

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間： 2007 ～2008
 課題番号：19791327
 研究課題名（和文） 播種性血管内凝固における TAFI の役割とその制御
 研究課題名（英文） Role of TFPI in disseminated intravascular coagulation
 研究代表者
 御館 靖雄（ONTACHI YASUO）
 金沢大学・医学系・協力研究員
 研究者番号：80377382

研究成果の概要：新規線溶阻止因子 TAFI の臨床意義は解明されていない。この度、播種性血管内凝固症候群（DIC）病態における TAFI および活性型 TAFI (TAFIa) の動態を、組織因子&LPS 誘発ラット DIC モデルを用いて検討した。DIC モデルにおいて、TAFIa は上昇したが、アルガトロバン投与により有意に抑制された。LPS 誘発 DIC モデルにおける臓器障害や炎症性サイトカイン上昇は、TAFIa 阻害薬により軽減した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：DIC、凝固、線溶

1. 研究開始当初の背景

播種性血管内凝固症候群（DIC）の本態は全身性持続性の著明な凝固活性化状態であるが、我々のこれまでの検討から、DIC の病態は線溶動態により大きく左右されることを明らかにしてきた。DIC モデルは、動物に LPS または組織因子（TF）を投与して作成するこ

とが可能である。我々は、線溶阻止因子 PAI や病理学的検討結果から、LPS 誘発 DIC モデルでは線溶が抑制され臓器障害が中心となる（臨床の線溶抑制型 DIC に類似したモデル）のに対し、TF 誘発 DIC モデルでは著しい線溶活性化とともに出血症状が中心になる（臨床の線溶亢進型 DIC に類似したモデル）とい

う対照的な病態を呈することを明らかにしている (Crit Care Med, 2002)。このことは、線溶活性化の程度が DIC 病態に大きく影響を与えることを示している。

近年、トロンビンによって活性化される新しいタイプの線溶阻止因子として TAFI (Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) が発見されたが、PAI の線溶抑制状態における意義が相当明らかにされてきたのとは対照的に、TAFI の生理的・病的意義についてはほとんど明らかにされていない。そこで今回 DIC モデルを用いて、TAFI 動態、TAFIa 阻害薬や抗トロンビン薬の影響を検討することにより、DIC における TAFI の役割を明らかにすることとした。

2. 研究の目的

DIC 誘発物質の異なる 2 種類の DIC モデル (LPS 誘発 DIC モデル, TF 誘発 DIC モデル) において下記の点を明らかにする。

- (1) 血中 TAFI および TAFIa の動態を検討する。
- (2) 外因性に TAFIa 阻害剤を投与し凝固線溶病態や炎症性サイトカインへの影響を評価する。
- (3) DIC モデルに対して抗トロンビン薬 (アルガトロバン) を投与して、TAFIa の動態への影響を検討する。

1)~3)の結果により DIC における TAFI の意義を、凝固線溶、炎症の両面より考察する。

本研究は、これまでに我々が報告してきた DIC 誘発物質の違いによって線溶活性化の程度が異なるという現象を TAFI の観点から検討することにより、TAFI の DIC における役割を明らかにしようとする点を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) DIC モデルの作成

体重 200g、6~7 週齢の Wistar 系雄性ラットを一晩絶食後、pentobarbital 麻酔し、尾静脈より留置針を留置、以下に従いモデルを作成した。

- ① TF 誘発 DIC モデルの作成 : TF 3.75 単位/kg/4hr を持続点滴。

- ② LPS 誘発 DIC モデルの作成 : LPS 5 mg/kg/4hr を持続点滴。

(2) DIC 関連凝血学的マーカー、炎症性サイトカインの推移 : DIC 惹起物質の投与開始時を 0hr とし、0, 4, 8, 12hr に採血し、血小板数、フィブリノゲン、プロトロンビン時間、D ダイマー、アンチトロンビン (AT)、トロンビン-AT 複合体 (TAT)、TNF、IL-6 を測定した。

(3) TAFI および TAFIa の動態の検討 : 上記二種類の動物 DIC モデルにおいて、血中 TAFI および TAFIa (ELISA) を経時的に追跡し、両 DIC モデルにおける動態を比較検討する。

(4) 臓器障害の評価 : 両 DIC モデルにおける臓器障害の進展を血中クレアチニン、ALT の経時的推移により評価する。

(5) 血栓形成の評価 : 腎臓系球体におけるフィブリン沈着の程度を PTAH 染色にて評価する。

(6) TAFIa 阻害剤、アルガトロバン投与の影響 : 両薬を TF 誘発 DIC モデル、LPS 誘発 DIC モデルのそれぞれに -0.5hr~4hr まで投与し、上記マーカーに対する影響につき検討する。

4. 研究成果

LPS 誘発 DIC モデルおよび TF 誘発 DIC モデルのいずれにおいても血中 TAFI 様活性 (血漿中に活性型として存在する TAFI とその他のカルボキシペプチダーゼ活性の両者) は増加した。

また、血中 TAFI 活性化能 (トロンビン・

TM 複合体試薬添加により TAFI の活性化を誘導して測定された TAFIa であり、すなわち血漿中に残存する基質としての TAFI 活性化能) については、4 時間において著しく低下し、時間の経過とともに回復する点も共通した動態であった。

従来の我々の検討から、LPS 誘発 DIC モデルにおいては線溶阻止因子 PAI は著増するのに対して (線溶抑制型 DIC モデル)、TF 誘発 DIC モデルにおいては、PAI の上昇は軽度に留まる (線溶亢進型 DIC モデル)。今回の検討においては、新規線溶阻止因子 TAFI に関しては、両モデルとも共通して TAFIa 様活性は上昇し、TAFI 活性化能は著減していた。このように、DIC において同じ線溶阻止因子である PAI-1 と TAFI の動態が大きく異なることが明らかになった。

次に、両モデルに TAFIa 阻害剤投与により、血中 TAFI 様活性および TAFI 活性化能の変動および DIC 病態への影響を検討した。両モデルにおいて TAFIa 阻害剤の投与により、血小板数、Fbg、TAT に変化は見られなかった。よって TAFIa 阻害剤投与による凝固系への影響はなかったと考えられた。一方、線溶活性化を反映した指標である D ダイマーは TAFIa 阻害剤投与において両モデルで増加したことから、線溶は促進されたと考えられた。

TAFIa 阻害剤投与による血中サイトカインへの影響であるが、LPS モデルにおいて TNF は 4 時間後で有意に抑制された。TAFIa 阻害剤投与により TNF の上昇が抑えられたのは、線溶阻止因子の抑制により線溶が活性化され、微小血栓の溶解が促進されたために、血液循環の改善を生じ、虚血が軽度に留まったためであると考えられた (虚血によりサイトカインは誘導されることが知られている)。実際、腎系球体におけるフィブリン

沈着は TAFIa 阻害剤投与により LPS モデルにおいて有意に軽減した。TF モデルはもともとフィブリン沈着が軽度であるが、有意差はなかったものの、改善傾向が見られた。フィブリン沈着の軽減は線溶亢進によるフィブリンの分解が促進したためであると考えられた。

次に、TAFIa の特異的阻害物質を検体に加えることにより、TAFIa 様活性の中の TAFIa のみについて検討した。その結果、血中 TAFIa 濃度は、TAFIa 様活性と同じく経時的に上昇することが確認された。また、TF モデルにおいては、TAFIa 濃度が 4 時間後、8 時間後と直線的に上昇したのに対し、LPS モデルでは 4 時間値以降の TAFIa 濃度の上昇は軽度にとどまった。TF モデルでは凝固活性化に伴い、二次的な線溶活性化がみられるが、過度な線溶活性化を抑制するために抗線溶物質である TAFI の活性化も亢進したと考えられた。

更に、両 DIC モデルに対して抗トロンビン薬 (アルガトロバン) を投与することにより、血中 TAFIa 活性、および TAFIa 様活性の変動及び DIC 病態への影響を検討した。TF モデルでは、抗トロンビン薬の投与によって血小板数、フィブリノゲン、D ダイマー、TAT といった、凝血的マーカーの異常値が有意に改善された。また腎障害マーカーとしての Cr 及び肝障害マーカーとしての ALT も有意に低下し、DIC 病態が著しく改善したものと思われた。血中 TAFIa 及び TAFIa 様活性は、8 時間後において有意に抑制されていた。これは抗トロンビン薬が、TF モデルで過剰生成したトロンビンを抑制することによってみられた結果であると考えられた。すなわち、*in vivo* において、TAFI がトロンビンによって活性化されていることを確認していることになる。

一方、LPS モデルにおいては、アルガトロバンにより D ダイマーの上昇、PT の延長といった凝血学的マーカーは抗トロンビン薬の投与によって有意に是正されていた。しかし、血小板数減少および TAT 上昇、フィブリノゲン低下には影響を与えなかった。また、炎症性サイトカイン TNF 及び IL-6 に対する抑制効果も見られなかった。血中 TAFIa 及び血中 TAFIa 様活性にも有意な影響を与えなかったが、トロンビンが十分に抑制されていない状態下において TAFI の活性化も抑制されてなかったかも知れない。今後、抗トロンビン薬の投与方法（投与量など）を変更しての検討も必要と考えられた。

以上、TAFIa は、両 DIC モデル（特に TF モデル）において経時的に上昇すること、また、少なくとも TF モデルにおいてはトロンビンによって TAFIa 及びその他のカルボキシペプチダーゼ活性を示す物質が形成されているものと考えられた。また、TAFIa 阻害薬は線溶抑制型 DIC の病態を改善する上で有効と考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 15 件）主要論文のみ。

1. 朝倉英策、御館靖雄：止血薬、抗線溶薬の適応と使用法—抗線溶薬—。日本血栓止血学会雑誌、印刷中。査読無し。
2. 朝倉英策、御館靖雄、林朋恵：播種性血管内凝固症候群の病態と診断。日本検査血液学会雑誌、印刷中。査読無し。
3. 朝倉英策、御館靖雄、林朋恵、前川実生、門平靖子：DIC の治療戦略。日本内科学会雑誌、印刷中。査読無し。
4. Omote M, Asakura H, Takamichi S, Shibayama M, Yoshida T, Kadohira Y, Maekawa M, Yamazaki M, Morishita E, Nakao S, Wada T: Changes in molecular markers of hemostatic and fibrinolytic activation under various sampling conditions using vacuum tube samples from healthy volunteers. *Thromb Res* 123: 390-395, 2008. 査読有り。
5. Morishita E, Sekiya A, Hayashi T, Kadohira Y, Maekawa M, Asakura H, Nakao S, Ohtake S: Increased M-CSF levels in patients with Graves' disease. *Int J Hematol* 88: 272-277, 2008. 査読有り。
6. Hayashi T, Morishita E, Ontachi Y, Yamazaki M, Asakura H, Takami A, Nakao S.: Expression of annexin II in human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms. *Thromb Res* 123: 274-280, 2008. 査読有り。
7. 朝倉英策、前川実生：リコンビナントトロンボモジュリン。臨床検査 52: 1581-1586, 2008. 査読無し。
8. 前川実生、朝倉英策：動物モデルを用いた DIC/臓器障害研究—最近の話題—。日本血栓止血学会雑誌 19: 369-377, 2008. 査読無し。
9. Takami A, Shibayama M, Orito M, Omote M, Okumura H, Asakura H: Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39: 501-507. 2007. 査読有り。
10. Koseki M, Asada N, Uryu H, Takeuchi M, Asakura H, Matsue K: Successful combined use of TA and UFH for life-threatening bleeding associated with intravascular coagulation in a patient with CML in blast crisis. *Int J Hematol* 86: 403-406, 2007. 査読有り。

11. Takami A, Mochizuki K, Ito S, Sugimori C, Yamashita T, Asakura H, Okumura H, Nakao S: Safety and efficacy of foscarnet for preemptive therapy against CMV reactivation after unrelated cord blood transplantation. Transplantation Proceedings 39: 237-239, 2007. 査読有り。
12. Saito H, Maruyama I, Shimazaki S, Yamamoto Y, Aikawa N, Ohno R, Hirayama A, Matsuda T, Asakura H, Nakashima M, Aoki N: Efficacy and safety of recombinant human soluble TM (ART-123) in DIC: results of phase III randomized, double-blind, clinical trial. J Thromb Haemost 5: 31-41, 2007. 査読有り。
13. 御館靖雄、朝倉英策: DICにおける凝固・線溶・炎症とその制御。日本検査血液学会雑誌 8: 127-133, 2007. 査読無し。
14. 門平靖子、朝倉英策: DIC の病態解析と新しい治療戦略。日本救命医療学会雑誌 21: 87-94, 2007. 査読無し。
15. 朝倉英策、御館靖雄、林朋恵: 血液凝固とビタミン K。Pharma Medica 25 (増刊号): 106-112, 2007. 査読無し。

[学会発表] (計 4 件) 代表的シンポジウムのみ。

1. 朝倉英策: 血小板 (数) 異常を呈する疾患の病態ならびに診断一播種性血管内凝固症候群の病態と診断一第 55 回日本臨床検査医学会. 2008. 11. 28. (名古屋)
2. 朝倉英策: がんと血栓症の最前線 (基礎から臨床まで) 一悪性腫瘍 (造血器を含む) における血栓・止血異常とその対策一第 31 回日本血栓止血学会学術推進 SPC シンポジウム. 2008. 11. 20 (大阪)
3. 朝倉英策: 組織因子および LPS 誘発 DIC

動物モデルの病態比較一凝固・線溶、炎症、薬物効果の観点から一日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 2008. 2. 16. (東京)

4. 朝倉英策: DIC 治療ガイドラインとその後一血液内科における DIC 診断の現状と問題点一第 30 回日本血栓止血学会・日本救急医学会合同シンポジウム。2007. 11. 16 (伊勢)

[図書] (計 3 件) 主要著書のみ。

1. 朝倉英策、御館靖雄: DIC の概念と病態「DIC 診療ガイドブック」(丸山征郎編)、メディカルレビュー、東京、印刷中。査読無し。
2. 朝倉英策、中尾眞二: DIC・凝固異常「炎症・再生医学事典」(松島綱治、西脇徹編)、朝倉書店。東京、印刷中。査読無し。
3. 前川実生、朝倉英策: 血栓症モデル作成法 (組織因子誘発モデル)「小動物の血栓症・動脈硬化モデル作成法」(鈴木宏治編)、144-153、金芳堂、京都、2007. 11. 査読無し。

[その他]

<http://www.3nai.jp/weblog/archive/category3932.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

御館 靖雄 (ONTACHI YASUO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号: 80377382

(2) 研究協力者

朝倉 英策 (ASAKURA HIDEAKI)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号: 60192936