F. Sakamaki**, H. Oya, S. Kyotani, N. Nakanishi, Y. Goto, Y. Masuda, K. Miyatake, K. Kangawa. Hemodynamic, renal and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 101 (5): 498-503; 2000.
- 64) T. Hasuda, T. Satoh, A. Shimouchi, S. Kyotani, **F. Sakamaki**, N. Nagaya, N. Nakanishi, K. Miyatake. Improvement in exercise capacity with nitric oxide inhalation in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Circulation* 101: 2066-2070; 2000.
- 65) H. Oya, N. Nagaya, T. Satoh, **F. Sakamaki**, S. Kyotani, M. Fujita, N. Nakanishi, K. Miyatake. Haemodynamic correlates and prognostic significance of serum uric acid in adult patients with Eisenmenger syndrome. *Heart* 84: 53-58; 2000.
- 66) **F. Sakamaki**, T. Satoh, N. Nagaya, S. Kyotani, H. Oya, N. Nakanishi, S. Kuribayashi, Y. Ishida. Correlation between severity of pulmonary arterial hypertension and 123I-metaiodobenzylguanidine left ventricular imaging. *J Nucl Med* 41: 1127-1133; 2000.
- 67) N. Nagaya, T. Nishikimi, M. Uematsu, T. Satoh, S. Kyotani, **F. Sakamaki**, M. Kakishita, K. Fukushima, Y. Okano, N. Nakanishi, K. Miyatake, K. Kangawa. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 102: 865-870; 2000.
- 68) **F. Sakamaki**, S. Kyotani, N. Nagaya, N. Sato, H. Oya, T. Satoh, N. Nakanishi. Increased Plasma P-selectin and Decreased Thrombomodulin In Pulmonary Arterial Hypertension Were Improved By Continuous Prostacyclin Therapy. *Circulation* 102: 2720-2725; 2000.
- 69) N. Nagaya, T. Nishikimi, M. Uematsu, T. Satoh, H. Oya, S. Kyotani, **F. Sakamaki**, K. Ueno, N. Nakanishi, K. Miyatake, K. Kangawa. Hemodynamic and hormonal effects of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Heart* 84: 653-658; 2000.
- 70) **坂巻文雄**: 原発性肺高血圧症 - 内科的治療を中心に-. 呼吸と循環 48 (9). 915-919; 2000.
- 71) **坂巻文雄**, 佐藤徹, 京谷晋吾, 永谷憲歳, 蓮田聡雄, 佐藤長人, 中西宣文, 国枝武義: 難治性肺高血圧の最新の治療法 1-2) NO ガス吸入の臨床効果-慢性効果-. *Therapeutic Research* 21 (9): 2041-2042; 2000.
- 72) 永谷憲歳, 岡野嘉明, 佐藤長人, 大谷秀雄, **坂巻文雄**, 京谷晋吾, 佐藤徹, 中西宣文, 国枝武義: 難治性肺高血圧の最新の治療法 2) 経口 PGI₂ の臨床効果と使用法. *Therapeutic Research* 21 (9): 2043-2045; 2000.
- 73) **坂巻文雄**, 中西宣文: 病態に応じた在宅酸素療法(HOT)をめざして; チアノーゼ型先天性心疾患. *HOME CARE TODAY* vol. 4 (3). 72-74; 2000.
- 74) **坂巻文雄**: ARDS up-to date 2000; エラストアーゼ阻害薬の可能性と展望. *Progress in Medicine* 20 (11): 2215-2218; 2000.
- 75) 佐藤長人, 京谷晋吾, **坂巻文雄**, 永谷憲歳, 大谷秀雄, 中西宣文: 全身性エリマトーデス, 抗リリ脂質抗体症候群を合併した慢性肺血栓栓症肺高血圧型に肺動脈血栓内膜摘除術を施行した 3 例. *日呼吸会誌* 38 (12): 958-964; 2000.
- 76) Yan Liu, Yin Wang, Munekazu Yamakuchi,

Sumikazu Isowaki, Etsuro Nagata, Yuichi Kanmura, Isao Kitajima, **Ikuro Maruyama**. Upregulation of Toll-Like Receptor 2 Gene Expression in Macrophage Response to Petidoglycan and High Concentration of Lipopolysaccharide Is Involved in NF-kB Activation. *Infection and Immunity*. 69(5): 2788-2796. 2000

77) Krishna Pada Sarker, Soichi Obara, Masanori Nakata, Isao Kitajima, **Ikuro Maruyama**. Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Letters* 472:39-44, 2000

78)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

2. 学会発表

(1) 国島伸治、小嶋哲人ら：連鎖解析による May-Hgglin Anomaly 責任遺伝子座の同定 第62回日本血液学会、福岡、平成12年3月

(2)石黒和博、小嶋哲人ら：ジーンターゲティングを用いたフォーカルアドヒージョンにおけるリュウドカンの機能解析 第62回日本血液学会、福岡、平成12年3月

(3)K. Ishiguro, and T. Kojima: Syndecan-4 (Ryudocan) is a transmembrane protein with heparansulfate glycosaminoglycans. XVth International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, Hamamatsu, Japan, 平成12年6月

(4)石黒和博、小嶋哲人ら：シンデカン4 (リュウドカン) 欠損による胎盤胎児血管の障害 第23回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成12年11月

(5)小嶋哲人、高木明ら：Long PCR 法を用いた血液凝

固第VIII因子遺伝子の逆位 (Inversion) 解析 第23回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成12年11月

(6)高木明、小嶋哲人ら：血液凝固第XIII因子の遺伝子多型解析 第23回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成12年11月

(7)山本晃士、小嶋哲人ら：LPS投与老齢マウスにおけるPAI-1、TF発現変化と血栓傾向第23回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成12年11月

(8)竹下享典、小嶋哲人ら：早期老化モデル「klotho遺伝子欠損マウス」における線溶系因子の発現と病理学的検討 第23回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成12年11月

(9)清水敦哉、小嶋哲人ら：アラニンスキャニング法を用いた血小板膜蛋白GP Ib α 鎖のVWFへの結合機序の解明 第23回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成12年11月

(10)清水敦哉、小嶋哲人ら：抗GP Ib α 鎖抗体を用いたGP Ib α 鎖のVWFへの結合機序の解明 第23回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成12年11月

(11)石黒和博、小嶋哲人ら：ジーンターゲティングにより解明されたシンデカン4 (リュウドカン) の生体における機能と疾患における役割 第23回日本分子生物学会、神戸、平成12年12月

(12)Miyamoto K, **Kitamoto Y**, Tokunaga H, Tomita K Administration of VEGF165 suppresses endothelial injury and promotes repair of impaired glomeruli in experimental glomerulonephritis. *Mol Biol Cell* 11 (suppl) 235a, 2000

(13)腎炎系球体でのトロンビン産生とその病態生理学的意義 **北本康則**、今村隆寿、福井博義、成瀬正浩、富田公夫 *日本腎臓学会誌* 42, 192, 2000
二次性腎疾患における尿中トロンビン活性の病態生理学的意義 **北本康則**、今村隆寿、福井博義、富田公夫 *臨床病理* 48 (suppl) 148, 2000

- (14) VEGF による糸球体構築とその維持 北本康則、竹屋元裕、徳永 寛、富田公夫 日本臨床生理学雑誌 (suppl) 30, 2000
- (15) 石田 晋、篠田 啓、川島晋一、小口芳久、岡田保典、池田栄二：若年発症の糖尿病網膜症における線維血管膜の VEGF 産生遊走グリア細胞による自己増殖機構. 第 104 回日本眼科学会 平成 12 年 4 月 京都
- (16) 池田栄二、石田 晋、岡田保典：増殖糖尿病網膜症血管新生における VEGF - VEGF 受容体系の関与. 第 89 回 日本病理学会総会 平成 12 年 4 月 大阪 ワークショップ III 血管病変の分子病理学的解析
- (17) Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E: Co-expression of VEGF-R2 and neuropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy. 2000 Annual Meeting, Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, April 30-May 5, 2000)
- (18) Ikeda E, Okada Y: Changes in the expression of vascular endothelial growth factor isoforms correlate with blood-brain barrier induction in the developing brain. XIth International Vascular Biology Meeting (Geneva, Switzerland, September 5-9, 2000)
- (19) Ishida S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E: Co-expression of VEGF-R2 and neuropilin-1 facilitates fibrovascular proliferation in diabetic retinopathy. XIth International Vascular Biology Meeting (Geneva, Switzerland, September 5-9, 2000)
- (20) 坂巻文雄、京谷晋吾、永谷憲歳、佐藤長人、大谷秀雄、中西宣文：肺循環障害における呼気中一酸化窒素 (NO) 濃度と肺血行動態の関係. 第 64 回日本循環器学会総会 (2000.4.1-4.3, 大阪).
- (21) 坂巻文雄、京谷晋吾、永谷憲歳、佐藤長人、大谷秀雄、中西宣文：高血圧を伴う慢性肺血栓性症例における血漿中トロンボモジュリン測定の意義. 第 64 回日本循環器学会総会 (2000.4.1-4.3, 大阪).
- (22) F. Sakamaki, S. Kyotani, N. Nagaya, H. Oya, N. Sato, T. Satoh, N. Nakanishi: Decreased plasma level of thrombomodulin in chronic pulmonary thromboembolism improved after pulmonary thromboendarterectomy. American Thoracic Society (ATS) 2000. 96 th International Conference (May 5-10, 2000, Toronto, Canada).
- (23) F. Sakamaki, A. Taguchi, T. Kurita, W. Shimizu, K. Suyama, N. Nagaya, S. Kyotani, N. Satoh, N. Aihara, N. Nakanishi, S. Kamakura: Serum KL-6 level in subjects treated with amiodarone with and without pulmonary complications. American Thoracic Society (ATS) 2000. 96 th International Conference (May 5-10, 2000, Toronto, Canada).
- (24) 坂巻文雄: 呼吸(肺)機能検査の現状と展望. 第 3 回呼気病態生化学研究会; 教育講演 (2000.6.24, 大阪) .
- (25) 坂巻文雄、佐藤徹、大谷秀雄、京谷晋吾、佐藤長人、永谷憲歳、中西宣文、宮武邦夫. 睡眠時呼吸障害を伴う慢性低左心機能患者に対する夜間酸素療法および式非侵襲的持続陽圧呼吸療法の導入. 第 48 回日本心臓病学会学術集会(2000.9.11-9.13, 大阪).
- (26) 坂巻文雄：心疾患および肺循環疾患領域における在宅酸素療法の実態と可能性. 第 65 回日本循環器学会総会 (2001.3.25-3.27, 京都).
- (27) F. Sakamaki, S. Kyotani, H. Oya, N. Nagaya, N. Sato, N. Nakanishi: Exhaled nitric oxide level can divide patients with pulmonary arterial hypertension into two subgroups that have different response to prostacyclin therapy. 第 65 回日本循環器学会総会 (2001.3.25-3.27, 京都).
- (28) F. Sakamaki, S. Suzuki, S. Sakuragi, S. Takagi, Y. Yasumura, N. Aihara, T. Sato, H. Takaki, Y. Goto. Improvement of ventilation-carbon dioxide production slope may depend on cigarette smoking level and early cardiac rehabilitation after acute myocardial infarction. 第 65 回日本循環器学会総会

(2001.3.25-3.27, 京都).

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にあり、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) / プロテイン C システムが存在し、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、ラディカルスカベンジャー作用、活性化プロテイン C が NF- κ B 活性化抑制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多機能性の細胞である。この抗血栓活性発現にはトロンボモデュリン (TM) / プロテイン C 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。活性化プロテイン C は活性化第 V、VIII 因子を水解する。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 とプロテイン C 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)、エンドトキシン (LPS)、TNF α で刺激して、その細胞毒性を調べた。それらの活性に対する rTM と活性化プロテイン C の効果を検討した。また細胞内 H₂O₂ の産生量をフルオロスキャンで調べた。NF κ B の活性化をゲルシフトアッセイで調べた。
- 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 H₂O₂ の産生を濃度依存性に抑制した (rTM の 0.2 μ M で 20%, 0.5 μ M で 29%, 1 μ M で 40% の抑制)。
- 2) HUVEC を PMA で刺激した時の細胞障害は 1 μ M 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。
- 4) 活性化プロテイン C は TNF α 、LPS 刺激による NF κ B の活性化を抑制した。

D. 考察

rTM は抗酸化作用、ラディカルスカベンジャー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“ウオーターフロント”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