

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：梅沢 陽太郎

専攻分野：小児科学

指導教授：清水 直樹

主論文の題目：

Glucocorticoid Directly Enhances mRNA levels of Endogenous Coagulation Factor VIII in Human Liver Sinusoidal Endothelial Cells

(糖質コルチコイドはヒト肝類洞内皮細胞における内因性凝固第VIII因子を mRNA レベルで直接亢進させる)

共著者：

Atsuki Yamashita, Mika Mori, Tomoko Ashikaga, Chiai Nagae, Mieko Akita, Noriko Suzuki, Satoshi Yamazaki, Hanae Kaneko, Yukino Nawa, Hiroaki Matsui, Makoto Sugiyama, Shigenobu Takayama, Naoki Shimizu, Masashi Taki

緒言

凝固第VIII因子活性 (factor VIII coagulant activity; FVIII:C) の増加は、糖質コルチコイド (Glucocorticoid; GC) による血栓症の病因と関連している可能性が指摘されているが、FVIII:C の増加のメカニズムは不明である。GC 投与と FVIII 増加の関係性を明らかにするため、今回我々は、GC で治療された免疫性血小板減少性紫斑病 (immune thrombocytopenic purpura; ITP) の小児患者における、FVIII およびフォンウィルブランド因子 (von Willebrand Factor; VWF) を含む凝固パラメーターの変化を分析した。また、FVIII 遺伝子 (*F8*) および VWF 遺伝子 (*VWF*) の mRNA 発現に対する GC 投与の影響を、FVIII 産生細胞として報告されているヒト肝類洞内皮細胞 (human liver sinusoidal endothelial cell; HLSEC) 株 (HLSEC/ciJ)、およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell;

HUVEC)株 (EA. hy926) を用いて検討した。

方法・対象

活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time; APTT) と FVIII:C、FVIII 抗原 (factor VIII antigen; FVIII:Ag)、および VWF 抗原 (von Willebrand Factor antigen; VWF:Ag) のレベルを、ITP の小児患者 6 症例の GC 治療の前後で比較した。本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (承認 1210 号、4283 号) の承認を得たものである。また、HLSEC/ciJ および EA. hy926 細胞における *F8* および *VWF* の mRNA レベルの変化を、デキサメタゾン (dexamethasone; DEX) 添加の前後で比較した。定量化には、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (real time-polymerase chain reaction; RT-PCR) を用いた。FVIII タンパク質レベルの変化について、DEX を添加した HLSEC/ciJ 細胞の細胞破碎液においても評価した。統計は、Wilcoxon の符号付順位検定または Steel 検定、Steel-Dwass 検定を用いた。

結果

APTT は ITP 患者の GC 治療後に有意に短縮した ($p < 0.01$)。FVIII:C および FVIII:Ag は GC 治療後に有意に増加した ($p < 0.01$) が、VWF:Ag レベルの有意な増加を認めなかった。HLSEC/ciJ 細胞における *F8* および *VWF* mRNA の発現は、1 μM および 100 μM の DEX 添加後に増加し ($p < 0.05$)、*F8* mRNA レベルにおいては、100 μM の DEX 添加後に最も有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。これらの増加は、GC 受容体 (GR) 拮抗薬である RU486 による前処置によって抑制された。また、EA. hy926 細胞においては、1 μM の DEX 添加後に *VWF* mRNA の発現が有意に増加した ($p < 0.05$) が、*F8* mRNA の発現の有意な増加はなかった。HLSEC/ciJ 細胞の細胞破碎液において、100 μM DEX 添加後の FVIII タンパク質の有意な増加は認めなかった。

考察

GC 投与による凝血的変化についての先行研究では、GC による凝固因子増加の中でも FVIII:C と VWF の変化が最も顕著であり、この2つの凝固因子の変化が血栓症の誘発に最も関連性が高いと考えられているが、その変化の機序については明らかにされていない。今回の研究において、ITP 患者を対象とした GC 投与では、FVIII:C, FVIII:Ag が増加した一方で、VWF:Ag は増加しなかった。このことから、FVIII の変化は VWF によらない FVIII 量の増加であることが示唆された。また、ヒト肝類洞内皮細胞株の HLSEC/ciJ において、GC 添加により *F8* および *VWF* mRNA が増加し、*F8* mRNA は用量依存的に増加した。さらにこれらの増加は、GR 拮抗薬である RU486 の前処置によって抑制された。従って、GC である DEX が直接的に GR の活性化を介して *F8* および *VWF* mRNA の転写活性化を促進した可能性が示唆された。DEX を添加した HLSEC/ciJ の細胞破碎液において、FVIII タンパク質の増加は認めなかった。この原因として、mRNA 増加量がタンパク増加には不十分であった可能性、タンパク質合成にインキュベーション時間が不足していた可能性、翻訳後修飾における問題の可能性などが示唆された。本研究の limitation として、使用した GC が DEX のみであり他の GC での検討をしていないこと、HLSEC/ciJ 細胞は不死化するために外因性遺伝子を導入した肝類洞内皮細胞株であり、細胞の基本的な特性がある程度変化している可能性があること、primary cell を用いていないことなどが考えられた。

結論

GR 活性化を介した GC による内因性 FVIII の mRNA レベルの直接的な産生亢進は、GC 投与に伴う FVIII:C 増加の一因である可能性が示唆された。