
研究助成業績報告集

第 26 回（2018 年度）バイエル循環器病研究助成
『血栓症とがん』

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	Trousseau 症候群における脳灌流状態の把握と有効な治療体系の探求	井上 学	1
2	がん誘発性血栓症における腫瘍由来ポドプラニンの寄与	竹本 愛	4
3	プロテオーム解析を用いた免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症メカニズムの解明	田尻和子	8
4	血栓の形成および退縮過程における CCR5 システムの病態生理学的役割の解明	樽谷 玲	12

Trousseau 症候群における脳灌流状態の把握と 有効な治療体系の探求*

国立循環器病研究センター・脳血管内科 医長
井上 学

I. 緒言

Trousseau 症候群¹⁾は、潜在性の悪性腫瘍の遠隔効果から神経症状を生じる傍腫瘍性神経症候群の一つであり、悪性腫瘍に伴う血液凝固亢進により脳梗塞を生じる病態である。脳組織は凝固外因系の引き金となるトロンボプラスチンが豊富に存在しており、トロンビンの拮抗因子であるトロンボモジュリンが乏しいため DIC (Disseminated intravascular coagulation: 播種性血管内凝固異常症) の標的臓器となりやすいといわれているためである。この Trousseau 症候群の治療方針は原疾患の治療が最優先とされ、早期に腫瘍を見つけ加療にあたることとされているが、脳梗塞の治療としては抗凝固療法のヘパリンが第一選択とされているだけで、ワーファリンや最近では直接作用型経口抗凝固薬 (DOAC) による予防なども検討されているが有効的なものはまだ確立されていない²⁾。また画像上の特徴として MRI (Magnetic resonance imaging: 磁気共鳴画像) で血管支配域に一致しない多数の散在性高信号を呈することが多く、明らかな脳主幹動脈の閉塞などは見られないことから、通常脳梗塞治療のターゲットとなる閉塞血管の再開通療法などは選択肢に挙がらない。この散在性の微小梗塞を引き起こしている全身性の凝固能異常が脳灌流に与えている状況は今までに探索されたことがなく、抗凝固療法と合わせて有効な治療を確立するためには、急性期脳灌流画像パターンを解析し、治療効果を検討する必要がある。

さて欧米では脳梗塞発症から早期に脳灌流状態が評価し、患者の治療効果を予測した先行研究があるが³⁾⁴⁾、日本では同様の研究が少なく、灌流画像の解析するソフトウェア⁵⁾の開発も十分に検討されていない状況である。脳灌流の評価には PET (Positron emission tomography: 陽電子放出断層撮影) がゴールドスタンダードとされているが、高額で放射線被曝もあり、

何より救急の現場では使用し難い現状がある。それに比べ MRI の灌流画像は通常撮像の MRI に 1 シークエンスを追加するだけで撮像が可能であり、患者移動の負担や被曝の影響もない。

欧米では標準化されつつある灌流画像解析ソフトウェア RAPID は、各種大規模な急性期脳梗塞の臨床試験に使用されており、信頼性が高い。5-7 分間で自動解析された CBF (cerebral blood flow; 脳血流量)・CBV (cerebral blood volume; 脳血液量)・MTT (Mean Transit Time; 平均通過時間)・Tmax (time to maximum; 造影剤の最大到達濃度) のマップから、Tmax が 6 秒より遅延している領域をペナンプラ領域と判定したマップを拡散強調画像 (diffusion weighted image; DWI) の自動計測マップとともに並べて表示することができる。DWI と Tmax のミスマッチ比が 1.8 より大きければ target mismatch と呼び、急性期血栓溶解療法への反応が良いとされている。逆に DWI が 70ml より大きい場合は malignant profile⁶⁾として急性期血栓溶解療法が不良であり、症候性脳出血のリスクが非常に高いとされている。

本研究ではこの RAPID により Trousseau 症候群の急性期脳灌流を評価し、これらの病態把握から有効な治療ストラテジーを検討する。

II. 対象・方法

当センターを受診した 2018 年 7 月から 2019 年 5 月までの連続症例を対象とした。担癌状態であり、当院に急性期脳梗塞で緊急搬送され、かつ 24 時間以内に頭部造影灌流画像が撮像できた症例を対象とした。担癌状態の血栓症リスクとして Khorana scale を評価し、D ダイマーなどの血液凝固マーカーも合わせて評価した。灌流画像に関しては腎機能障害と造影剤アレルギーがない症例を対象とし、急性期灌流画像解析ソフト RAPID による解析を行

い、拡散強調画像(diffusion weighted image; DWI)と灌流画像(perfusion weighted image; PWI)の異常分布を検討した。治療内容(内科的保存療法もしくは血栓溶解療法)や退院時の日常生活自立度(modified Rankin Scale; mRS)も評価した。

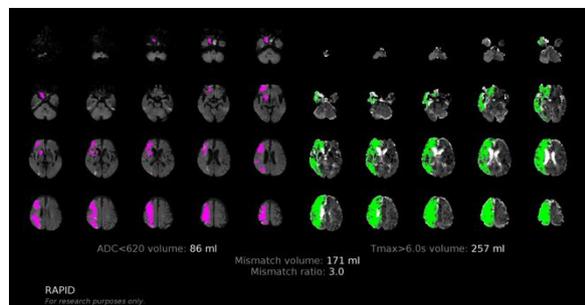


図1 RAPIDによるDWIとPWIの出力マップ。

本症例は悪性腫瘍 Stage4 の 81 歳男性であり、他院治療中に左半身麻痺が出現し当院に搬送された。来院時発症時刻は不明で脳卒中重症度評価スケールである NIHSS(National Institutes of Health Stroke Scale)は 22 点で頭部 MRI/MRA では右半球に広範梗塞と右内頸動脈閉塞を認めた。続いて灌流画像検査もを行い、虚血性コア(DWI)は 86mL, PWI で示されるペナンブラ領域(Tmax >6s)は 257mL と、target mismatch 症例であったが腫瘍の頭蓋内転移の可能性があり、全身状態などの観点から積極的な血栓回収療法は見送った。

III. 結果

期間中、担癌状態で急性期脳梗塞を発症した 12 例のうち、腎機能不全のため造影剤の使用ができなかった 4 例を除く 8 例(男性 7 名, 女性 1 名)が解析対象となった。平均は 83 歳であった。胃癌が 3 例, 肺癌が 2 例, 膵癌が 1 例, 肝癌が 1 例, 喉頭癌が 1 例であった。Khorana scale は中央値 1.5 (IQR 0.25-2) で中等度リスク症例が多かった。また全例において D ダイマーの上昇が見られた。急性期灌流画像にて灌流異常を示した症例は 6 例であり、そのうち 2 例が遺伝子組み替え組織プラスミノゲン・アクチベータ(recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA)による経静脈的血栓溶解療法を受けた。この 6 例の画像背景として虚血性コアは中央値(IQR)で 12mL(0-58.2)であり、ペナンブラ領域とされる Tmax 6 秒の延長領域の中央値(IQR)は 97.5(69.8-178.3)であった。

表1 患者/画像背景

平均±標準偏差(SD), 中央値(IQR)もしくは率(%)

	n=8
年齢(歳)	83±4
男性(%)	7(88)

収縮期血圧(mmHg)	165±28.8
拡張期血圧(mmHg)	83.6±17.8
Body mass index	21.7±2.3
ヘモグロビン濃度(g/dL)	12.8±1.6
白血球数(10 ³ /μL)	6.5±1.4
血小板数(万/μL)	20.3±2.7
来院時血糖(mg/dL)	137.1±37.1
LDL-コレステロール(mg/dL)	77.3±18.1
BNP(pg/ml)	80.8±70.9
D ダイマー(μg/mL)	5.5±4.6
Khorana scale(中央値, IQR)	1.5 (0.25-2)
発症時 NIHSS(中央値, IQR)	5.5 (2-14)
静注血栓溶解(rt-PA)療法(%)	2(25)
発症前 mRS	3 (0-4)
退院時 mRS	4 (2-4)
画像背景	
灌流異常(%)	6(75)
Tmax 6 秒の延長領域(mL)	97.5(69.8-178.3)
虚血性コア(DWI)領域(mL)	12(0-58.2)

IV. 考察

悪性腫瘍の患者が脳梗塞を起こす発症率は報告があるが、脳梗塞全体での Trousseau 症候群の発症率は報告が少ない。本研究では期間中 603 例の急性期脳梗塞症例のうち、12 例が担癌状態で脳梗塞を発症したが、約 2%の発症率は、他の Trousseau 症候群の国内報告⁷⁾とや国際レビュー⁸⁾ともほぼ合致する数字であった。

またリスク因子として Trousseau 症候群の D ダイマーの平均値が 5.5±4.6 μg/ml と、他の脳梗塞のタイプと比較して著明に高値を示しており、その他の血管リスクとして知られている脂質異常、血糖異常や高血圧はさほど目立たなかった。Trousseau 症候群では悪性腫瘍による凝固能亢進状態から血栓症を生じる病態であるゆえ、悪性腫瘍合併脳梗塞は悪性腫瘍非合併脳梗塞と比較して高血圧、脂質異常症は有意に低いとされており⁹⁾、本研究からも脳梗塞発症機序として通常の血管リスク因子よりも過凝固状態が大きく関わっていることが示唆された。

近年、急性期脳梗塞において DWI と PWI の比率を見て安全に再灌流療法を行うことで治療時間枠が 24 時間まで拡大した。本研究のように担癌状態で出血性リスクの高い症例は、安全性が評価できていれば積極的な再灌流療法も十分に可能であることがわか

った。本研究で経静脈的血栓溶解療法を受けた症例は2例ともDWIとPWIの比率が1.8を上回っており安全性が画像上確認できており、また内科的治療および経静脈的血栓溶解療法後の出血性合併症は0例であった。このように急性期脳灌流状態の評価はTrousseau症候群に対して再灌流療法を行う際の安全性の指標となる可能性がある。残念ながら担癌状態であることで元々の日常生活自立度は中央値で3であったが、治療後の日常生活自立度は大幅に悪化しておらず、むしろ5例は元のADLと変化なく退院できていることから、今後画像で安全性が確認できた場合は「Trousseau症候群は積極的に脳梗塞治療をする」という治療体系に切り替えるべきかもしれない。

V. 結論

担癌患者における脳梗塞は多様であり、症例も少ないことから特徴的な患者画像背景を捉えることは困難であった。Trousseau症候群における急性期脳灌流画像評価は、その後の安全な再灌流療法を実施する指標となる可能性がある。

VI. 研究協力者

豊田一則・国立循環器病研究センター・副院長
古賀政利・国立循環器病研究センター・脳血管内科部長
猪原匡史・国立循環器病研究センター・脳神経内科部長
森田佳明・国立循環器病研究センター・放射線部医長

VII. 参考文献

- 1) Trousseau A. Plegmasia alba dolens. Lectures on clinical medicine, delivered at the Hotel-Dieu, Paris. 1865;5:281-332.
- 2) Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. Blood. 2007;110:1723-1729.
- 3) Albers GW, Thijs VN, Wechsler, L et al. Magnetic resonance imaging profiles predict clinical response to early reperfusion: the diffusion and perfusion imaging evaluation for understanding stroke evolution (DEFUSE) study. Ann Neurol. 2006;60:508-517.

- 4) Lansberg MG, Straka M, Kemp S, et al. MRI profile and response to endovascular reperfusion after stroke (DEFUSE 2): a prospective cohort study. Lancet Neurol. 2012;11:860-867.
- 5) Straka M, Albers GW, Bammer R. Real-time diffusion-perfusion mismatch analysis in acute stroke. J Magn Reson Imaging. 2010;32:1024-1037.
- 6) Inoue M, Mlynash M, Straka M, et al. Patients with the malignant profile within 3 hours of symptom onset have very poor outcomes after intravenous tissue-type plasminogen activator therapy. Stroke. 2012;43:2494-2496.
- 7) 赤塚和寛, 服部直樹, 伊藤瑞規ほか. 当院でのTrousseau症候群40例の臨床的特徴. 脳卒中 2018 ; 40: 421-426.
- 8) Cestari DM1, Weine DM, Panageas KS, et al. Stroke in patients with cancer: incidence and etiology. Neurology. 2004;62:2025-30.
- 9) Schwarzbach CJ, Schaefer A, Ebert A, et al. Stroke and cancer: the importance of cancer-associated hypercoagulation as a possible stroke etiology. Stroke 2012;43: 3029-3034

がん誘発性血栓症における腫瘍由来ポドプラニンの寄与

公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター
基礎研究部・研究員
竹本 愛

I. 緒言

ポドプラニンとは扁平上皮がん、骨肉腫、悪性膠芽腫など多様ながんで発現している膜貫通型糖タンパク質で、がん細胞が血行性に転移する過程において、血小板上のレセプターCLEC-2 と結合することで血小板の活性化・凝集を誘導する。このポドプラニンの作用により、がん細胞は腫瘍塞栓として毛細血管に留まり、転移成立に繋がる(1)。また、血小板を纏ったがん細胞は、血流によるシアストレスやNK細胞による排除機構に対して抵抗性を示し、転移が助長される可能性もある。我々は、これまでにポドプラニンが血小板凝集を介して転移を促進する経路、腫瘍増大を促進する経路を明らかにしてきた(2)。また、ポドプラニン—CLEC-2 結合を阻害できるポドプラニン中和抗体を独自に創製し、マウスを用いた血行性転移のモデルにおいて、この中和抗体のがん転移抑制効果を示した(3)。そこで、このポドプラニン中和抗体を抗腫瘍薬・転移阻害薬として臨床応用することを目指し開発研究が進められている。

がん患者の静脈血栓塞栓症のリスクは、転移性のがんにおいてさらに増大することが知られる(4)。そこで本研究では、血小板凝集誘導活性示す転移促進因子であるポドプラニンの寄与に着目し、がん誘発性の血栓症に繋がる経路とポドプラニン中和抗体による抑制効果を検討する目的で、①がん由来遊離ポドプラニンの検出と②がん由来血栓症モデルの構築を試みることにした。

II. 対象・方法

細胞株と培養条件

ポドプラニン陽性ヒトがん細胞株として、肺扁平上皮がん細胞株 PC-10 (Immuno-Biological Laboratories, Gunma)、骨肉腫細胞株 SJSA-1 (American Type Culture Collection, ATCC)、同意を得られた骨肉腫患者由来の検体から樹立した細胞株 Sa-Xeno-147-P0 を用い、ポドプラニン陰性細胞株と

して、肺腺がん細胞株 A549(ATCC)と PC-10 のポドプラニンノックアウト細胞(5)を使用した。それぞれの細胞は、PC-10 と A549 が 10% ウシ胎児血清(FBS)を含む DMEM、SJSA-1 が 10% FBS を含む RPMI1640、Sa-Xeno-147-P0 が 15% FBS を含む RPMI1640 /Ham's F-12 (1:1) を培養用培地として用いた。

抗体

エクソソームマーカーの検出用に、抗 Alix 抗体 (Santa Cruz)、抗 Tgs101 抗体 (Santa Cruz)を用い、ローディングコントロールの検出用に、抗 β -actin 抗体 (MBL) を用いた。ヒトポドプラニン中和抗体は所属研究室にて樹立したマウスモノクローナル抗体 PG4D2 を用いた(3)。

細胞外小胞の分画

70-80%コンプレントまでディッシュ上で培養した細胞の培地を通常の培養用培地から FBS 非添加の培地に置換し 2 日間培養した。その培養上清を回収し、300 g, 10 min, 4°C で遠心続いて 2,000 g, 10 min で遠心することで細胞や死細胞片を除いた。さらに、その上清を 10,000 g, 30 min の遠心分離し、さらにその上清を 100,000 g, 2 h 遠心後、沈殿を PBS(-)に懸濁し、再度同じ条件で遠心しエクソソーム画分として回収した(6)。その沈殿を PBS(-)に懸濁し、BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) によりタンパク定量後、実験に用いた。エクソソーム生合成阻害剤である GW4869 (Sigma) は、FBS 非添加の培地に置換する際に 20 μ M で添加し、2 日間培養後、細胞外小胞の遠心分離に用いた。

マウス血小板凝集アッセイ

マウスから 0.32% クエン酸を用いて心採血し、150 g, 8 min, 室温で遠心し、血小板を含む血漿画分を回収した。さらに、500 g, 10 min, 室温で遠心し、血小

板を沈殿させた。血小板を Tyrode's buffer (0.4 mM Na₂HPO₄, 11.9 mM NaHCO₃, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose) に懸濁後、再度 500 g, 10 min, 室温で遠心し、洗浄血小板を回収した。Tyrode's buffer に再懸濁し、血小板の濃度を測定し、2.5 x10⁸/ml 血小板懸濁液 (200 µl/反応系) としてアッセイに用いた。アッセイ開始時に細胞や細胞外小胞を刺激因子として添加し、血小板の凝集を MCMヘマトレーサー313血小板凝集測定計でモニターした。ポドプラニン中和抗体による抑制を検出する際には、反応系の血小板懸濁液にポドプラニン中和抗体もしくはコントロールとしてマウス IgG2a を 5-50 µg/ml になるようにあらかじめ添加し、2 分後に刺激因子を添加しその後の凝集率を測定した。

In vivo での血小板活性化・血栓誘発の評価

ポドプラニン陽性がん起因した血栓症誘導モデルとして、ポドプラニン陽性がん細胞やポドプラニン陽性がん細胞の培養上清から分画したエクソソームの尾静脈移植、ポドプラニン陽性のがん細胞を皮下移植した担がんマウスモデルを用い検討を行った。血小板活性化の検出のため、これらのモデルマウスから 0.32% クエン酸で心採血し、血漿を調製した。血漿の分離は、500 g, 10 min, 室温で遠心後上清を回収し、さらに 10,000 g, 5 min 室温で再度上清を回収することで行った。血漿は、-80°Cにて保管した。血小板活性化の検出は、活性化によって放出された血小板由来増殖因子の ELISA (R&D)、マウス D-dimer の ELISA (LifeSpan Biosciences)で行った。マウスは、SCID-beige または BALB/c-nu (日本チャールスリバー)を用いた。

III. 結果

市販のポドプラニン高発現ヒトがん細胞株、非発現細胞に加え、同意を得た患者由来の検体から我々が樹立した細胞株を用いて以下の解析を行った。

①がん細胞由来遊離ポドプラニンの検出

まず、使用したポドプラニン発現細胞株が示す血小板凝集誘導活性におけるポドプラニンの寄与を検討した。特にポドプラニンの高発現を示す肺扁平上皮がん細胞株 PC-10 や骨肉腫細胞株 SJSA-1、Sa-Xeno-147-P0 を用いたところ、誘導された血小板凝集は、ポドプラニン中和抗体の添加により、濃度依存的に抑制された。したがって、これらの細胞の血小板凝集能におけるポドプラニンの寄与とポドプラニン中和抗

体による抑制効果が示された。ポドプラニン依存的な血小板凝集が認められた細胞株について、がん細胞から遊離したポドプラニンの存在を検討した。細胞を FBS を含まない培地で 2 日間培養し、培養上清からトリクロロ酢酸沈殿させたタンパク質をウェスタンブロットで解析したところ、ポドプラニン陽性細胞 PC-10 の培養上清においてポドプラニンを検出した。一方で、ポドプラニン陰性細胞 A549、ポドプラニンをノックアウトした PC-10 細胞の上清からは当然ポドプラニンは検出されなかった。それまでの検討において、ポドプラニンを発現する細胞と異なり、細胞から精製した可溶性のポドプラニンは、多量に血小板懸濁液に添加しても、血小板凝集を誘導することがなかったことから、ポドプラニンの存在状態は血小板活性化誘導能に重要といえる。そこで次に、培養上清中に認められたポドプラニンが、がん細胞から遊離した可溶性分子として存在しているのか、細胞外小胞に含まれるのかを検討した。超遠心による細胞外小胞分画法で培養上清を分画し、ポドプラニンの所在をウェスタンブロットで解析したところ、Alix、Tsg101 といったエクソソームマーカーが多く検出される画分にポドプラニンの存在を認めた。さらに、中性スフィンゴミエリナーゼ阻害剤である GW4869 処理によりエクソソーム生成を抑制したところ、同画分からポドプラニンが顕著に減少したことから、ポドプラニンが特にエクソソームに存在していることが示された。また興味深いことに、ポドプラニンをノックアウトした PC-10 細胞から回収したエクソソーム画分中のエクソソームマーカー分子は、GW4869 処理同様、減少傾向にあった。この結果から、ポドプラニンがエクソソーム中の構成因子に影響を与える可能性とエクソソーム産生量自体に影響を与える可能性が考えられた。一方、ポドプラニンを高発現している骨肉腫細胞株 SJSA-1 については、培養上清にポドプラニンを検出できなかったが、エクソソームマーカーも検出できなかったことからエクソソーム産生自体が培養条件下で低い細胞であると考えられた。続いて、ポドプラニン陽性エクソソームを含む画分に血小板活性化能があるか検討を行った。ポドプラニン陽性がん細胞 PC-10、Sa-Xeno-147-P0 から超遠心で分画したエクソソームを定量し、血小板凝集誘導アッセイに添加したところ、血小板凝集能を示した。また、誘導された血小板凝集はポドプラニン中和抗体添加によって濃度依存的に抑制された。一方、ポドプラニンを発現しない A549 細胞の培養上清から取得したエクソソーム画分

は血小板凝集誘導活性が弱かった。ポドプラニンをストックダウンした PC-10 細胞から回収したエクソソームも血小板凝集活性を示したが、ポドプラニン中和抗体を添加しても抑制されなかった。以上の結果から、ポドプラニン陽性のがん細胞から放出されるエクソソームは、ポドプラニン依存的に血小板に作用し凝集を誘導することが示された。

②がん由来血栓症モデルの構築

①の結果を踏まえると、ポドプラニン陽性のがん患者においては、腫瘍から遊離したエクソソームに含まれるポドプラニンが血小板を活性化・凝集させ血栓症を誘導する可能性がある。我々が、がん治療薬として開発を目指しているポドプラニン中和体が、このようなポドプラニン陽性のがんに起因した血栓症を抑制する効果を付随することも期待される。そこで、これら进行评估する *in vivo* モデルの構築を行った。まず、ポドプラニン依存的に誘導された血小板活性化・凝集を検出する系の検討を行った。*in vitro* で血小板凝集誘導活性を示したポドプラニン陽性のがん細胞と活性を示さなかったポドプラニン陰性のがん細胞をマウス尾静脈に移植し、*in vivo* での血小板の活性化を活性化によって放出される増殖因子の血中濃度を測定することで検出した。細胞を移植し1時間後の血漿について、ELISA で解析した結果、ポドプラニン陽性のがん細胞を移植した場合に、血小板由来増殖因子の血中濃度が高かった。一方、ポドプラニン陰性のがん細胞 A549 を移植した場合は、コントロールとして行った PBS(-) 移植と同レベルの血中濃度であった。移植後 24 時間、48 時間の血液から調整した血漿を用いて D-dimer の検出も ELISA で行ったところ、ポドプラニン陽性細胞移植により、血栓が生じたことを示す D-dimer のレベルが 24 時間で増加していた。この結果から、*in vitro* で血小板凝集能を示す細胞は、実際に *in vivo* でも血小板の活性化を誘導し、その活性化は血小板由来増殖因子や D-dimer の血中濃度のモニターで検出可能であることがわかった。尾静脈移植したポドプラニン細胞と同レベルの凝集能を示す量のエクソソームを移植すればポドプラニンを介したエクソソーム誘導血栓症モデルの構築も可能でポドプラニン中和抗体による抑制効果を評価できると考えられた。多量の培養上清中からエクソソームを調製すると共に、より臨床を反映したモデルとしてポドプラニン陽性のがんマウスを用い、血小板活性化および血栓症マーカーの検出検討を進めている。最適なモデルが得られたら、ポドプラニン中和抗体投与による抑

制効果の検証によりポドプラニンの寄与を明らかにしていきたい。

IV. 考 察

本研究では、がん患者で問題となる血栓症におけるポドプラニンの関与とその経路の解析とポドプラニン中和抗体による抑制効果を検証できるモデルの構築を目指して検討を進めた。その結果、ポドプラニン陽性がん細胞からポドプラニンが遊離すること、細胞から遊離したポドプラニンがエクソソームに存在すること、そしてそのエクソソームがポドプラニンを介した血小板凝集能を示すことを明らかにした。このことは、エクソソーム膜表面にポドプラニンが発現しており、血小板凝集誘導に最重要なドメイン PLAG4 をエクソソーム膜外に提示していることを示唆している。ポドプラニンを高発現している細胞からは、低発現細胞より高レベルのポドプラニン発現エクソソームが認められると予想された。しかし、ポドプラニンを高発現する骨肉腫細胞株 SJSA-1 では上清中の遊離ポドプラニンおよびエクソソームマーカー分子のレベルは低かったことから、がん細胞ごとにエクソソーム放出量は異なり、ポドプラニン陽性腫瘍であっても遊離ポドプラニンによる血小板活性化のリスクが高いとは限らないと思われた。また、がんの進行に従ってエクソソーム産生量が高まることが知られている (7)。よって、腫瘍のポドプラニン発現以上に、血液中の遊離ポドプラニンの検出が血小板活性化および血栓症のリスクを予測するマーカーとして有用であるかもしれない。現在、がん研究会有明病院にて診療を受け同意を得られた患者で、特にポドプラニン発現頻度が高い骨軟部腫瘍に罹患した患者から血液検体の収集を行っており、我々の構築した高感度サンドイッチ ELISA によるポドプラニン検出と D-dimer の検出を併せて行うことで、両者の関係を検討する計画である。さらに今後は、がんに関連した血栓症が臨床問題となるがん種における検討が特に重要である。少なくとも、血栓症のリスクが高い脳腫瘍においては、ポドプラニンの発現頻度が特に高く、ポドプラニンの発現と予後との相関に加え(8)、ポドプラニン発現と静脈血栓塞栓症のリスクとの相関も近年示唆された (9)。また、ポドプラニン陽性頻度が 50%程度の卵巣明細胞がんでは (10)、患者の 40%ほどで静脈血栓塞栓症が起こると報告されており (11)、これらの腫瘍でポドプラニンの関与がどの程度あるのか、ポドプラニンを高発現しているモデル細胞株とポドプラニン中和抗

体を用いて検討していく必要がある。

V. 結論

多様ながん細胞の細胞膜に発現し、血小板を活性化することで転移を促進する因子であるポドプランインが、がん細胞から遊離したエクソソーム上にも発現しており、血小板活性化に寄与することが示唆された。したがって、ポドプランインを発現するがんに関連した血栓症の誘導にこの経路が関与する可能性がある。また、ポドプランイン陽性のエクソソームが誘導する血小板活性化・凝集はポドプランインと血小板の結合を阻害できるポドプランイン中和抗体によって抑制することが可能であった。がん転移抑制および抗腫瘍効果が期待され応用に向けた開発を進めているポドプランイン中和抗体の副次的効果として、そのがんに起因した血栓症の抑制も期待できる。腫瘍におけるポドプランインの発現レベルだけでなく、エクソソーム放出の程度にも依存する経路であるため、エクソソーム上のポドプランインと考えられる血中のポドプランインレベルは、ポドプランイン陽性腫瘍患者における血栓症の予測マーカーとして可能性がある。

VI. 研究協力者

- 片山量平・がん研がん化学療法センター 基礎研究部・部長
- 高木聡・がん研がん化学療法センター 基礎研究部・研究員
- 佐藤重男・がん研がん化学療法センター 基礎研究部・主任研究助手
- 高見美穂・がん研がん化学療法センター 基礎研究部・研究助手
- 阿江啓介・がん研有明病院 整形外科・部長
- 船内雄生・がん研有明病院 整形外科・医長

VII. 参考文献

- 1) Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, et al. The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am J Pathol* 2007; 170: 1337-1347.
- 2) Takemoto A, Miyata K, Fujita N. Platelet-activating factor podoplanin: from discovery to drug development. *Cancer Metastasis Reviews* 2017; 36: 225-234.
- 3) Takagi S, Oh-hara T, Sato S, et al. Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its

role in pulmonary metastasis. *Int J Cancer* 2014; 134: 2605-2614.

- 4) Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, et al. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005; 293: 715-722.
- 5) Miyata K, Takemoto A, Okumura S, et al. Podoplanin enhances lung cancer cell growth in vivo by inducing platelet aggregation. *Sci Rep* 2017; 7: 4059.
- 6) Hood JH, Pan H, Lanza GM, et al. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab Invest* 2009; 89: 1317-1328.
- 7) Greening DW, Gopal SK, Xu R, et al. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 40: 72-81.
- 8) Eisemann T, Costa B, Harter PN, et al. Podoplanin expression is a prognostic biomarker but may be dispensable for the malignancy of glioblastoma. *Neuro Oncol* 2019; 21: 326-336.
- 9) Riedl J, Preusser M, Nazari PM, et al. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood* 2017; 129: 1831-1839.
- 10) Oe S, Hasegawa K, Nagase S, et al. Expression of podoplanin in epithelial ovarian carcinomas and its potential as a marker for clear cell adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2010; 29: 405-10.
- 11) Duska LR, Garrett L, Henretta M, et al. When 'never-events' occur despite adherence to clinical guidelines: the case of venous thromboembolism in clear cell cancer of the ovary compared with other epithelial histologic subtypes. *Gynecol Oncol.* 2010; 116: 374-377.

プロテオーム解析を用いた免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症メカニズムの解明

筑波大学医学医療系循環器内科・助教
田 尻 和 子

I. 緒言

免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫療法は、様々な悪性腫瘍で有効性が示されており、今後さらに使用が拡大することが予想される。免疫チェックポイント分子 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 [CTLA-4] や programmed cell death-1 [PD-1]、programmed death-ligand 1 [PD-L1] など) は抑制性共シグナルを伝達することによって免疫細胞の活性化を抑制し、免疫応答の恒常性を維持している分子群である。免疫チェックポイント阻害剤より抗腫瘍免疫が活性化される一方、自己免疫の賦活化によると考えられる免疫関連有害事象の発生が問題となっている。免疫関連有害事象は全身の様々な部位で認められ、従来の抗がん剤による副作用とは異なる特徴を有する。心臓への有害事象の発生頻度は1%程度と希な合併症と考えられている¹、診断に至っていないケースも多く、実際にはもっと多いものと予想される。臨床像は多彩で、心筋炎、たこつぼ型心筋症、伝導ブロック、致死性不整脈、心膜炎、心タンポナーデ等の報告がある²。心筋炎症例では、心筋生検でマクロファージと CD8 陽性 T 細胞を主体とした炎症細胞浸潤を認める例が多い³。今後、がん免疫療法はますます発展していくことが予想され、それに伴い未知の心臓合併症の発症が危惧される。腫瘍医との綿密な連携のもと、がん診療チームの一員として腫瘍循環器医が果たすべき役割も増していくことが予想される。

免疫チェックポイント阻害剤使用後に心筋炎と筋炎を発症した症例の T 細胞受容体レパトア解析結果によると、がん組織と心臓、骨格筋に同じ T 細胞受容体を持つ T 細胞クローンが浸潤していることが明らかとなった³。さらに、がん組織のトランスクリプトーム解析によって、がん組織にも骨格筋や心筋特異的な遺伝子発現を認めたことから、がん組織が体細胞遺伝子変異によりネオアンチゲンを合成し、その蛋白には骨格筋や心筋と共通の T 細胞ネオエピトープが存在

している可能性が示唆されるが、未だ明らかになっていない。

さらに最近の研究結果では、免疫関連有害事象の発生には細胞性免疫だけでなく B 細胞を主体とした液性免疫も大きな役割を果たしていることが示唆されているが⁴、心筋炎において検討はなされていない。

そこで、本研究では免疫チェックポイント阻害剤によって発症した心筋炎の病態に自己抗体が関与しているかどうかをプロテオーム解析の手法を用いて網羅的に検討した。

II. 対象・方法

対象は免疫チェックポイント阻害剤により心筋炎を発症した 2 症例である (表 1)。

表 1 患者背景

	免疫チェックポイント阻害剤	年齢	原疾患
症例①	Nivolumab	70代	腎細胞癌
症例②	Nivolumab	50代	非小細胞性肺癌

症例①は 70 代男性。肺転移を伴う進行腎細胞がん患者で、nivolumab 投与後に心筋炎、筋炎、重症筋無力症を発症した (初回 nivolumab 投与 30 日後に発症した)。心筋生検では CD3 陽性 T リンパ球と CD68 陽性マクロファージの浸潤を多数認め、T リンパ球は CD8 陽性リンパ球が主体であった。また、少数の CD20 陽性 B リンパ球の浸潤も認めた。心筋炎診断後にステロイドパルス治療を行い心筋炎は改善したが、その後がんが増悪し、8 ヶ月後に死亡した。

症例②は 50 代女性。遠隔転移を伴う非小細胞性肺癌の診断で nivolumab が開始となった。しかし、初回 nivolumab 投与後 23 日目に心不全のために入院となった。心筋生検では明らかな炎症細胞浸潤は指

摘できなかったが、心エコー図検査では心尖部や前壁の新規の壁運動低下を認め、冠動脈病変は認めなかったために nivolumab による心筋炎と診断し、ステロイドパルス治療を行った。しかし、病態の改善なく nivolumab 投与 2 ヶ月後に心不全のために死亡した。

免疫チェックポイント阻害剤投与前後に血清を採取し、プロテオーム解析を行うまで -80°C に保存した。自己抗体の網羅的解析に使用したプロテインアレイは、20,000以上のタンパク質コレクションを搭載し、ヒトプロテオームの 81%を網羅した CDI Laboratories 社の HuProt™ Human Proteome Microarray v3.1 を用いた。

また、心筋炎患者の血清中のサイトカイン量を Abcam 社の Cytokine Array – Human Cytokine Antibody Array (Membrane, 80 Targets)を用いて検討した。

III. 結果

免疫チェックポイント阻害剤投与により心筋炎を生じた 2 症例の免疫チェックポイント阻害剤投与前と心筋炎発症時の血清中の自己抗体をプロテオームアレイを用いて検出した。まず、これまでに心筋炎を含む種々の心疾患に関与することが報告されている自己抗体について検討を行った。その中で、toropomyosin1-4、Na-K ATPase、熱ショック蛋白 60 に対する自己抗体を検出した (表 2)。しかし、それらの自己抗体は免疫チェックポイント投与前と比較して最大で 1.23 倍の上昇にとどまり、有意な上昇とは言えなかった。他のこれまでに心疾患との関与が報告されている $\beta 2$ -、 $\beta 3$ -、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体、ムスカリン受容体 (M2)、心筋トロポニン T/I、ラミニン、熱ショック蛋白 70 に対する自己抗体は検出されなかった。

表 2 心筋炎関連自己抗体の関与 (数字は免疫チェックポイント阻害剤投与後の信号強度を投与前の信号強度で除した値)

自己抗原	症例①	症例②
Tropomyosin 1	0.76	0.84
Tropomyosin 2	1.02	検出されず
Tropomyosin 3	1.23	0.88
Tropomyosin 4	0.75	検出されず
Na-K ATPase, alpha 3 polypeptide	1.13	0.94
Heat shock protein 60	0.93	検出されず

次に、その他の自己抗体に関して網羅的に検討した (図 1)。図 1 の volcano plot の赤枠内に示した自己蛋白に対する自己抗体 (IgM) が免疫チェックポイント阻害剤投与後に有意に増加していた。

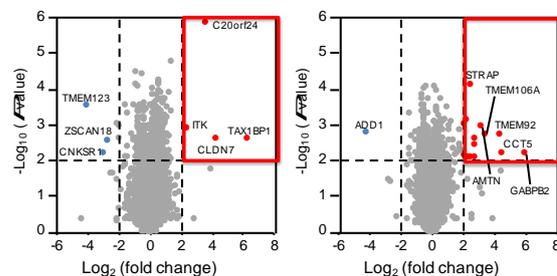


図 1 プロテオーム解析による自己抗体の検出 (左:心筋炎①、右:心筋炎②)。赤枠内は心筋炎発症時に免疫チェックポイント阻害剤投与前に比べて 4 倍以上に有意に $[p < 0.01]$ 増加していた自己抗体を示した)

さらに、免疫チェックポイント阻害剤の投与やステロイド治療により生じたサイトカインプロファイルの変化をサイトカインアレイを用いて検討した (図 2、図 3)。心筋炎発症時には免疫チェックポイント阻害剤投与前と比べ、fibroblast growth factor-4 (FGF-4)、neurotrophin-4 (NT-4) が上昇し、interleukin (IL)-7、macrophag-derived chemokine (MDC/CCL22)、insulin-like growth factor 1 (IGF-1)、TIMP metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1) が減少していた。ステロイドパルス治療により心筋炎発症時より IL-4、interferon- γ (IFN- γ)、thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17)、B lymphocyte chemoattractant (BLC/CXCL13)、FGF-4、FGF-6、fractalkine (CX3CL1)、insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3)、leukemia inhibitory factor (LIF)、TNF superfamily member 14 (LIGHT)、monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4/CCL13)、NT-4、pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC/CCL18)、placental growth factor (PlGF)、transforming growth factor, beta 3 (TGF- $\beta 3$) が有意に減少し、IGF-1 が有意に増加していた。

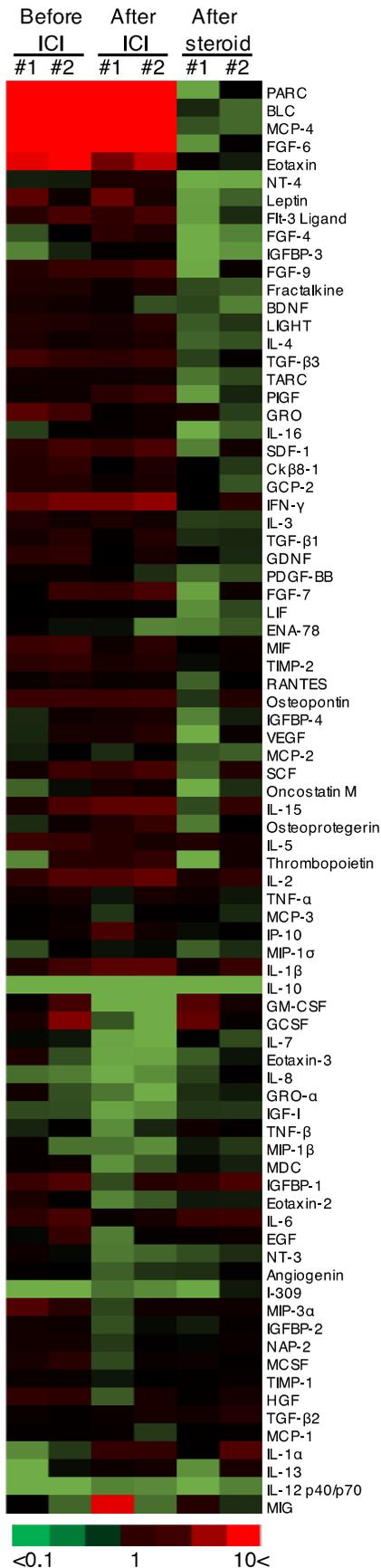


図2 免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 投与前後ならびにステロイド治療によるサイトカインの変化 (#1: 症例①、#2: 症例②)

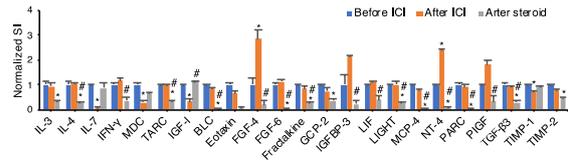


図3 免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 投与前後ならびにステロイド治療によるサイトカインの変化 (* $P<0.05$ vs before ICI, # $P<0.05$ vs after ICI。ICI 投与前の信号強度を 1 として計算した)

IV. 考察

本研究で、*toropomyosin1-4*、Na-KATPase、熱ショック蛋白 60 に対する自己抗体が免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎の 2 症例で検出された。Latif ら⁵は、抗 *toropomyosin* 抗体は拡張型心筋症 (DCM) 患者の 55%に、虚血性心疾患患者の 21%で検出されると報告しているが、その機能は明らかになっていない。Baba ら⁶は DCM 患者 100 症例と年齢を一致させた健常人 100 例の抗 Na-K ATPase 抗体の有無を検討したところ、DCM 患者では 26%に検出されたのに対して、健常人では 2%の陽性率にとどまったと報告している。また本抗体の存在は心室頻拍の独立した予測因子であるとともに、心臓突然死や低心機能の予測因子であることも報告した。心室頻拍を高頻度に認めることも明らかにした。さらに、抗 Na-K ATPase 抗体陽性患者血清中の IgG は *in vitro* で Na-K ATPase 活性を抑制したことから、本抗体は病態形成に一定の役割を果たしていることが示唆されている。熱ショック蛋白 60 に対する自己抗体は DCM 患者の 85%に、虚血性心疾患患者の 42%で検出されると報告されているが⁵、その病態生理学的な影響は不明である。我々が経験した 2 症例は免疫チェックポイント阻害剤投与前からこのような自己抗体が検出されたことから、免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症の予測因子として用いることができる可能性が考えられる。しかし、免疫チェックポイント阻害剤投与後の心筋炎発症時に有意な上昇を示さなかったことから、病態への関与は少ないことが示唆される。

免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症時に有意な上昇を認めた自己抗体は、両症例で共通するものは認めなかった。症例①では制御性 T 細胞の分化に有用な IL2-inducible T cell kinase (ITK)⁷や、NF- κ B を介した炎症の活性化を負に制御する蛋白である TAX1 binding protein 1 (TAX1BP1)⁸に対する自己抗体の著明な増加を認め、心筋炎の発症と進展に

重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、症例②においてはがんの進展に関連する蛋白 (serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP)⁹、transmembrane protein 106A (TMEM106A)¹⁰、chaperonin containing TCP1 (T-Complex Protein 1) subunit 5 (CCT5)¹¹) に対する自己抗体の著明な上昇を認め、免疫チェックポイント阻害剤による抗腫瘍作用に影響を与えている可能性が示唆された。

免疫チェックポイント阻害剤投与前、心筋炎発症時、ステロイド投与後の血清中のサイトカインプロファイル変化を網羅的に検討したところ、サイトカインプロファイルが大きく変化していることが明らかとなった。これらの液性因子も心筋炎の発症と進展、ならびにステロイド治療効果に影響していた可能性が考えられる。

本研究全体を通しての大きなリミテーションは症例が少ないこと、心筋炎を生じなかった免疫チェックポイント阻害剤使用患者との比較ができていないことが挙げられる。病態解明には今後の研究でこれらの課題を克服することが必要である。

V. 結論

本研究では免疫チェックポイント阻害剤使用後に心筋炎を生じた稀な 2 症例から既知の心筋炎関連自己抗体や未知の自己抗体を検出した。本研究のように、腫瘍循環器の見地から免疫チェックポイント阻害剤の作用機序や心筋障害を臨床的・基礎的に詳細に解析することで、これまででない心筋炎の機序あるいは治療に向けた研究のシーズが見つかり、新たなトランスレーショナルリサーチへと展開できる可能性を多いに含んでいると考える。

VI. 研究協力者

家田真樹・筑波大学医学医療系循環器内科・教授
関根郁夫・筑波大学医学医療系臨床腫瘍学・教授

VII. 参考文献

1. Salem J-E, Manouchehri A, Moey M, et al. Cardiovascular toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: an observational, retrospective, pharmacovigilance study. *Lancet Oncol* 2018;19:1579–1589.
2. Tajiri K, Ieda M. Cardiac Complications in

Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Front Cardiovasc Med* 2019;6:3.

3. Johnson DB, Balko JM, Compton ML, et al. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2016;375:1749–1755.
4. Das R, Bar N, Ferreira M, et al. Early B cell changes predict autoimmunity following combination immune checkpoint blockade. *J Clin Invest* 2018;128:715–720.
5. Latif N, Baker CS, Dunn MJ, et al. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:1378–1384.
6. Baba A, Yoshikawa T, Ogawa S. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1153–1159.
7. Huang W, Solouki S, Koylass N, et al. ITK signalling via the Ras/IRF4 pathway regulates the development and function of Tr1 cells. *Nat Commun* 2017;8:15871.
8. Shembade N, Pujari R, Harhaj NS, et al. The kinase IKK α inhibits activation of the transcription factor NF- κ B by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1. *Nat Immunol* 2011;12:834–843.
9. Yuan G, Zhang B, Yang S, et al. Novel role of STRAP in progression and metastasis of colorectal cancer through Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget* 2016;7:16023–16037.
10. Liu J, Zhu H. TMEM106A inhibits cell proliferation, migration, and induces apoptosis of lung cancer cells. *J Cell Biochem* 2019;120:7825–7833.
11. Gao H, Zheng M, Sun S, et al. Chaperonin containing TCP1 subunit 5 is a tumor associated antigen of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:64170–64179.

血栓の形成および退縮過程における CCR5 システムの病態生理学的役割の解明

和歌山県立医科大学 循環器内科 博士研究員
樽谷 玲

I. 緒言

担癌患者において静脈血栓塞栓症の発症リスクは健常群に比べ4～7倍高い(1)。さらに血栓症を有する担癌患者は、血栓症を認めない担癌患者に比べ予後が悪い(2)。また、担癌患者の静脈血栓塞栓症は、非担癌患者に比べ再発リスクが高いとも報告されている(3)。担癌患者における血栓形成は、①癌細胞由来サイトカインによる血管内皮傷害、②癌細胞からトロンボプラスチンが過剰による凝固系の亢進が原因と言われている(4)。しかしながら、静脈血栓塞栓症の発症・退縮の機序は現在においても未だ十分に解明されているとは言いがたい。そのため、臨床的には抗凝固療法などの対症療法しかないのが現状である。

そこで予防を含めた静脈血栓塞栓症に対する根本的治療法開発のため、申請者らの研究グループはサイトカイン・ケモカインに注目し、炎症性サイトカインである IFN-gamma が血栓退縮に抑制的に作用することを明らかにしている(5)。さらなる血栓形成・融解の分子メカニズムを詳細に解明するため、本研究では大腸癌・膵癌・乳癌・前立腺癌など様々な癌腫の転移への関連が報告され(6)、血栓の形成・退縮過程における Key player の一つと考えられるケモカインレセプターCCR5に注目し、血栓の形成・退縮における CCR5 システムの病態生理学的役割を検討した。

II. 対象・方法

本研究では、実験動物として主に CCR5 遺伝子欠損 (CCR5KO) マウス(Balb/c)、及びコントロールとして野生型 (WT) マウスを使用した。静脈血栓塞栓症モデルを用い、血栓の形成・退縮において差異を認めるか比較検討した。

1) マウス深部静脈血栓塞栓症モデル

深麻酔下でのマウスの下大静脈結紮術によって深部静脈血栓を形成させ、血栓サイズ・血栓重量・下大静脈血流の推移を検討した。

2) 病理組織学的および免疫組織化学的検索

採取した血栓について、HE 染色による病理組織学的検索を行い、さらにマクロファージ、uPA、tPA、VEGF、CCR5、CCR5 以外のサイトカイン・ケモカインに対する免疫染色を行った。

3) 遺伝子発現およびタンパク定量

血栓試料から total RNA を抽出し real time RT-PCR 法にて、凝固・線溶系の因子 (tPA、uPA)、CCR5、CCR5 以外のサイトカイン・ケモカイン、について検討した。

4) サイトカイン・ケモカインの治療効果の検討

WT マウスに血栓を発症させた後に、CCR5 のリガンドに対する中和抗体を投与し、その影響を検討した。

1)～4)の結果を総合し、静脈血栓塞栓症における CCR5 の病態生理学的役割について検討した。

データは全て平均値±標準偏差で表記し、2群間の比較は T 検定を行った。

III. 結果

1. 深部静脈血栓の経時的変化についての検討

生後8週齢オスの WT マウス及び CCR5KO マウスに対し下大静脈結紮 10 日後に血管内から採取した血栓を比較したところ、図 1・図 2 のように時間が経過するにつれて、CCR5KO マウスの方が、血栓サイズ・重量ともに WT マウスに比べ大きいことが分かった。

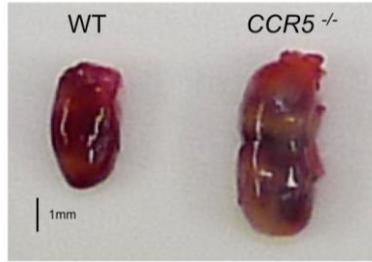


図1 下大静脈結紮10日後の血栓

血栓サイズは、CCR5KO マウスの方がWT マウスに比較し、大きかった。

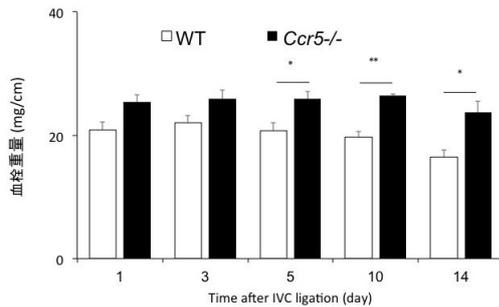


図2 下大静脈結紮後の血栓重量の推移

深部静脈血栓の重量は、WT マウスに比べ CCR5KO マウスで有意に重かった。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

また、時間経過に伴い WT マウスの下大静脈の血流量は、CCR5KO マウスに比べ、高値を示すことが分かった (図3)。これらの結果より、WT マウスでは CCR5KO マウスに比較して、より短期間で血栓が退縮するため、下大静脈血流も速やかに回復すると考えられた。

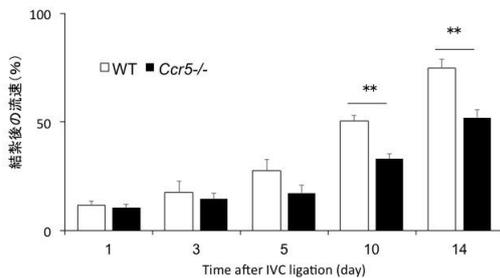


図3 下大静脈結紮後の下大静脈流速の推移

結紮前の血流量を100%とし、それに対する結紮後の流速の比率を縦軸、時間経過を横軸とした。WT マウス・CCR5KO マウスともに下大静脈の血流は改善していくが、WT マウスの方が有意に流速の改善が見られた。** $P < 0.01$ 。

2. CCR 発現細胞の経時的変化とその発現細胞についての検討

生後8週齢オスのWT マウスに対し、下大静脈結紮後、得られた血栓を免疫組織化学的染色を行った。その結果、WT マウスの血栓内には CCR5 陽性細胞が、主に血栓辺縁部に観察され、その数は結紮からの時間経過に伴い増加した (図4)。また血栓中には、Ccr5 遺伝子の発現も認められた (図5)。また、血栓に対し、CCR5 と F4/80 を用いた蛍光二重染色を行ったところ、CCR5 陽性細胞と F4/80 陽性細胞が一致した (図6)。これより、血栓内において CCR5 を産生する細胞は、主として F4/80 陽性マクロファージであると考えられた。

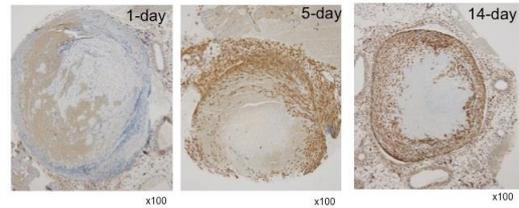


図4 深部静脈血栓における CCR5 陽性細胞の発現

CCR5 陽性細胞が、血栓辺縁部を中心に観察され、経時的に増加した。

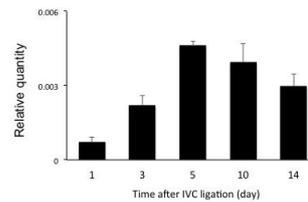


図5 深部静脈血栓の CCR5 遺伝子発現

深部静脈血栓において下大静脈結紮5日後をピークに CCR5 遺伝子発現を認める。

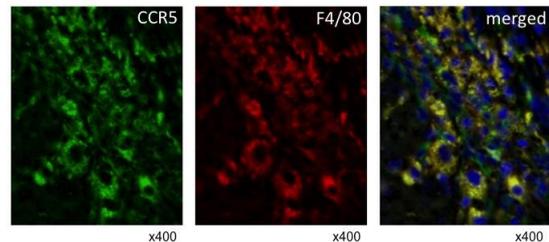


図6 F4/80 陽性マクロファージによる CCR5 産生

下大静脈結紮14日後の深部静脈血栓において、CCR5 陽性細胞と F4/80 陽性細胞が一致した。

3. 深部静脈血栓の器質的変化についての検討

血栓溶解に伴う器質的変化の有無を明らかにするために血栓内の新生血管について検討を行った。下

大静脈結紮 3 日後までの血栓では、WT マウス・CCR5KO マウス共に全く新生血管を認めなかった。一方、下大静脈結紮 5 日後以降の血栓に血管新生を認め (図 7)、その数は時間経過とともに増加した (図 8)。新生血管数では、WT マウスの方が CCR5KO マウスと比較して、有意に多いことが分かった。さらに血栓内における血管内皮増殖因子 (VEGF) の遺伝子発現量も WT マウスの方が CCR5KO マウスと比較して、有意に多いことが分かった (図 9)。CCR5 が深部静脈血栓内の血管新生に影響していることが考えられた。

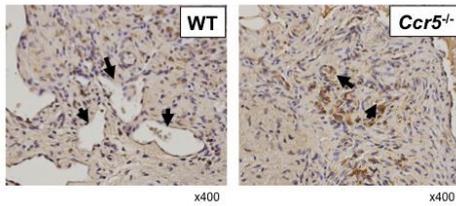


図 7 深部静脈血栓内の新生血管
結紮後 21 日目の血栓を示す。下大静脈結紮後 5 日以降の血栓に新生血管を認めた。

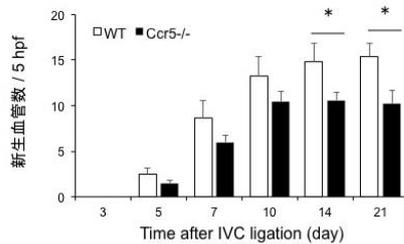


図 8 深部静脈血栓内の新生血管数の経時変化
深部静脈血栓内の新生血管数は時間経過とともに増加した。さらに、WT マウスの方が CCR5KO マウスと比較して、その数が有意に多かった。* $P < 0.05$ 。

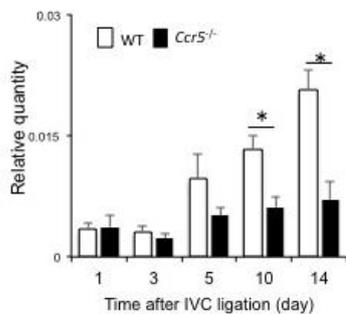


図 9 深部静脈血栓の血管内皮増殖因子 (VEGF) 発現
血栓内の VEGF 遺伝子発現量において、WT マウスの方が CCR5KO マウスと比較して、有意に多かった。* $P < 0.05$ 。

4. 深部静脈血栓における血栓溶解因子の発現についての検討

深部静脈血栓の退縮と血栓溶解因子との関連を明らかにするため、血栓溶解因子であるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (uPA) 及び組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA) の遺伝子発現について検討した。CCR5KO マウスの深部静脈血栓は WT マウスに比べ、uPA・tPA とともに遺伝子発現が有意に低下していることが分かった。この結果より、CCR5 が深部静脈血栓内において血管溶解因子に影響していることが考えられた。

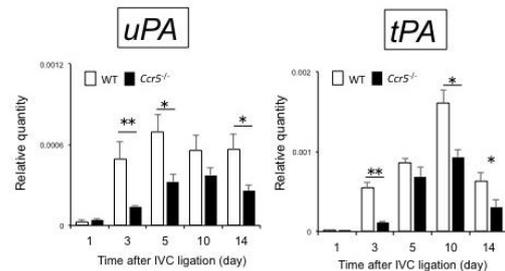


図 10 深部静脈血栓における血栓溶解因子 (uPA・tPA) 発現
血栓内の uPA 及び tPA の遺伝子発現量において、CCR5KO マウスの方が WT マウスと比較して、uPA・tPA とともに有意に少なかった。* $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

5. 深部静脈血栓に発現した CCR5 のリガンドについての検討

深部静脈血栓内 CCR5 のリガンドを検討するため、real time RT-PCR 及び蛍光二重染色を行ったところ、CCR5 のリガンドとして、主に CCL3、CCL4、CCL5 が存在していることが分かった (図 11・図 12)。

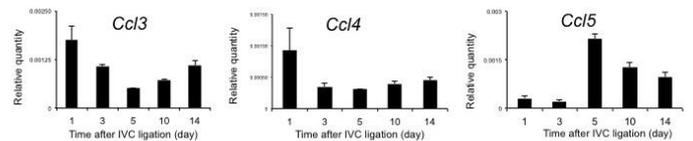


図 11 深部静脈血栓内の CCL3、CCL4、CCL5 の遺伝子発現
深部静脈血栓内に CCL3・CCL4・CCL5 遺伝子の発現が増加した。

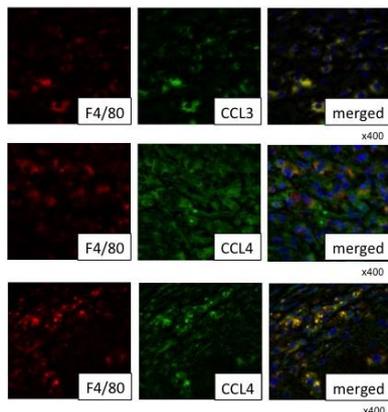


図12 CCR5のリガンド

CCR5発現F4/80陽性マクロファージがそれぞれCCL3・CCL4・CCL5が発現していた。CCR5のリガンドとして、CCL3、CCL4、CCL5が存在していると考えられた。

さらにそれらのリガンドがそれぞれ血管新生や血栓融解へのどのように影響を及ぼしているか検討するため、WT マウス・CCR5KO マウスそれぞれから採取した腹腔内マクロファージを、リコンビナントマウス CCL3 を加えて 24 時間刺激した後、血栓溶解因子 (uPA・tPA) および血管内皮増殖因子 (VEGF) の遺伝子発現量を検索した。WT マウスの腹腔内マクロファージは CCR5KO マウスと比較して、uPA の遺伝子発現が有意に増加することが分かった。同様の方法にて腹腔内マクロファージをリコンビナントマウス CCL4 で刺激すると、WT マウスで Vegf 遺伝子の発現が増加し、リコンビナントマウス CCL5 で刺激すると、WT マウスで tPA 遺伝子の発現がそれぞれ増加した (図 13)。

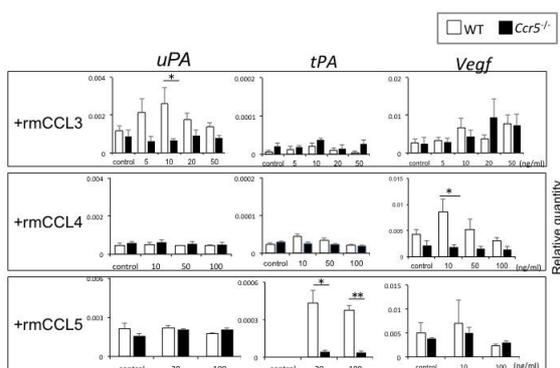


図13 腹腔内マクロファージにおけるリコンビナントマウス (rm) CCL3・CCL4・CCL5 投与後の血栓溶解因子および血管内皮増殖因子の遺伝子発現

CCR5KO マウスに対し WT マウス由来のマクロファージにおいて、

リコンビナント蛋白を投与したところ、rmCCL3 では tPA、rmCCL4 では Vegf、rmCCL5 では uPA の遺伝子発現が、有意に多い結果となった。* $P < 0.05$ 。

さらに CCR5 システムの血栓溶解への関与を明らかにするために、CCR1KO マウスの腹腔内マクロファージをリコンビナント CCL3 で刺激したところ、uPA 遺伝子の発現増加を認めた(図 14)。また、WT マウスの腹腔内マクロファージに抗 CCL4 抗体を加えると、Vegf 遺伝子の発現低下を認めた(図 15)。これらより、CCL3/CCR5 システムが uPA 産生に、CCL4/CCR5 システムが VEGF 産生に関与していると考えられた。

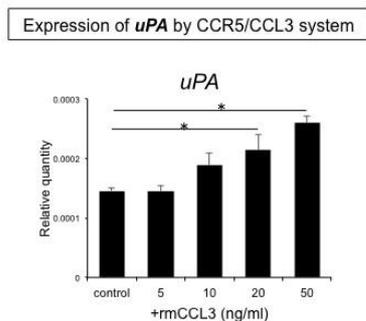


図14 CCL3/CCR5 システムによる uPA 産生
CCR1KO マウスの腹腔内マクロファージをリコンビナント CCL3 で刺激したところ、uPA の増加を認めた。* $P < 0.05$ 。

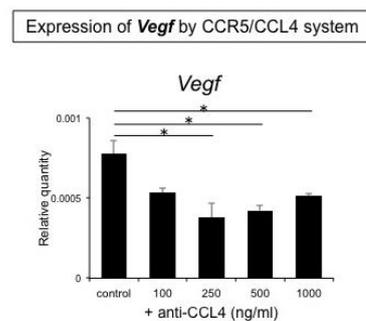


図15 CCL4/CCR5 システムによる VEGF 産生
WT マウス由来の腹腔内マクロファージに抗 CCL4 抗体を加えると、Vegf 遺伝子の低下を認めた。* $P < 0.05$ 。

IV. 考察

肺動脈血栓塞栓症の 90%以上は、下肢および骨盤内の深部静脈血栓に由来するものである(7)。病理学的に血栓形成の主要因として、血流うっ滞、血管内皮傷害、凝固能亢進が Virchow の三徴としてよく知られている(8)。その一方で、血栓の形成・退縮には、

各種サイトカイン・ケモカインが複合的に関与していることが示唆されてきた(5, 9, 10)。

本研究により CCR5 がマクロファージを通して、血栓溶解因子および血管内皮増殖因子の発現に関与し、血栓の退縮に関与していることが新たに示された。この成果は CCR5 を分子標的とする新薬開発につながると考えられ、新薬が開発されれば、担癌患者において、癌自体による死亡の次に、静脈血栓塞栓症による死亡が多いという現状を打破する可能性を秘めている。

V. 結論

CCR5 遺伝子が欠損すると、深部静脈血栓内の血栓溶解因子 (tPA・uPA) および血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生は低減する。その結果、CCR5 遺伝子欠損マウスでは深部静脈血栓の溶解が阻害され、CCR5 が血栓の退縮に関与していることが示唆された。

今回の研究成果は、CCR5 システムを分子標的とする新薬開発につながるのではないかと考えられた。

VI. 研究協力者

近藤稔和・和歌山県立医科大学法医学・教授
石田裕子・和歌山県立医科大学法医学・講師
野坂みずほ・和歌山県立医科大学法医学・助教
木村章彦・和歌山県立医科大学法医学・博士研究員
川口真理子・和歌山県立医科大学法医学・研究員

VII. 参考文献

- 1) Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, et al. Malignancies, Prothrombotic Mutations, and the Risk of Venous Thrombosis. *JAMA* 2005; 293: 715-722.
- 2) Lee AY, Levine MN, Baker RI, et al. Randomized Comparison of Low Molecular Weight Heparin and Coumarin Derivatives on the Survival of Patients With Cancer and Venous Thromboembolism. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 2123-2129
- 3) Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A, et al. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* 2002; 100: 3484-3488.
- 4) Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010; 468: 829-833.
- 5) Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, et al. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 2911-2920.
- 6) Mañes S, Mira E, Colomer R, et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *Journal of Experimental Medicine* 2003;198: 1381-1389.
- 7) 伊東正明, 池田正孝, 石橋宏之ほか編. 肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断, 治療, 予防に関するガイドライン (2017 年改訂版) 2017. p 1-93.
- 8) Meissner MH, Strandness JR. The epidemiology and natural history of acute deep vein thrombosis. In: Glociczki P, et al. editors. Hand-book of venous disorders. Arnold, 2001.p.38-48.
- 9) Humphries J, McGuinness CL, Smith A, et al. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) accelerates the organization and resolution of venous thrombi. *J Vasc Surg* 1999; 30: 894-899.
- 10) Varma MR, Varga AJ, Knipp BS, et al. Neutropenia impairs venous thrombosis resolution in the rat. *J Vasc Surg* 2003; 38: 1090-1098.