

158. 組織トロンビンの拡張型心筋症病態形成への関与

伊藤 敬一

東京慈恵会医科大学 医学部 内科学講座 循環器内科学

Key words : 拡張型心筋症, 組織トロンビン, 心臓組織特異的プロトロンビン過剰発現マウス

緒言

血液凝固カスケードの最終産物であるトロンビンは protease activated receptor-1 を介して、胃の収縮、障害血管の修復、血小板凝集など様々な生理的作用を示す事が知られている。トロンビンは様々な組織に存在し内皮細胞や線維芽細胞でもその存在が確認されている。我々は心臓においても組織トロンビンが存在する事をヒトの剖検心を用いて免疫組織学的に証明した¹⁾。一方、拡張型心筋症患者の血液では血液中のトロンビンが亢進している事が報告されている²⁾。心臓組織にもトロンビンは存在するため、拡張型心筋症ではこの組織トロンビンが亢進している可能性がある。そこで、我々は拡張型心筋症モデルマウス ($\Delta K210$ knock-in mice (B6 ; 129-Tnnt2 tm2Mmto)) を用いて組織トロンビンが拡張型心筋症の病態に関与しているかどうかを検討した。拡張型心筋症モデルマウス (DCM 群) に対して、4 週目から 8 週目まで直接的トロンビン阻害薬であるダビガトランを 6 g/日投与した群 (DCM+D 群)、および wild type (Wild 群) の 3 群を比較検討した。DCM 群では Wild 群と比較して心重量の増加が認められたが、ダビガトラン投与により心重量の増加が抑制されていた。また、心臓超音波検査では DCM 群では左室収縮能の低下が認められたが、ダビガトラン投与により改善が認められた。そして、生存率も DCM+D 群の方が DCM 群と比較して改善されていた。トロンビンを抑制する事により心機能および生存率の改善が見られた。このメカニズムを調べるためマイクロアレイを用いて原因遺伝子を検討した。その結果、*Casq1*、*Postn*、*Myh7* の 3 つの遺伝子が候補に挙がったが、蛋白質発現をウェスタンブロット法にて検討すると、いずれもダビガトランで有意に抑制されていなかった。TUNEL 染色を行った結果、DCM 群で見られた TUNEL 陽性細胞がダビガトラン投与により抑制されている傾向にありアポトーシスの関与が示唆された³⁾。

以上の結果より組織トロンビンが拡張型心筋症の病態に関与している可能性が示された。今回の研究では組織トロンビンの過剰発現が拡張型心筋症を引き起こす事が強く示唆されるために、心臓特異的プロトロンビン過剰発現マウスを作製する事とした。組織においてプロトロンビンを過剰発現させる事により、内因性のプロトロンビンの作用について検討する。また、実際にトロンビンが心臓組織に取り込まれている事を確認するため、トロンビンを HiLyte 647 にて蛍光標識し、トロンビンの動態を観察する。

方法

Origene 社より購入した prothrombin プラスミドを大腸菌 (DH5 *a* 株、コンピテントセル) に導入し、増幅した。得られた大腸菌から prothrombin プラスミドを抽出した。制限酵素によるプラスミドの確認をした後、ベクター (pBKS II) を制限酵素で切断し、同じ制限酵素を負荷したプライマーを用いて prothrombin プラスミドから prothrombin (インサート) を増幅しバンドを確認した。目的産物であれば、Gel extraction kit を用いて DNA を抽出した。Ligation kit を用いてベクターとインサートをライゲートした。Transformation 法によりライゲートした α MHC-prothrombin プラスミドの導入を行い、LB プレートにコロニーが出来ているか確認した。コロニーから大腸菌を増幅し、プラスミドを抽出する。得られたプラスミドの塩基配列を確認後、受精卵へのマイクロインジェクション以降の遺伝子改変マウス作製工程を業者へ委託した。作製したプロトロンビン過剰発現マウス (prothrombin transgenic mouse, PT-TG) と対照マウス (non-transgenic littermate, PT-Wild) のプロトロンビン mRNA 発現量を Polymerase Chain Reaction (PCR) 法にて確認した。

また、実際にトロンビンが心臓組織に取り込まれている事を確認するため、10単位のトロンビンをHiLyte 647にて蛍光標識し、トロンビンの動態を観察した（C57/BL6 Control群1匹：PBS投与、Thrombin群2匹：Thrombin投与）。そして、PT-WildとPT-TGの心重量を測定した。

結果および考察

1. プロトロンビン過剰発現マウスにおけるプロトロンビン mRNA 発現の確認

上記方法にてプロトロンビン過剰発現マウスを作製し、8週の時点での心臓におけるプロトロンビン mRNA を確認した（図1）。

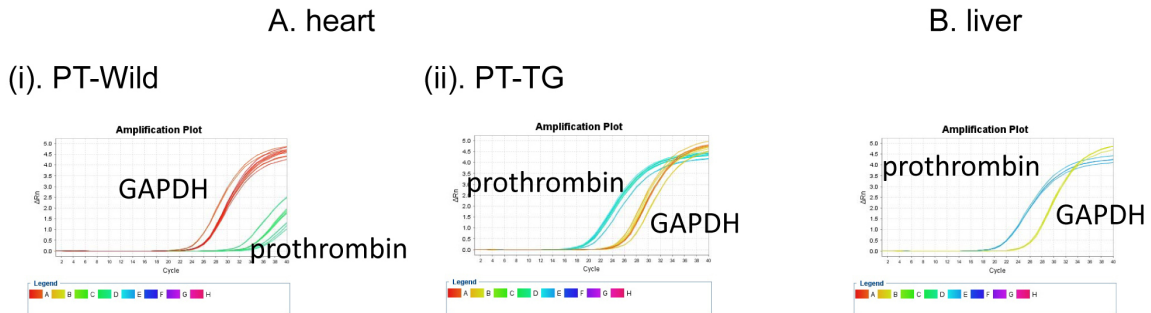


図1. プロトロンビン過剰発現マウスにおけるプロトロンビン mRNA 発現の確認

A) 心臓における (i) Wild type マウス (n = 5) および (ii) プロトロンビン過剰発現マウス (PT-TG) (n = 5) におけるプロトロンビン mRNA の発現。B) Wild type マウスにおけるプロトロンビン mRNA の発現 (n = 1)。

Wild type ではプロトロンビン mRNA は存在せず、心臓特異的過剰発現で増えてきている。positive control である肝臓でもプロトロンビンは確認出来る。ヒトやマウスで確認出来たトロンビンは内因性よりも外因性の要因が強い可能性がある。

2. 外来性トロンビンの動態

実際にトロンビンが心臓組織に取り込まれている事を確認するため、10単位のトロンビンをHiLyte 647にて蛍光標識し、トロンビンの動態を観察した（C57/BL6 Control群1匹：PBS投与、Thrombin群2匹：Thrombin投与）（図2）。

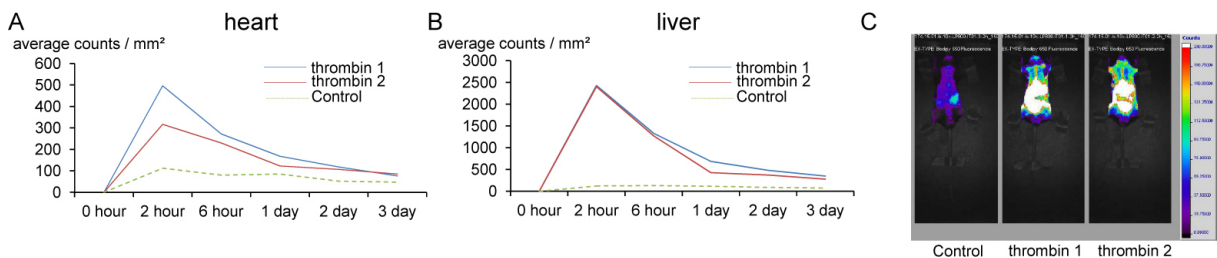


図2. 外来性トロンビンの動態

A) 心臓における外来性トロンビンの動態。B) 肝臓における外来性トロンビンの動態。C) eXplore Optix Imaging System による全体のトロンビン動態（投与後2時間）。

Positive control である肝臓では強いシグナルが見られ、また心臓でもシグナルが観察される。外来性に投与したトロンビンは心臓に取り込まれている事が分かる。これらの結果より、心臓組織において存在するトロンビンは内因性ではなく、血中由来のトロンビンである事が分かった。

表 1.

	PT-Wild (n=5)	PT-TG (n=5)
体重 (g)	18.1±1.1	17.0±1.7
心重量 (mg)	101.4±10.6	89.9±16.6
心重量/体重 (×10 ⁻³)	5.6±0.4	5.3±0.5

PT-Wild と PT-TG マウスにおける心重量の比較 (何れも統計学的有意差なし)

PT-Wild と PT-TG マウスにおいて体重、心重量、心重量/体重のいずれも有意差を認めなかった (表 1)。PT-TG マウスの心臓組織においてプロトロンビンが過剰に発現している事は確認したが、これ自体だけでは心毒性は確認出来なかった。また、我々は DCM マウスを用いた実験で過剰なトロンビンは心毒性を示すことを確認したが、今回の PT-TG では PT-Wild と比較して心重量の増加は見られなかった。プロトロンビンはリン脂質、血液凝固第 X 因子によりトロンビンへ変換されるが、適切な触媒条件が心臓組織では揃わないため、プロトロンビンからトロンビンへの変換が起こらず、PT-TG に対する心毒性が起こらなかった可能性が考えられる。

文 献

- 1) Ito K, Date T, Ikegami M, Hongo K, Fujisaki M, Katoh D, Yoshino T, Anzawa R, Nagoshi T, Yamashita S, Inada K, Matsuo S, Yamane T, Yoshimura M. An immunohistochemical analysis of tissue thrombin expression in the human atria. PLoS One 2013;8:e65817. doi: 10.1371/journal.pone.0065817. PMID: 23785453.
- 2) Yamamoto K, Ikeda U, Furuhashi K, Irokawa M, Nakayama T, Shimada K. The coagulation system is activated in idiopathic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1995;25:1634-1640. PMID: 7539015.
- 3) Ito K, Hongo K, Date T, Ikegami M, Hano H, Owada M, Morimoto S, Kashiwagi Y, Katoh D, Yoshino T, Yoshii A, Kimura H, Nagoshi T, Kajimura I, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S, Ogawa K, Minai K, Ogawa T, Kawai M, Yajima J, Matsuo S, Yamane T, Taniguchi I, Morimoto S, Yoshimura M. Tissue thrombin is associated with the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2017;228:821-827. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.176. PMID: 27888761.