

in 336 Japanese patients. *Int J Hematol* 73: 194-198, 2001

4. Nakahara M, Iida H, Urata M, Fujise M, Wakiyama M, Kinoshita S, Tsuda H, Okamura T, Yao K, Yao T, Hamasaki N. A novel splice acceptor site mutation of Protein S gene in affected individuals with type I Protein S deficiency: Allelic exclusion of the mutant gene. *Thromb Res* 101: 387-393, 2001
5. Kanaji T, Kanaji S, Osaki K, Kuroiwa M, Sakaguchi M, Mihara K, Niho Y, Okamura T. Identification and characterization of two novel mutations (Q421K and R123P) in congenital factor XII deficiency. *Thromb Haemost* 86 : 1409-1415, 2001
6. Sugio Y, Okamura T, Shimoda K, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Niho Y, Inaba S, Fujimura Y.
Ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura with an IgGtype

inhibitor to von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Int J Hematol* 74 : 347-351, 2001

7. Yoshimoto K, Yakushiji K, Ijuin H, Ono N, Hashiguchi M, Imamura R, Ogata H, Okamura T, Sata M, Hashimoto H Colour Doppler ultrasonography of a segmental branch of the portal vein is useful for early diagnosis and monitoring of the therapeutic course of veno-occlusive disease after allogenic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 115: 945-948, 2001
8. Asano Y, Maeda M, Uchida N, Yokoyama T, Osaki K, Shimoda K, Gondo H, Okamura T, Okamura S, Niho Y. Immunosuppressive therapy for patients with refractory anemia. *Ann Hematol* 80: 634-638, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

糖尿病症例におけるメイラード反応後期生成物と

血管内皮細胞障害との関連に関する研究

分担研究者 垣下 榮三

兵庫医科大学総合内科

研究要旨

糖尿病症例における血栓性合併症とメイラード反応後期生成物(advanced glycation endproducts; AGE)の関連が注目されており、血中セロトニン濃度も糖尿病症例では高値であることが知られている。一方 hepatocyte growth factor (HGF)は肝細胞に対する増殖因子であるが、血管内皮細胞にも特異的に増殖作用を及ぼすとされており、糖尿病症例においては高血糖状態の持続により、血管内皮細胞障害が起こり、HGFの産生が増加していることが想定される。糖尿病症例の血栓性合併症のマーカーとして血中HGF値の有用性を評価することを目的として、糖尿病症例の頸動脈病変を調査し血中HGF濃度とAGEの関連性について検討した。糖尿病症例において血中AGE濃度と血小板凝集の間に正相関関係が認められ、AGEは糖尿病症例における血栓形成傾向と関連することが示唆された。血中HGF濃度は高値を示し、年齢、頸動脈の内膜・中膜肥厚、プラークスコアと正相関し、頸動脈における血管内皮細胞障害に基づく変化であることが考えられた。一方HGFはHbA1cとは相関せず、AGEと相関が認められ、この変化は長期間の高血糖による血管内皮障害を背景としたものと考えられた。またHGFは血中PAI-1濃度と正相関を認めた。これらの結果より、血中HGF値は糖尿病症例において長期間の高血糖状態の結果生じた血栓形成傾向を基盤とした血管合併症のマーカーになりうると考えられた。

A. 研究目的

Advanced Glycation Endproducts 以下 AGE はさまざまな組織に加齢に伴って、或いは糖尿病・アルツハイマー病といった病的老化状態において蓄積の増加することが知られており、老化物質の一つとして注目されている。我々はこれまでに、AGEの血小板凝集に対する作用を ex vivo, in vitro でレーザー散乱光凝集測定装置を用いて測定し、AGEは血小板の凝集、殊にセロトニン凝集を亢進させることを明らかにし、報告してきた。一方、糖尿病患者において血栓性合併症とAGEの関連が注目されており、血中セロトニン濃度も糖尿病患者では高値であることが知られている。また Hepatocyte growth factor 以下 HGF は肝細胞に対する増殖因子として知られるようになったが、肝細胞だけでなく血管内皮細胞にも特異的に増殖作用を及ぼすとされている。糖尿病患者に於いては高血糖状態の持続により、血管内皮細胞障害が起こり、血管内皮特異的

増殖因子 HGF の産生が増加していることが想定される。この糖尿病における HGF 産生増加は、網膜症などの血管増殖性合併症の進展に関与することは既に知られている。我々は2型糖尿病患者の血栓性合併症として頸動脈病変を調査し、血中HGF濃度との関連性について、他の血中マーカーとともに比較検討した。

B. 研究方法

対象はこの1年間に当科に入院した2型糖尿病患者、男性29名・女性21名で平均年齢は60.1歳であった。対象とした2型糖尿病患者より早朝空腹時に採血を行い、3.8%クエン酸ナトリウム10分の1容で抗凝固した全血を80G 10分間遠沈してPRPを得た。これにセロトニンを加え、レーザー散乱光凝集測定装置を用いて小凝集塊生成を測定した。また、血清を分離し、血中HGF濃度をELISA法にて測定した。一方、頸動脈病変の評価として頸動脈エコー検査を行い、内

頸動脈内中膜複合体厚とプラークスコアを測定した。さらに、血中 AGE、PAI-1 濃度も ELISA により測定し、関連性を検討した。In vitro の検討では、ヒトアルブミンを 250mM グルコースを含む PBS で、8 週間・37°C でインキュベートすることにより AGE を作成した。また、対照としてグルコースを含まない PBS で同じく 8 週間インキュベートしたヒトアルブミンを用意した。健常人より得た PRP 180 μ l に、作製した AGE アルブミン 20 μ l を加え 5mg/ml とし、血小板凝集の測定は 3 分間プレインキュベートした後セロトニンまたは ADP を加え、凝集塊生成を観察した。なお各対象症例には研究概要を口頭で説明し、血液検体採取および頸動脈エコー検査施行の同意を得た。

C. 研究結果

対象とした 2 型糖尿病患者の患者背景は、次のとおりである。糖尿病罹病期間は平均 12.4 年。HbA1c は $8.1 \pm 1.9\%$ 血管合併症は、単純性網膜症が 6 例、前増殖性網膜症が 6 例、増殖性網膜症が 4 例。また、腎症では早期腎症 4 例、顕性腎症 16 例であった。血小板凝集能についての検討では、小凝集塊生成のピーク値の平均で比較すると、対照健常例での 1.277 に比べて糖尿病症例では 1.373 とピーク値が高い傾向がみられた。糖尿病患者の血小板凝集能と血中 AGE 濃度、ヘモグロビン A1c、空腹時血糖値、年齢との関連を検討した。血小板凝集能は、セロトニン 10 μ M による小凝集塊生成のピーク値を以て表した。糖尿病症例では、セロトニンによる小凝集塊生成は血中 AGE 濃度と正相関する傾向が認められたが、空腹時血糖やヘモグロビン A1c との相関は無かった。全症例の血中 HGF 濃度と年齢の相関を検討した。糖尿病患者に於いては患者年齢と血中 HGF 濃度には正相関が認められ、糖尿病症例では高年齢になるのに従い HGF は高値を示した。HGF と中長期的な血糖コントロールの関連を検討した。血中 HGF 濃度は、HbA1c とは相関が認められなかったが、血中 AGE 濃度とは正相関が認められた。HGF と頸動脈病変との相関を検討した。糖尿病患者に於いては、血中 HGF 濃度と頸動脈内中膜

厚およびプラークスコアは正相関した。すなわち、頸動脈病変の進行した症例ほど HGF は高値を示すことが明らかになった。糖尿病患者の血中 HGF 濃度と血中 PAI-1 濃度の関連を検討した。

糖尿病患者に於いては血中 HGF 濃度と血中 PAI-1 濃度は正相関した。In vitro の検討では、セロトニン 10 μ M の刺激により血小板は小凝集塊を一時的に生成し、その後解離する。小凝集塊生成のピーク値で比較すると AGE-Alb の添加により、セロトニン 10 μ M による血小板凝集塊生成は対照に比べて亢進した。一方、ADP 1 μ M の刺激では、血小板は大凝集塊を形成してしまい、AGE による影響は判然としない。そこで 0.5 μ M と低濃度の ADP で刺激すると、血小板はセロトニン刺激の時と同様に一時的に小凝集塊を形成し、その後解離した。小凝集塊生成のピーク値で比較すると、AGE-Alb の添加により、ADP 0.5 μ M による血小板凝集塊生成は、セロトニンの時と同様に対照に比べて亢進した。セロトニン刺激による血小板小凝集塊生成を、AGE アルブミン添加量を変えて測定した各濃度における、ピーク値の平均値で比較すると、添加した AGE アルブミンの濃度依存性に血小板小凝集塊生成は亢進した。

D. 考 察

セロトニンによる血小板凝集能についての検討では、対照健常例に比べて糖尿病症例では高い傾向がみられ、糖尿病患者では血小板凝集が亢進していることを示している。糖尿病症例では、セロトニンによる小凝集塊生成は血中 AGE 濃度と正相関する傾向が認められたが、空腹時血糖やヘモグロビン A1c との相関は無かったことから糖尿病患者においては血栓形成傾向の亢進に AGE が関与している可能性が示唆された。血中 HGF 濃度は、HbA1c とは相関が認められなかったが、血中 AGE 濃度とは正相関が認められた。このことより、今回検討した 2 型糖尿病患者に於いては、HGF はより長期の血糖コントロールを反映する AGE と相関すると考えられた。糖尿病患者に於いては血中 HGF 濃度と血中 PAI-1 濃度は正相関した。我々は PAI-1 が、糖尿病症例にお

いて血栓性合併症のリスクを示す指標になることを既に報告している。今回、HGF と PAI-1 が相関を認めたことより、HGF は血栓形成傾向を示す可能性が示唆された。

E. 結論

1. 糖尿病患者において血中 AGE 濃度と血小板凝集の間に正相関が認められた。
2. 糖尿病患者の血中 HGF 濃度は上昇し年齢、頸動脈の内中膜厚、プラークスコアと正相関し、動脈硬化における血管内皮障害に基づく変化であることが考えられた。
3. 血中 HGF 濃度が HbA1c とは相関が無く、血中 AGE 濃度と正相関したことより、この変化はより長期間の高血糖による血管内皮障害を背景としたものと考えられた。
4. 血中 HGF 濃度はプラークスコア、血中 PAI-1 濃度と正相関を認めたことより、糖尿病症例において血中 HGF 濃度は長期間の高血糖状態の結果生じた血栓形成傾向を基盤とする血管合併症のマーカーになりうると思われた。
5. これら AGE の血小板凝集に対する亢進作用は老化による血栓傾向の増大や糖尿病における血栓

性合併症の発症に関与すると思われる。

G. 研究発表

1. 長谷川善一、末廣 謙、澤田暁宏、紺屋浩之、日笠 聡、難波光義、垣下榮三：2 型糖尿病におけるメイラード反応後期生成物(AGE)の血管新生作用への関与について。第 24 回日本血栓止血学会(平成 13 年 11 月、京都)
2. 長谷川善一、紺屋浩之、佐谷かほり、浜口朋也、郡 耕介、末廣 謙、難波光義、垣下榮三：2 型糖尿病患者における血管合併症のリスクファクターと血中 HGF 濃度との関連性。第 16 回日本糖尿病合併症学会(平成 13 年 10 月、大阪)
3. 長谷川善一、末廣 謙、紺屋浩之、浜口朋也、郡 耕介、難波光義、垣下榮三：2 型糖尿病患者の血小板機能亢進におけるメイラード反応後期生成物(AGE)の関与。第 44 回日本糖尿病学会(平成 13 年 4 月、京都)
4. 長谷川善一、末廣 謙、澤田暁宏、丸茂幹雄、辻岡 洋、紺屋浩之、浜口朋也、日笠 聡、難波光義、垣下榮三：メイラード反応後期生成物と血小板機能。第 98 回日本内科学会(平成 13 年 4 月、横浜)

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

下肢深部静脈血栓症の実践的診断法

分担研究者 川崎 富夫

大阪大学附属病院血管外科

研究要旨

下肢深部静脈血栓症（DVT）の早期診断と治療は、肺塞栓症予防による生命予後の改善のみでなく、医療経済上も合理的である。一般医療施設つまり中小規模病院にて現実に施行できるDVT迅速診断法が無いことから、広く一般医療施設を対象とした、高精度、安全、迅速簡便な方法として、造影剤を使用せず、1スライス撮影のみのため放射線被爆量を胸部X P程度まで低下させ、旧式の装置でも診断可能な、CT scanを使用した実践的な方法を新しく考案した。下腿部中枢側のCT画像1枚において、患側と健側で筋束の断面積を比較してその違いを比較する方法である。筋束断面積比が1.1以上である場合に視覚にて認識可能となるが、この面積比（つまり視認可能かどうか）をcut-offとすると、下腿部DVTの約90%をスクリーニング可能であり、リンパ浮腫などの非特異的な下肢腫脹を除外診断できることも明らかになった。

A. 研究目的

急性深部静脈血栓症（DVT）は、肺塞栓を引き起こして重篤になりやすい。急性DVTを早期に診断し治療することは、引き続いて起こる肺塞栓症を予防し生命予後を改善するのみでなく、医療経済的にも合理的である。DVT患者は基幹病院に紹介された時点ですでに重症化しているのが実状であることから、一般医療施設（中小規模病院）の段階で施行できる信頼性の高いDVT迅速診断法が求められていた。現在、DVTに対する一般医療施設の啓蒙状況を考慮すると、DVT診断目的で新しい機器の購入と診断トレーニングのために投資する余力がある一般医療施設は少ないと考えられる。私たちは、我が国の現状と保健医療の特殊性を考慮して、一般医療施設が現状で受け入れやすく、精度が高く、安全で、簡便かつ迅速に施行できる方法として、CT scanの単純撮影を使用した実践的な方法を考案した。一般医療施設がDVTの実践的診断法を持つこと自体が、DVTの診断に対する自信につながり、一般医療施設に対するDVTについての最も効果的な啓蒙手段であると考えられる。さらに、日常診療における患者との対話において説明が行き届き、その結果、一般住民のDVTに対する興

味が高まると予想される。この一般住民に対する啓蒙が、DVT患者が軽い症状のうちに受診することにつながり、結果として真の意味でのDVTの早期診断と早期治療につながっていくと考えており、これが最終目標といえる。以上より、単純CTを使用した急性DVTの実践的な診断法の確立を進めているが、大腿部DVTに関しての診断能力の高さに関してはすでに明らかにしてきたので、今回は従来診断が困難であった下腿DVTに対して、この診断法の有効性を検討した。

B. 研究方法：

平成11年1月から平成13年12月までに、急性下腿腫脹を呈した患者は13例であった。DVT 6例、リンパ浮腫3例、蜂窩織炎3例、筋肉出血1例であった。DVTの確定診断は、duplex scan、静脈造影、R I静脈造影にて行った。造影剤を使用しない単純CTにて、下腿中枢側（最大周径部）を1枚（1スライス）撮影した。CT画像の処理は、画像をCTスキャン自体のコンピューターを使用するか、あるいはCT画像をパーソナルコンピューターに取り込んで大腿部筋束の断面積を計算し、患側の断面積を健側の断面積で割った値（下腿筋束断面積比：CMR）を求めた。また、

CT画像上で患側および健側の大腿部筋束の断面積の差を、視覚にて判別可能かどうかについて検討し、コンピューターによる解析結果と比較した。

C. 研究結果

急性DVT患者、リンパ浮腫患者、蜂窩織炎患者、筋肉出血患者のそれぞれのCMRは 1.3 ± 0.2 (n=6)、 1.0 ± 0.1 (n=3)、 1.0 ± 0.03 (n=3)、 1.2 (n=1)であり、DVTとリンパ浮腫、ならびにDVTと蜂窩織炎の間には有意な差があった ($p < 0.05$)。CMRのcut-off値として、視覚認識可能な1.15という値が妥当と考えられた。このcut-off値を使用した場合には、sensitivity 83%、specificity 86%、accuracy 85%であった。

D. 考 察

急性DVTによる下肢腫脹の本態は、静脈うっ滞による筋肉腫脹であり、急性DVTに合併する肺塞栓は、筋肉収縮時の急激な静脈圧上昇が引き金となる。単純CTを用いた我々の方法は、筋肉の腫脹に注目して、他覚的にかつDVTの専門でない医師にもDVTの診断が容易に行える。この方法で、下腿のDVTの診断率は約90%で、非特異的下腿腫脹の除外診断も可能である。またこの方法は、一般医療施設の(場合によっては旧式の)CT装置でもDVT迅速診断法が可能であり、高精度、安全、迅速簡便な診断方法である。造影剤を使用しないので造影剤の副作用の心配が無く、3~5mm幅の1スライス撮影のみでよいことから放射線被曝量も非常に少ない。以上より、今

回のCTを用いた迅速診断法は、一般医療施設で施行可能な方法であるとともに信頼性も高く、DVTの早期治療開始に結びつくことから、真の意味で実践的である。今後、CT検査料の算定方法、DVT発生頻度が高い診療科への協力要請、情報公開等が必要と考えられる。

E. 結 論

下腿部中枢側の単純CT画像1枚にて患側と健側で筋束の断面積を比較してその違いを視覚にて比較する方法により、下腿部DVTの約90%を診断可能で、非特異的な下肢腫脹の除外診断も可能であった。この方法は一般病院ですぐに実践可能な診断法である。

F. 研究発表

静脈学 13(1)、39-43、2002.

深部静脈血栓症の診断におけるCT画像と血液凝固検査を用いたスクリーニング法
渋谷 卓、川崎富夫

学会発表

深部静脈血栓症の診断と治療戦略

第101回日本外科学会総会、2001年、サージカルフォーラム

川崎富夫、渋谷 卓、藤村博信、中村 隆、青野泰久、辻 慶久、上田篤史、徳永 勝、有吉秀男、門田守人、末久悦次、金倉 譲

G. 知的所有権の取得

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

アンチトロンビン・ノックアウトマウスの作製と表現型解析

分担研究者 小嶋哲人

名古屋大学医学部

研究要旨

生理的抗凝固因子・アンチトロンビン（AT）の欠乏症は深部静脈血栓症の危険因子として知られているが、その完全欠損症例は文献報告もなく胎児致死に至ると考えられていた。本研究で AT 欠損型マウスの作製解析を行った結果、完全欠損型は 14.5 日目まではほぼ正常に成長したが、その後心筋、肝臓類洞に広範な血栓形成を起し、消費性凝固障害ならびに肝障害に伴う広範な皮下出血や頭蓋内出血のため死亡することが示唆された。また、AT 欠損型ヘテロマウスでの LPS 投与敗血症モデルでの血栓形成傾向は、ヒト・AT 製剤による補充療法により改善することも確認された。

A. 研究目的

アンチトロンビン（AT）は血漿中でトロンビンによる血液凝固を阻害する蛋白分解酵素インヒビターの一つであり、血液の流動性を維持するのに貢献している。AT 欠乏症／異常症にはさまざまなタイプがあり、主に深部静脈に血栓を起す危険因子として知られている。しかし、AT が完全に欠損した症例の文献報告はないため、その完全欠損は胎児致死にいたると考えられてきたが、詳細は不明であった。我々は特定の遺伝子を破壊するジーンターゲティングの手法を用いて AT 欠損型マウスを作成し、マウスの胎児発生における AT の役割を解析した。さらに、AT 欠乏マウスにおける血栓傾向について解析を行った。

B. 研究方法

マウス AT gene をもとにネオマイシン耐性遺伝子とジフテリア毒素 A フラグメント遺伝子によるポジティブ・ネガティブセレクション用ターゲティングベクターを作成し、ES 細胞に導入後 G-418 入り ES 培地により選択培養し、PCR およびサザン解析して相同組換え体を単離・同定した。変異 ES 細胞を C57BL/6J マウスの胚盤胞に注入して仮親から生まれたキメラマウスを交配し、ヘテロ変異マウスを得た。次に、ヘテロ変異マウスの雄雌を交配してホモ体の作成を行った。

AT 欠失マウスは死産もしくは胎内死亡して生まれてこないことが判明したため、各妊娠時期の胎児を解析してその死因ならびに発生異常の起こる病態の解明を行った。一方、ヘテロ変異マウスは外見上も野生型マウスと同様に生まれ、血栓症の自然発生を認めないため、LPS 投与による血栓誘発条件下での血栓形成の違いについて両マウスで比較検討した。すなわち、大腸菌由来の LPS を投与した 4 時間後に各臓器を摘出し、抗フィブリン抗体を用いた免疫染色で血栓形成の評価を行った。さらに、ヒト・AT 製剤による療法での LPS 誘発血栓症の予防効果について検討した。なお、動物実験に際しては名古屋大学医学部動物実験指針に基づき、動物愛護の精神のもとに動物に与える苦痛を最小限にし、行う実験も必要最小限に止めた。

C. 研究結果

AT 遺伝子の 1 アレルが欠損した、いわゆるヘテロマウスどうしを交配したところ、妊娠 14.5 日目まではメンデルの法則に従い各遺伝子型の胎児が得られ、その野生型胎児と AT 欠損型胎児との間に外見上の差異を認めなかった。しかし、AT 欠損型胎児では妊娠 15.5 日で約 70%、妊娠 16.5 日では 100% に広範な皮下出血を伴う死亡を認め、AT 欠損型新生児は 1 匹も得ることはなかった。これらの死亡 AT 欠損型胎児を組織学的に

解析したところ、心筋と肝臓に広範なフィブリンの沈着を認めた。特に、肝臓では動脈や中心静脈ではなく類洞に沿ってフィブリンの沈着を認めた。これらのフィブリン沈着は、軽度ではあるものの生存していた妊娠 15.5 日の全ての AT 欠損型胎児にも認められた。更に、妊娠 14.5 日の AT 欠損型胎児を 4 匹調べた結果、そのうち 1 匹において心筋の一部にフィブリンの沈着を認めた。すなわち、これらのフィブリン沈着が単なる死後変化でないことが確認された。一方、脳や肺などの他の組織には明らかなフィブリン沈着を認めなかった。一方、AT 遺伝子の 1 アレルが破壊されたヘテロマウスは正常に発育し、妊娠、出産なども特に明らかな血栓症をもたらすことなく行われた。また、ヘテロマウスは血漿中の AT 抗原量、活性値はそれぞれ野生型マウスの 60.9%、55.3% と低下しており、ヒトにおけるタイプ 1 AT 欠乏症と同様の病態であると考えられた。次に、大腸菌由来の LPS 投与を行う血栓誘発条件下での血栓形成の違いについて検討した。LPS 投与の 4 時間後に各臓器を摘出し、抗フィブリン抗体を用いた免疫染色で血栓形成の評価を行ったところ、ヘテロマウスでは腎臓糸球体ならびに肝臓類洞にフィブリン沈着を認め、ヘテロマウスにおいてより著明で糸球体血栓形成率はヘテロマウスにおいて有意に高値を示した。一方、マウスに 20 時間の拘束ストレスを与えたところ、やはりヘテロマウスにおいて糸球体血栓形成率が有意に高値を示した。次に、LPS 投与前に AT を補充することにより血栓形成が抑制されるかどうかを検討した。そこで、LPS 投与 30 分前に AT 製剤を 50 単位/kg 投与したヘテロマウス（野生型マウスと同程度の AT 活性値を示す）と、コントロールとして同量の生理食塩水を投与したヘテロマウスの糸球体血栓形成率を比較したところ、糸球体血栓形成率は AT 補充群がコントロール群に比べ有意に低く、AT の補充は血栓形成を抑制することが証明された。

D. 考 察

AT は妊娠後期の胎児生存に必須であり、特に心筋と肝臓における血液凝固の制御に重要な

役割を果たしていることが示唆された。AT 欠損型死亡胎児では広範な皮下出血部位や頭蓋内出血部位でもフィブリンの沈着を認めず、消費性凝固障害ならびに肝障害に伴うフィブリンノゲンの欠乏が出血性死因の一つと示唆された。また、AT 欠乏マウスは血栓症を自然に発症せず、LPS 投与や過度のストレスの曝露により著明な血栓形成傾向を認め、さらにヒト AT 製剤の予防投与で LPS 投与による血栓形成が抑制できたことより、ヒト AT 欠乏症のマウスモデルとしてその病態解析に有用であると考えられる。

E. 結 論

ジーンターゲット法を用いて AT 欠損マウスを作成した結果、AT 完全欠損型は妊娠 14.5 日以降、心筋、肝臓類洞に広範な血栓形成を起こし、消費性凝固障害および肝障害に伴う広範な皮下出血や頭蓋内出血のため死亡することが判明した。また、AT 欠損型ヘテロマウスはヒト AT 欠乏症のマウスモデルとして有用で今後の血栓症病態解析への活用が期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. S. Kunishima, T. Kojima, T. Matsushita, T. Tanaka, M. Tsurusawa, Y. Furukawa, Y. Nakamura, T. Okamura, N. Amemiya, T. Nakayama, T. Kamiya, and H. Saito: Mutations in the NMMHC-A gene cause auto-somal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). *Blood* 97 (4): 1147-1149, 2001.
2. T. Kojima, A. Takagi, M. Maeda, T. Segawa, A. Shimizu, K. Yamamoto, T. Matsushita, and H. Saito: Plasma Levels of Syndecan-4 (Ryudocan) Are Elevated in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Thromb Haemost* 85 (5): 793-799, 2001.
3. K. Ishiguro, K. Kadomatsu, T. Kojima, H. Muramatsu, S. Matsuo, K. Kusugami, H. Saito, and T. Muramatsu: Syndecan-4

- Deficiency Increase Susceptibility to k-Carrageenan-Induced Renal Damage. *Lab. Invest.* 81 (4), 509-516, 2001.
4. T. Murate, Y. Banno, K. T-Koizumi, K. Watanabe, N. Mori, A. Wada, Y. Igarashi, A. Takagi, T. Kojima, H. Asano, Y. Akao, S. Yoshida, H. Saito, and Y. Nozawa: Cell type-specific localization of sphingosine kinase 1a in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 49(7): 845-55, 2001.
 5. T. Iwaki, T. Matsushita, T. Kobayashi, Y. Yamamoto, Y. Nomura, K. Kagami, T. Nakayama, I. Sugiura, T. Kojima, J. Takamatsu, N. Kanayama, H. Saito: DNA sequence analysis of protein S deficiency-identification of four point mutations in twelve Japanese subjects. *Semin. Thromb. Hemost.* 27(2): 155-60, 2001.
 6. T. Shimokawa, K. Yamamoto, E. Yamafuji, T. Kojima, H. Saito: Expression of Protein S in the Murine Heart and Cultured Mouse Cardiomyocytes, Is Down-regulated by Cytokines. *Thromb. Haemost.* 86 (2): 623-629, 2001.
 7. Shirahata A, Kamiya T, Takamatsu J, Kojima T, Fukutake K, Arai M, Hanabusa H, Tagami H, Yoshioka A, Shima GM, Naka GH, Fujita GS, Minamoto Y, Kamizono J, Saito H.: Clinical trial to investigate the pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and efficacy of recombinant factor VIIa in Japanese patients with hemophilia with inhibitors. *Int. J. Hematol.* 73 (4): 517-525, 2001.
 8. K. Ishiguro, K. Kadomatsu, T. Kojima, H. Muramatsu, M. Iwase, Y. Yoshikai, M. Yanada, K. Yamamoto, T. Matsushita, M. Nishimura, K. Kusugami, H. Saito and T. Muramatsu: Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J. Biol. Chem.* 276, (50), 47483-47488, 2001.
 9. S. Kunishima, T. Matsushita, T. Kojima, N. Amemiya, Y.M. Choi, N. Hosaka, M. Inoue, Y. Jung, S. Mamiya, K. Matsumoto, Y. Miyajima, G. Zhang, C. Ruan, K. Saito, K.S. Song, H.-J. Yoon, T. Kamiya, H. Saito: Identification of six novel MYH9 mutations and genotype-phenotype relationships in autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *J. Hum. Genet.* 46:722-729, 2001
 10. 山田貴之、高木 明、中出祐介、村手 隆、柳田正光、中山享之、山本晃士、松下 正、高松純樹、齋藤英彦、小嶋哲人：Long-PCR法を用いた血液凝固第VIII因子遺伝子の逆位解析 *血栓止血学会誌* 12 (3): 187-196, 2001
 11. 中山享之、小嶋哲人：プロテインS欠乏症 *血栓止血学会誌* 12 (3): 235-239, 2001
1. 学会発表
 1. T. Kojima, A. Takagi, M. Maeda, et al.: Plasma Levels of Ryudocan (Syndecan-4) Are Elevated in Patients with Acute Myo-cardial Infarction. XVIIth Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Paris, France, 平成13年7月
 2. K. Ishiguro, T. Kojima, Y. Nakayama, et al.: Antithrombin deficiency causes embryonic lethality accompanied with fibrin deposition in the myocardium and liver in mice. XVIIIth Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Paris, France, 平成13年7月
 3. H. Saito, T. Kojima, K. Ishiguro, et al.: Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. International Symposium on Receptors and Ion Transporters in Cardiovascular System, Suita, Japan, 平成14年2月
 4. 国島伸治、神谷忠、小嶋哲人：シンポジウム1 血液疾患とゲノム医学 5. ポジショナルクロニングによる May-Hegglin Anomaly 責任遺伝子の同定 第63回日本血液学会、名古屋、

平成 13 年 4 月

5. 石黒和博、小嶋哲人、中山由紀子ら：プレナリーセッション 2 マウスアンチトロンビン完全欠損による胎児死亡 第 63 回日本血液学会、名古屋、平成 13 年 4 月
6. 柳田正光、石黒和博、小嶋哲人ら：アンチトロンビン欠乏マウスに対する LPS 投与の影響 第 63 回日本血液学会、名古屋、平成 13 年 4 月
7. 小嶋哲人、高木明、前田雅弘ら：心筋梗塞患者における ryudocan 血中濃度 第 63 回日本血液学会、名古屋、平成 13 年 4 月
8. K. Ishiguro, T. Kojima, K. Kusugami, et al.: Syndecan-4 Deficiency Increases Susceptibilities to Thrombosis in the Fetal Vessels of the Placenta, k-Carrageenan Induced Renal Damage and

Lipopolysaccharide Induced Lethality. 第 63 回日本血液学会、名古屋、アジアンセッション、平成 13 年 4 月

9. 山本晃士、竹下享典、小嶋哲人ら：拘束ストレス負荷マウスにおける PAI-1 の発現変化—TNF-alpha の関与— 第 24 回日本血栓止血学会学術集会、京都、平成 13 年 11 月
10. 石黒和博、小嶋哲人、山本晃士ら：リュドカン欠損によるエンドトキシンショックの増悪 第 24 回日本血栓止血学会学術集会、京都、平成 13 年 11 月

G. 研究協力者

高木明、村手隆：名古屋大学医学部保健学科
石黒和博、柳田正光、中山享之、竹下享典、山本晃士、松下 正、：名古屋大学医学部第一内科
齋藤英彦：国立名古屋病院

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

癌細胞による止血機構への挑戦

分担研究者 坂田 洋一

自治医科大学分子病態研究部

研究要旨

腎盂移行上皮癌による vascular intimal carcinomatosis を基礎疾患とし、顕著な一次線溶亢進により重篤な出血傾向を呈した症例について、癌細胞による血栓形成抑制機構の側面から解析した。移行上皮癌組織摘出標本から細胞株 SS-TCC を樹立した。免疫組織染色にて、SS-TCC は TFPI、u-PAR、MMP-2、MT1-MMP を発現していた。SS-TCC は 3 次元コラーゲンゲル上で培養すると、血管内皮細胞に類似した管腔様構造を形成した。SS-TCC 細胞株を SCID マウスに移植することにより xenograft model を作製した。SS-TCC はマウス皮下で増殖し、腫瘍組織内に組織学的に血管様構造を示した。血栓形成に果たすプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系との連関機構を解析した。エラスターゼ刺激により細胞表面上のプラスミノゲンの結合活性が増加した。この結合活性の増加は、プラスミノゲンの C 末端ドメイン群（クリングル 5+ 活性ドメイン）に依存することが明らかにされた。またプラスミノゲンは、エラスターゼ遺伝子の転写活性を約 30% まで低下させた。さらにプラスミンによるフィブリン分解産物の濃度依存性（0 - 1microM）に影響を受けるプロモーター領域（-1045 - -1121）が存在することが明らかとなった。このことから、フィブリン分解物によるエラスターゼ遺伝子の転写調節機構の存在が示唆された。

A. 研究目的

癌細胞の増殖は、癌周辺部組織における血管新生に依存するものと考えられている。一方で、癌細胞がその増殖に必要な酸素や栄養分の補給を自ら行うことにより、血管新生に依存しない代替機構を有することが報告されている。特に癌細胞の血管擬態は、癌細胞が血管内皮細胞の血管構築を模倣し宿主周辺正常組織との間で液性因子の積極的な交換を可能にするものであり、臨床的には虚血攻撃による癌の発育抑制の観点から、また基礎的には血管内皮細胞が有する抗血栓性の本態の解明する上で重要な概念である。我々は、顕著な一次線溶亢進病態をきたした臨床例において病理学的に癌細胞が血管内面を被覆した形で発育増殖する vascular intimal carcinomatosis という極めて特異な病態をみだし、本研究ではこの臨床例を解析することにより、癌細胞が血液凝固系を巧みに制御し局所における血栓形成反応を回避する機序を明らかにすることを目指した。

血栓溶解には、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系を介する酵素反応が主たる役割を果たしている。しかしプラスミノゲン先天性欠損患者には血栓症がみられないことが指摘されており、これらの患者では血液中の白血球由来エラスターゼ活性の高値がみられ、精製プラスミノゲンを投与することによりそのレベルが正常化する。このことは、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系とエラスターゼ系との連関機構が存在することを示唆している。そこで単球系細胞株を用い、プラスミノゲンの細胞表面への結合活性に与えるエラスターゼの作用と、エラスターゼ遺伝子の転写活性に及ぼすプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系の影響をエラスターゼ遺伝子プロモーター領域の deletion mutants を用いて解析した。

B. 研究方法

1) SS-TCC 細胞株の樹立：患者手術摘出腎組織から移行上皮癌部を採取し、15%ウシ胎児血清添

加 MEM 培地にて培養し、接着因子非存在下での壁着性を有する細胞群を選択し、成長因子非添加にて継代を繰り返し安定した増殖性 (doubling time: 1.5 days) を示す細胞株 SS-TCC を確立した。

2) SS-TCC の免疫組織染色：細胞株 SS-TCC をチャンバースライド上で培養し 4%パラホルムアルデヒドによる固定後、抗ヒト von Willebrand factor (vWF) 抗体、抗ヒト tissue factor pathway inhibitor (TFPI) 抗体、抗ヒト thrombomodulin (TM) 抗体、抗ヒト an-nexin II 抗体を用いて、内皮細胞としての特徴および抗血栓性因子の発現の有無について免疫組織学的に解析した。また、フィブリノゲンの分解に関わる因子として、抗ヒト urokinase type plasminogen (u-PA) 抗体、抗ヒト u-PA 受容体 (u-PAR) 抗体、抗ヒト matrix metalloproteinase 2 (MMP2) 抗体、抗ヒト MMP9 抗体、抗ヒト membrane type1-MMP (MT1-MMP) 抗体、MT2-MMP 抗体を用い解析した。

3) 3次元コラーゲンゲル上での SS-TCC の培養：SS-TCC を 3次元コラーゲンゲル (マトリゲル, BecktonDikinson) 上で培養し形態変化を観察するとともに、SS-TCC および臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) をそれぞれ蛍光色素 (Cell Tracker, Molecular Probe) で標識し、3次元コラーゲンゲル上で直接的共培養を行い、両細胞間の相互作用を検討した。

4) SS-TCC の SCID マウスへの移植モデルの確立：抗アシアロ GM1 抗体を腹腔内に前投与した SCID マウスの背部皮下に、 1×10^7 個の SS-TCC を移植し 1週ごとに腫瘍径を計測した。移植後 4週間目に腫瘍を切除し、免疫組織学的解析を行った。

5) THP-1 細胞へのプラスミノゲン結合活性の解析：単球系細胞株である THP-1 へのプラスミノゲンの結合活性のエラスターゼ刺激による変化を、Alexa488 (Molecular Probe) で蛍光標識した Glu-プラスミノゲンおよびその分画 (ミニプラスミノゲンおよびクリングル 1+2+3 フラグメント) を用いて FACSscan により検討した。

6) 白血球エラスターゼプロモーターの解析：エ

ラスターゼ遺伝子プロモータ領域 (-1282 - +1) をクローニングし、5' 側を順次削除した deletion mutants を作製した。これらの cDNAs をルシフェラーゼレポータープラスミドベクター (pGL3, Promega) に組み込んだ後、THP-1 細胞および 3T3 細胞にトランスフェクションし、プラスミノゲンおよびその派生物の刺激によるプロモーター活性をルミノメーター (LB96V, Berthold) で測定した。

(倫理面への配慮) 臨床研究を実施する上で、ヘルシンキ宣言の基本原則を遵守し、被験者の人権に充分配慮しかつ不利益性や危険性を排除するとともに、インフォームドコンセントを取得し研究を遂行した。

C. 研究結果

1) 臨床例の病理学的解析：左腎盂原発の移行上皮癌を基礎疾患とし、顕著な一次線溶亢進病態をきたし重篤な出血傾向を呈した症例 (平成12年度研究で報告) について剖検標本の病理学的解析を行った。肺動脈には動脈壁内面を被覆するように高円柱状の腫瘍細胞が単層から 2, 3層に並んで増殖し、腫瘍細胞の動脈壁への浸潤は内膜に局限しており、中膜や外膜にはみられない (図1)。腫瘍細胞と循環血液が直接的に接するにも関わらず血栓形成はみられず、血栓は内皮が剥離し腫瘍細胞の被覆を伴わない部位に局限していた。腫瘍細胞は cytokeratin 染色および CA19-9 染色が陽性であり、浸潤部では腺管構造がみられた。このような癌細胞の発育増殖は極めて特異であり、病理学的に血管内膜癌症 (vascular intimal carcinomatosis) とされる病態である。

2) 細胞株 SS-TCC の樹立：vascular intimal carcinomatosis をきたす本癌細胞の止血栓制御機構を解析するため、摘出腎移行上皮癌部から得た組織を培養、継代し、細胞株 SS-TCC を樹立した。SS-TCC は、接着因子の非存在下で壁着活性を有し、増殖因子非依存性に安定した増殖性を示した。SS-TCC は、単核小型細胞と多核大型細胞の 2種類の細胞集団で構成されていた。SS-TCC の免疫組織染色では、抗血栓性因子として TFPI が発現していた (図2)。一方で u-PA および

u-PAR が共に陽性であることや MMP2 と MT1-MMP の発現がみられており、フィブリノゲンの分解にプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系およびマトリックスメタロプロテアーゼ系という複数の機構の関与が示唆された。また、SS-TCC は 3 次元コラーゲンゲル上で管腔様構造を形成し、HUVECs との共培養系では両細胞は有機的に接着、伸展し管腔形態を構成した。

3) SCID マウス移植モデルの解析：抗アシアロ GM1 抗体を前投与した SCID マウスの背部皮下に 1×10^7 個の SS-TCC を移植した。SS-TCC はマウス皮下にて増殖し、移植後 2 週間で径約 8mm 大の肉眼的に赤褐色の血管に富む腫瘍を形成した (図 3)。移植した腫瘍辺縁部に管腔構造が複数箇所みられ、内腔にはいずれも赤血球を主体とした血球細胞貯留が認められた。管腔は血管内皮細胞を欠き腫瘍細胞により構築されており、管腔内側にフィブリン血栓は存在しなかった。

4) プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系との連関機構の解析：THP-1 細胞へのプラスミノゲン結合活性のエラスターゼ刺激による変化を、Alexa488 蛍光標識 Glu-プラスミノゲンおよびその分画 (ミニプラスミノゲン、クリングル 1+2+3) を用いて、FACSscan により検討した。エラスターゼ刺激により細胞表面上のプラスミノゲンの結合活性が増加すること、この増加はプラスミノゲン分子のクリングル 5 および活性ドメインに依存することが明らかになった (図 4)。次に、プラスミン系がエラスターゼ産生に与える影響を検討するために、プラスミノゲンとその派生物質やプラスミンによるフィブリノゲン分解産物が、エラスターゼ遺伝子の転写活性に及ぼす効果を解析した。エラスターゼ遺伝子プロモータ領域 (-1282 - +1) をクローニングし、5'側を順次削除した deletion mutants を作製した。これらの cDNAs をルシフェラーゼレポータープラスミドに組み込み、THP-1 細胞および 3T3 細胞に一過性発現させ、刺激物質を加えることで転写活性を検討した。プラスミノゲンは、生理的濃度 ($1 \mu\text{M}$) においてエラスターゼ遺伝子の転写活性を約 30% まで低下させた。さらに、-1045 から -1121 の領域にはフィブリノゲン分解

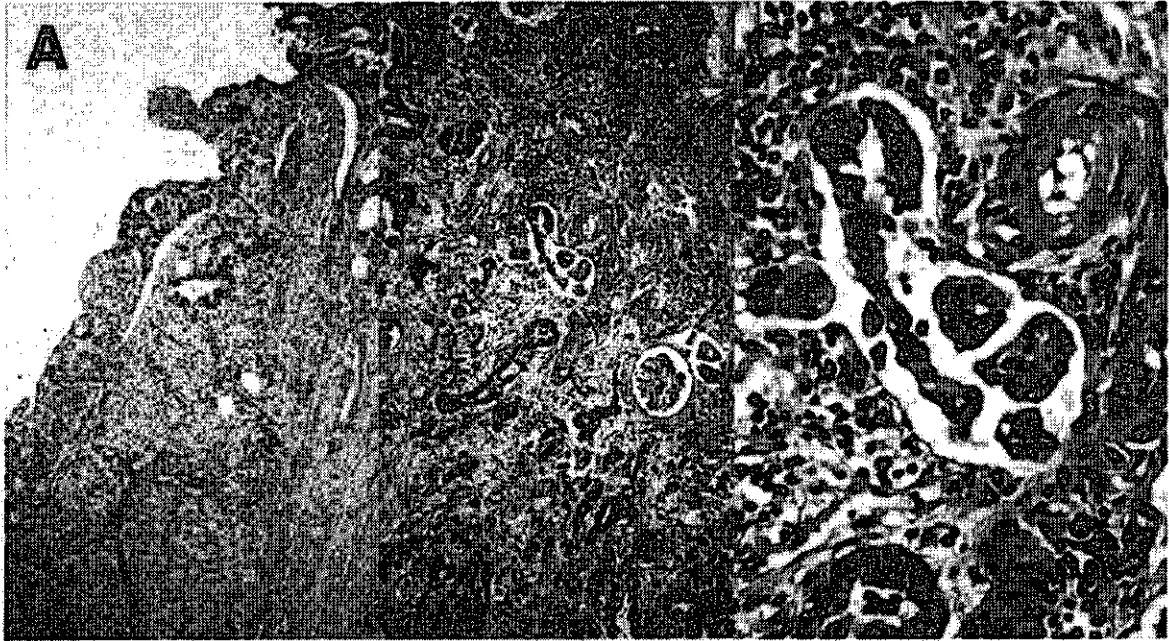
物に濃度依存性 ($0-1 \mu\text{M}$) に直接的あるいは間接的な影響を受ける部位が存在することも明らかとなった。

D. 考 察

一次線溶亢進により重篤な出血傾向を呈した症例は、病理学的に癌細胞が動脈壁内側を被覆した状態で発育増殖する vascular intimal carcinomatosis という極めて特異な病態を呈していた。腫瘍細胞が血管内面において如何に抗血栓性を有し血液の流動性を保持しているかを解析するために、原発巣から得られた癌組織を培養継代し細胞株 SS-TCC を樹立した。SS-TCC は免疫染色にて TFPI を発現していることから、外因系凝固反応の開始段階を抑制し止血栓の形成を制御している可能性が示唆された。また SS-TCC が u-PA および uPAR を発現していることや、MMP-2 や MT1-MMP が免疫組織学的に陽性を示したことから、腫瘍細胞表面上においてこれらの機構によりフィブリノゲンが分解されていることが示唆される。我々はこれまでに、本例の循環血液中にはフィブリノゲンを分解し得る液性因子が存在しないことを報告しており (平成 12 年度研究)、SS-TCC で得られた知見は臨床病態と一致するものと考えられた。さらに SS-TCC が 3 次元コラーゲンゲル上で血管内皮細胞と共役的に血管構築を行うことをみいだしたが、腫瘍細胞が血管内皮細胞の存在する血管壁に接着、増殖していく機序を明らかにする上で重要なモデルであり、今後さらなる解析を行う予定である。

SS-TCC を SCID マウスに移植し、xenograft モデルを確立した。移植した SS-TCC は、マウス皮下において腫瘍を形成し組織学的に特徴のある増殖形態を示した。腫瘍辺縁部には赤血球を主成分とした血球細胞を内包した管腔が形成され、管腔壁に血管内皮細胞が存在しないにも関わらず血栓形成をきたすことなく腫瘍細胞が血管様構造を構築していた。これらはいわゆる血管擬態 (vascular mimicry: Maniotis, A.J., et al. Am J Pathol 155: 739, 1999) に相当するものと考えられる。vascular intimal carcinomatosis から得られた細胞株 SS-TCC の xenograft モデルが血

Lt Kidney



Rt Main Pulmonary Artery

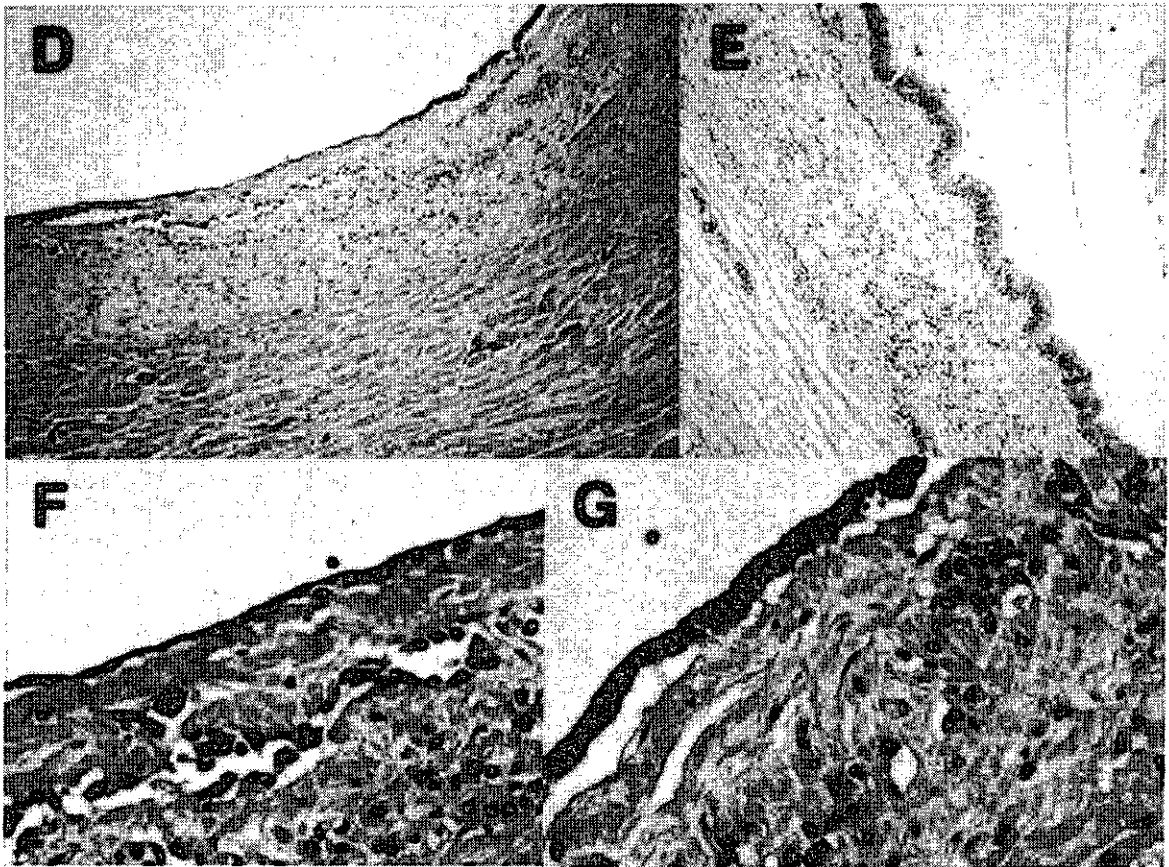


図1. 左腎原発巣および左肺動脈の病理組織 (HE 染色) : 腎盂内増殖部は papillary transitional cell carcinoma (A) であるが、浸潤部は線癌成分が主体である (B, C)。左肺動脈には正常血管内皮 (D) に連続する血管内膜癌症がみられる (E - G)。

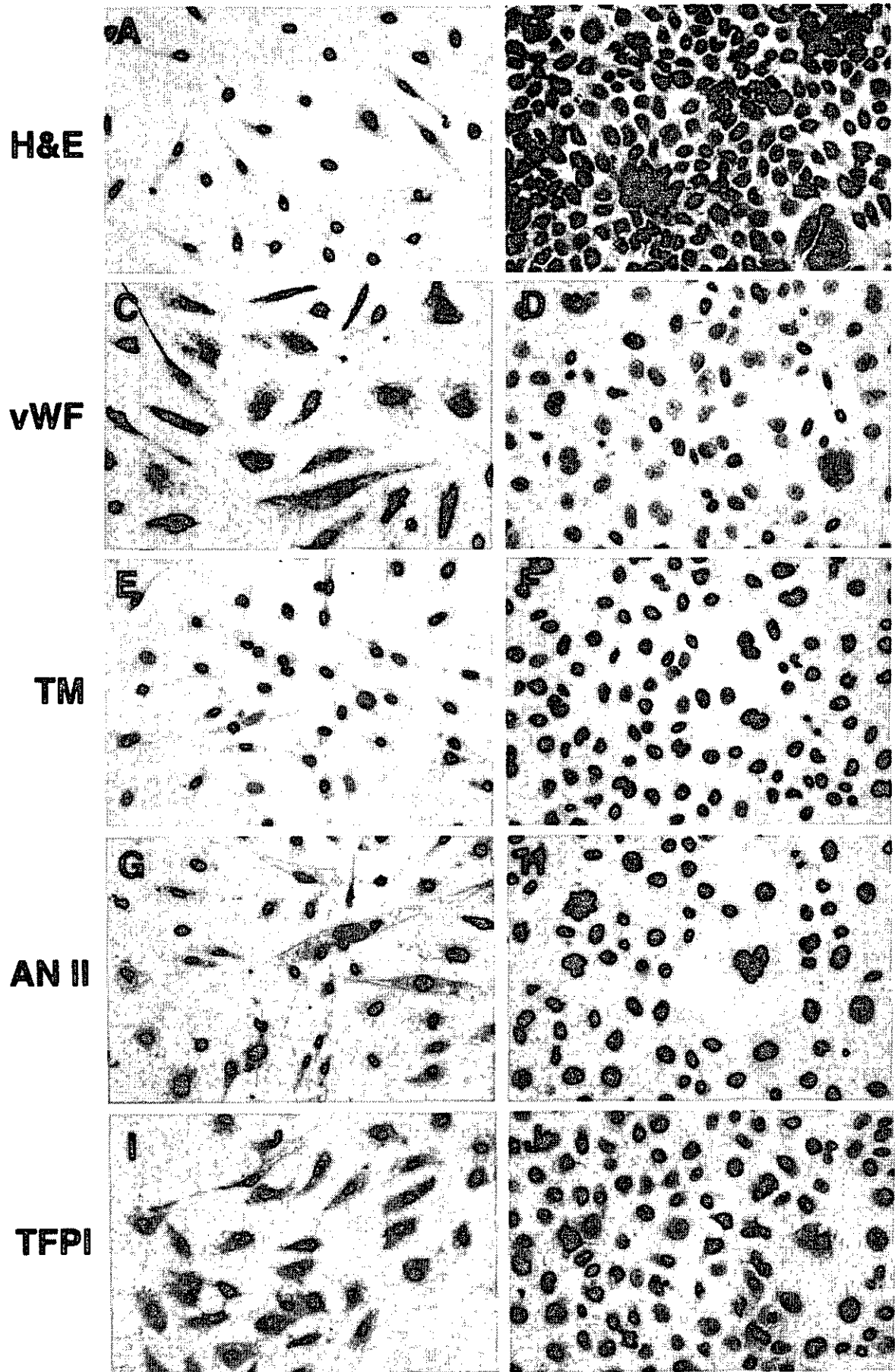


図2. SS-TCC の免疫組織染色：SS-TCC および血管内皮細胞 (HUVEC) をそれぞれチャンバースライド上で培養後、HE 染色および各抗体による免疫組織染色を行った。

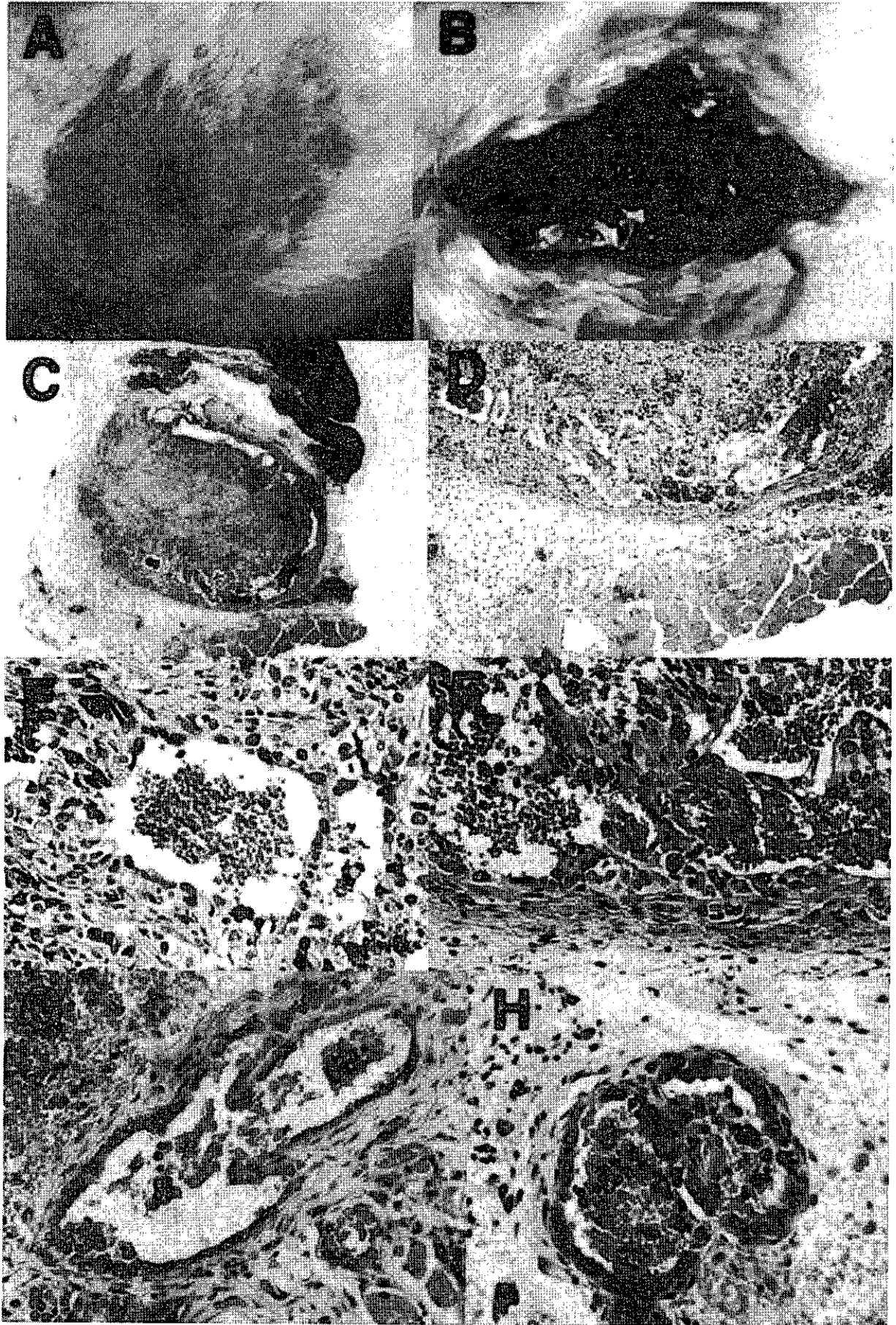


図3. SS-TCCのSCIDマウスへの移植モデルの作製：SS-TCCをマウス背部皮下に移植し、2週後に解析した。SS-TCCはマウス皮下において生着増殖し、赤褐色の腫瘍を形成した(A, B)。腫瘍のH&E染色像(C: 40X, D: 100X, E-H: 400X)。

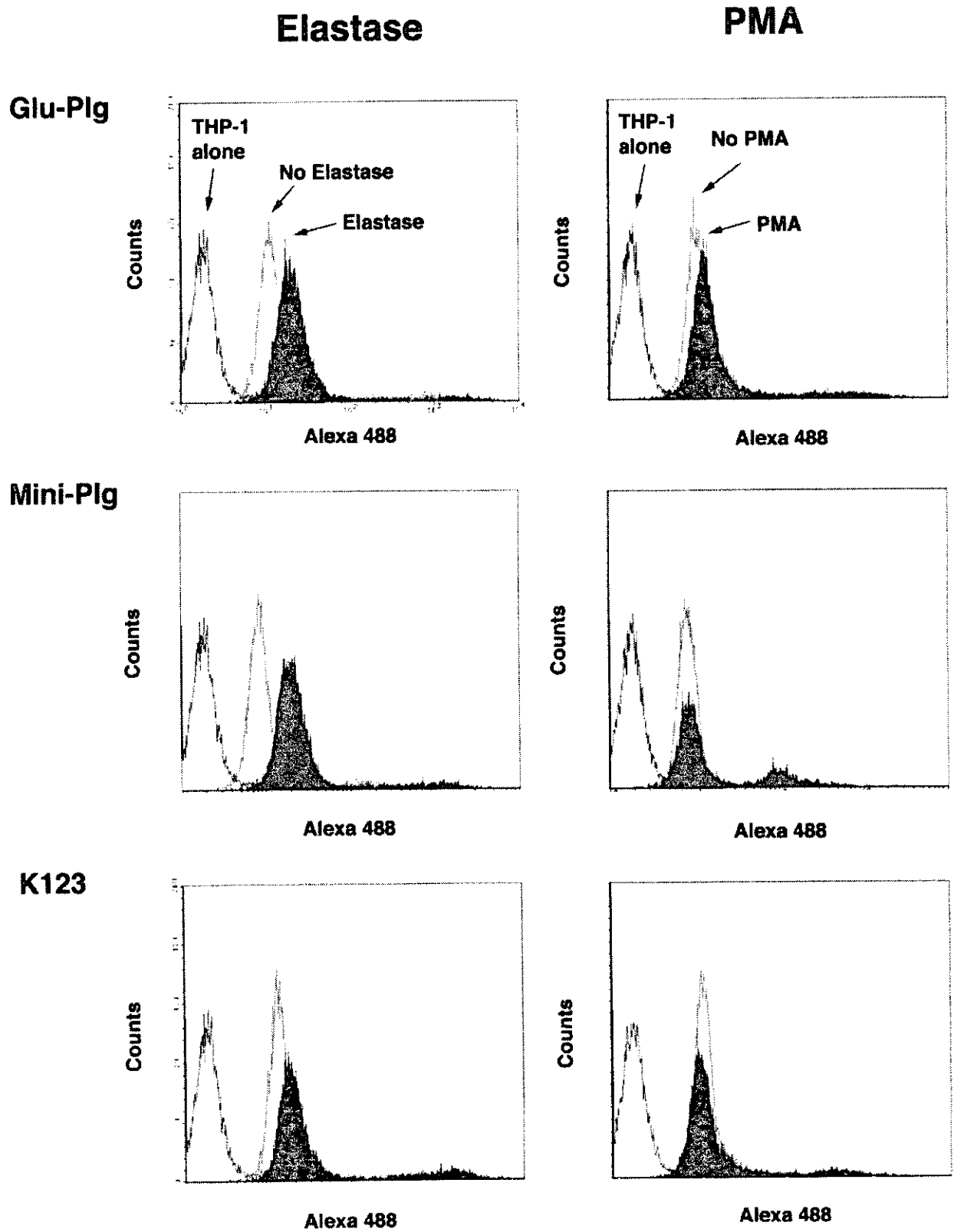


図4. THP-1細胞におけるプラスミノゲンの結合活性に与える白血球エラスターゼの効果：プラスミノゲンおよびその派生物をそれぞれ Alexa488 で蛍光標識し、白血球エラスターゼ (1 μ M) またはフォルボールエステル (10nM) 処理で処理した THP-1 細胞へ添加し、その結合活性を FACSscan にて解析した。

管擬態を示したことは、両病態が類似した機序により惹起される可能性を示すものであると考えられる。

血栓形成に果たすプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系との関連機構を解析した。エラスターゼ刺激により細胞表面上のプラスミノゲンの結合活性が増加した。この結合活性の増加は、プラスミノゲンのC末端ドメイン群(クリングル5+活性ドメイン)に依存することが明らかにされた。この結合様式はフォルボールエステル刺激とは明らかに異なり、これまでに報告されている結合形態にはない新規のものであることが示唆された。エラスターゼ処理により、膜表面に発現するレセプタはプラスミノゲン減少時に膜表面でのプラスミンを介する組織線溶を効率よく進行させるための機構と解釈される。現在、新しいレセプタの本体を明らかにする仕事を進めている。一方でプラスミノゲンは、エラスターゼ遺伝子の転写活性を約30%まで低下させた。さらにプラスミンによるフィブリン分解産物の濃度依存性(0-1microM)に影響を受けるプロモーター領域(-1045--1121)が存在することが明らかとなった。このことから、フィブリン分解物によるエラスターゼ遺伝子の転写調節機構の存在が示唆された。PAI-1遺伝子で報告されているように、フィブリン分解物が直接核内に移行し転写因子の結合活性を制御し転写調節を行っているか否かに関して今後さらに解析を進める必要がある。

E. 結 論

顕著な一時線溶亢進病態をきたした臨床例において、vascular intimal carcinomatosisという極めて特異な癌細胞の発育増殖形態をみいだした。本例から樹立した細胞株SS-TCCは、血管内皮細胞の有する抗血栓機構とともにu-PA/u-PAR系およびマトリックスメタロプロテアーゼ系を駆使し細胞表面上でフィブリン分解を起こしていることが明らかとなった。SS-TCCのxenograftモデルの解析により、vascular intimal carcinomatosisと血管擬態との類似性が示唆された。血栓形成に果たすプラス

ミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系との関連機構を解析し、エラスターゼによる細胞表面へのプラスミノゲン結合活性の制御、プラスミノゲンによる直接のおよびフィブリン分解物を解する間接的なエラスターゼ遺伝子に対する転写調節機構が存在することが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Madoiwa, S., Nakamura, Y., Mimuro, J., Furusawa, S., Koyama, T., Sugo, T., Matsuda, M., Sakata, Y.: An Autoantibody against Prothrombin aberrantly alters the Proenzyme to facilitate Formation of a Complex with its Physiological Inhibitor Antithrombin III without Thrombin Conversion. *Blood* 97: 3783-3789, 2001.
2. Mimuro, J., Muramatsu, S., Hakamada, Y., Mori, K., Urabe, M., Madoiwa, S., Hirokawa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Recombinant AdenoAssociated Virus Vector-Transduced Vascular Endothelial Cells Express The Thrombomodulin Transgene Under The Regulation of Enhanced Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promoter. *Gene Therapy* 8: 1690-1697, 2001.
3. Watanabe T, Minakami H, Sakata Y, Obara H, Wada T, Onagawa T, Sato I.: Effect of Heparin on activated partial thromboplastin time in patients undergoing gynecologic or obstetric surgery. *Gynecol. Obstet. Invest.* 51: 178-183, 2001.
4. Watanabe T, Minakami H, Sakata Y, Matsubara S, Tamura N, Obara H, Wada T, Onagawa T, Sato I.: Effect of labor on maternal dehydration, starvation, coagulation, and fibrinolysis. *J. Perinat. Med.* 29:

528 -534, 2001.

5. Hamano A, Tanaka S, Takeda Y, Umeda M, Sakata Y.: A novel monoclonal antibody to fibrin monomer and soluble fibrin for the detection of soluble fibrin in plasma. *Cin.Chim. Acta.*, (in press).
6. Imura O, Kusano E, Takahashi H, Yashiro T, Madoiwa S, Sakata Y, Asano Y.: Effect of ureteral obstruction on gelatinase A in rat renal cortex. *Exp. Nephrology*, (in press)
7. 坂田洋一、目黒輝雄: 慢性透析患者に見られる高ホモシステイン血症の治療. *日本透析会誌* 34: 243-248, 2001.

2) 学会発表

1. 窓岩清治, 三室 淳, 中三川千鶴子, 諏合輝子, 坂田洋一: 一次線溶亢進を呈した腎盂原発移行上皮癌から樹立した細胞株 SS-TCC の解析. 第24回日本血栓止血学会学術集会, 名古屋, 平成13年11月21日.
2. 諏合輝子, 窓岩清治, 三室 淳, 坂田洋一, 松田道生: 異常フィブリノゲンのつくるフィブリン構造. 第24回日本血栓止血学会学術集会, 名古屋, 平成13年11月21日.
3. 佐藤一也, 永嶋貴博, 森 政樹, 和泉 透, 桐戸敬太, 大月哲也, 永井 正, 室井一男, 小松則夫, 小沢敬也, 窓岩清治, 三室 淳, 坂田洋一: 後天性凝固因子インヒビターを合併した急性リンパ球性白血病の1例. 第43回日本臨床血液学会総会, 神戸, 平成13年11月13日
4. Madoiwa, S., Nakamura, Y., Mimuro, J., Furusawa, S., Koyama, T., Sugo, T., Matsuda, M., Sakata, Y.: An autoantibody against prothrombin aberrantly alters the proenzyme to facilitate formation of a complex with its physiological inhibitor antithrombin III without thrombin conversion. XVIII Congress the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Paris, July 6, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特になし

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
総括研究報告書

培養ラット大動脈血管内皮細胞における TPA 及び
PAI-1 mRNA 発現に及ぼす ADP の影響
分担研究者 辻 肇
京都府立医科大学附属病院輸血部

研究要旨

Adenosine 5'-diphosphate(ADP)は、生体内の恒常性の維持に重要な役割を果たしているが、血管内皮細胞における血栓形成調節への関与は十分には明らかにされていない。培養ラット大動脈血管内皮細胞を用い、tissue type plasminogen activator(TPA) 及び plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)の発現に及ぼす ADP の影響について検討した。ADP の添加により TPA mRNA 発現は、濃度依存性に亢進した。P2Y 受容体アゴニストである Adenosine 5'-O-(2-thiodiphosphate) (ADP- β -S) 及び ADP の分解産物である adenosine により TPA mRNA 発現が亢進した。ADP は PAI-1 mRNA 発現を亢進しなかった。ADP、ADP- β -S、adenosine とともに、Angiotensin II(Ang II)刺激による PAI-1 mRNA 発現亢進を濃度依存性に抑制した。以上より、ADP は血管内皮細胞に作用して TPA mRNA の発現を亢進し、Ang II による PAI-1mRNA 発現亢進を抑制すると考えられ、血管内皮細胞を抗血栓方向へ誘導すると考えられた。

A. 研究目的

血管内皮細胞は、TPA や PAI-1 等を産生し、血栓形成調節に関与することが知られる。血管作動性物質の一つである ADP の血管内皮細胞を介した血栓形成調節への役割は明らかではない。血管内皮細胞における TPA 及び PAI-1 の mRNA 産生に及ぼす ADP の作用、さらに Ang II 刺激による PAI-1 発現亢進状態における ADP の影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

実験には、培養ラット胸部大動脈血管内皮細胞を用いた。200~250g の雄性 SD 系ラットより胸部大動脈を切離した後、explant 法にて血管内皮細胞を分離、培養し、2~3 世代の細胞を実験に用いた。1%BSA を含んだ DMEM にて 48 時間のプレコンディショニングを行った後、培養上清中に ADP, ADP- β -S, adenosine 0.1~100 μ M を添加し 3 時間刺激した。また Ang II 1nM を同時添加し 3 時間刺激した。RAECs より total RNA を抽出し、TPA 及び PAI-1 の mRNA 発現量を northern blotting 法にて検討した。

実験は、京都府立医科大学実験動物委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

ADP 0.1~100 μ M 濃度の範囲において、添加濃度に応じて TPAmRNA 発現の亢進を認めた。100 μ M の濃度にては、control に比べ 3.1 倍の発現亢進を認めた。ADP は、細胞表面上に存在するヌクレオチダーゼにより分解されることから、比較的安定した ADP の analog である ADP- β -S を使用し検討した。ADP- β -S を 0.1~100 μ M 濃度の範囲で添加すると、TPAmRNA 発現は濃度依存性に亢進し、100 μ M の濃度にては、control に比べ 3.3 倍の発現亢進を認めた。さらに、血管内皮細胞上に存在するヌクレオチダーゼによる ADP の分解産物である adenosine の TPA mRNA 発現への影響を検討した。Adenosine 0.1~100 μ M 濃度の範囲で、TPA mRNA 発現は添加濃度に依存して亢進し、100 μ M 濃度の adenosine にては、control に比べ 2.2 倍の発現亢進を認めた。一方、ADP 添加による PAI-1mRNA 発現量の変化は認めなかった。