1. 血流中の組織因子：炎症, 血栓症, および傷害に対する 反応のメディエータとしての機能

1. Circulating forms of tissue factor as mediators of thrombosis, inflammation, and the response to injury

Paul N. Yu Professor and Chief of Cardiology, Director of Center for
Cellular and Molecular Cardiology, University of Rochester

Mark B. Taubman

監修 九州大学大学院医学研究院 病理病態学 教授 居石克夫

Key words: 組織因子, 動脈血栓, 血液凝固カスケード, アテローム硬化性プラーク, 炎症

はじめに

冠動脈血栓はアテローム硬化病変（プラーク）の破綻から血栓形成が開始され、血管内腔の閉塞にまで至る病変である。この血栓形成過程はきわめて迅速であり、組織因子（tissue factor; TF）を介する外因系血液凝固カスケードが重要な役割を担うと考えられる。

TFは分子量約40 kDaの膜1回貫通型の糖蛋白で、マクロファージや血管内皮細胞、平滑筋細胞、動脈外膜の線維芽細胞など多様な細胞におけるその発現は、増殖因子やサイトカインの刺激により迅速に誘導されることが知られている。しかしながら近年の研究によると、生体内で重要な機能を担うTFにはいくつかのタイプがあることが示されている。最近注目されているTFの多様な作用とともに、血流中に存在するマイクロパーティクルまたは可溶性蛋白としてのTFに関する知見を概説したい。

血栓形成以外の TF の作用

TF は血液凝固カスケードの外因系イニシエータとして、トロンビン生成やフィブリン塊の形成を開始させる重要な因子である (図 1)。TF の作用は正常な止血機序の一部として不可欠であるとともに、一方で動脈血栓や静脈血栓の形成にも関与することが知られている。

さらに最近では、TF が多様な心血管系作用を有することも明らかにされてきた。例えば、われわれが Mount Sinai Medical Center の Badimon らと共同で行ったブタ冠動脈モデルの実験では、遺伝子組換え型 TF 経路インヒビター (rTFPI) の投与により、冠動脈形成術後の内膜/中膜比や内腔狭窄が有意に抑制されることが認められた (*J Am Coll Cardiol* 36: 2303-2310, 2000) (図 2)。同様の知見は、第 VIIa 因子と TF の結合を阻害する第 VIIa 因子インヒビターを用いたウサギ大腿動脈アテローム硬化モデルの実験 (*Circulation* 92: 3041-3050, 1995) など、多数の研究からも明らかにされており、何らかの方法で TF 活性を抑制すると動脈傷害後の再狭窄や内膜肥厚が低減することが示唆される。

また、TF は虚血/再灌流障害の発現にも関与するようである。例えば、ウサギ脊髄虚血/再灌流障害モデルにおける神経学的回復 (*J Surg Res* 63: 174-178, 1996)、あるいはラット肝動脈傷害モデルにおける生命予後 (*Transplantation* 67: 45-53, 1999) などを指標とした研究では、外因系血液凝固インヒビターである TFPI 投与による転帰の改善が報告された。われわれの共同研究者である Scripps Research Institute の Mackman らも、ウサギ冠動脈閉塞モデルに抗 TF モノクローナル抗体を投与することで心筋梗塞領域が有意に減少することを明らかにしている (*Am J Pathol* 157:

図 1 血液凝固カスケード
PL: リン脂質 PAR: プロテアーゼ活性化受容体

図 2 ブタ冠動脈傷害に対する TFPI の作用

1849–1862, 2000).

そのほかにも，新生血管内膜における TF の発現が癌の転移に関連する可能性のあること，ある種の細菌やウイルスの病原性の発現に TF が関与することなどが報告されている．一方，TF ノックアウトマウスの研究からは，心臓における TF の欠損が心筋線維化や左室機能不全と関連することが示され，ヒトの心不全の病態との類似性について興味深い報告が得られている．またわれわれは最近，肺高血圧症の病態における TF の関与についても検討を開始しており，疾患の進行に伴う肺細小動脈の内膜肥厚や閉塞には TF の発現が付随すること（図 3），あるいは肺高血圧症の特徴的な組織学的所見である蔓状病変（plexiform lesion）においても TF の発現亢進が認められることなどを明らかにした．予備的検討ではあるが，これらの肺高血圧症のラットモデルに TFPI を投与したところ，内膜過形成の著明な消退と肺動脈圧の著明な低下が確認されている．

これらの知見の興味深い点は，いずれも TF の重要な機能として知られている血栓形成とは関連しないことである．とくに上記の Mackman らの虚血/再灌流障害の研究では，脱フィブリノゲン剤である ancrod を投与しても梗塞サイズに影響がないことが確認されており，TF の抑制による有益作用がフィブリン沈着とは無関係であることが示された．Mackman らも考察しているように，血管損傷時や虚血/再灌流障害時には TF が発現することでトロンビンなどの生成が開始され，結果として炎症反応や組織損傷の亢進に寄与する可能性が考えられる．

プラーク破綻による血栓形成機序の仮説

プラーク病変を抗 TF 抗体で染色する

図 3 肺高血圧症における肺細小動脈病変：TF の発現

と、マクロファージや平滑筋細胞とともに、とくに壊死性のコアが著明に染色される(図4)。この部分には死滅細胞の破砕物があると考えられるが、TF そのものは比較的分解されにくいいため、活性を保持している可能性がある。実際にアテレクトミーで切除したプラーク病変を用いたわれわれの研究では、検討した50病変中43病変(86%)でTF抗原が検出され、63病変中53病変(84%)では著明なTF活性が認められた(*Circulation* 94: 1226-1232, 1996)。また、プラークのなかでも多くのTFを含有する脂質コアは高い血小板沈着活性を示すことが報告されている(図5)。これらのことから、プラークが破綻した際には内部のTFが血流に曝露され、結果として、その後の血栓形成が惹起されるという仮説が浮上し、広く受け入れられてきた。しかしながら、近年の研究では必ずしもこの仮説に一致しない知見が明らかにされている。

動脈損傷モデルにみる血栓形成機序

プラーク破綻による血栓形成機序を理解するためには、動脈損傷モデルでの考察が有益である。正常なラット動脈では、TF

■: 壊死性コア

図4 アテローム硬化性プラークにおけるTF抗原の局在: 壊死性コア

Toschi V, et al. *Circulation* 95: 594-599, 1997

図5 TFはヒトアテローム硬化性プラークの血栓形成能を調節する

INT: 正常内膜, Coll: コラーゲンに富むマトリクス, Foam: 泡沫細胞に富むマトリクス, TM: 正常中膜, ADV: 外膜, LRC: 脂質コア

図6 動脈血管壁損傷後のTFの発現

は内皮や平滑筋細胞ではなく外膜のみに発現している．一方，動脈内腔へ損傷を加えると，4時間以内に平滑筋細胞にTF発現が誘導されるものの血栓は形成されないが，2週後に2回目の損傷を加えると，直後に表面上で血栓が形成される様子が認められた．この現象を模式的に示すと図6のようになり，1回目の損傷では平滑筋細胞にTFの発現が誘導される前に白血球や血小板が表面に接着するため，TFは血流に曝露されない．しかし2週後までには内皮細胞の下層でTFを発現した平滑筋細胞が新生内膜を形成しているため，この時点で再損傷を加えると，ただちにTFが血流に曝露され，血栓が形成されるのである．内部にTFを含有するプラークに対しアテレクトミーや血管形成術を施行した際にみられる血栓形成は，この機序に類似する状況下にあるものと思われる．

血管壁から血流へのTFの移行

上記の動脈2回損傷の実験では損傷部位に確かにTFが発現し，血栓が形成された．しかしながら，形成されるのは比較的小さな血栓であり，臨床的にみられる大きな血栓形成とは乖離があった．この原因を検討するために，われわれは*ex vivo*のフローチャンバー実験を行った(*Thromb Haemost* 83 : 622-628, 2000)．これはラット大動脈検体を配置したチャンバーに第VIIaおよびX因子を含む灌流液を灌流させ，生成される第Xa因子をリザーバー部位で定量してTF活性の指標とした実験である(図7)．その結果，チャンバーに正常動脈，損傷24時間後の動脈，損傷2週後の動脈，2回損傷直後の動脈などを配置した際には，リザーバーでTF活性はまったく検出されなかったが，血管壁の表面を綿棒で軽く拭う操作を加えると，正常動脈，

図7 管状フローチャンバー

損傷後の動脈いずれにおいても TF 活性が検出された。このことから、通常の抗体染色では TF が検出されないような正常血管であっても、実際にはある程度の TF が発現している可能性が示唆された。さらに興味深いことに、動脈検体をチャンバーから取り外した後にもリザーバー部位では持続的に TF 活性が検出されたことから、血管壁の表面に発現した TF が灌流液に移行したことが判明した。2 回損傷後の血管壁で大きな血栓が形成されない原因は、おそらく露呈した TF が迅速に血流中に移行したためであろう。

また、もう 1 つの重要な知見として、動脈血栓を TF 抗体で染色すると全体がきわめて均一に染まることが挙げられる。臨床的な閉塞性の血栓はきわめて大きく迅速に形成されるため、これらの TF がすべて血管壁から血栓内へと拡散されたものとは考えにくい。血中由来の TF と考えるほうが合理的である。

血流内に存在する TF： マイクロパーティクル

このように近年の研究からは、血流内へと放出される TF の存在が示唆され、実際に TF 活性を有する微粒子成分（マイクロパーティクル；MP）がヒトおよび動物の血液において同定されてきた。また、それらの MP に由来する TF が確かに血栓形成に関与することも動物モデルで確認されている。

これらの MP は血管内皮細胞、アポトーシスに陥ったプラークのマクロファージ、あるいは血小板や白血球など、TF を発現し得るあらゆるタイプの細胞に由来する可能性があり、その起源は傷害や虚血が発生した組織によって異なるのかもしれない（図 8）。培養平滑筋細胞を用い

- 血管内皮細胞
- アポトーシスに陥ったプラークのマクロファージ
- 血小板（粘着媒介性？）
- 白血球（単球、好中球）
- 血管平滑筋細胞？
- 損傷または虚血組織（例、虚血心筋）？

図 8 流血中のマイクロパーティクルの起源

たわれわれの実験では，新鮮培地上にまいた培養平滑筋細胞からは数分以内に TF が放出され始め，24 時間後までには生成された TF の約 10% が放出されていた．この過程は正常なホメオスタシスの一部であるとともに，壊死やアポトーシスの帰結として発生する場合もあるようである．

新たな血流内 TF：可溶性 TF 蛋白

さらに 2003 年には，それまで存在すら知られていなかった新しいタイプの TF 分子が同定された (*Nat Med* 9: 458-462, 2003)．これはヒト TF mRNA の増幅時に偶然に検出された分子で，TF 遺伝子の 5 番目のエクソンがスプライスアウトされたオルタナティブ・スプライス型 TF (asTF) である (図 9)．asTF ではスプライシングの結果としてフレームシフトが生じており，通常の TF 分子にみられる膜貫通ドメインがなく，独自の C 末端配列を有しているが，TF の細胞外活性部位の多くは保持していることが特徴である．通常の TF より 40 アミノ酸ほど小さいこの asTF 蛋白は，膜に固定されているのではなく可溶性分子として血中に放出されている．

実験的血栓を抗 asTF 抗体で染色したところ，血小板と同部位に asTF の局在が確認された (図 10)．また *ex vivo* の灌流系でブタ中膜あるいはコラーゲンゲルにヒト血液を灌流すると，asTF と通常の全長 (fl) TF の双方が染色された．これらのことから血流内には asTF が存在し，MP と同様に血栓上に蓄積されることが明らかである．現在までにマウス asTF のクローニングも完了しており，われわれは多様な組織における asTF および flTF の発現を確認している．

asTF の活性については，1) 第 VIIa 因子結合部位を有するが，第 X 因子結合部位

図 9 血流内 TF の起源：オルタナティブ・スプライシング
fl: 全長, as: オルタナティブ・スプライス

図 10 実験的血栓における asTF と血小板の共存 (*ex vivo*)

は消失している、2) 溶液中では不活性である、3) リン脂質を添加すると活性を示す、4) 血小板単層に添加した場合に最も活性が高いが、fTF に比べれば低い、などの知見が判明している。asTF は凝集した血小板のリン脂質が存在する損傷部位のみで活性を発現する。MP の場合と同様に、通常は血栓を引き起こすほどの活性レベルは示さないのである。asTF の起源や血栓形成過程への関与などを解明することが今後の課題である。

まとめ

TF は血栓形成とは関連しない多様な心血管系への作用を有することが明らかにされており、その背景にはトロンビンや第Xa 因子を介する炎症反応が関与する可能性がある。

一方、血栓形成機序に関する近年の研究では、その少なくとも一部に血流内のTF が関与することが明らかにされてきた。動脈血栓においては、血管壁の損傷によりTF が血流に露呈されることが“血栓形成の開始”に、血流内に存在するTF が損傷部位に接着することが“血栓の成長”に関与する、という仮説が考えられる(図11)。

Q & A

後藤 (東海大学医学部内科学系) : 血流内のTF が血栓の成長に関与するという点はきわめて興味深いと思います。その際、TF が血栓に蓄積するメカニズムとはどのようなものでしょうか。

Taubman : 一般にMP やasTF はきわめて粘着性があります。ご存知のように、MP の表面上には粘着性の分子が発現していますが、最も重要な分子はP-セレクトインで

- 血管壁損傷(プラーク破綻/びらん/虚血/PTCA/ステント留置)により活性型TFが血流に曝露される血栓形成の開始
- マイクロパーティクルとして、または可溶性蛋白として血流内を循環するTFが血管壁損傷部位に接着する血栓の成長

図11 動脈血栓におけるTFの作用(仮説)

あることが示唆されています。もし血栓への MP の蓄積をみる実験を P-セレクトリン・ノックアウトマウスで行えば，血栓サイズが明らかに小さく，血栓中の TF 量が著明に少なくなるでしょう。asTF については現在，結合に関する実験を試みているところです。

後藤：それでは，何らかの抗 P-セレクトリン抗体を添加すると，TF の蓄積は減少するということですね。

Taubman：もしそのような抗体を加えれば，血栓の成長は阻害されるでしょう。

浅田（宮崎大学医学部病理学）：血栓の成長に MP が寄与することをお話しになりましたが，MP には様々なサイズのものがあります。大きさの違いは血栓の成長に影響するのでしょうか。

Taubman：きわめて重要な問題であると思いますが，現在のところ不明です。MP のサイズ

を明確に分離した研究はまだ行われていないと思います。従来のソーティングシステムでは容易ではないでしょう。Harvard Medical School の Furie らは FACS 解析システムを改良し，この問題の解明を試みているようです。推測ですが，おそらく粒子サイズが異なれば血栓形成能も異なるのではないのでしょうか。

小野（静岡県立大学薬学部病態薬学講座）：炎症プロセスにおいて TF 活性を制御するためには，どのような方法がよいとお考えでしょうか。TF 活性を直接的に阻害すべきか，あるいは第 Xa 因子活性を制御するほうがよいのでしょうか。

Taubman：明確にはお答えできませんが，TF 活性を直接的に阻害してしまうと，酵素活性とは関連しない作用も含め，TF のあらゆる作用が遮断されてしまいます。代わりに第 Xa 因子を阻害すれば，純粋に抗血栓という観点で TF 阻害と同等に有効ではないのでしょうか。