
研究助成業績報告集

第 23 回（2015 年度）バイエル循環器病研究助成
『動脈疾患と抗凝固療法』

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	動脈硬化リスクを有する慢性心不全患者に抗凝固療法が炎症性バイオマーカーに及ぼす影響についての前向き探索的臨床研究	高濱 博幸	1
2	動脈硬化発症における FXa-PARs シグナルのマクロファージ活性化調節機構の解明	福田 大受	6
3	トロンビン活性化を促進する新しい凝固・血栓形成機構の解明	藤田 佳子	13
4	アテローム血栓症の直接的抗凝固療法に繋がるプラークの血栓形成能の解明	山下 篤	15

動脈硬化リスクを有する慢性心不全患者に抗凝固療法が炎症性バイオマーカーに及ぼす影響についての前向き探索的臨床研究

国立循環器病研究センター・心臓血管内科部門心不全科
高濱 博幸

I. 緒言

近年、心不全患者の病態進展において様々な炎症反応の誘導・維持が重要な役割を果たしていることが示唆されている。全身的な pro-inflammatory state (前炎症状態) は冠血管内皮細胞から reactive oxygen species (ROS) 産生に関与し、血管内皮細胞で産生された ROS は血管内皮細胞の一酸化窒素 (NO) の availability の低下や心筋細胞での PKG の低下をもたらすことにより心不全病態の悪循環を惹起させることが考えられる¹。また心房細動は心不全患者に高率に合併するが、近年の研究では心房細動患者において炎症性マーカーの上昇は心血管予後に関連することが明らかとなりつつある²。つまり心不全悪化と心房細動の発症は相互に関連性を有し、その共通する背景因子に炎症が存在する可能性が示唆される。ここで前炎症状態を検出する技術は特にバイオマーカーの開発分野で進歩が著しい。例えば、Pentraxin3 (PTX3) は炎症性マーカーの一つであるが、リポ多糖体(LPS)やインターロイキン-1(IL-1)、TNF- α などの炎症シグナルに反応して血管内皮細胞や血管平滑筋細胞などから産生される。そのため、主に IL-6 の刺激により肝臓で産生される CRP と比べ、より鋭敏に血管局所の炎症を反映すると考えられている。さらに近年の研究では拡張期心不全患者において冠循環で PTX3 の上昇が示唆されており高感度 CRP と比しても有意に左室の拡張不全の程度と相関する³。また growth differential factor-15 (GDF-15) は TGF- β ファミリーに属し組織障害時の炎症や酸化ストレスに関与し心血管予後との関連性も深いことが知られている⁴。さらに心房細動患者において GDF-15 は出血・塞栓イベントの強力な予後予測因子であることも明らかとなった (ARISTOTLE 試験)⁵。これらのバイオマーカー測定に代表されるように測定技術の進歩により前炎症状態の検出が可能となりつつあり本研究ではこれらのバイオマーカー測定により心不全患者の前炎症状態を検出する。

ここで新規経口抗凝固薬 (Novel anti-coagulants:

NOAC) は作用機序より活性型血液凝固第X因子

(FXa) 阻害薬とトロンビン阻害薬に大別される。ここで FXa は活性化血小板膜の陰性荷電リン脂質のホスファチジルセリンに結合して Va 因子と複合体を形成しプロトロンビンをトロンビンへ変換する。FXa は白血球や血管組織の細胞膜上のプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) -1, 2 を活性化して炎症促進や血管収縮などを惹起させる。さらにトロンビンは血小板や血管内皮細胞の PAR-1 を活性化して血小板凝集や血管内皮の炎症を惹起させるが、一方プロテイン C/活性化プロテイン C 受容体 (EPCR) を介した抗炎症作用も有すると考えられている。このように凝固系と炎症には密接な関連があり、特に FXa 阻害剤については上記機序より抗炎症作用を期待し得る。実際、動物実験レベルでは、リバーロキサバンの投与により炎症性メディエーターの発現が低下することが報告されている⁶。これらの NOAC の抗炎症作用が明らかとなっているのは、既出報告ではリバーロキサバンに限定されており本試験でリバーロキサバンを選択した根拠となっている。

一方、ワルファリンについては近年、動物実験レベルでビタミン K 依存性凝固タンパクの抑制から matrix gla protein の抑制を介した血管の石灰化やオステオカルシンを介した骨粗鬆症などの副作用も知られるようになってきた⁶⁸。ワルファリンから NOAC への治療変更がこれらの石灰化促進抑制に及ぼす効果についても不明な点が残されている。

また心不全患者における炎症は過凝固状態を惹起することが知られている⁹。心不全によって惹起された過凝固状態に対する NOAC とワルファリンの効果の差異については不明な点が多く¹⁰本試験では凝固活性化マーカーの測定もあわせて行う。

前述のリバーロキサバンの抗炎症作用は心不全患者の前炎症状態の改善に有効であることが期待される。心不全患者では高率に心房細動を併発しており^{11, 12}抗凝固薬導入を必要とする症例は多いが、最近の NOAC の登場で薬剤選択上、新しい選択肢が加

わった。一方で、心房細動を併発する非弁膜症性心不全患者に対する抗凝固療法の薬剤選択は未だ定まっていない現状にある。本研究では心房細動を伴う心不全患者において抗凝固薬の投与が炎症性マーカーや血管石灰化に関するバイオマーカーに及ぼす影響について探索的な検討を行い、将来の心不全患者の抗凝固薬選択に参考となり得る基礎的な情報を取得することを研究の目的としている。

II. 対象・方法

1. 目的

本試験では、心房細動合併心不全患者においてリバーロキサバンによる炎症性マーカー(高感度 CRP)に対する効果をワルファリンと比較して、単施設、無作為化、非盲検、実薬対照並行群間比較試験にて評価する。

2. 試験デザイン

単施設、無作為化、非盲検、実薬対照並行群間比較試験

3. 評価項目

3.1 主要評価項目

高感度 CRP の変化量 (ベースラインと 12 週後/48 週後)

3.2 副次評価項目

有効性評価項目

炎症性バイオマーカーの評価として

- 1) ペントラキシン 3 のベースラインと比較した変化量 (3 ヶ月後)
- 2) GDF-15 のベースラインと比較した変化量 (3 ヶ月後)

血管石灰化マーカーとして

- 3) matrix gla protein のベースラインと比較した変化量 (3 ヶ月後)

凝固系活性化マーカーとして

- 4) トロンビン・アンチトロンビン複合体
- 5) プロトロンビンフラグメント 1+2

心不全重症度の評価として

- 6) 血漿 BNP の変化量 (3 ヶ月後)

心血管イベントの評価として

- 7) 複合エンドポイント (心血管死または心血管疾患による入院) の発生率 (試験終了時)
- 8) 複合エンドポイント (心血管死または心不全による入院) の発生率 (試験終了時)
- 9) 心血管死の発生率 (試験終了時)
- 10) 心血管疾患による入院の発生率 (試験終了時)
- 11) 心不全による入院の発生率 (試験終了時)

- 12) あらゆる理由による死亡の発生率 (試験終了時)
- 13) あらゆる理由による入院の発生率 (試験終了時)

血栓塞栓症のイベントの評価として

- 14) 脳卒中の発生率の評価 (試験終了時)
- 15) 心尖部血栓塞栓症の発生率の評価 (任意・試験終了時)

安全性評価項目

- 1) 血液学的検査 (ヘモグロビン、ヘマトクリット値)
- 2) 肝機能 (AST, ALT, 総ビリルビン)
- 3) 腎機能 (BUN、クレアチニン)
- 4) 凝固系 (プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン、D ダイマー)
- 5) 有害事象

4. 試験薬情報

4.1 試験薬名称・含量等

一般名：リバーロキサバン

販売名：イグザレルト錠 10mg/イグザレルト錠 15mg

4.2 試験薬の名称・含量等

一般名：ワルファリン

販売名：ワーファリン錠 1mg/ワーファリン 0.5mg

5. 対象患者の選択：本試験は、心房細動合併心不全患者を対象とする。対象被験者として、登録時に下記のとすべての選択基準に合致し、いずれの除外基準にも抵触しない患者を適格症例として登録する。

5.1 選択基準

本臨床試験の登録には、以下の全ての選択基準を満たさなければならない。

- 1) 同意取得時の年齢が 20 歳以上 85 歳未満の患者

- 2) 心不全を呈する患者

以下のいずれかを満たす患者を心不全を呈する患者と定義する。

- ① 当院入院中の心不全患者
- ② 心不全入院既往のある外来通院患者
- ③ NYHA2 度以上の患者かつ過去 6 ヶ月以内に血漿 BNP 値が 100pg/ml 以上を呈した患者

- 3) 発作性心房細動もしくは持続性心房細動、永続性心房細動を伴う患者

- 4) 文書による同意が得られる患者

5.2 除外基準

- 1) 既に第 Xa 因子阻害剤もしくは直接トロンビン阻

害剤を内服中の患者

- 2) 心尖部血栓症の既往のある患者
- 3) 中等度以上の弁膜症を有する患者（ただし中等度の機能性僧帽弁逆流の有無は問わない）
- 4) 機械的補助循環装置を装着中の患者
- 5) 心血管疾患の手術を予定している患者
- 6) 明らかな感染性疾患や自己免疫性疾患を有している患者やステロイド製剤を内服している患者
- 7) 心サルコイドーシスの患者
- 8) 同意取得3ヶ月前よりスタチン、アセチルサリチル酸の内服を開始した患者
- 9) 同意取得3ヶ月前より以降に急性心筋梗塞・脳卒中・全身性塞栓症を発症した患者
- 10) クレアチニンクリアランス 15ml/分未満の患者
- 11) 血液凝固能の異常を伴う肝疾患、もしくは中等度以上の肝障害(Child-Pugh 分類の B または C)
- 12) 同意取得6ヶ月前より以降に頭蓋内出血や消化管出血の既往のある患者
- 13) 妊婦、または妊娠している可能性のある女性
- 14) コビシタットを含有する薬剤、HIV プロテアーゼを内服している患者
- 15) アゾール系抗心筋剤の系抗真菌剤を経口または内服加療を受けている患者
- 16) ワルファリンカリウムもしくはリバーロキサバンに過敏性を有する患者
- 17) 骨粗鬆症治療薬ビタミン K2（メナテトレノン）を内服中の患者
- 18) イグラチモドを内服中の患者
- 19) 重篤な悪性腫瘍の患者
- 20) 他の臨床試験に既に参加もしくは本試験期間中に参加する予定がある患者（ただし観察研究は除く）
- 21) その他の理由により、試験責任医師または分担医師が本試験への参加を不適当と判断した患者。

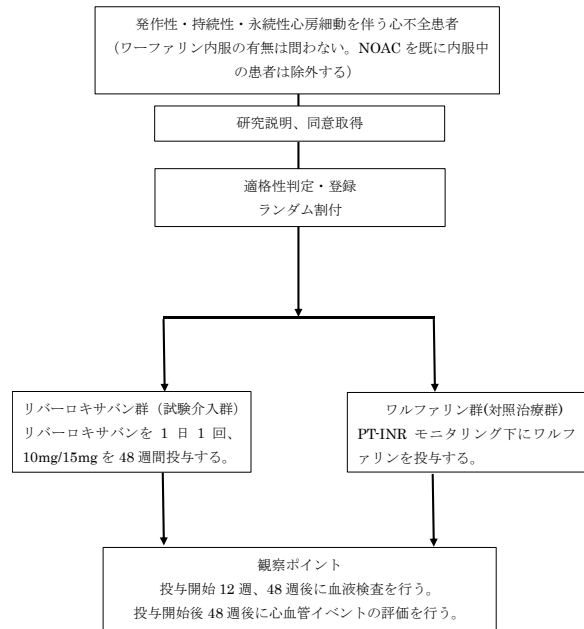
5.3 割付

被験者は、最小化法によりランダムにリバーロキサバン群またはワルファリン群に割り付けられる。リバーロキサバン群とワルファリン群の割付比は1：1である。最小化法で考慮する割付因子は、登録時点における CRP 値（0.50 以上または未満）、左房径（45mm 以上または未満）、年齢（75 歳以上または未満）、腎機能（eGFR30ml/min/1.73m² 以上または未満）、EF（50%以上または未満）、心房細動（発作性心房細動または持続性心房細動）の6項目である。なお、割

り付けには国立循環器病研究センター内の SAS 動的割付けシステムを用いる。

6. 試験薬の投与

本試験のスケジュールは以下のとおりである。



6.1 リバーロキサバン群（介入群）

リバーロキサバンとして15mgを1日1回経口投与する。なお中等度の腎機能障害（クレアチニンクリアランス 30-49ml/分）の患者ではリバーロキサバン 10mg 1日1回投与への減量を行う。リバーロキサバン群に割り付けられた症例は、試験開始日以降、試験終了または試験中止まで、他の NOAC ならびにワルファリンの服薬を禁止する。

ワルファリン服用患者のリバーロキサバンへの切り替えは以下のように行う。ワルファリン最終投与後、PT-INR が 2.0 以下（70 歳未満）、1.6 以下（70 歳以上）であることを確認しリバーロキサバンの投与を開始する。

6.2 ワルファリン群（対照群）

ワルファリンコントロールは日本循環器学会抗凝固・抗血小板療法に関するガイドラインに準じて PT-INR によるモニタリングを行う。循環器疾患に関する抗凝固・抗血小板療法に関するガイドラインに準じる。ワルファリン群に割り付けられた症例は、試験開始日以降、試験終了または試験中止まで NOAC への変更は禁止する。

7. 目標症例数

目標症例数：70 例（[リバーロキサバン群] 35 例 [ワルファリン群] 35 例）

8. 統計的事項

8.1 目標症例数の設定根拠

孤立性心房細動に対するリバーロキサバン、ダビガトランが炎症性マーカーに与える影響について検討した先行研究（Circulation 2014; 130: A11890）に基づき、投与から 12 週後のリバーロキサバン投与群とダビガトラン投与群における、対数変換後の高感度 CRP の投与前からの変化について、群間差を 1.5、標準偏差 2 と仮定した。リバーロキサバン投与群の変化がダビガトラン投与群よりも大きいとの片側仮説のもとで、検出力を 80%、有意水準を 2.5% とすれば、t 検定に基づく必要最小例数は 29 例と計算された。さらに脱落例を考慮し、組み入れ目標被験者数を 35 例群と設定した。

8.2 主要評価項目の解析

高感度 CRP のベースラインから 12 週ならびに 48 週の変化量についてワルファリン群、リバーロキサバン群の比較について t 検定を用いて解析する。解析を実施する前に、高感度 CRP は対数変換を施す。対数変換に基づき得られた結果を指数変換し、投与後値の投与前値に対する比として結果を両側 95% 信頼区間と一緒に表示する。必要に応じて、ベースライン、12 週、48 週の高感度 CRP の推移をモデルに基づく方法（例えば、混合効果モデルなど）を用いて検討する。

8.3 副次評価項目の解析

有効性評価項目

GDF-15、ペントラキシン 3、matrix gla protein のベースライン・3 ヶ月の変化量についてワルファリン群、リバーロキサバン群の群間の比較を、主要評価項目と同様の解析を実施する。

安全性評価項目

出血性合併症について、ワルファリン群、リバーロキサバン群のそれぞれについて、発生頻度、発生割合を計算する。必要に応じて、Fisher の直接確率計算を用いてこれらの発生割合を群間で比較する。

9. 倫理的事項

遵守すべき諸規則

本試験は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」及び試験実施計画書を遵守して実施する。

III. 結 果

本臨床試験は 2017 年 6 月 30 日までに 70 症例のエントリーを予定する前向き介入臨床試験である。途中解析は予定しておらず全症例をエントリー後、結果の公表を行う予定である。ただし試験開始前に先立ち予備的な調査としてレトロスペクティブな解析を実施したので報告する。病名登録システムならびにカルテ解析から 288 名の心不全入院患者を抽出した。さらにこのうちリバーロキサバンを内服した 10 名の心不全患者（NYHA3-4）を抽出した。この患者群の患者（DCM 3 例、ICM 1 例、収縮性の保持された心不全患者（HFpEF）4 例）との結果であった。3 日間の観察期間（リバーロキサバン投与前日、投与開始翌日）のなかで平均血清 CRP 値は $0.99 \pm 2.13 \text{ mg/dl}$ から $0.89 \pm 1.37 \text{ mg/dl}$ への低下を認めた。ただし、以前に当院で実施した急性心不全患者のデータベースを用いると心不全患者全体でも入院時 $\text{CRP} 1.71 \pm 2.94 \text{ mg/dl}$ に対し退院時の CRP は $0.55 \pm 1.07 \text{ mg/dl}$ への低下が認められた（ $n=432$ ）。

IV. 考 察

上記予備調査の結果からリバーロキサバン内服後の炎症反応の低下傾向を確認し得たが、自験例を上記に示したとおり、急性心不全入院患者には CRP 値の上昇が認められ心不全の安定期（退院時）には CRP 値の低下傾向が認められた。従ってこの炎症反応の改善が心不全自体の改善によるものであるか？薬剤による影響であるか？を弁別するためには前向き介入試験が必要であると考えた。本臨床試験は 2016 年 4 月時点で試験継続中の段階である。中間解析については予定しておらず、全症例解析後、結果を公表予定である。従って現時点での結果公表は控えたい。緒言に記載したように本試験はリバーロキサバンの多面的作用に着目する一方で炎症の複数のカスケードに着目しており今後の研究の進展に期待したい。

V. 結 論

リバーロキサバンの抗炎症作用に着目した前向き

臨床試験を開始した。

VI. 研究協力者

安斉俊久・国立循環器病研究センター・部長
北風政史・国立循環器病研究センター・部長
神崎秀明・国立循環器病研究センター・医長
朝倉正紀・国立循環器病研究センター・医長
菅野康夫・国立循環器病研究センター・医長
長谷川拓也・国立循環器病研究センター・医師
大原貴裕・国立循環器病研究センター・医師
天木誠・国立循環器病研究センター・医師
高潮征爾・国立循環器病研究センター・医師
岡田厚・国立循環器病研究センター・医師

VII. 参考文献

参考文献

1. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: Comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:263-271
2. Wallentin L, Hijazi Z, Andersson U, et al.. Growth differentiation factor 15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation: Insights from the apixaban for reduction in stroke and other thromboembolic events in atrial fibrillation (aristotle) trial. *Circulation*. 2014;130:1847-1858
3. Matsubara J, Sugiyama S, Nozaki T, et al.. Pentraxin 3 is a new inflammatory marker correlated with left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with normal ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:861-869
4. Anand IS, Kempf T, Rector TS, et al. Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: Relation to disease severity and prognosis in the valsartan heart failure trial. *Circulation*. 2010;122:1387-1395
5. Hara T, Fukuda D, Tanaka K, et al. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in apoe-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2015;242:639-646
6. Fusaro M, Dalle Carbonare L, Dusso A, et al. Differential effects of dabigatran and warfarin on bone volume and structure in rats with normal renal function. *PLoS One*. 2015;10:e0133847
7. Luo G, Ducey P, McKee MD, et al. P Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix gla protein. *Nature*. 1997;386:78-81
8. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1400-1407
9. Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004;109:2698-2704
10. Gheorghiade M, Thyssen A, Zolynas R, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban and its effect on biomarkers of hypercoagulability in patients with chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30:218-226
11. Mohammed SF, Borlaug BA, Roger VL, et al. Comorbidity and ventricular and vascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: A community-based study. *Circ Heart Fail*. 2012;5:710-719
12. Sato N, Kajimoto K, Keida T, et al. Clinical features and outcome in hospitalized heart failure in japan (from the attend registry). *Circ J*. 2013;77:944-951

動脈硬化発症における FXa-PARs シグナルの マクロファージ活性化調節機構の解明

—FXa-PARs シグナルと動脈硬化—

徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学分野・特任講師
福田 大受

I. 緒言

近年、新規の経口血液凝固阻害薬が臨床応用され、抗凝固療法において良好な成績を収めている(1)。一方、最近の大規模臨床試験(ATLAS 試験)によって、直接型活性化血液凝固第 X 因子(FXa) 阻害薬の一つ rivaroxaban を通常の抗凝固療法に用いられる用量よりも少量投与することで、急性冠症候群患者における新たな心血管イベントが減少することが示された(2-4)。この結果は FXa 阻害が動脈血栓の形成を抑制したのみならず、抗凝固以外の何らかの抗動脈硬化作用を有する可能性を示唆している。

動脈硬化は、マクロファージを中心とした血管の慢性炎症を基盤として発症する(5)。様々な経路が、マクロファージの活性化を引き起こす(6)。以前から、血液凝固因子が血液凝固に関与するだけでなく、種々の臓器の炎症反応を引き起こす可能性が示唆されている(7)。特に、FXa は、プロテアーゼ受容体(protease-activated receptor, PAR)のサブタイプのうち、主に PAR-2 を活性化することが報告されている(8, 9)。しかしながら、FXa-PARs シグナルのマクロファージ活性化における役割は知られていない。そこで、我々は、「FXa-PARs シグナルがマクロファージを活性化し、血管の炎症を惹起することで、動脈硬化病変の進展に関与する」との仮説に着想し、検証を行うこととした。

II. 対象・方法

最初に FXa-PARs シグナルの動脈硬化への関与の可能性を検討するため、性別と週齢を一致させた動脈硬化モデルマウスである apolipoprotein E 欠損(ApoE KO)マウスと野生型マウスの間で、大動脈と動脈硬化の進展に重要な役割を果たすマクロファージにおける PARs の発現を比較検討する。次に FXa-PAR2 シグナルを阻害することで動脈硬化病変の形成を抑制できるか検討するため、FXa 阻害薬で

ある rivaroxaban を用いた薬理的阻害実験と、ApoE KO マウスにおいて PAR-2 を遺伝学的に欠損させた PAR-2/ApoE 2 重欠損(dKO)マウスを用いた遺伝学的阻害実験を行う。動脈硬化病変の形成の程度を、大動脈における en face Sudan IV 染色で検討する。また、大動脈起始部における動脈硬化病変における Oil red O 染色(脂質沈着の解析)や picrosirius red 染色(膠原線維の解析)、マクロファージマーカーである Mac3 や monocyte chemoattractant protein (MCP-1)、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) に対する免疫染色などの組織学的検討を行い、動脈硬化病変の不安定化の程度を評価する。また、大動脈の遺伝子発現を定量的 RT-PCR (qPCR)を用いて検討する。

さらに、マクロファージにおける FXa-PAR2 シグナルが、動脈硬化病変形成に与える影響を検討するため、ApoE KO マウスの骨髄を PAR-2/ApoE dKO マウスの骨髄で置換し、骨髄特異的 PAR-2 欠損 ApoE KO マウスを作製し、コントロールの骨髄キメラマウス(ApoE KO マウスの骨髄を ApoE KO マウスの骨髄で置換)との間で、動脈硬化病変の形成や不安定化を比較検討する。

これらのマウスにおける、血糖値や血中脂質値、血圧、体重などを比較検討する。

また、マクロファージの活性化における FXa-PAR2 シグナルの役割を検討するため、PAR-2 KO マウスと野生型マウスから、骨髄細胞を採取し、M-CSF の存在下で骨髄由来マクロファージを分化させ、FXa や PAR-2 アゴニスト(AP-2)を用いて刺激を行い、炎症性物質の発現の程度や脂質の取り込みの程度などを比較検討する。

さらに、ヒト冠動脈病変の形成における FXa-PAR2 シグナルの関与を検討するため、当科でスタチンの投与から最低 6 か月後に、左前下行枝に対してステント留置を行い、ステントの近位端から

5 mm 以上離れた部位のプラーク量を血管内超音波法(intravascular ultrasound, IVUS)で測定しえた 32 症例において、血中の FXa 濃度を測定し、プラーク量との相関を検討した。

データは全て平均値±標準誤差で表記。2 群間の比較は unpaired-T test で行い、多群間の比較は one-way ANOVA で行い、各群間の比較には Scheffe's post hoc analysis を行った。臨床検体を用いた検討では、2 変量の相関は univariate analysis を用い解析を行った。

III. 結果

1. 大動脈とマクロファージにおける PARs の発現検討

性別と週齢が一致した野生型マウスと ApoE KO マウスの大動脈において、PARs の発現を qPCR で比較したところ、PAR1 と PAR2 に関しては、ApoE KO マウスにおいて有意な発現増加が認められた。また、動脈硬化の発症と進展に重要な役割を果たすマクロファージにおいても、PARs の発現が認められることが分かった (図 1)。

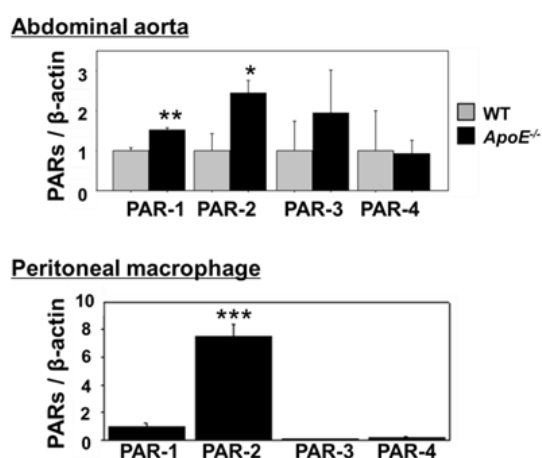


図 1. PARs の発現

(上段) 大動脈における PAR-2 の発現は、野生型マウスに比べて ApoE KO マウスで有意に多い。(下段) マクロファージには PAR-1 と PAR-2 が多く発現する。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2. rivaroxaban による抗動脈硬化作用の検討

生後 8 週齢の雄性 ApoE KO マウスに対して rivaroxaban (5 mg/kg/day) を西洋食に混ぜ、20 週間投与した。その間の体重増加量は、投与群と無投与群との間で差は認めず、さらに投与 20 週間後の血圧や血糖値、血中脂質レベルは有意差を認めなかった

(表 1)。

表 1. Rivaroxaban の代謝パラメーターに対する影響

	Control (n=18)	Rivaroxaban (n=21)	p-value
Body weight, g	43.3 ± 2.5	37.8 ± 2.4	0.12
Heart rate /min	690 ± 21	732 ± 19	0.15
Systolic BP, mmHg	103.1 ± 2.8	99.6 ± 2.6	0.36
Mean BP, mmHg	81.2 ± 2.7	80.0 ± 2.5	0.72
Diastolic BP, mmHg	70.3 ± 2.9	70.1 ± 2.7	0.36
Plasma glucose, mg/dl	163.1 ± 10.0	160.9 ± 9.3	0.87
Triglyceride, mg/dl	123.3 ± 13.2	128.9 ± 12.2	0.76
Total cholesterol, mg/dl	1162.1 ± 115.8	1004.7 ± 107.2	0.33
Rivaroxaban, µg/L	—	28.49 ± 2.57	—
Factor Xa, ng/ml	7.29 ± 0.68	8.02 ± 0.59	0.42
TAT complexes, ng/ml	43.6 ± 8.1	49.8 ± 6.7	0.55

しかし、大動脈弓部における大動脈病変の形成は rivaroxaban の投与によって有意に抑制され(図 2)、動脈硬化プラークにおける脂質沈着や膠原線維の減少、さらにマクロファージの浸潤や MMP-9 の発現は、rivaroxaban 群で有意に低下し、動脈硬化プラークは安定化していることが分かった (図 3)。

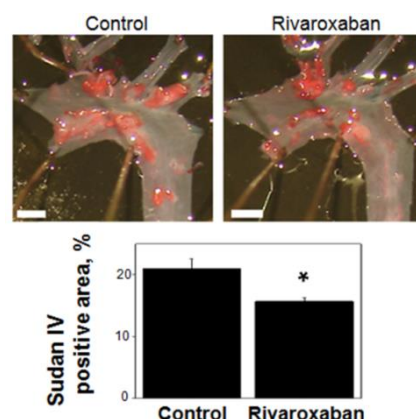


図 2. 薬理的 FXa-PAR-2 シグナル阻害による動脈硬化抑制作用

ApoE KO マウスにおいて、FXa 阻害薬である rivaroxaban の投与により FXa-PAR-2 シグナルを薬理的に阻害すると、無治療の ApoE KO マウスと比べて、Sudan IV 染色で評価される大動脈弓部の動脈硬化病変の形成が有意に抑制された。* $P < 0.05$ 。

また、大動脈から抽出した RNA を用いた qPCR では、rivaroxaban の投与によって、大動脈におけるマクロファージの浸潤や MCP-1 や TNF- α などの炎症性物質の発現が有意に低下していることが分かった (図 4)。また、今回用いた rivaroxaban の投与量は、臨床容量の下限程度であった (表 1)。これらの結果は、rivaroxaban 投与によって FXa を阻害することで FXa-PAR2 シグナルが遮断され、血管壁における炎症を抑制することで動脈硬化の形成が抑制されたことを示唆していると考えられた。

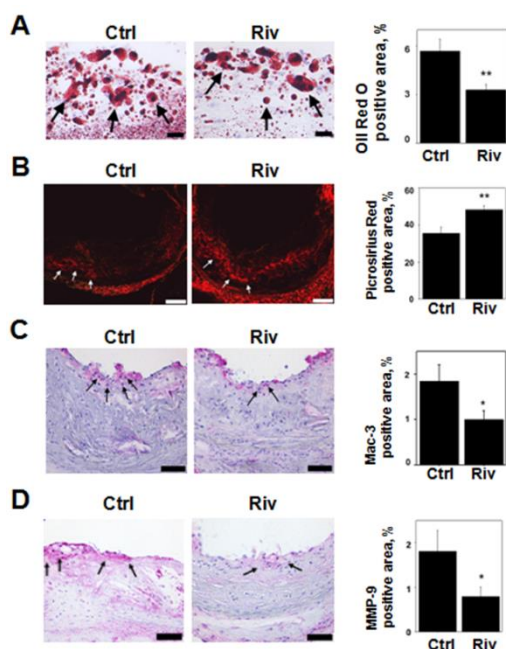


図3. 薬理的 FXa-PAR-2 シグナル阻害による動脈硬化病変の安定化作用

ApoE KO マウスにおいて、FXa 阻害薬である rivaroxaban の投与により FXa-PAR-2 シグナルを薬理的に阻害すると、無治療の ApoE KO マウスと比べて、動脈硬化病変における脂質沈着(A)、膠原線維の減少(B)、マクロファージの浸潤(C)、MMP-9 の発現(D)が有意に減少し、動脈硬化病変が安定化していることが明らかになった。*P<0.05、**P<0.01。

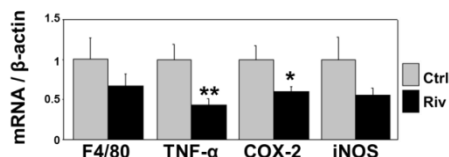


図4. 薬理的 FXa-PAR-2 シグナル阻害による大動脈における炎症性物質の発現抑制効果

ApoE KO マウスにおいて、FXa 阻害薬である rivaroxaban の投与により FXa-PAR-2 シグナルを薬理的に阻害すると、無治療の ApoE KO マウスと比べて、大動脈における炎症性物質の発現が低下することが明らかになった。*P<0.05、**P<0.01。

3. PAR-2 の遺伝的欠損による抗動脈硬化作用の検討

ApoE KO マウスと PAR-2 KO マウスを交配し、PAR-2/ApoE 2 重欠損 (dKO)マウスを作製した。生後 8 週齢の雄性 PAR-2/ApoE dKO マウスに西洋食を 20 週間投与した。ApoE KO マウスを対象群として用いた。PAR-2/ApoE dKO マウスと ApoE KO マ

ウスの間に、体重や血糖値、血中脂質値、血圧に差は認められなかった (表 2)。

表 2. PAR-2 の遺伝的欠損が代謝パラメーターに与える影響

	ApoE KO	PAR-2/ApoE dKO	p-value
Body weight, g	38.8 ± 1.8	43.0 ± 1.5	0.07
Heart rate, /min	667 ± 14	645 ± 12	0.28
Systolic BP, mmHg	110.5 ± 3.7	115.7 ± 3.0	0.29
Diastolic BP, mmHg	80.1 ± 3.8	84.2 ± 3.1	0.41
Plasma glucose, mg/dl	133.7 ± 6.2	131.5 ± 5.0	0.78
Triglyceride, mg/dl	117.0 ± 31.2	114.5 ± 26.4	0.95
Total cholesterol, mg/dl	1084.3 ± 179.0	1316.4 ± 151.3	0.33
HDL-C, mg/dl	20.5 ± 5.0	26.0 ± 4.3	0.41
LDL-C, mg/dl	1040.3 ± 173.0	1298.2 ± 151.7	0.27

しかし、大動脈弓部における動脈硬化病変の形成は PAR-2 の遺伝的欠損によって有意に抑制されていた (図 5)。

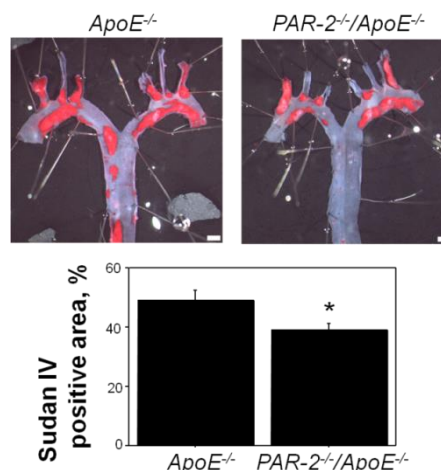


図5. 遺伝的 FXa-PAR-2 シグナル阻害による動脈硬化抑制作用

PAR-2 を遺伝的に欠損させた ApoE KO マウス (PAR-2^{-/-}/ApoE^{-/-}) は、通常の ApoE KO マウスと比べて、Sudan IV 染色で評価される大動脈弓部の動脈硬化病変の形成が有意に抑制された。*P<0.05。

また、PAR-2 の欠損により動脈硬化プラークにおける脂質沈着や膠原線維の減少、さらにマクロファージの浸潤や MMP-9 の発現は低下し、動脈硬化プラークは安定化していることが分かった (図 6)。また、大動脈から抽出した RNA を用いた qPCR では、PAR-2 の遺伝的欠損によって、大動脈におけるマクロファージの浸潤や MCP-1 や TNF-α などの炎症性物質の発現が有意に低下していることが分かった

(図 7)。これらの結果は、PAR-2 の遺伝的欠損によって FXa-PAR2 シグナルが遮断され、血管壁における炎症を抑制することで動脈硬化の形成が抑制されたことを示唆していると考えられた。

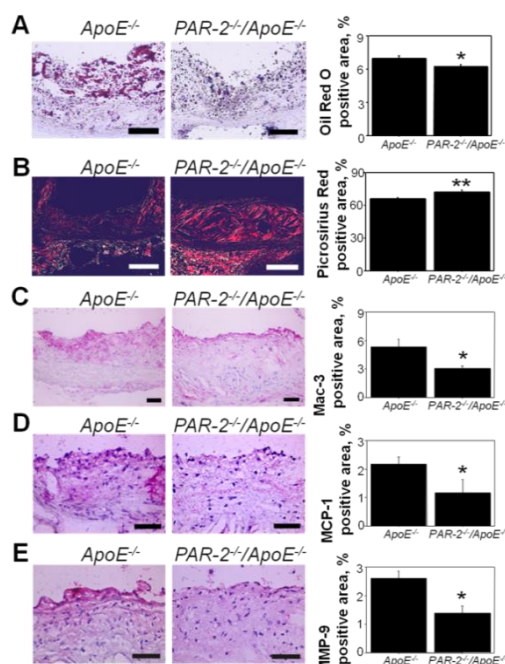


図 6. 遺伝的 FXa-PAR-2 シグナル阻害による動脈硬化病変の安定化作用

PAR-2 を遺伝的に欠損させた ApoE KO マウス (PAR-2^{-/-}/ApoE^{-/-}) は、通常の ApoE KO マウスと比べて、動脈硬化病変における脂質沈着(A)、膠原線維の減少(B)、マクロファージの浸潤(C)、MCP-1 の発現(E)、MMP-9 の発現(E)が有意に減少し、動脈硬化病変が安定化していることが明らかになった。*P<0.05, **P<0.01。

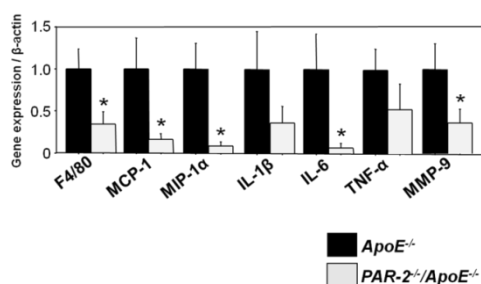


図 7. 遺伝的 FXa-PAR-2 シグナル阻害による大動脈における炎症性物質の発現抑制効果

PAR-2 を遺伝的に欠損させた ApoE KO マウス (PAR-2^{-/-}/ApoE^{-/-}) は、通常の ApoE KO マウスと比べて、大動脈における炎症性物質の発現が低下することが明らかになった。*P<0.05, **P<0.01。

4. 骨髄特異的 PAR-2 欠損による抗動脈硬化作用の検討

これまでの論文で PAR-2 は、血管内皮細胞や平滑筋細胞などの血管構成細胞と、白血球系の細胞に発現しており、逆に血小板には発現しないという、他

の PAR ファミリーには見られない発現パターンを示すことが明らかになっている。これまでに血管内皮細胞における PAR-2 の役割については検討されているが、PAR-2 がマクロファージ機能に与える影響については検討されていない。そこで、ApoE KO マウスの骨髄を PAR-2/ApoE dKO マウスの骨髄で置換した骨髄移植マウスを作製した。ApoE KO マウスの骨髄を ApoE dKO マウスの骨髄で置換した骨髄移植マウスをコントロール群として、西洋食負荷により、動脈硬化病変を誘導した。尚、骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスとコントロールマウスの間で、体重や血圧、血中脂質レベルや血糖値に差は認めなかった (表 3)。

表 3. 骨髄特異的 PAR-2 欠損が代謝パラメーターに与える影響

Donor Recipient	ApoE ^{-/-}	PAR-2 ^{-/-} /ApoE ^{-/-}	p-value
Body weight, g	28.8±1.7	27.6±1.5	0.30
Heart rate /min	667±14	667±14	0.49
Systolic BP, mmHg	102.3±7.5	106.5±6.5	0.35
Diastolic BP, mmHg	62.7±7.2	69.8±6.3	0.91
Plasma glucose, mg/dl	131.3±6.3	122.8±5.5	0.25
Triglyceride, mg/dl	186.3±23.9	223.8±29.7	0.34
Total cholesterol, mg/dl	983.1±42.2	1147.0±79.5	0.09
HDL-C, mg/dl	26.4±2.9	21.1±2.0	0.14
LDL-C, mg/dl	919.4±44.3	1081.0±80.7	0.10

骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスは、有意に動脈硬化病変の形成が抑制され (図 8)、

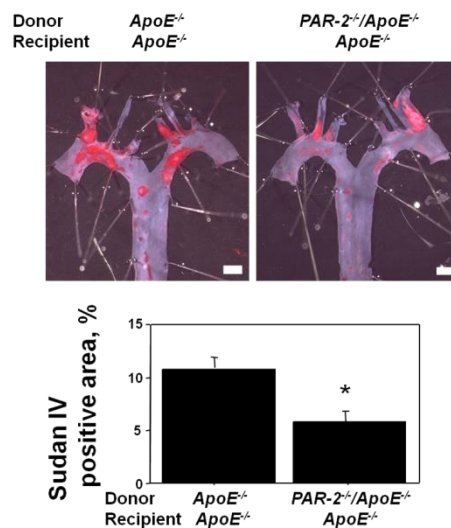


図 8. 骨髄特異的 PAR-2 欠損による動脈硬化抑制作用

骨髄移植により ApoE KO マウスの骨髄を PAR-2^{-/-}/ApoE^{-/-}マウスの骨髄によって置換した骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスは、コントロール骨髄移植マウス(ApoE KO マウスの骨髄を ApoE KO マウスの骨髄によって置換した)と比べて、Sudan IV 染色で評価される大動脈弓部の動脈硬化病変の形成が有意に抑制された。*P<0.05。

プラークにおける脂質沈着や膠原線維量、マクロファージ浸潤などで評価された不安定性も減弱していた (図 9)。

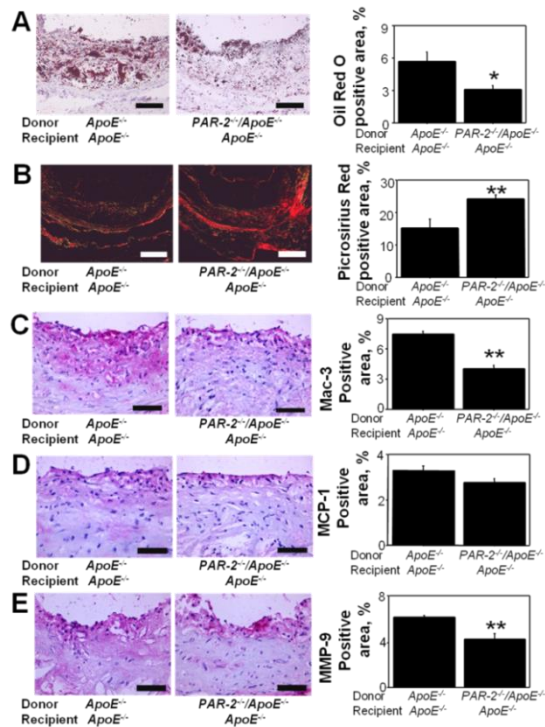


図 9. 骨髄特異的 PAR-2 欠損による動脈硬化病変の安定化作用
骨髄移植により ApoE KO マウスの骨髄を PAR-2^{+/+}/ApoE^{+/+}マウスの骨髄によって置換した骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスは、コントロール骨髄移植マウス(ApoE KO マウスの骨髄を ApoE KO マウスの骨髄によって置換した)と比べて、動脈硬化病変における脂質沈着(A)、膠原線維の減少(B)、マクロファージの浸潤(C)、MCP-1の発現(E)、MMP-9の発現(E)が有意に減少し、動脈硬化病変が安定化していることが明らかになった。*P<0.05、**P<0.01。

さらに、大動脈における MCP-1 や TNF- α などの炎症性物質の遺伝子発現も骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスで減少していた (図 10)。

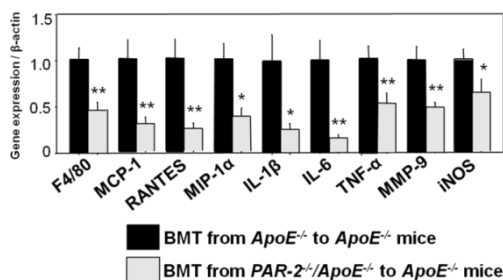


図 10. 骨髄特異的 PAR-2 欠損による大動脈における炎症性物質の発現抑制効果

骨髄移植により ApoE KO マウスの骨髄を PAR-2^{+/+}/ApoE^{+/+}マウスの骨髄によって置換した骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスは、コントロール骨髄移植マウス(ApoE KO マウスの骨髄を ApoE KO マウスの骨髄によって置換した)と比べて、大動脈における炎症性物質の発現が低下することが明らかになった。*P<0.05、**P<0.01。

5. マクロファージの活性化における FXa-PAR2 シグナルの役割の検討

FXa-PAR2 シグナルがマクロファージの活性化に与える影響を検討するため、野生型マウスと PAR-2 KO マウスから骨髄由来マクロファージを作製し、FXa と PAR-2 の特異的アゴニストペプチドを用いて刺激を行った。その結果、野生型マウス由来の骨髄由来マクロファージでは、FXa と PAR-2 アゴニストによる刺激によって、MCP-1 や TNF- α の発現が増加したが、PAR-2 KO マウス由来のマクロファージでは、同様の反応は認められなかった。さらに、マクロファージは脂質を取り込み、泡沫化することで活性化し、動脈硬化の発症を促進する。野生型マウスの骨髄由来マクロファージに FXa や AP-2 を作用させることで泡沫化が促進されたが、PAR-2 KO マクロファージでは、泡沫化の促進が認められなかった。これらの結果は、FXa-PAR2 シグナルの活性化が、マクロファージの活性化を促進することを示唆していると考えられた (図 11)。

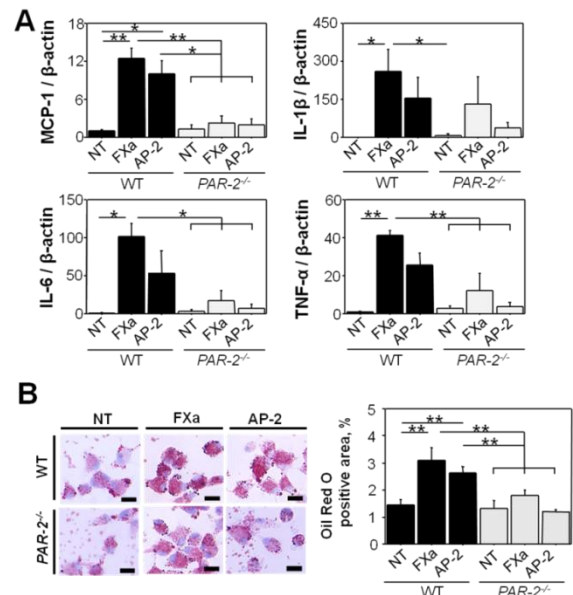


図 11. FXa-PAR2 シグナルによるマクロファージ活性化効果
(A) FXa や PAR-2 の特異的アゴニスト(AP-2)は、野生型マウスの骨髄由来マクロファージを活性化し、炎症性物質の発現を増加させ

たが、PAR-2⁺マウスの骨髄由来マクロファージでは、炎症性物質の発現増加は認められなかった。(B) 野生型マウスの骨髄由来マクロファージは、FXa や AP-2 により、酸化 LDL の取り込みが促進したが、PAR-2⁺マウスの骨髄由来マクロファージでは、酸化 LDL の取り込み促進効果は認められなかった。*P<0.05、**P<0.01。

6. ヒト動脈硬化における FXa-PAR2 シグナルの関与の検討

スタチンの内服歴が 6 カ月以上ある安定狭心症患者で、当科で左前下行枝にステント留置を受けた安定狭心症患者のうち、ステント近位端から 5 mm 以上離れた血管を、5 mm 以上にわたって、IVUS を用いて観測し、プラーク容積を計測できた 32 症例 (69.6±1.1 歳、男性 63%) において、血液中の FXa 濃度を測定し、冠動脈プラークの容積との相関を検討したところ、有意な正の相関を認めた ($r=0.42$, $p<0.05$) (図 12)。

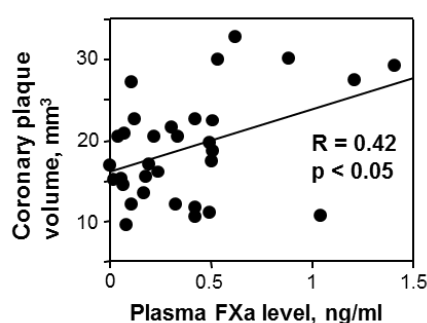


図 12. 冠動脈プラーク容積と FXa 濃度の関係

冠動脈疾患患者において冠動脈プラーク容積と FXa 濃度は、有意な正の相関を認めた。

IV. 考察

凝固系は、血液凝固以外にも、多くの機能を持っている (10)。PARs の中でも、特に、今回注目した PAR-2 は、血小板には発現せず、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞と、白血球系の細胞に発現しており、血管の生理活性調整に関与することが報告されている (8)。さらに、PAR-2 シグナルが、脂肪組織の炎症に関与し、引き続くインスリン抵抗性の発症に関与すること (11)、血管障害後の新生内膜増殖に関与する (12) ことから、生体内の慢性炎症への関与も推測された。また、近年、FX が動脈硬化内のマクロファージに発現していることも報告された (13)。しかし、FXa-PAR-2 シグナルのマクロファージ活性化における役割と動脈硬化への関与は検討されていなか

った。今回、我々が行った薬理学的ならびに遺伝的な FXa-PAR-2 シグナルの遮断実験は、ApoE KO マウスにおける動脈硬化病変の形成と不安定化を抑制し、FXa-PAR-2 シグナル動脈硬化病変形成に関与することを示した。さらに骨髄移植により作製した骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスを用いた検討では、動脈硬化発症の中心的役割を果たすマクロファージの活性化に FXa-PAR-2 シグナルが関与することを明らかにした。また、骨髄由来マクロファージを用いた *in vitro* 実験においても、PAR-2 シグナルがマクロファージの炎症反応を惹起することが証明された。また、ヒトの冠動脈疾患の重症度と、血中の FXa が関連したことから、ヒトの動脈硬化病変の形成にも FXa-PAR-2 シグナルが関与することが推測された。以上から、FXa-PAR-2 シグナルは、マクロファージの活性化を介して血管の炎症を惹起し、動脈硬化病変の形成を促進することが示唆された。今回の結果は、新しい動脈硬化発症の機序を明らかにするだけでなく、FXa-PAR-2 シグナルが、動脈硬化の新しい治療標的になる可能性を示すものであると考えられた。

V. 結論 (まとめ)

FXa-PAR-2 シグナルは、マクロファージを活性化することで血管の炎症を惹起し、動脈硬化病変の形成を促進する。特に最近、経口直接型抗凝固薬が臨床で使用できるようになり話題となっているが、今回の研究結果から、これらの薬剤が、抗凝固薬としてだけではなく、抗動脈硬化薬としても効果が期待できるのではないかと考えられた。

VI. 研究協力者

原知也 徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学分野・医員

山口浩二 徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学分野・助教

村田知慧 徳島大学大学院医歯薬学研究部人類遺伝学分野・助教

八木秀介 徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学分野・助教

添木武 徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学分野・講師

若槻哲三 徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学分野・講師

井本逸勢 徳島大学大学院医歯薬学研究部人類遺伝学分野・教授

島袋充生 徳島大学大学院医歯薬学研究部心臓血管病態医学分野・特任教授

佐田政隆 徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学分野・教授

VII. 参考文献

1. Ageno W, Spyropoulos AC, Turpie AG. Role of new anticoagulants for the prevention of venous thromboembolism after major orthopaedic surgery and in hospitalised acutely ill medical patients. *Thromb Haemost* 2012; 107:1027-1034.
2. Mega JL, Braunwald E, Mohanavelu S, et al. Rivaroxaban versus placebo in patients with acute coronary syndromes (ATLAS ACS-TIMI 46): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 2009;374:29-38.
3. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2012;366:9-19.
4. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, et al. Comparison of the efficacy and safety of two rivaroxaban doses in acute coronary syndrome (from ATLAS ACS 2-TIMI 51). *Am J Cardiol* 2013;112:472-478.
5. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
6. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-1695.
7. Spronk HM, de Jong AM, Crijns HJ, et al. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovasc Res* 2014;101:344-351.
8. Leger AJ, Covic L, Kuliopulos A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation* 2006;114:1070-1077.
9. Major CD, Santulli RJ, Derian CK, et al. Extracellular mediators in atherosclerosis and thrombosis: lessons from thrombin receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:931-939.
10. Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 2004;109:2698-2704.
11. Badeanlou L, Furlan-Freguia C, Yang G, et al. Tissue factor-protease-activated receptor 2 signaling promotes diet-induced obesity and adipose inflammation. *Nat Med* 2011;17:1490-1497.
12. Tennant GM, Wadsworth RM, Kennedy S. PAR-2 mediates increased inflammatory cell adhesion and neointima formation following vascular injury in the mouse. *Atherosclerosis* 2008;198:57-64.
13. Borissoff JI, Heeneman S, Kilinc E, et al. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation* 2010;122:821-830.

トロンビン活性化を促進する新しい 凝固・血栓形成機構の解明

—凝固因子新規受容体の発見—

信州大学医学部・生理学教室・助教
藤 田 佳 子

I. 緒 言

血栓形成は、血管機能の病理的变化と結びついて、いと古くから考えられてきた。Virchow's triad として知られるように、向血栓性は血液・血流・血管壁の病理的变化から生じている。血液の粘稠度の増加、繊維素溶解活性低下、血液凝固因子の増加、血流の緩慢、血管内皮障害が血栓形成の要因となる。

近年、凝固因子に着目して開発された抗凝固薬が登場してきた。トロンビン阻害薬、第 Xa 因子阻害薬はワルファリンに代わるべく、この数年続々と登場している。しかし、新しく抗凝固薬が開発されれば、その薬による正常な凝固阻害がおこるため、さらにそれを抑制する薬が開発されている (1-3)。

凝固関連蛋白質は血中に多く存在するが、それらが、凝固カスケード反応の開始と共に各々活性化されていき、最終的にトロンビンが大量に生成される仕組みが成り立っている。そしてトロンビンによるフィブリノーゲン切断により、フィブリンができ、血栓ができる。そして血栓は、脳梗塞、心筋梗塞、肺塞栓症などを引き起こす。

血中の凝固関連蛋白質は非常に多いが、各々の血中濃度や半減期、働きが異なることや、血友病をはじめとした凝固因子欠損疾患などが多く存在するため、古くから幅広く研究が続けられている。また、血中の凝固関連蛋白質は凝固を促進するものと、凝固を抑制するものとが存在する。凝固を亢進するものは、凝固カスケードの主な因子だけにとどまらず、血小板活性化に伴う因子も含まれる。また、凝固を抑制する因子についても、アンチトロンビンⅢをはじめヘパリン類似物質、プロテイン C などがある。体内には、凝固因子、抗凝固因子を制御する機構が備わっている。出血に対し、止血機構、抗凝固作用が働き、血栓に対しては線溶系が働くようになっている。現在行われている薬物治療は、体内にある凝

固関連蛋白質を応用した阻害物質であったり、血中からそのものを精製蛋白として用いたり、組み換え蛋白質として作製して用いられている。そのため、病気においても治療においても、その凝固作用と抗凝固作用のバランスが閾値を超えると、その途端に凝固機構が破綻してしまう。

2. 研究の目的

本研究課題では、血栓形成を引き起こす血液凝固系の新しいトロンビン活性化機構を解明することを目的とする。血液凝固因子によって引き起こされるカスケードによりトロンビンが生成される。凝固因子に結合する蛋白に着目し、それらの相互作用によって引き起こされる凝固促進作用を検討した。

II. 対象・方法

(1) 血漿を用いたトロンビン活性化の検出

血漿希釈溶液に、トロンビン基質 (Chromogenix S-2238) を加え、トロンビン活性を検出した。凝固因子 (Haematologic Technologies Inc. (HTI) 社より購入)、リン脂質、CaCl₂ 溶液、蛋白質 A を加えて反応を開始させた。蛋白質 A、およびそのネガティブコントロールとしての蛋白質 B は Expi293 細胞システムを用い、pcDNA6.2/V5/GW/D-TOP (Lifetechnologies inc.) にてクローニングした plasmid を用いて作製した。

反応溶液は 384-well プレートに混合し、CaCl₂ 溶液を加えて反応を開始させた。405 nm での吸光度を Spectra Max 340PC384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) で経時的に測定した。SoftMax Pro ソフトウェア (Molecular Devices) にて解析し、kinetic reduction の Vmax mode (milli-units per min, Max ΔOD/min) にて算出した。

血漿は市販のコントロール血漿 (SIEMENS,

54819924)、各凝固因子欠損血漿 (GEORGE KING) を用い、試薬の調製には 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH7.4 緩衝液を用いた。リン脂質溶液は、L- α -phosphatidylcholine (PC) (Avanti, Alabaster, AL, 187535) と L- α -phosphatidylserine (PS) (Avanti, 189557)を用いた。それらをソニケーター (BIORUPTOR UCD-300, COSMO BIO, Tokyo, Japan) を用いてリン脂質溶液を調製した。

(2) プロトロンビンから生成されるトロンビンの検出

血漿中の凝固因子 (HTI 社より購入) を組み合わせ、プロトロンビンから生成されるトロンビンを検出した。反応溶液は、CaCl₂、リン脂質、血中濃度に合わせた各凝固因子、蛋白質 A、B を含む混合液を用意した。反応溶液を 37°C ウォーターバスでインキュベートし、sample buffer と混合し、反応を停止させた。反応溶液を SDS-PAGE (Wako, 5-20% #194-15021) で泳動し、CBB (Wako, Quick CBB PLUS) 染色を行った。

III. 結果

トロンビン基質の発色にて、トロンビン活性を評価したところ、正常血漿でみられるトロンビン活性は蛋白質 A によって増加傾向を示した。一方、コントロール蛋白として用いた蛋白質 B ではその増加傾向はみられなかった。複数の凝固因子欠損血漿を用いて、トロンビン基質試験を行った。欠損因子や蛋白質 A などの添加でトロンビン活性の増加を示すものがあった。

次に、プロトロンビンからのトロンビン生成をみる再構成系を組み、SDS-PAGE によって評価した。トロンビンの基質として、合成基質ではなくプロトロンビンを用意し、その切断をみた。この実験により、合成基質によるトロンビン活性検出だけでなく、プロトロンビン切断によるトロンビン生成を確認した。

プロトロンビンは、プロトロンビンを切断する凝固因子 Xa を含むいくつかの凝固因子を混合した溶液中で、経時的に切断された。蛋白質 A 存在下では、コントロール蛋白質 B と比較し、早くトロンビンが検出された。

IV. 考察

血液が凝固する際、凝固カスケードによってできるトロンビンが重要な働きをもつ。凝固カスケード

反応が加速されることはトロンビンが多く生成され、トロンビン作用が爆発的に上昇することを意味する。過度な血栓生成を防ぐために、トロンビンの働きを制御する直接トロンビン阻害剤や、トロンビン生成を阻害する Xa 阻害剤が誕生しているが、出血リスクがつきまとう。Xa 阻害剤がワルファリンのような定期的な血液検査を必要としないといっても、過度な出血が起こる可能性がある。

本研究で用いた、蛋白質 A は血管の細胞に存在する蛋白であり、今回調べた凝固関連蛋白質とは異なるリガンドをもつ。また、近年、蛋白質 A が血栓塞栓症にも強い働きがある可能性が見出された。蛋白質 A は、これまでの血液凝固系研究ではターゲットになることはなかった。蛋白質 A を制御することによって、蛋白質 A に関与する凝固亢進を制御できる可能性が考えられた。

V. 結論

今回の結果から、凝固系活性化を促進する新しい蛋白があることがわかった。本研究で得られた止血・血栓・凝固の生理的・病態生理的メカニズムをもとに、副作用の少ない治療の開発、凝固・血栓の未解明の病態を解く可能性がある。本研究から、血栓形成機構の研究を発展させる機会を得ることができた。

VI. 研究協力者

沢村達也・信州大学医学部・教授

垣野明美・信州大学バイオメディカル研究所・助教

VII. 参考文献

- 1) Lu G, DeGuzman FR, Hollenbach SJ, et al. A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. *Nat Med.* 2013;19: 446-451
- 2) Xu Y, Cai C, Chandarajoti K, et al. Homogeneous low-molecular-weight heparins with reversible anticoagulant activity. *Nat Chem Biol.* 2014;10:248-250
- 3) Larsson M, Rayzman V, Nolte MW, et al. A factor XIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk. *Sci Transl Med.* 2014;6:222ra17.

アテローム血栓症の直接的抗凝固療法に繋がる プラークの血栓形成能の解明

宮崎大学医学部病理学講座構造機能病態学分野・助教
山下 篤

I. 緒言

心筋梗塞や脳梗塞などの心血管イベントの多くは、動脈硬化巣（プラーク）の破綻に伴う血栓形成によって発症することからアテローム血栓症と総称されている。アテローム血栓が血小板とフィブリンからなることから抗血小板薬に抗凝固薬の併用が試みられたが出血性合併症のリスクが問題となっている。

イベント発症にはプラーク破綻が重要であることは認識されているが、これまでの人体病理学的研究や臨床画像診断により、プラーク破綻の多くは無症候性（血栓が小さく非閉塞性）であることが明らかにされてきており、プラーク破綻が必ずしも血栓性イベントに発展するとは限らない¹⁾。よって、プラークの血栓形成能（プラーク破綻時に血栓形成を促す程度）が破綻後の血栓の大きさとイベント発症に極めて重要であると考えられる。このため、プラークの血栓形成能を制御する機序の解明は、アテローム血栓症の病態解明のみならず、あらたな抗血栓薬の開発に繋がることが予想される。

これまでに、ヒトの大動脈プラークに血液凝固の開始因子である組織因子（TF）が過剰に発現していること²⁾、イベント発症急性期に採取された冠動脈血栓は TF とフィブリンが豊富であること³⁾、さらに動脈硬化性血栓モデルを用いてプラークの TF 発現が動脈血栓サイズに大きく影響すること⁴⁾などを報告してきた。一方、TF の発現がプラーク破綻部での血栓形成において重要な役割を果たしていると考えられているが、冠動脈の血栓サイズを規定する因子は明確になっていない。

ヒトのプラークにおいて低酸素領域が存在することが報告され、動脈硬化の病態との関連性が示唆されている⁵⁾。実際、動物モデルのプラークにおいて低酸素領域の存在を確認し、プラークの代謝が低酸

素状態に影響されること⁶⁾や、プラークの糖代謝が動脈の血栓形成能を反映することを報告した⁷⁾。これらの結果から、ヒトプラーク内の低酸素状態が TF 発現やプラークの血栓形成能に関与することが推察された。

本研究では、人体病理標本、動脈硬化性血栓モデル、培養細胞を用いて、冠動脈の血栓サイズと関連する因子やプラークの低酸素状態と血栓形成能の関連を明らかにすることを目的とする。

II. 対象・方法

1. 剖検症例の病理学的解析

宮崎大学で行われた剖検症例のうち、急性心筋梗塞で亡くなった 19 症例の責任冠動脈（症候性血栓、20 血管標本）と非心臓死で血栓を有する 15 症例の冠動脈（無症候性血栓、20 血管標本）を用いた。ホルマリン固定後、パラフィンブロックにし連続組織標本を作成した。

HE 染色標本を用いて、血栓サイズ（ μm^2 ）、血栓/内腔比（血栓性内腔占拠率、%）、内膜/中膜面積比、内腔/内膜比（狭窄率、%）、脂質コア面積/血管面積比（脂質コア領域比）、プラーク破綻の長さ（ μm ）を顕微鏡用画像解析ソフトで測定した。プラーク破綻の長さは線維性被膜の破綻部の長さとして定義し図 1 のように測定した。

平滑筋細胞、マクロファージ、TF、グルコース輸送体 1（Glut-1）、ヘキシキナーゼ II（HK-II）の発現を免疫組織化学で半定量評価、もしくは染色陽性細胞数を計測した。

2. ヒト冠動脈アテレクトミー標本の病理学的解析

不安定狭心症（n=16）、安定狭心症（n=16）の臨床診断で治療的に摘出されたアテレクトミー標本を用

いた。採取直後に 4%パラフォルムアルデヒドで固定しパラフィン標本とした。平滑筋細胞、マクロファージ、T リンパ球、hypoxia inducible factor (HIF)-1 α 、nuclear factor (NF)- κ B、フィブリン、TF、plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 を免疫組織化学で評価した。

3. 家兎動脈硬化性モデル

日本白色家兎 (2.5-3.0kg) を使用した。動脈硬化巣の作成のため 0.5%コレステロール食負荷 1 週間後に右頸動脈から 2.5mm 径のバルーンカテーテルを挿入し片側の大腿動脈内膜を傷害した。バルーンカテーテル傷害 3 週後に摘出し組織評価やプラーク培養を施行した。組織内低酸素の検出のためピモニダゾール (Hypoxiaprobe-1, 60mg/kg) もしくはコントロールの生理食塩水を血管採取 2 時間前に静脈投与した。平滑筋細胞、マクロファージ、ピモニダゾール、HIF-1 α 、NF- κ B、TF を免疫組織化学で評価、染色陽性面積等を画像処理ソフトで半定量評価した。局在を蛍光免疫染色で評価した。

4. 家兎動脈硬化性血栓モデル

上記同様に動脈硬化巣を作成し、バルーンカテーテル傷害 3 週後、大腿動脈に再度 2F のバルーンカテーテルを挿入し内膜を傷害した。傷害 15 分後、ヘパリン(500U/kg)による抗凝固処理後に摘出、4%パラフォルムアルデヒドで固定しパラフィン標本を作成した。大腿動脈に形成された血栓面積を顕微鏡下で測定し血栓量とした。血栓中に占める血小板とフィブリンを免疫組織化学で半定量評価した。

5. プラーク培養

上記同様に動脈硬化巣を作成し、バルーンカテーテル傷害 3 週後に大腿動脈を摘出し、実体顕微鏡下で動脈硬化巣を剥離、無血清の Dulbecco's modified Eagle's medium に浸し、低酸素下(1%O₂)もしくは通常酸素下で培養した。培養血管の HIF-1 α 、NF- κ Bp65 核内局在を免疫組織化学もしくは蛍光免疫染色法で、TF と PAI-1 発現を elisa 法で測定した。HIF-1 阻害薬 dimethyl-bisphosphonol (100 μ mol/L) や NF- κ B 阻害薬 Bay11-7085 (20 μ mol/L) を使用した。

6. 細胞培養

単球系細胞 THP-1 を RPMI1640 培地で培養した。100 nmol/L の phorbol 12-myristate 13-acetate

(PMA)でマクロファージに誘導、非接着細胞を除去洗浄し、低酸素下(1%O₂)もしくは通常酸素下で培養した。TFmRNA をリアルタイム PCR 法、TF 蛋白と HIF-1 α 、NF- κ Bp65 核内局在を elisa 法で測定した。また凝固活性の指標として培養細胞による家兎血漿凝固時間を測定した。

7. 統計処理

2 群間比較は Mann-Whitney U 検定、対応のない t 検定を行った。多群間比較は two way ANOVA のうち Bonferroni post-hoc 検定を行った。相関解析では Spearman 順位相関、多重比較解析を行った。p<0.05 を統計学的有意差ありとした。

III. 結 果

1-1 症候性、無症候性血栓を有する冠動脈の特徴

症候性血栓は無症候性血栓と比較して血栓サイズ、血栓による内腔占拠率、プラーク破綻の長さが高値であった (図 1)。

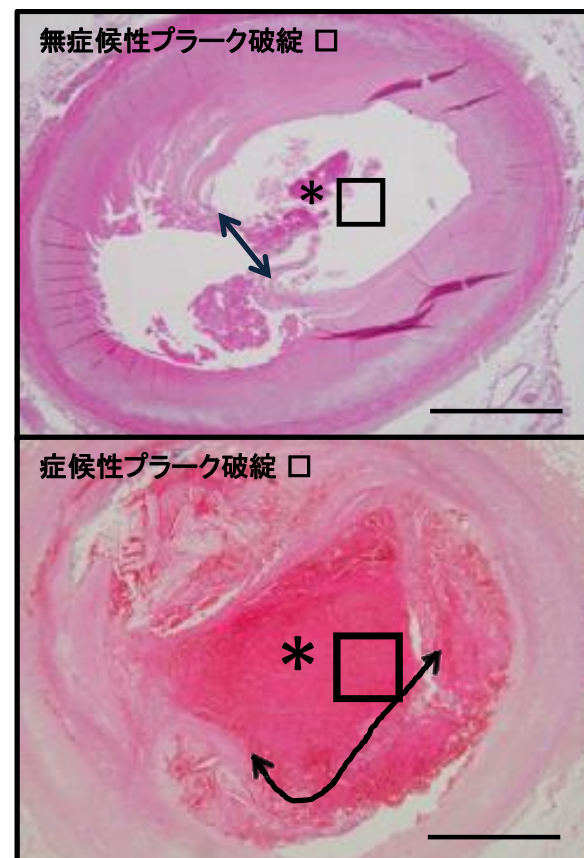


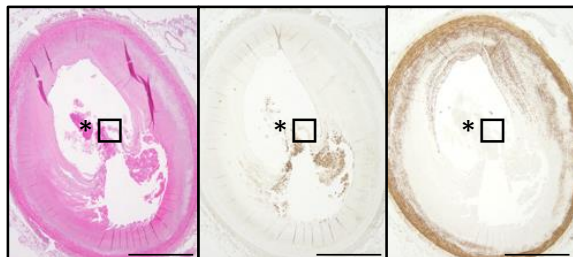
図 1 冠動脈の無症候性および症候性プラーク破綻に伴う血栓の HE 染色写真。

プラーク破綻の長さを線維性被膜の破綻部の長さ (両矢印) とした。無症候性血栓は小さな壁内血栓 (上段、*) であるが、症候性血栓の破綻部は長く閉塞性血栓 (下段、*) の形成を認める。

スケールバー1mm、文献8より。

また、内膜/中膜比、狭窄率、脂質コア領域も症候性血栓を有する冠動脈で高値であった。図2に無症候性、症候性血栓を有する冠動脈のHE染色とマクロファージを認識する抗体CD68と平滑筋を認識する抗体SMAを用いた免疫組織化学を示す。いずれもプラーク破綻と血栓形成を認めるが、無症候性血栓は非閉塞性血栓であるのに対し、症候性血栓は内腔をほぼ閉塞していた。破綻部のプラークにはマクロファージの浸潤を認め、平滑筋細胞に乏しかった。マクロファージの浸潤は症候性血栓を有するプラークで多い傾向を示したが有意差を認めなかった。平滑筋細胞は症候性血栓を有するプラークで少ない傾向を示したが有意差を認めなかった。このように、プラーク破綻にはプラークの脆弱性が重要であるが、大きな血栓形成にはプラーク破綻の程度やプラークの大きさが重要であると考えられる。

無症候性プラーク破綻 □



症候性プラーク破綻 □

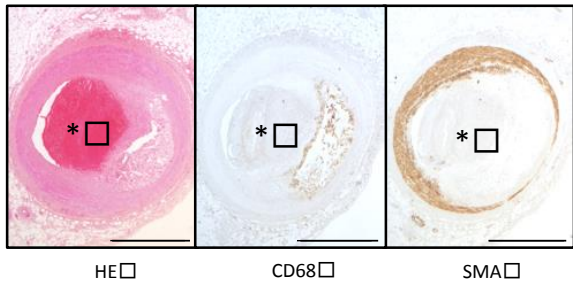


図2 無症候性、症候性血栓を有する血管のHE染色写真とCD68、SMAの免疫組織化学。無症候性血栓は壁内血栓（星印）であるが、症候性血栓（*印）は狭窄した内腔を閉塞している。いずれも線維性被膜破綻部周囲に平滑筋細胞は乏しくマクロファージの浸潤を認める。スケールバー1mm、文献8より改変。

図3に症候性血栓の標本におけるHE染色、CD68とTFの免疫組織化学を示す。TFは脂質コアの周辺や内部、プラーク表層に分布しており、一部はマクロファージの分布と一致していた。TF染色陽性面積は症候性血栓を有するプラークで有意に大きかった。

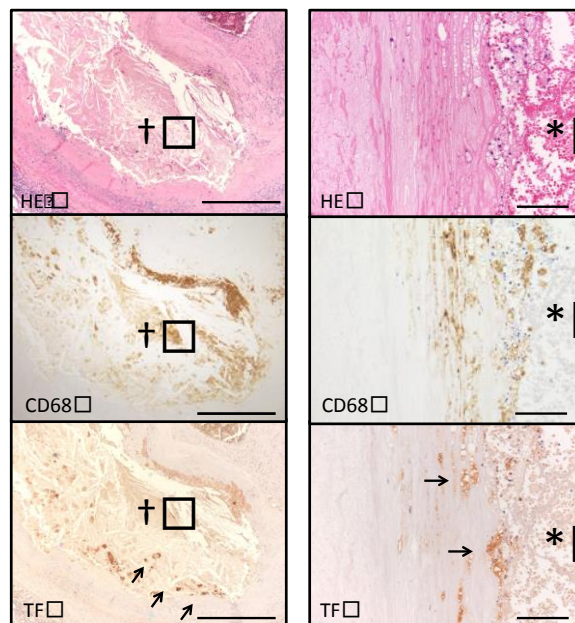


図3 症候性血栓を有する血管の標本のHE染色写真と、CD68、TFの免疫組織化学。

TFの発現は脂質コア縁、内部（左列）、プラーク表層（右列）で認め、CD68陽性マクロファージの分布と関連している。*印は血栓を示す。□印は、脂質コアを示す。スケールバー500μm（左段）、100μm（右段）、文献8より。

これまでの基礎研究から動脈の糖代謝と血栓形成能やプラークの低酸素と糖代謝産物の変化の関連性が示唆されたため^{6,7}、糖代謝関連の低酸素応答性因子の発現を検討した。図4に症候性血栓の標本におけるHE染色とCD68、グルコース輸送体のGlut-1、解糖系の酵素であるHK-IIの免疫組織化学を示す。Glut-1とHK-IIはCD68陽性のマクロファージの一部に局在していたが、HK-IIの陽性細胞はGlut-1よりも広範囲に分布した。Glut-1やHK-IIの陽性細胞数は症候性血栓を有するプラークで有意に多かった。

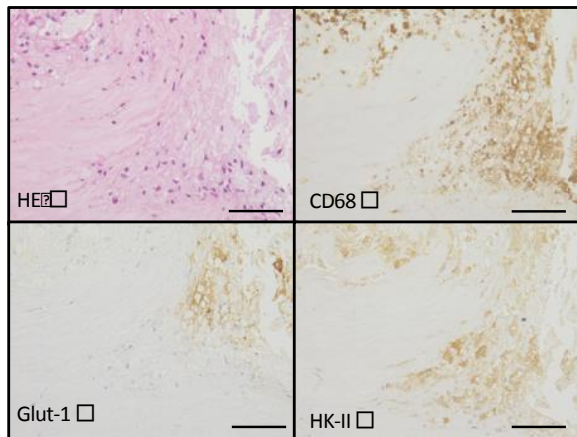


図 4. 症候性血栓を有する血管の HE 染色写真と、Glut-1、HK-II の免疫組織染色。

プラーク辺縁に分布するマクロファージ領域の一部に Glut-1 と HK-II の発現を認める。Glut-1 の発現は HK-II と比較して少ない。スケールバー100 μ m、文献 8 より。

1・2. 冠動脈の血栓サイズや血栓性内腔占拠率と血管因子の相関

冠動脈血栓の大きさや血栓による内腔閉塞と関連する血管因子を明らかにするために相関解析を行った。冠動脈の血栓サイズは、破綻の長さ、TF 陽性面積、HK-II 陽性有核細胞数と正の相関を示した(表 1)。また、血栓性内腔占拠率は、破綻の長さ ($r=0.77$)、内膜/中膜比 ($r=0.49$)、狭窄率 ($r=0.43$)、脂質コア領域比 ($r=0.31$)、TF 陽性面積 ($r=0.46$)、HK-II 陽性有核細胞数 ($r=0.43$) と正の相関を示した。

表 1 血栓サイズと血管因子の相関 (文献 8 より改変)

	r	p 値
破綻の長さ	0.80	<0.0001
内膜・中膜比	0.24	0.13
狭窄率	0.15	0.37
脂質コア領域比	0.23	0.16
SMA 陽性面積	-0.17	0.29
CD68 陽性面積	0.23	0.16
TF 陽性面積	0.38	<0.05
Glut-1 陽性面積	0.16	0.33
HK-II 陽性面積	0.40	<0.05

破綻の長さと血栓サイズや閉塞率との強い関連性から、急性心筋梗塞の発症にプラーク破綻の程度が極めて重要であることが考えられる。また血小板とフィブリンからなる血栓形成においてプラークの凝

固活性の重要性を支持する結果であった。さらに冠動脈においても低酸素応答と糖代謝活性や血栓形成能の関連が示唆された。

2 虚血性心疾患の冠動脈プラークにおける HIF-1 α や NF- κ B と血栓性因子の関連

HIF-1 α や NF- κ B は低酸素応答性の転写因子であり、後者は TF 発現を誘導することが知られている。冠動脈の血栓性病態と HIF-1 α や NF- κ B の関連を検討するために、安定狭心症と不安定狭心症のアテレクトミー標本を用いた。不安定狭心症のプラークは安定狭心症のプラークと比して、フィブリン、TF 及び低酸素応答性線溶抑制因子である PAI-1 の陽性面積、マクロファージ陽性面積が広く、T リンパ球数、HIF-1 α と NF- κ Bp65 蛋白の陽性核数が増加していた。血栓性プラークの免疫組織化学で、TF、PAI-1、フィブリン、HIF-1 α 、NF- κ Bp65 が近傍に局在していた(図 5)。

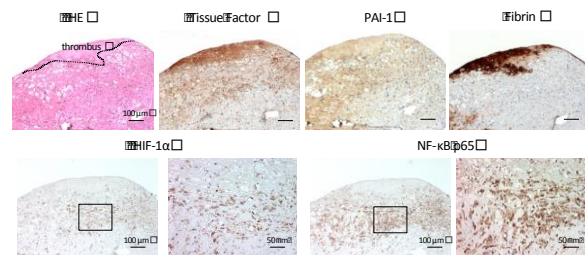


図 5. 不安定狭心症プラークにおける HIF-1 α や NF- κ B と血栓性因子の局在。

血栓性プラークにフィブリンの付着、tissue factor や PAI-1 の局在、HIF-1 α と NF- κ Bp65 の陽性核を認める。HIF-1 α と NF- κ Bp65 画像内の黒枠の強拡大をそれぞれ下段右側に示す。文献 9 より。

冠動脈プラークの HIF-1 α 陽性核数はマクロファージ面積($r=0.56$, $p<0.01$)、NF- κ Bp65 陽性核数($r=0.48$, $p<0.01$)、TF 陽性面積 ($r=0.50$, $p<0.01$)、PAI-1 陽性面積 ($r=0.19$, $p<0.01$)、フィブリン面積 ($r=0.38$, $p<0.05$)との相関を認めた。さらに、冠動脈プラークの HIF-1 α 陽性核数は血栓性プラークで増加していた。

上述の冠動脈の病理学的解析より低酸素応答と冠動脈の血栓形成能やその病態における HIF-1 α や NF- κ B の関与が示唆されたため、以下の動物実験や培養実験を行った。

3. 家兔動脈硬化血管における低酸素と TF 発現

0.5% コレステロール負荷食とバルーンカテーテ

ルによる内腔傷害により誘導した動脈硬化病変と非傷害コントロール血管の組織写真を示す。ピモニダゾールの免疫組織化学で検出される低酸素領域はプラーク深部のマクロファージに富む部分とプラーク表層の細胞の一部に局在していた (図 6)。

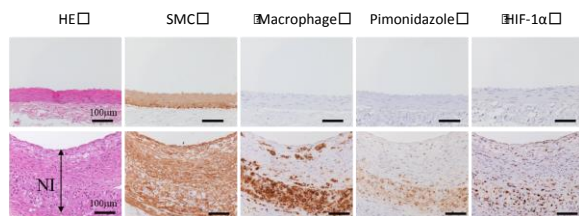


図 6. 家兎大腿動脈の動脈硬化巣における低酸素領域の局在
動脈硬化巣 (下段) は平滑筋細胞、マクロファージと細胞外器質からなり、プラーク深部と一部の表層細胞にピモニダゾール陽性の低酸素領域と HIF-1α陽性核を認める。上段はコントロール血管。NI (動脈硬化巣の新生内膜)、文献 9 より。

脂肪染色ではマクロファージに富む領域に、中性脂肪の蓄積が見られた。蛍光 2 重染色でピモニダゾール陽性細胞の主体はマクロファージであった。低酸素領域、HIF-1αや NF-κBp65 の陽性核数、TF 陽性面積はコントロール血管と比較して動脈硬化血管で増加していた。血管内に占める低酸素領域は、内膜中膜比 ($r=0.70$, $p<0.01$)、マクロファージ面積 ($r=0.63$, $p<0.01$)、HIF-1α ($r=0.62$, $p<0.01$) や NF-κBp65 ($r=0.42$, $p<0.05$) の陽性核数、および TF 陽性面積 ($r=0.59$, $p<0.01$) と相関していた。このように低酸素領域に一致した HIF-1αや NF-κBp65 の核内局在や組織因子発現との関連性が確認された。

4. 血管壁の低酸素と動脈血栓形成

血管壁の低酸素と血栓形成の関連を検討するために、家兎大腿動脈血栓モデルを用いて評価した。大腿動脈のバルーン傷害 15 分後に形成される血栓はコントロール血管と比して動脈硬化血管で大きく血小板やフィブリンで形成されていた。血管壁の低酸素領域は血栓総面積 ($r=0.38$, $p<0.01$)、血小板陽性面積 ($r=0.32$, $p<0.05$)、血栓のフィブリン陽性面積 ($r=0.87$, $p<0.0001$) と正の相関を認めた。多変量解析の結果、低酸素領域とマクロファージ面積は TF 発現の独立した予測因子であった。この結果より、血管壁の低酸素状態は血液凝固活性を反映しプラーク破綻後のフィブリン形成に関与することが示唆された。

5. 大腿動脈プラーク内の低酸素応答と血栓性因子の発現

プラーク内での低酸素細胞の応答と TF や PAI-1 の発現を検討するために、家兎大腿動脈からプラークを摘出し 1%O₂ の低酸素下で培養した。蛍光 2 重染色で低酸素細胞の核内に HIF-1αや NF-κBp65 の局在を認めた。また同部位では TF の発現が亢進していた (図 7)。

1%O₂ の低酸素下で HIF-1αと NF-κBp65 の陽性核数は 6 時間、3 時間をピークとして増加し、TF や PAI-1 の発現は 6 時間で有意に増加した。その増加は HIF-1α阻害薬もしくは NF-κB 阻害薬の添加で抑制された。

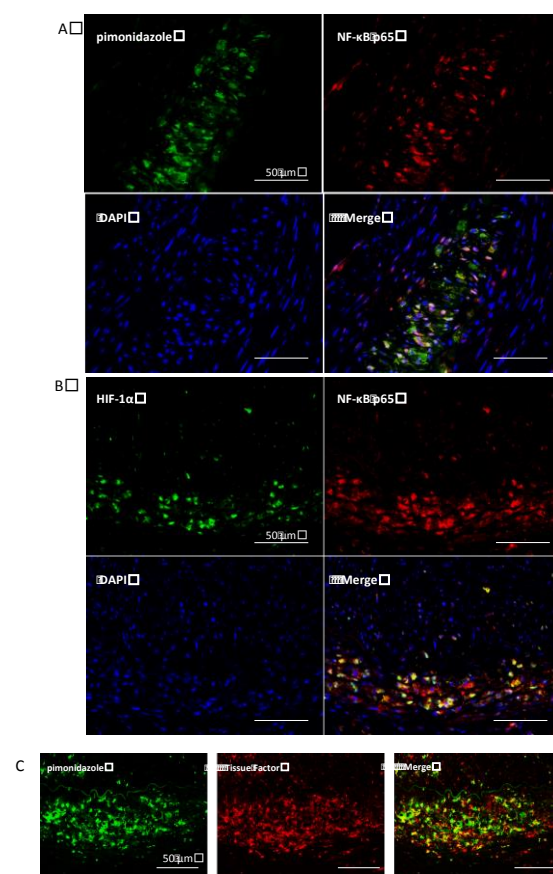


図 7. 低酸素下プラーク組織における HIF-1α、NF-κB、TF の発現

家兎大腿動脈の動脈硬化巣を剥離し 1%O₂ 下で 6 時間培養した。ピモニダゾール、HIF-1α、NF-κB、TF、DAPI の蛍光 3 重染色。ピモニダゾール陽性細胞に NF-κBp65 の陽性核、同一核における HIF-1α、NF-κB の局在、ピモニダゾール陽性領域に TF の発現を認める。文献 9 より改変。

6. マクロファージにおける低酸素と TF 発現

マクロファージにおける低酸素刺激と TF 発現を検討するために、PMA を用いて THP-1 細胞をマクロファージに誘導した。TFmRNA や TF 蛋白は低酸素刺激(1%O₂)6 時間後をピークに増加し、核内タンパクに占める HIF-1 α や NF- κ Bp65 も増加していた。細胞の血液凝固活性の指標である血漿凝固時間は低酸素培養下で短縮(凝固活性の増加)していた。それらは HIF-1 α 阻害薬もしくは NF- κ B 阻害薬の添加で抑制された (図 8)。

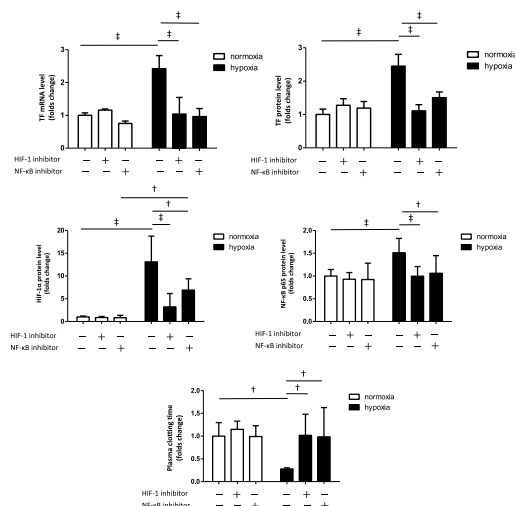


図 8. 培養マクロファージにおける TF 発現と凝固活性
THP-1 マクロファージを 1%O₂ の低酸素下もしくは通常酸素下で 6 時間培養、TFmRNA (n=6 ずつ)、TF 蛋白 (n=4~6)、核蛋白質における HIF-1 α (n=5 ずつ)や NF- κ Bp65 (n=8~10 ずつ)、家兎血漿凝固時間 (n=6 ずつ)を測定した。dimethyl-bisphosphonol (HIF-1 阻害薬, 100 μ mol/L)や Bay11-7085 (NF- κ B 阻害薬, 20 μ mol/L)、 $\dagger$ p<0.01, $\ddagger$ p<0.0001、文献 9 より改変。

IV. 考 察

冠動脈プラーク破綻後の血栓形成には血小板の凝集とフィブリンの形成からなる。病理学的検討より、プラーク破綻の程度が血栓サイズや急性心筋梗塞の発症と強い関連を示し、血小板や血液凝固反応の活性化の程度が、症状の発症に極めて重要であると考えられた。今回の検討では血小板の活性化因子を検討していないためプラークの血栓形成能を総合的に判断することはできないが、冠動脈の血栓形成におけるプラークの凝固活性の重要性が確認された。血液凝固反応によって生じるトロンビンが血小板活性化に働くことが一因と考えられる。また動物モデルの検討同様に糖代謝と血栓形成能の関連が示唆された。今回の研究によりプラーク内の低酸素環境に対する細胞応答が糖代謝の亢進と血栓形成能を関連

づけることが示唆された。その応答に HIF-1 α や NF- κ B の関与が考えられる。興味深いことにそれら 2つの因子は相互作用性に TF の発現に寄与していると考えられた^{9,10}。一方、プラークの病態には炎症性刺激が重要である。プラークの血栓形成能において炎症性刺激と低酸素環境の相加作用もしくは相乗作用が予想され、現在検討を進めている。

V. 結 論

プラークの血栓形成能を規定する機序は明確ではなく、それを標的とした治療法は確立されていない。本研究の成果によりプラークの血栓形成能の指標として低酸素応答により誘導される TF 発現の重要性が動物モデルや培養細胞のみならずヒトの冠動脈においても確認された。本研究はアテローム血栓症の抗凝固治療法を目指した基礎的研究でありプラーク内の TF 発現を標的とした抗凝固療法の発展に重要な情報をもたらすと考えられる。

VI. 研究協力者

松浦祐之介・宮崎大学医学部・大学院生
前川和也・宮崎大学医学部・大学院生
浅田祐士郎・宮崎大学医学部・教授

VII. 参考文献

- 1) Sato Y, Hatakeyama K, Yamashita A, Marutsuka K, et al. Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. *Heart*. 2005;91:526-30.
- 2) Hatakeyama K, Asada Y, Marutsuka K, Sato Y, et al. Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 1997;133:213-219.
- 3) Yamashita A, Sumi T, Goto S, Hoshiba Y, et al. Detection of von Willebrand factor and tissue factor in platelets-fibrin rich coronary thrombi in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2006;97:26-28.
- 4) Yamashita A, Matsuda S, Matsumoto T, Moriguchi-Goto S, et al. Thrombin generation by intimal tissue factor contributes to thrombus formation on macrophage-rich neointima but not normal

- intima of hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2009;206:418-426.
- 5) Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL, Kisters N, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1258-1265.
 - 6) Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y, Yamasaki K, et al. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. *PLoS One*. 2014;9:e86426.
 - 7) Yamashita A, Zhao Y, Zhao S, Matsuura Y, et al. Arterial (18)F-fluorodeoxyglucose uptake reflects balloon catheter-induced thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor- κ B in rabbit atherosclerotic lesions. *Circ J*. 2013;77:2626-2635.
 - 8) Okuyama N, Matsuda S, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, et al. Human coronary thrombus formation is associated with degree of plaque disruption and expression of tissue factor and hexokinase II. *Circ J*. 2015;79:2430-2438.
 - 9) Matsuura Y, Yamashita A, Iwakiri T, Sugita C, et al. Vascular wall hypoxia promotes arterial thrombus formation via augmentation of vascular thrombogenicity. *Thromb Haemost*. 2015;114:158-172.
 - 10) Yamashita A, Asada Y. Pathology and pathophysiology of atherothrombosis: Thrombus growth, vascular thrombogenicity, and plaque metabolism, In: Božič-Mijovski M, editor. *Thrombosis, atherosclerosis and atherothrombosis: New insights and experimental protocols*. Rijeka, Croatia: Intech; 2015. p.1-p.25.