4. 接着分子, 組織因子

岡田 靖¹⁾²⁾ Gregory J. del Zoppo²⁾ 藤島 正敏³⁾

国立病院九州医療センター脳血管内科¹⁾, スクリプス研究所分子実験医学部門²⁾

九州大学医学部第二内科³⁾

Key words: 接着分子, 組織因子, 血液凝固, 脳虚血, 再灌流
(脳卒中 21: 452—456, 1999)

はじめに

近年, 重要な生体反応である炎症, 免疫機構などの分子レベルの解析と相まって, 脳虚血時の微小循環障害, no-reflow 現象, 血栓形成においても様々な細胞接着分子や血液凝固因子が重要な役割をはたしていることが明らかになってきた¹⁾²⁾. 本シンポジウムでは接着分子, 組織因子の脳虚血の病態への関与, および発症危険因子としての役割について, スクリプス研究所での実験成績を中心に, 最近の知見にもふれてみたい.

1. 脳虚血における接着分子の役割

1) セレクチンの脳微小循環に及ぼす影響

接着分子の中で, 脳微小循環に関与するものとして, セレクチン, Ig スーパーファミリー, インテグリンがとくに重要である. セレクチンファミリーはレクチン様ドメインを有し, 主なものに P-, E-, L-セレクチンがある. P-セレクチンは血小板の α 顆粒および血管内皮細胞の Weibel Palade 体に存在し, トロンビンやサイトカインの刺激で分単位で発現して, 白血球の血管内皮への接着 (rolling) に関与し, 血栓形成の初期の段階で血小板, 白血球, 血管内皮の相互の接着と凝固機転にも重要な役割を担っていると考えられている³⁾. 一方, E-セレクチンはおもに炎症や再灌流時の活性化白血球の血管内皮への接着に関連しており, 敗血症, DIC, 虚血・再灌流後の微小循環障害などに関与している⁴⁾.

このような病態を明らかにする目的で, 我々はヒヒを用い, 一側中大脳動脈起始部にバルーンデバイスを装着した閉塞/再開通モデルを作製し, 2 時間虚血, 3 時間虚血+1, 4, 24 時間再灌流後の脳組織について凍結切片による免疫組織化学染色を行い, 脳微小血管における各種の接着分子の発現および微小血管の開

率について検討を行った^{1)~4)}. その結果, P-セレクチンおよび血小板二次凝集時に作動するインテグリン GP IIb/IIIa は, 非虚血側では発現せず, 虚血側では虚血中より発現し, 再開通後 24 時間まで累積して増加した (図 1).

一方, 同一実験系を用いた Haring ら⁴⁾の E-セレクチンおよび E-P セレクチンに関する検討では, その発現は虚血中よりみられ漸増するものの, 注目されることは非虚血側にも 24 時間後に発現が見られたことであり, その発現機序として虚血後のサイトカインの持続的刺激などが考えられた.

2) β_2 インテグリンと Ig スーパーファミリー

セレクチンによる rolling につづき, 白血球膜表面に発現した β_2 インテグリン (CD 11/CD 18) は, 血管内皮上のカウンター受容体 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) と接着することで, 白血球の内皮への強固に接着 (firm adhesion) し, 細胞内へと侵入 (transmigration) する¹⁾²⁾. 急性期脳梗塞, あるいは一過性脳虚血患者の白血球表面に, CD 11 b/CD 18 の発現が増加していることが確認されている. 前述のヒヒの局所脳虚血/再灌流モデルにおいては, 血管内皮の ICAM-1 は, 3 時間の虚血中には発現せず, 再灌流 1 時間後より発現した (図 1). ICAM-1 は炎症や虚血時に白血球が血管内皮に強固に接着する際に重要な役割を担っており, Tumor Necrosis Factor- α , インターロイキン-1 などの炎症性サイトカインや細菌エンドトキシンの刺激により, 発現が促進される. 脳虚血急性期には梗塞巣周囲に多形核白血球とともに ICAM-1 の発現も顕著なことが剖検で確かめられている. ICAM-1 は虚血後数時間から数日間にわたって発現するとの報告が多い.

β_2 インテグリンに対する抗体, あるいは ICAM-1 に対する抗体の投与は白血球の微小循環障害および二

図1 ヒヒ中大脳動脈閉塞・再灌流モデルにおける虚血・再灌流側 (I/R) と非虚血側 (non-I/R) 基底核領域微小血管のPセレクトリン (黒カラム), ICAM-1 (斜線カラム) およびGP IIb/IIIa (白カラム) の発現頻度
脚注; 頻度は全血管数 (CD 31 で染色) に対する fraction の割合を示している。
(C): 未手術のコントロール, (-1): 2時間閉塞群, (1, 4, 24): それぞれ3時間閉塞+1, 4, 24時間再灌流群

二次的な脳組織傷害を回避しうる可能性がある。Moriら³⁾はヒヒの局所脳虚血/再灌流モデルに、 $\beta 2$ インテグリンのサブユニットCD 11bに対する抗体IB4を虚血前に投与し、微小血管の開存率が有意に増加することを示した。その他の脳虚血実験でも、 $\beta 2$ インテグリンに対する抗体、セレクトリンに対する合成オリゴペプチド、抗ICAM-1抗体の投与およびtPA後の抗ICAM-1抗体投与が、虚血後の脳組織傷害の軽減に有効であることが報告されている。

しかし米国で行われた臨床試験では、発症6時間以内の虚血性脳血管障害625例に対し、抗ICAM-1抗体、Enlimomabの5日間投与は予後、死亡率ともプラセボに比較して有意な効果は認められなかった⁶⁾。むしろ実薬群において発熱患者、無菌性髄膜炎患者を有意に増加させたといわれている。現在ヨーロッパで、同一抗体を用いての発症24時間以内投与の臨床試験が進行中であるが、より早期に、かつ虚血再灌流状態が想定される患者を対象とすることが望ましい。対象例のエントリ基準や免疫能への影響も含めて慎重に試

験を進めてゆくべきとの意見が多い。さらに米国では抗CD 18抗体を用いた脳虚血に対する臨床治験HALT studyがPhase IIを終了し、これまでとくに重篤な副作用はみられておらず、今後の成績が待たれる。

3) インテグリン $\alpha v \beta 3$ と血管新生

インテグリン $\alpha v \beta 3$ は血管内皮に存在し、血管内皮成長因子(VEGF)と密接に関連して血漿の血管外漏出と脳浮腫の発現、虚血数日後においては傷害部位の血管新生に関与しているといわれている。われわれの実験でも $\alpha v \beta 3$ は、非虚血側での発現はなく、虚血脳の微小血管において、比較的大きな血管 (30~50 μm) に選択的に発現することを確認した⁷⁾。

抗 $\alpha v \beta 3$ 抗体およびFITCラベルの抗フィブリン抗体で二重染色すると、 $\alpha v \beta 3$ 抗体の発現とフィブリンの沈着した血管分布とに密接な関連のあることが明らかになった。 $\alpha v \beta 3$ の発現には虚血に伴う種々のサイトカインの刺激とともに、血管内のフィブリンも関与していると考えられる。近年、動脈硬化性狭窄部位での粥腫内出血は vasa vasorum から中内膜への新生血

管が破綻することが原因の一つと考えられ、 $\alpha\text{v}\beta 3$ の新生血管の成長への関与が注目されている。 $\alpha\text{v}\beta 3$ のモノクロナル抗体は血管新生抑制作用が期待され、血管手術後の内膜肥厚防止への応用が試みられている。 $\alpha\text{v}\beta 3$ とフィブリン、VEGF、血管新生との関連については、今後さらに注目すべき知見が得られるものと期待される。

2. 脳虚血における組織因子の役割

組織因子 (TF) は活性化第 VII 因子と複合体を形成して外因系凝固に重要な役割を果たしている。近年、第 X 因子への関与も明らかにされ、血管内の病的血栓の形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。TF の分布は単球、血管内皮、平滑筋、線維芽細胞など多岐におよぶが、通常、血管内皮には発現せず、サイトカイン、トロンビン、リポポリサッカライド、VEGF などの刺激により発現が促進される。

抗 TF 抗体で免疫組織化学染色した脳微小血管では、TF が外膜周囲に豊富に分布し、monocyte から放出される TF とともに、血管破綻時の止血機構や病態下の血栓形成に関わっていると考えられる。

脳虚血・再灌流実験では脳微小血管内にまずフィブリン血栓を生じ、しだいに血管周囲にも漏出したフィブリノーゲンが変化して血管周囲にもフィブリンが観察される。すなわち虚血早期には血管内フィブリンが主体であり、経時的に血管外フィブリンが増加する。血管外フィブリンの形成には漏出したフィブリノーゲンが、ここで TF と反応しフィブリンを形成することが考えられる。

われわれの虚血/再灌流実験において、抗 TF 抗体 TF 9-6 B 4 をあらかじめ虚血前に投与した場合に、脳微小血管の開存率は非投与群に比べて有意に増加していた (図 2)⁸⁾。この結果は抗 TF 抗体の急性期脳梗塞への臨床応用の可能性を示唆する結果である。一方、外因系凝固インヒビター (TFPI) は血管内皮より発現し、第 VII 因子・TF 複合体および活性化第 X 因子に対して抑制的に作用し、凝固活性を阻害する。国立循環器センターの鏡谷ら⁹⁾の検討では、脳梗塞患者の血漿 TFPI 活性は、アテローム血栓性脳梗塞およびラクナ梗塞では対照群より低く、一方、心原性脳塞栓では対照群と差はなかった。血栓性脳梗塞における TFPI 活性低下の原因としては血管内皮の動脈硬化性変化が関与している可能性が考えられる。

図 2 ヒヒ中大脳動脈閉塞・再灌流モデルにおける虚血・再灌流側 (I/R) と非虚血側 (non-I/R) 基底核領域微小血管のフィブリンの分布および検出頻度
脚注；open bar (白カラム) は未治療群, closed bar (黒カラム) は抗 TF 抗体 TF 9-6 B 4 の虚血前投与群である。(1) (2) (3) および (Total) はそれぞれ基底核領域の微小血管の血管内, 血管内+血管外, 血管外のみ, および全血管におけるフィブリンの検出頻度

図 3 脳虚血, 血栓形成, および炎症反応と接着分子, 組織因子の関係

3. 感染症が脳梗塞発症に及ぼす影響

脳梗塞の危険因子, 発症誘発因子として近年、感染や慢性炎症性疾患が注目されている。脳梗塞発症前に感染症が先行していることはしばしば経験されるが、Grau ら¹⁰⁾は脳梗塞発症 1 週間前の感染の既往は、高血圧、糖尿病など従来の危険因子に比し、relative risk が高く、独立した危険因子であると報告した。その機序として、発熱、水分摂取不足による脱水、フィブリノーゲン・白血球増多による微小循環障害のほか、抗凝固因子の抑制、炎症性サイトカイン、モノサイトからの組織因子の放出などが血栓形成のリスクを高めていることが考えられている。

ま と め

細胞接着分子と脳血管障害について考える場合, 白血球・血管内皮・神経細胞が相互に影響を及ぼし合い, 急性期の病態を形成していることを念頭におく必要がある。すなわち脳虚血に続発して血栓が単に形成されるという考え方ではなく, 局所において脳虚血, 血栓形成, 炎症反応の三者が相互に同時に進行し, 細胞接着分子, 組織因子がそれぞれに作用する病態を考える必要があると思われる(図3)。抗接着分子療法, 抗組織因子療法は実験的に良好な成績がみられるにも関わらず, まだ臨床応用には至っていない。超急性期の血栓溶解療法に加え, 今後は虚血再灌流後の病態に対する治療も必要であろう。これからの急性期治療のコンビネーション療法の一つとして, 抗接着分子療法, 抗組織因子療法が有効な治療法として発展することを期待したい。

文 献

- 1) del Zoppo GJ, Schmid-Shonbein GW, Mori E, et al : Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22 : 1276—1283, 1991
- 2) del Zoppo GJ : Microvascular response to cerebral ischemia/inflammation. *Ann NY Acad Sci* : 132—147, 1996
- 3) Okada Y, Copeland BR, Mori E, et al : P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 25 : 201—210, 1994
- 4) Harin H-P, Berg EL, Tsurushita N, et al : E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke* 27 : 1386—1392, 1996
- 5) Mori E, del Zoppo GJ, Chambers JD, et al : Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke* 23 : 712—718, 1992
- 6) The Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, Sherman DG : The enlimomab acute stroke trial : Final results. *Neurology* 48(Supple) : A 270, 1997
- 7) Okada Y, Copeland BR, Hamann GF, et al : Integrin $\alpha\beta 3$ is expressed in selected microvessels following focal cerebral ischemia. *Am J Pathol* 149 : 37—43, 1996
- 8) Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, et al : Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 25 : 1847—1854, 1994
- 9) Abumiya T, Yamaguchi T, Terasaki T, et al : Decreased plasma tissue factor pathway inhibitor activity in ischemic stroke. *Thromb Haemost* 74 : 1050—1054, 1995
- 10) Grau A, Buggle F, Heingl S, et al : Recent infection as a risk factor for cerebrovascular ischemia. *Stroke* 26 : 373—379, 1995

Abstract**Cell adhesion molecules and tissue factor as risk factor for brain infarction**

Yasushi Okada, M.D.^{1,2)}, Gregory J. del Zoppo, M.D.²⁾ and Masatoshi Fujishima, M.D.³⁾

¹⁾Department of Strokeology, National Kyushu Medical Center

²⁾Department of Molecular and Experimental Medicine, Scripps Research Institute

³⁾Department of Medicine and Clinical Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

The role of cell adhesion molecules and tissue factor as risk factor for brain infarction has been emphasized. By primate models of middle cerebral artery occlusion and reperfusion (MCA : O/R), we have tested the potential role of these molecules in the microvasculature in ischemic brain tissue. Significant increase of cell adhesion molecules (P-selectin, E-selectin, ICAM-1, and GP IIb/IIIa) of immunoreactive expression was recognized in the affected site of MCA : O/R. Infusion of monoclonal antibody of β 2 integrin subunit (CD 11 b), IB 4 produced significant increase in reflow. Preischemia infusion of the anti-tissue factor monoclonal antibody, TF 9-6 B 4 resulted in significant reduction of intramicrovascular fibrin in MCA : O/R. These results indicate that cell adhesion molecules and tissue factor-mediated events may play an important role in the processes of brain ischemia, coagulation system activation and inflammation, which are interrelated each other.

(Jpn J Stroke 21 : 452—456, 1999)

Key words: cell adhesion molecules, tissue factor, coagulation, brain ischemia, reperfusion