
プロテアーゼ活性化受容体2の生体内分布と
動脈硬化発生・進展における役割

研究課題番号 16590321

平成16年度～平成17年度

科学研究補助金「基盤研究（C）」研究成果報告書

平成18年5月

研究代表者 丸塚浩助

(宮崎大学医学部・助教授)

研究組織

マルツカ コウスケ

研究代表者： 丸塚 浩助（宮崎大学医学部助教授）

研究者番号：00239154

アサダ ユウジロウ

研究分担者： 浅田 祐士郎（宮崎大学医学部教授）

研究者番号：70202588

ハタケヤマ キンタ

研究分担者： 畠山 金太（宮崎大学医学部講師）

研究者番号：60325735

ヤマシタ アツシ

研究分担者： 山下 篤（宮崎大学医学部助手）

研究者番号：90372797

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,300	0	2,300
平成17年度	1,300	0	1,300
総計	3,600	0	3,600

目次

研究発表

1. 学会誌等（投稿論文） ----- 4～6

 原著論文（18編） ----- 4～6

 総説（6編） ----- 7

 著書（2編） ----- 7

2. 学会発表 ----- 8～9

研究成果 ----- 10～12

1. 研究目的 ----- 10

2. 研究成果の概要 ----- 11～12

発表論文別刷 ----- 13～

研究発表

発表論文

(原著論文)

1. **Yamashita A, Furukoji E, Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamamoto H, Tamura S, Ikeda Y, Sumiyoshi A, Asada Y**: Increased vascular wall thrombogenicity combined with reduced blood flow promotes occlusive thrombus formation in rabbit femoral artery. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2004;24(12):2420-2424.
2. **Harada-Shiba M, Takagi A, Marutsuka K, Moriguchi S, Yagyu H, Ishibashi S, Asada Y, Yokoyama S**: Disruption of autosomal recessive hypercholesterolemia gene shows different phenotype in vitro and in vivo. **Circulation Research**, 2004;95(9):945-952.
3. **Nakamura R, Kato J, Kitamura K, Onitsuka H, Imamura T, Cao Y, Marutsuka K, Asada Y, Kangawa K, Eto T**: Adrenomedullin administration immediately after myocardial infarction ameliorates progression of heart failure in rats. **Circulation** 2004;110(4): 426-431.
4. **Kawamoto R, Hatakeyama K, Imamura T, ishikawa T, Date H, Shibata Y, Takenaga M, Asada Y, Eto T**: Relation of C-reactive protein to restenosis after coronary stent implantation and to restenosis after coronary atherectomy. **American Journal of Cardiology**, 2004;94:104-107.
5. **Ishikawa T, Imamura T, Hatakeyama K, Date H, Nagoshi T, Kawamoto R, Matsuyama A, Asada Y, Eto T**: Possible contribution of C-reactive protein within coronary plaque to increasing its own plasma levels across coronary circulation. **American Journal of Cardiology**, 2004;93:611-614.
6. **Ishikawa T, Hatakeyama K, Imamura T, Ito K, Hara S, Date H, Shibata Y, Hikichi Y, Asada Y, Eto T**: Increased adrenomedullin immunoreactivity and mRNA expression in coronary plaques obtained from patients with unstable angina. **Heart**, 2004;90:1206-1210.
7. **Tsuruda T, Kato J, Cao YN, Hatakeyama K, Masuyama H, Imamura T, Kitamura K, Asada Y, Eto T**: Adrenomedullin induces matrix metalloproteinase-2 activity in rat aortic adventitial fibroblasts.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004;325:
80-84.

8. **Sato Y, Hatakeyama K, Yamashita A, Marutsuka K, Sumiyoshi A, Asada Y**: Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. **Heart**, 2005; 91(4):526-530.
9. **Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y**: Adenovirus-mediated transfer of human placental ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus formation in vivo. **Circulation**, 2005;111(6):808-815.
10. **Hatakeyama K, Hao H, Imamura T, Ishikawa T, Shibata T, Fujimura Y, Eto T, Asada Y**: Relation of CD39 to plaque instability and thrombus formation in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. **American Journal of Cardiology**, 2005;95(5):632-635.
11. **Sun H, Koike T, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, Kitajima S, Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen YE, Fan J**: C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. **American Journal of Pathology**, 2005;167(4):1139-1148.
12. **Tsuruda T, Kato J, Matsui E, Hatakeyama K, Masuyama H, Imamura T, Kitamura K, Asada Y, Eto T**: Adrenomedullin alleviates not only neointimal formation but also perivascular hyperplasia following arterial injury in rats. **European Journal of Pharmacology**, 2005; 508(1-3):201-204.
13. **Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Masuyama H, Cao YN, Imamura T, Kitamura K, Asada Y, Eto T**: Antifibrotic effect of adrenomedullin on coronary adventitia in angiotensin II-induced hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, 2005;65:921-929.
14. **Hoshiba Y, Hatakeyama K, Tanabe T, Asada Y, Goto S**: Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelets with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi

obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2006;4(1):114-120.

15. **Nishihira K, Yamashita A, Tanaka N, Kawamoto R, Imamura T, Yamamoto R, Eto T, Asada Y**: Inhibition of 5-hydroxytryptamine receptor prevents occlusive thrombus formation on neointima of the rabbit femoral artery. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 2006;4(1):247- 255.
16. **Yamashita A, Sumi T, Goto S, Hoshiba Y, Nishihira K, Kawamoto R, Hatakeyama K, Date H, Imamura T, Ogawa H, Asada Y**: Detection of von Willebrand factor and tissue factor in platelets-fibrin rich coronary thrombi in acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**, 2006;97(1):26-8.
17. **Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Yamashita A, Nakamura K, Imamura T, Kitamura K, Onitsuka T, Asada Y, Eto T**: Adrenomedullin in mast cells of abdominal aortic aneurysm. **Cardiovascular Research**, 2006;70(1):158-164.
18. **Kawamoto R, Yamashita A, Nishihira K, Furukoji E, Hatakeyama K, Ishikawa T, Imamura T, Itabe H, Eto T, Asada Y**: Different inflammatory response and oxidative stress in neointimal hyperplasia after balloon angioplasty and stent implantation in cholesterol-fed rabbits. **Pathology Research and Practice**, 2006 (in press)

(総説)

1. **Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, and Asada Y**: Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, 2005;12(1):1-8.
2. **畠山金太、丸塚浩助、浅田祐士郎** : 【臨床分子内分泌学 心血管内分泌代謝系】 アドレノメデュリン 基礎研究の進展 アドレノメデュリンの生体内分布と機能 **日本臨床** 2004;62(9):211-215.
3. **丸塚浩助、畠山金太、浅田祐士郎** : 【Vascular Biologyからみた血栓・線溶系】 病理学的見地からみた血栓・線溶系の役割 **分子心血管病** 2005; 6(1):19-26.
4. **畠山金太、丸塚浩助、浅田祐士郎** : 【血栓症に関するQ&A】 基礎 血液凝固系の活性化が起こると、血管新生などの細胞増殖が促進されたり、インヒビターによって抑制されると言われています。それらの機構はどこまで明らかになっているのでしょうか **血栓と循環** 2005;13(2):130-133.
5. **畠山金太、丸塚浩助、山下篤、浅田祐士郎** : 【急性冠症候群(ACS)の最前線】 プラークの破裂とびらんの病理 **血管医学** 2005;6(2):97-104.
6. **畠山金太、丸塚浩助、山下篤、浅田祐士郎、住吉昭信** : 【虚血性心疾患2006】 心と脳の動脈硬化 **成人病と生活習慣病** 2006;35(10):1089-1096
7. **山下 篤** : 動脈硬化性血栓の成長における血管壁の凝固活性と血流の関与 **日本血栓止血学会雑誌** 2006;17(1):29-37.

(出版物)

1. **丸塚浩助、浅田祐士郎** : 病態生理に関する基礎的・臨床的研究 最近の進歩 病態研究 動脈硬化と血小板・凝固線溶系 **医学のあゆみ別冊 血液疾患-state of arts Ver. 3**, pp. 320-323 2005
2. **畠山金太、浅田祐士郎** : プラークラプチャーとエロージョン **血栓症ナビゲーター**、メディカルレビュー社 pp.112-113 2005

学会発表

(特別講演・シンポジウム)

1. **Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, Moriguchi S, Sato Y, Asada Y**: Pathophysiology of thrombogenic event in acute coronary syndrome.
The 36th Japan Atherosclerosis Society Annual Meeting. English Forum 2:
Plaque instability: From molecular mechanisms to clinical applications
(Fukuoka, 2004)

(一般講演)

1. **Hatakeyama K, Marutsuka K, Yamashita A, Moriguchi S, Imamura T, Shibata Y, Fujimura Y, Asada Y**: CD39 expression in human coronary atherosclerotic lesions.
Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-pacific Division (Nagoya, 2004)
2. **川本理一朗、山下 篤、西平賢作、畠山金太、古小路英二、丸塚浩助、今村卓郎、板部洋之、江藤胤尚、浅田祐士郎**: バルーン傷害およびステント挿入後の新生内膜形成における炎症反応, CRP, 酸化ストレスの関与 高脂血症家兎を用いた検討
第36回日本動脈硬化学会学術総会 (福岡, 2004)
3. **斯波真理子、高木敦子、大平望都、安部映理、丸塚浩助、浅田祐士郎、野牛宏晃、石橋 俊、横山信治**: Autosomal recessive hyper-cholesterolemia (ARH) ノックアウトマウスの解析—ARHはLDL受容体取り込みに必要か?—
第36回日本動脈硬化学会学術総会 (福岡, 2004)
4. **畠山金太、浅田祐士郎**: 冠動脈硬化巣におけるCD39/ecto-ATPase 発現の検討
第9回血管病理研究会 (東京, 2004)
5. **Hatakeyama K, Azuma Y, Hao H, Imamura T, Nishihira K, Kawamoto R, Shirai M, Ogawa H, Asada Y**: Lack of association between Chlamydia pneumoniae infection and plaque instability or restenosis in coronary atherosclerotic lesion.
第69回日本循環器学会総会 (横浜, 2005)
6. **Hatakeyama K, Hao H, Imamura T, Ishikawa T, Shibata Y, Fujimura Y, Eto T, Asada Y**: Relation of CD39 to plaque instability and thrombus formation in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris.

第69回日本循環器学会総会（横浜、2005）

7. **Nishihira K, Hatakeyama K, Imamura T, Shibata Y, Itabe H, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H, Eto T, Asada Y**: Thioredoxin and oxidized lipoprotein are increased in unstable plaque obtained by directional coronary atherectomy.
第69回日本循環器学会総会（横浜、2005）
8. **Hoshiba Y, Hatakeyama K, Asada Y, Goto S**: Possible contributing role of tissue factor and activated platelets in the formation of occlusive fibrin-rich coronary thrombi.
第69回日本循環器学会総会（横浜、2005）
9. **Tsuruda T, Kato J, Matsui E, Hatakeyama K, Masutyama H, Imamura T, Kitamura K, Asada Y, Eto T**: Adrenomedullin alleviates not only neointimal formation but also perivascular hyperplasia following arterial injury in rats.
第69回日本循環器学会総会（横浜、2005）
10. **畠山金太、羽尾裕之、丸塚浩助、山下 篤、盛口清香、浅田祐士郎**：冠動脈硬化巣におけるChlamydia pneumonia 感染についての検討
第94回日本病理学会総会（横浜、2005）

研究成果

研究目的

動脈硬化症は、虚血性心疾患・脳血管障害・壊疽等の様々な臓器に重篤な障害を引き起こすとともに、死因の上位を占める疾患群の基盤となる病態であり、その病態の解明と予防・治療法の確立は医学のみならず、社会的にも急務の課題となっている。動脈硬化症の発生・進展について、近年、内膜肥厚を形成する血管平滑筋細胞が骨髄もしくはそれ以外の幹細胞由来であるとの報告があり、動脈硬化発生の機序は混沌としている状態であり、しかも、血液幹細胞が動脈硬化巣を形成する機序の詳細は全く明らかにされていない。我々はこれまでに、動脈硬化巣の進展に伴い、血液凝固系の引き金である組織因子 (TF) が強く発現しており、プラーク破綻に伴って凝固活性が亢進し、これにより血栓形成が惹起され、急性冠動脈症候群の発症に大きく関与することを明らかにしてきた (Atherosclerosis 1998, Thromb Haemost 1998, Circulation 2001)。また、その TF が血液凝固系活性型第 7 因子 (FVIIa) と TF/FVIIa 複合体を形成することによって、血管平滑筋細胞に対して血小板由来増殖因子相当の強力な走化因子であることを見いだした (Thromb Haemost 1996, 1997, Thromb Res 1999)。これらのことより、動脈壁に発現される TF が、FVIIa を介し血管平滑筋細胞の遊走を刺激し、動脈硬化発生に関与していることが示唆されたが、TF/FVIIa 複合体の平滑筋への作用機序は不明であった。近年、トロンビンレセプターのホモログである Protease-activated receptor 2 (PAR2) が TF/FVIIa 複合体により活性化されることが報告され、我々も TF/FVIIa 複合体による血管平滑筋細胞の遊走に PAR2 が関与することを見出した (Thromb Res, 2002)。しかし、細胞表面での TF/FVIIa 複合体と PAR2 との相互関係および血液幹細胞での詳細は未だ不明である。また、PAR2 の組織内分布すら、明確にされていないのが現状である。

これらの背景を踏まえ、以下の 4 点を期間内の目標に掲げ、本研究を進める。

- 1) PAR2 の全身生体内 (ヒト、マウス) 分布、特に、血管平滑筋細胞および血液幹細胞での PAR2 の発現を、特異的抗体を用いて細胞学的および組織学的に確認するとともに、in situ hybridization 法および microdissection 法を用いて分子生物学的に確認する。
- 2) マウス実験的内膜肥厚における PAR2 の役割を各種抑制抗体等を用いて検証する。また、異性間骨髄移植および異性間血管移植により、骨髄由来細胞による内膜肥厚の有無を確認する。
- 3) PAR2 ノックアウトマウスの作製とそのマウスから得られる培養平滑筋細胞および骨髄細胞を用いて、細胞遊走実験を行い、動脈硬化巣形成への影響を検証する。
- 4) TF/FVIIa 複合体と PAR2 との細胞表面での相互関係の検証と細胞内情報伝達を解析する。

研究成果の概要

実験的血栓／内膜肥厚モデルの作製：

GFP マウスの骨髄細胞を雄性 C57BL/6 に移植、生着を確認後、大腿動脈から大動脈にかけてナイロン糸を留置することによって、血栓形成ー内膜肥厚の一連を評価できる新しいモデルを作製し、蛍光顕微鏡下に血栓の器質化巣及び内膜肥厚巣への骨髄細胞由来 GFP 陽性細胞関与を検討した。また、構成細胞を免疫組織学的に同定した。血栓の表面に存在する炎症細胞はほとんどが GFP 陽性であったが、器質化巣および内膜肥厚巣ともに、平滑筋細胞・内皮細胞の形質を示した細胞には GFP 陽性細胞は極少数で構成細胞あたり 1%弱であった。これらのことから、血栓の器質化巣・肥厚巣を構成する細胞はほとんどが血管壁から遊走してきた平滑筋細胞・内皮細胞から成ることあきらかとなり、骨髄由来細胞は関与したとしても極わずかであることが示された。

PAR2-KO マウスにおける血栓の器質化・内膜肥厚：

C57BL/6 マウスとバッククロス 5 代目の PAR2-KO マウスにおいて、上記の方法を用いて血栓器質化・内膜肥厚の差異を検討した。PAR2-KO マウスにおいて若干血栓器質化・内膜肥厚が弱い傾向にあったが有為差は認められなかった。一方、家兔腸骨動脈閉塞性血栓および内膜肥厚モデルを作製(ATVB, 2004)し、この系において、血小板凝集抑制効果とともに PAR2 による細胞内シグナル伝達を抑制すると考えられる CD39 を過剰発現させると血栓形成とともに内膜肥厚を抑制することをあきらかにした (Circulation, 2005)

蛍光顕微鏡による各種検索：

本補助金により購入した顕微鏡画像取り込み装置を用い、ヒト解剖症例およびマウスにおける PAR2 の生体内分布を検討中である。また、上記の蛍光免疫染色による細胞同定とともに、心筋梗塞モデルにおける線維化の定量(Circulation, 2004)、ARH-KO マウスにおける LDL 取り込みの差異を検討した(Circulation Res, 2004)。

血栓の組成の検討：

人体における血栓およびそれに伴う血栓の器質化／内膜肥厚の組成を確認するために、心筋梗塞症例病理解剖例において、責任冠状動脈における血栓の組成を検討した。その結果、プラーク破裂症例ではフィブリン優位の血栓が形成され、プラークびらん症例では血小板優位であるがいずれの場合でも混合血栓であることがあきらかとなった。(Heart, 2005) この結果は、動脈硬化発生の基盤となる内膜肥厚巣の形成の初期には内膜肥厚の成長因子として血小板のみならず、フィブリン血栓を形成する凝固因子の関与が示唆された。(J Atheroscl Thromb, 2005)

PAR2のマウスおよびヒトにおける生体内分布の検討：

C57BL/6マウスおよびPAR2ノックアウトマウスより全身の組織を採取、10%ホルマリンおよび4%パラホルムアルデヒドによる固定後のパラフィン切片および凍結組織からの凍結切片において作製済みの抗マウスPAR2活性化ペプチドに対する抗血清および市販のPAR2に対する特異抗体を用いた免疫組織学的検討を行ったが、両者に差異は無く、抗体および抗血清のマウス組織における免疫組織学的検索に適していないことが考えられた。また、死後6時間以内の剖検例より全身各臓器を採取し、薄切凍結切片における免疫組織学的に同様に検討したが、平滑筋細胞・消化管上皮に発現を認めるものの、PAR2の存在様式とは染色性が異なっており信頼性に乏しく、マウス同様、明確な細胞局在を見出し得なかった。

骨髄移植マウスにおける検討：

致死量放射線照射を必要としない骨髄移植法を用い、GFPマウスの骨髄細胞を、雄性C57BL/6に移植後、ナイロン糸留置法にて血栓/内膜肥厚モデルを作製し、血栓の器質化/内膜肥厚に関与する細胞の特性を同定した。骨髄移植生着確認後、ナイロン糸留置後4週目に蛍光顕微鏡下にGFP陽性細胞の関与を検討したが、同部位への骨髄由来GFP陽性細胞は極少数に留まり、ほとんど関与しないことがあきらかとなった。（論文作成中）