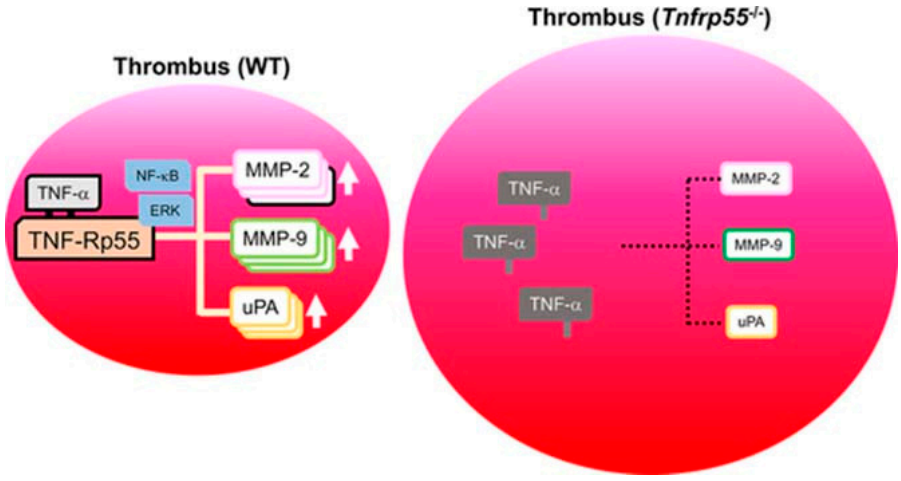
10　深部静脈血栓形成における分子法医病理学的研究	近藤　稔和

【目的】突然死とは、発症後 24 時間以内の自然死（内因死）と定義され、我が国における突然死の発生頻度は、全自然死の 14〜17%にのぼる。突然死は、いつでもどこででも発生し、また死亡したという事実でしか把握できず、その殆どが法医解剖により死因が究明される。肺動脈血栓塞栓症は、従来、欧米で多い疾患とされていたが、我が国においても食生活の変化に伴い増加傾向にあり、さらにエコノミークラス症候群や地震被災地で長期車内生活が要因となった肺動脈血栓塞栓症の死亡例が報告されたことから注目されるようになった。肺動脈血栓塞栓症の塞栓子の 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。深部静脈血栓形成・融解機序は、血栓内への炎症細胞浸潤と血管内皮細胞のサイトカインを通じたクロストークが重要とされている。そこで、炎症性サイトカインの一つ、腫瘍壊死因子（Tumor necrosis factor-α、TNF-α）が深部静脈血栓形成・融解にどのように関与しているのかの分子メカニズムを解析する。

【方法】TNF-αのレセプターである I 型 TNF レセプター（TNFRp55）遺伝子欠損マウス（*TNFRp55*KO）マウスと野生型マウス（WT）マウスを用いて、全身麻酔下で開腹し、実体顕微鏡観察下にて下大静脈（IVC）を結紮し、静脈血栓を作成する。その後、血栓を採取し、重量及び長さを測定し、さらに免疫組織化学的解析および分子生物学的解析を行う。

【結果】血栓重量は WT マウスより *TNFRp55* KO マウスで大きく、IVC の血流量は WT マウスでより短期間で回復した。しかしながら、血栓内の好中球およびマクロファージ数は両者で変化は認められなかった。一方、血栓融解の促進因子であるマトリックスメタロプロテアーゼ2（matrix metalloproteinase 2、MMP-2）、 MMP-9 およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ（urokinase-type plasminogen activator、PLAU）の遺伝子発現は、*TNFRp55* KO マウスにおいて WT マウスよりも有意に減弱していた。以上の *TNFRp55* 遺伝子欠損では、血栓中における MMP-2、MMP-9 および PLAU 発現を抑制することによって血栓融解を阻害すると考えられ、TNF-α-TNFRp55 が、深部静脈血栓治療の有用な分子標的となり得ることが示唆された。

血栓形成における TNF-α-TNFRp55 の役割



10. 深部静脈血栓形成における分子法医病理学的研究

近藤　稔和

和歌山県立医科大学 医学部 法医学講座

Key words：突然死，法医病理学，肺動脈血栓塞栓症，深部静脈血栓，腫瘍壊死因子

緒　言

突然死とは、発症後 24 時間以内の自然死（内因死）と定義され、我が国における突然死の発生頻度は、全自然死の 14～17%である。突然死は、いつでもどこででも発生し、その殆どが法医解剖により死因が究明される。突然死の死因を医学的に究明することは、死亡者の個人の尊厳を擁護するとともに、その後に発生してくる種々の社会的問題を解決するための手段であり、法医学の使命である。

近年、突然死の原因疾患の代表である肺動脈血栓塞栓症に対する関心が高まってきたものの、塞栓子の 90%以上を占める深部静脈血栓の発症・融解の機序については未だ解明されていない点が多い。深部静脈血栓形成・融解機序は、血栓内への炎症細胞浸潤と血管内皮細胞のサイトカインを通じたクロストークが重要とされている［1］。

そこで、本研究では TNF-α のレセプターである I 型 TNF レセプター（TNFRp55）遺伝子欠損マウス（*TNFRp55* KO）マウスを用いて血栓形成・融解の分子メカニズムを解析し、TNF-α-TNFRp55 が、深部静脈血栓治療の有用な分子標的となり得ることが示唆された［2］。

方　法

1. マウス深部静脈血栓塞栓症モデル作製法の確立

*TNFRp55*KO マウスおよび野生型マウス（WT）マウスを麻酔下で開腹し、下大静脈を結紮することによって静脈血栓を形成した［3］。結紮後経時的に血栓を採取し、重量及び長さを測定する。

2. 病理組織学的および免疫組織化学検索

採取した血栓試料ついて、ヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン・トリクローム染色を施施し。さらに血栓内マクロファージについて免疫染色を行った。

3. 遺伝子発現解析

血栓試料から総 RNA を抽出し、血栓融解の促進因子であるマトリックスメタロプロテアーゼ2（matrix metalloproteinase 2、MMP-2）、MMP-9 およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ（urokinase-type plasminogen activator、PLAU）の遺伝子発現を検索した。

4. 腹腔内マクロファージ単離・解析

*TNFRp55*KO マウスおよび WT マウスにチオグリコレートを腹腔内投与し、マクロファージを単離後、TNF-α 添加による、MMP-2、MMP-9 および PLAU の遺伝子発現を検索した。

5. TNF-α および TNF-α 抑制剤投与

WT マウスにおいて IVC 結紮後、TNF-α または TNF-α 抑制剤（抗 TNF-α 抗体または Etanercept）腹腔内投与し、血栓の状況を検討した。

6. 統計的解析

結果については、平均±標準誤差を算出し、2 元配置分散分析または Student t test で解析し、$p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結　果

1. *TNFRp55* 遺伝子欠損の血栓形成・融解への影響について

IVC 結紮後 3 日までは *TNFRp55*KO マウスおよび WT マウスで血栓の大きさに差はなかったが、5 日目以降では *TNFRp55*KO マウスの方が WT マウスよりも明らかに血栓重量が大きく、血流の再開通が遅延していた（図 1A から C)。また、*TNFRp55*KO マウスで血栓の器質化は顕著で、コラーゲン成分であるハイドロキシプロリン含有量も多かった（図 1D から F)。これらのことから、*TNFRp55*KO マウスでは血栓の融解が遅延することが判明した。

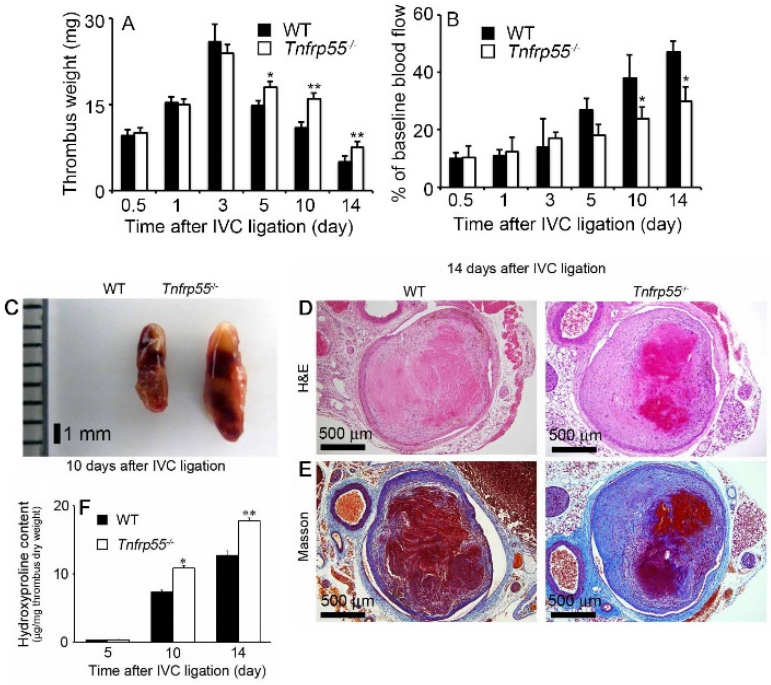


図 1.　*TNFRp55*KO マウスおよび WT マウスの下大静脈結紮による静脈血栓形成

(A) 血栓重量

(B) 下大静脈血流量

(C) 血栓肉眼像

(D) 血栓のヘマトキシリン・エオジン染色像

(E) 血栓のマッソン・トリクローム染色像

(F) 血栓内ハイドロキシプロリン含有量

$^{**}P < 0.01$、$^{*}P < 0.05$、Two-way ANOVA by Dunnett post hoc test

2. *TNFRp55* 遺伝子欠損の血栓融解因子は発現への影響について

血栓融解には MMP-2、MMP-9 および PLAU が密接に関与していることが知られている [3]。そこで、*TNFRp55*KO マウスおよび WT マウスについて、これら血栓融解因子の遺伝子発現について検討したところ、*TNFRp55*KO マウスでは、血栓中における MMP-2、MMP-9 および PLAU の遺伝子発現が WT マウスと比較して有意に減弱していた。

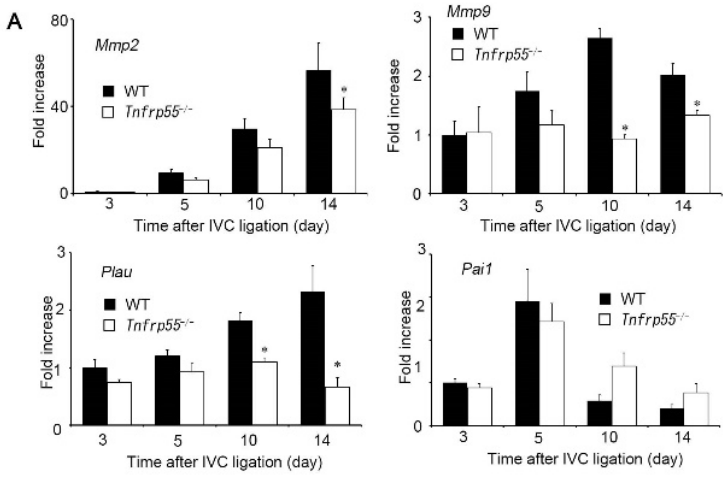


図 2. TNFRp55KO マウスおよび WT マウスにおける血栓内の MMP-2、MMP-9 および PLAU の遺伝子発現
(A) MMP-2 (B) MMP-9 (C) PLAU (D) PAI-1
$^{**}P < 0.01$、$^{*}P < 0.05$、Two-way ANOVA by Dunnett post hoc test

3. *TNFRp55* 遺伝子欠損の血栓内の白血球数への影響について

血栓融解に関与する MMP-2、MMP-9 および PLAU はマクロファージから産生されることが知られている [4、5]。そこで、*TNFRp55*KO マウスおよび WT マウスの血栓内のマクロファージについて検討したところ、両群間でマクロファージ数に差は認められなかった。

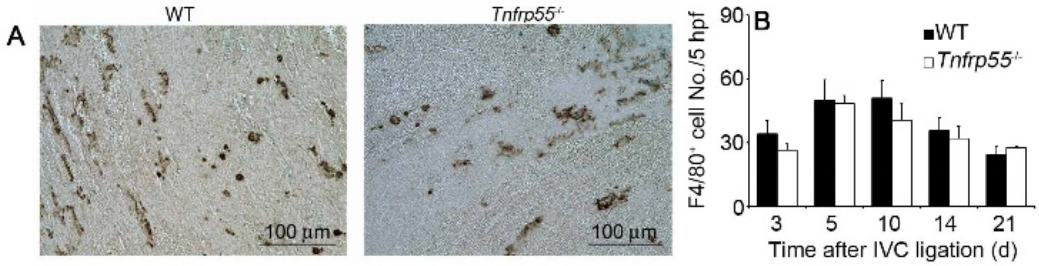


図 3. *TNFRp55*KO マウスおよび WT マウスにおける血栓内マクロファージ浸潤
(A) 血栓内マクロファージの免疫染色像 (B) 血栓内マクロファージ数

4. 血栓融解因子発現に関する TNFRp55 の依存性について

*TNFRp55*KO マウスおよび WT マウスから腹腔内マクロファージを単離し、MMP-2、MMP-9 および PLAU の遺伝子が TNFRp55 依存的に発現しているのか否かについて検討したとこ。WT マウス由来のマクロファージでは TNF-α添加によって MMP-2、MMP-9 および PLAU の遺伝子発現が著明に上昇したが、*TNFRp55*KO マウス由来のマクロファージでは TNF-α添加しても MMP-2、MMP-9 および PLAU の遺伝子発現に変化は認められなかった。したがって、TNF-α は TNFRp55 を介して血栓融解因子である MMP-2、MMP-9 および PLAU 発現を誘導することが明らかとなった。

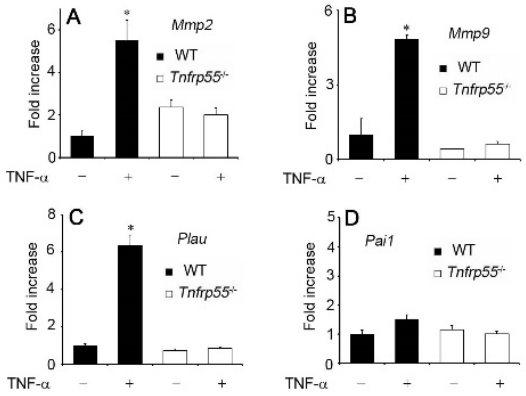


図 4. マクロファージにおける TNF-α添加による血栓融解因子の遺伝子発現

(A) MMP-2 (B) MMP-9 (C) PLAU (D) PAI　*P< 0.05、Student t test

5. TNF-αおよびTNF-α抑制剤によるの血栓形成・融解への影響について

WT マウスの IVC 結紮後に、TNF-α または TNF-α 抑制剤（抗 TNF-α 抗体または Etanercept）を投与して、血栓形成・融解への影響を検討したところ、TNF-α 投与群ではコントロール群と比較して有意に血栓が小さかった。一方、抗 TNF-α 抗体または Etanercept の TNF-α 抑制剤投与群では、投与群ではコントロール群と比較して有意に血栓が大きく、*TNFRp55*KO マウスと同様の傾向を示した。

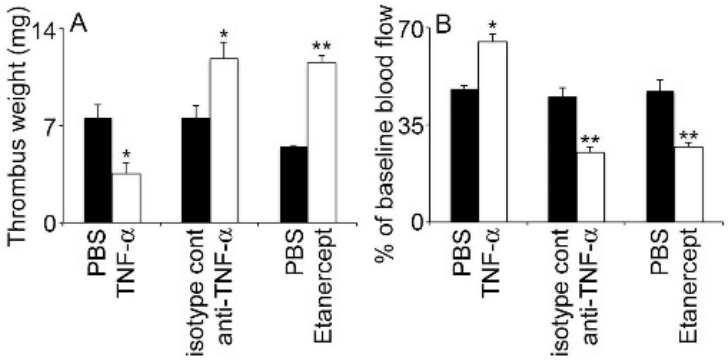


図 5. TNF-α および TNF-α 抑制剤の効果

(A) 血栓重量　(B) 下大静脈血流量　**P< 0.01、*P< 0.05、Student t test

考　察

突然死例の死因究明だけにとどまらず、突然死及びそれに関連する研究を通じて突然死の原因疾患についての予知・予防並びに治療法開発のための情報を提供することも、これからの法医学の重要且つ新たな使命であると考える。

特に、肺動脈血栓塞栓症の原因である深部静脈血栓の発症・融解の機序については未だ解明されていない点が多いため、臨床的には抗凝固剤などの対症療法しかないのが実態である。

そこで、*TNFRp55*KO マウスを用いて血栓形成・融解の分子メカニズムを解析したところ、*TNFRp55*KO マウスでは、血栓中における MMP-2、MMP-9 および PLAU 発現を抑制することによって血栓融解を阻害すると考えられた。さらに、腹腔内マクロファージを培養し、TNF-α を添加したところ、WT マクロファージでは MMP-2、MMP-9 および PLAU の遺伝子発現が亢進したが、*TNFRp55*KO マクロファージではこれらの遺伝子に変化が認められなかった。

以上のことから、TNF-α-TNFRp55 が、深部静脈血栓治療の有用な分子標的となり得ることが示唆された。さらに、法医学実務で遭遇する疾患について、分子生物学的アプローチを施すことにより、法医学が臨床医学と基礎医学の架け橋的役割を務め、さらには法医学を発信源とする医科学の発展に寄与するものと考える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、和歌山県立医科大学法医学講座の野坂みずほ、石田裕子、木村章彦、國中由美、同循環器内科学講座の樽谷玲、同臨沂検査医学講座の古田眞智、金沢大学がん進展制御研究所の向田直史である。

文　献

1) Wakefield TW、 Myers DD、 Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Mar;28(3):387-91. doi:10.1161/ATVBAHA.108.162289. PubMed PMID: 18296594.

2) Nosaka M、Ishida Y、Kimura A、Kuninaka Y、Taruya A、Furuta M、Mukaida N、Kondo T. Contribution of the TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α)-TNF-Rp55 (Tumor Necrosis Factor Receptor p55) Axis in the Resolution of Venous Thrombus. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Nov;38(11):2638-2650.doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311194. PMID: 30354252.

3) Nosaka M、Ishida Y、Kimura A、Kuninaka Y、Inui M、Mukaida N、Kondo T. Absence of IFN-γ accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. J Clin Invest. 2011 Jul;121(7):2911-20. doi:10.1172/JCI40782. PMID: 21646723.

4) Nosaka M、 Ishida Y、 Kuninaka Y、 Kimura A、 Kondo T. Immunohistochemical detection of uPA、 tPA、 and PAI-1 in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age estimation. Int J Legal Med. 2012 May;126(3):421-5. doi: 10.1007/s00414-012-0680-z. PMID: 22361951.

5) Nosaka M、 Ishida Y、 Kimura A、 Kondo T. Immunohistochemical detection of MMP-2 and MMP-9 in a stasis-induced deep vein thrombosis model and its application to thrombus age estimation. Int J Legal Med. 2010 Sep;124(5):439-44. doi:10.1007/s00414-010-0484-y. PubMed PMID: 20623133.