

動脈硬化懇談会

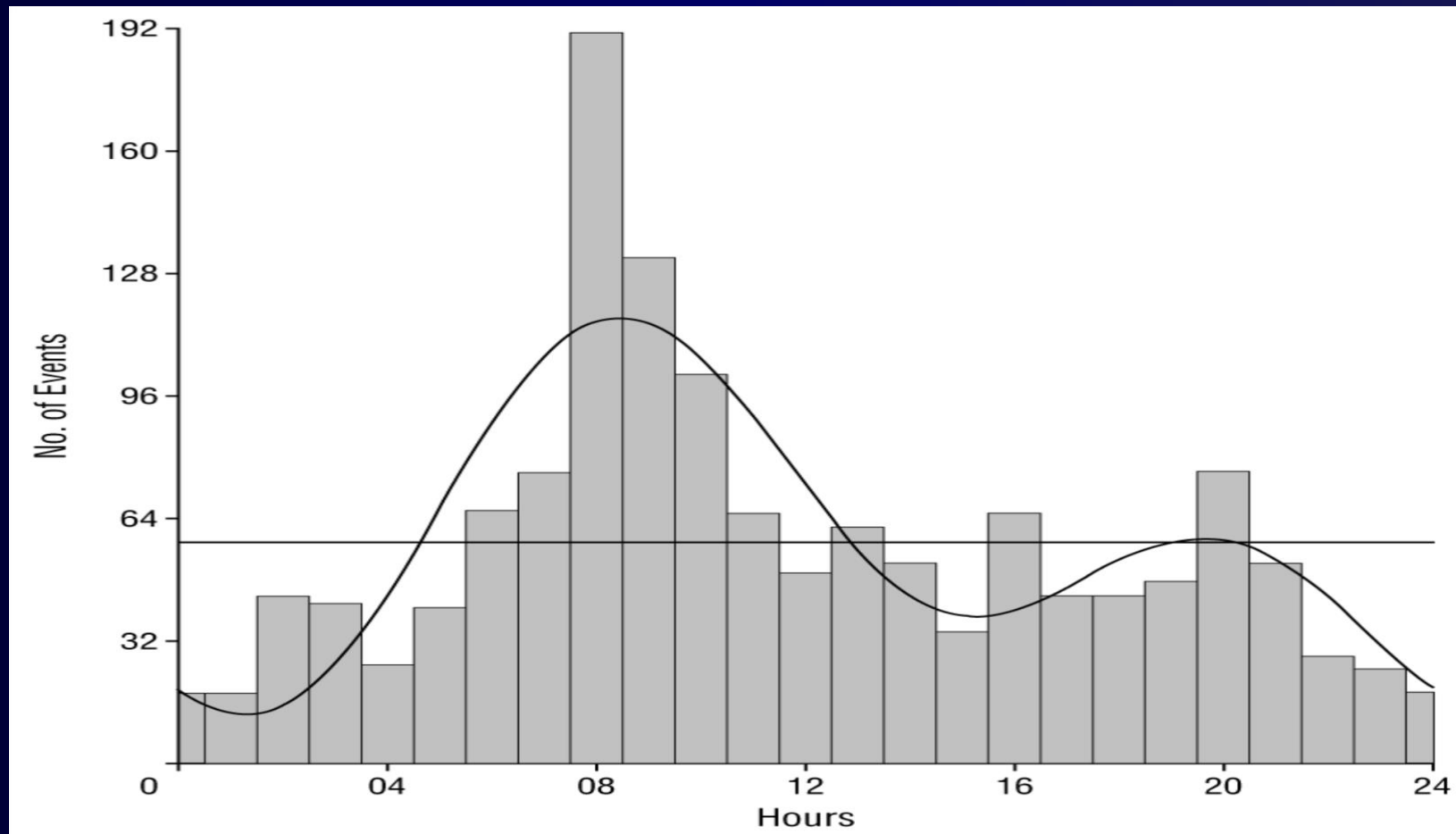
血栓症と線溶系 体内時計の関わり

平成26年5月28日

齊藤 内科クリニック

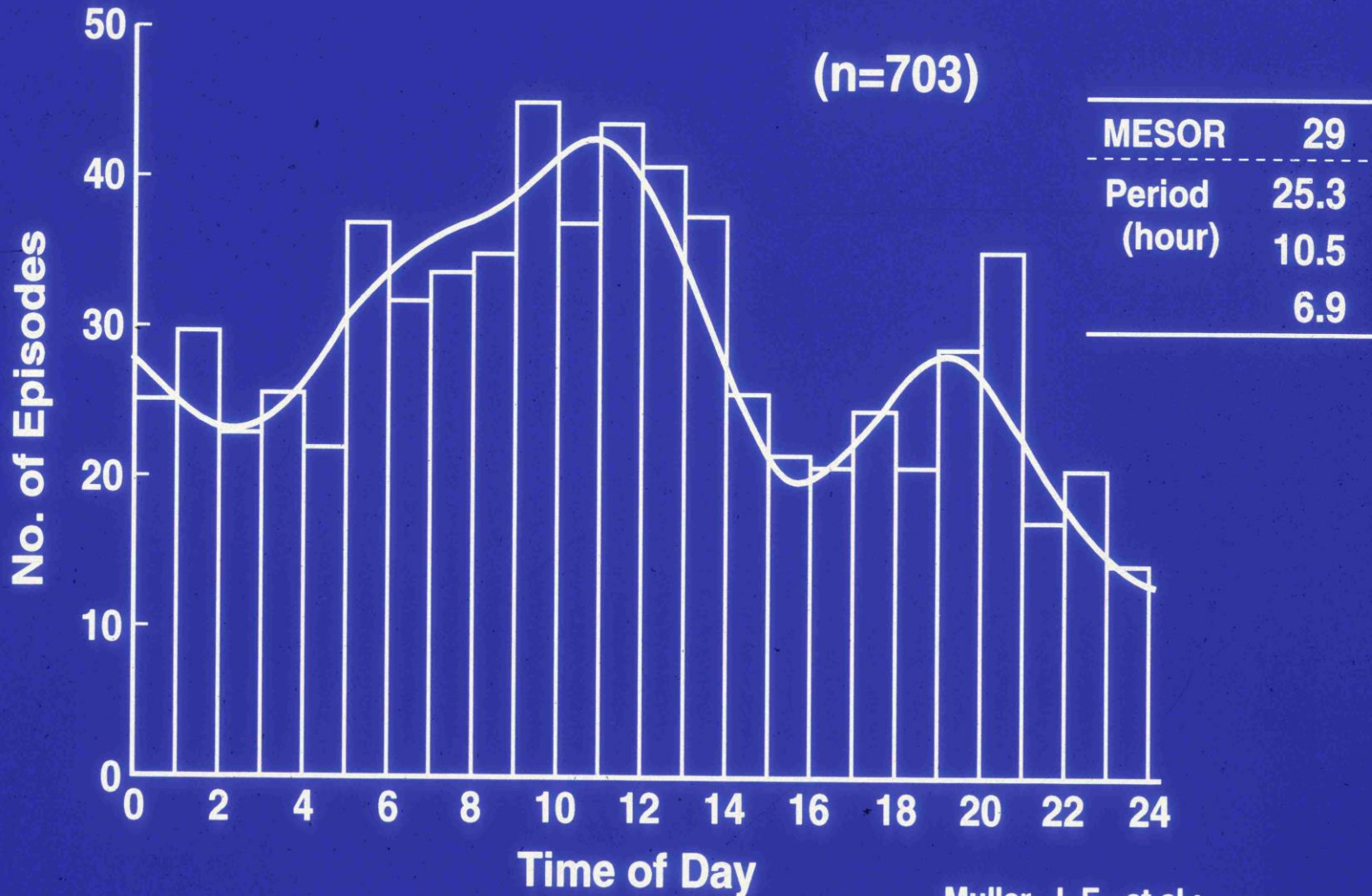
齊藤 勉

脳梗塞発症の日内変動



脳梗塞発症は早朝に多い

Hourly Frequency of Onset of Myocardial Infarction



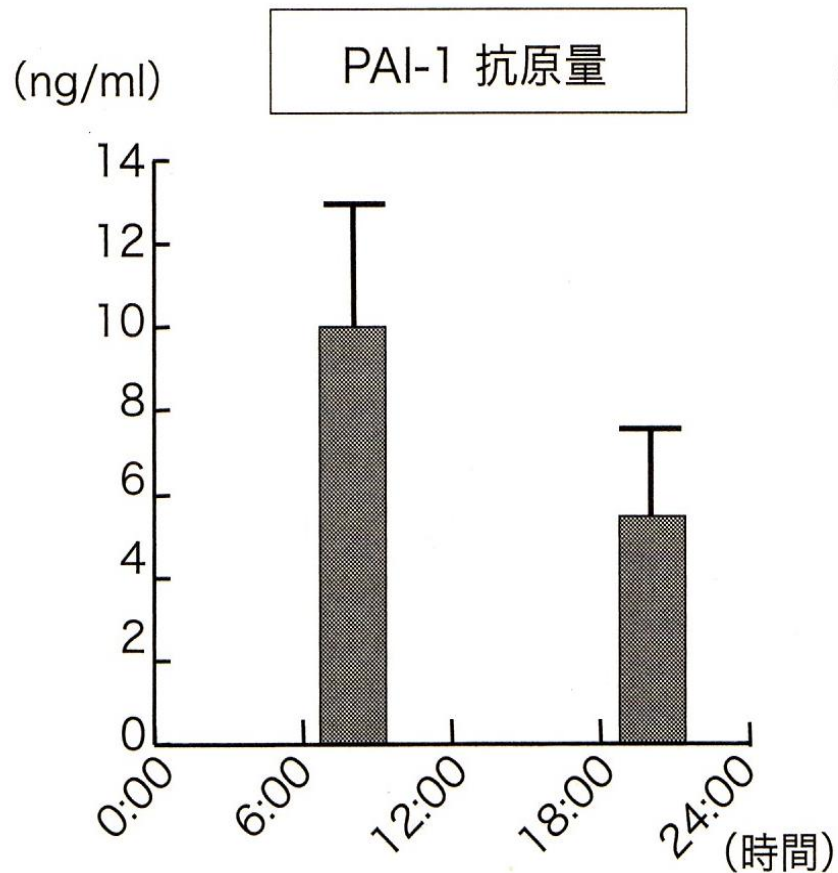
Muller, J. E., et al.:
N. Engl. J. Med. 313:1315, 1985.

異型狭心症虚血発作の日内変動

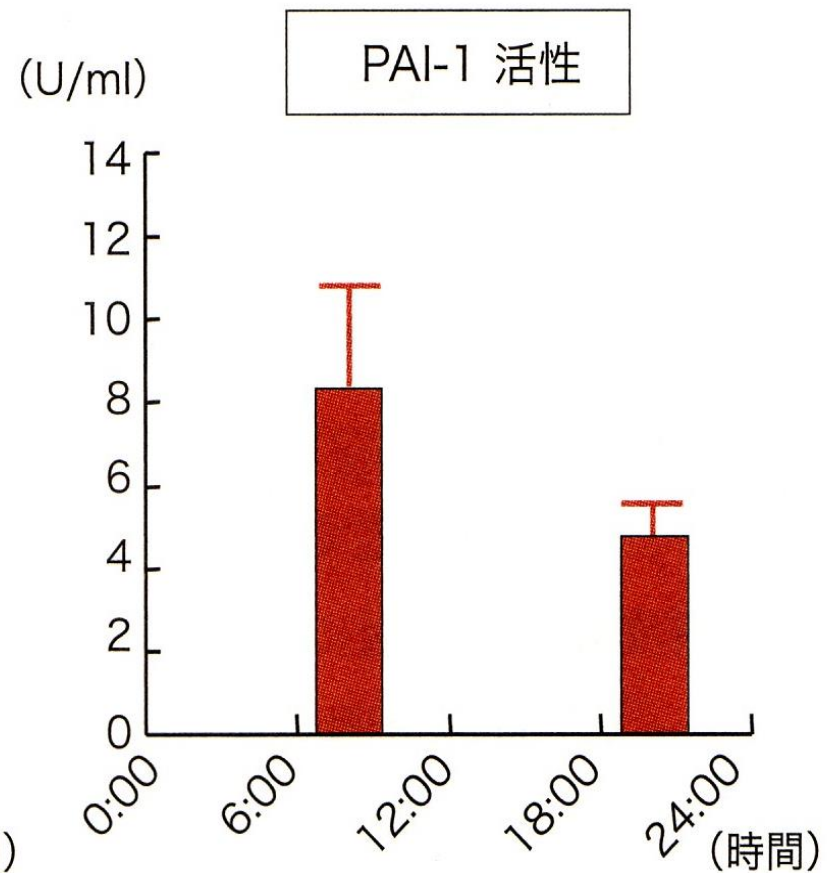
回/時間



ヒト血漿中 PAI-1 抗原量、活性の日内変動。



Kapiotis S et al. Circulation(1997)



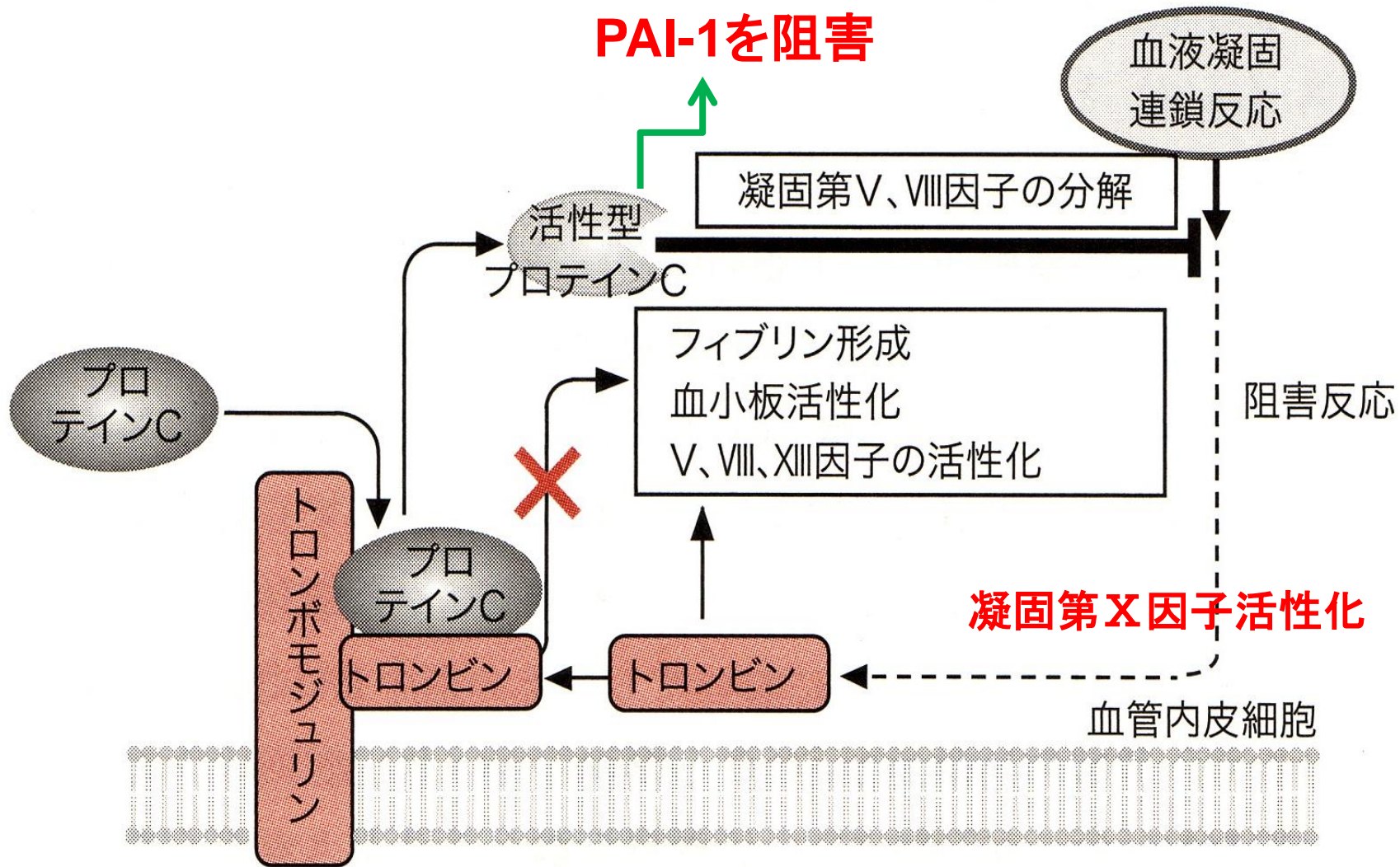
Angleton P et al. Circulation(1989)

心筋梗塞や脳梗塞発症の概日リズムを説明するにはPAI-1の変動だけでは説明がつかず、他の凝固線溶系因子についても研究されている。

血管内皮細胞表面で合成され、トロンビン産生を制御するトロンボモジュリン(TM)が重要である

血管内皮細胞上でのTMの働き

PAI-1を阻害



血栓形成に関わる因子の 日内リズム

凝固線溶系の濃度が日内変動を示すことが明らかになっているが、その意義については、詳細不明である。

活動期に止血能力を高め、休息期に血栓を溶解せしめることが個体の生命維持に重要であるかもしれない....

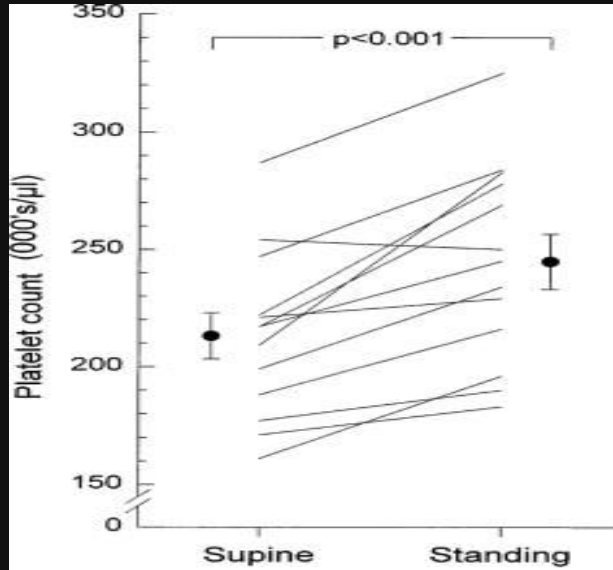
1. 血小板の日内変動

血小板を活性化する因子として
カテコールアミン類、トロンビン、コラーゲン、.....

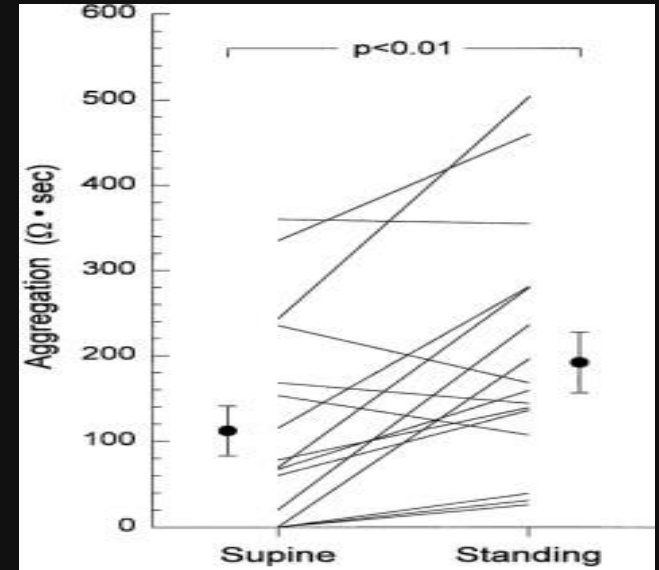
Mechanisms Underlying the Morning Increase in Platelet Aggregation: A Flow Cytometry Study

Andrews NP: JACC, 1996, 1789 – 1795.

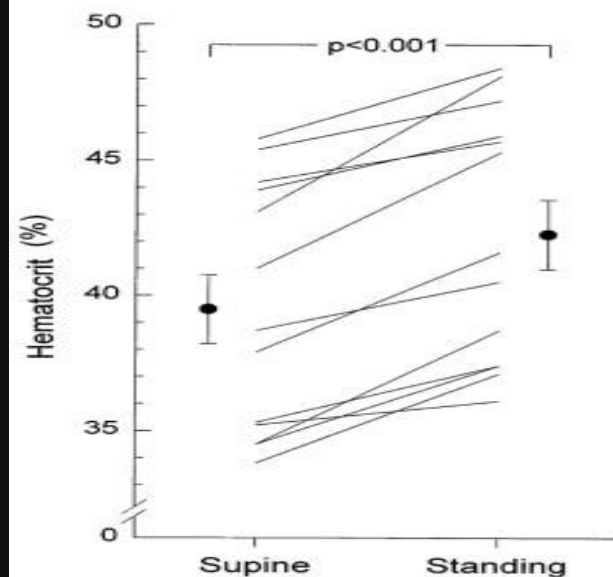
Platelet



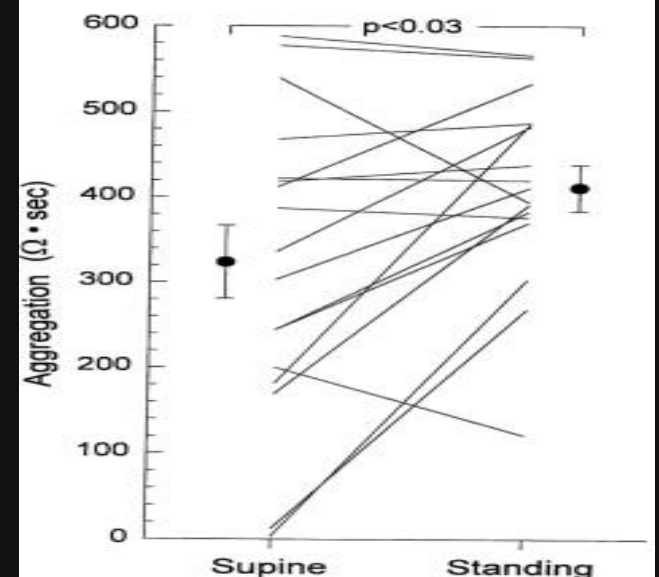
ADP



Hematocrit



Collagen



Mechanisms Underlying the Morning Increase in Platelet Aggregation: A Flow Cytometry Study

Andrews NP: JACC, 1996, 1789 – 1795.

Table 1. Catecholamines and Fibrinolytic and Procoagulant Factors

	Supine (mean \pm SEM)	Standing (mean \pm SEM)	p Value
Catecholamines			
Epinephrine (pg/ml)	14 \pm 2	33 \pm 6	< 0.01
Norepinephrine (pg/ml)	177 \pm 17	512 \pm 50	< 0.001
Fibrinolytic factors			
PAI-1 antigen (ng/ml)	11.4 \pm 3.4	13.8 \pm 4.8	0.03
t-PA antigen (ng/ml)	6.0 \pm 0.9	7.7 \pm 1.1	< 0.01
Procoagulant factors			
Fibrinogen (mg/dl)	203 \pm 14	241 \pm 30	< 0.03
Fibrinogen (whole blood)*	117 \pm 7	133 \pm 16	0.02
PT fragment 1.2 (nmol/liter)	0.69 \pm 0.11	0.86 \pm 0.12	0.01

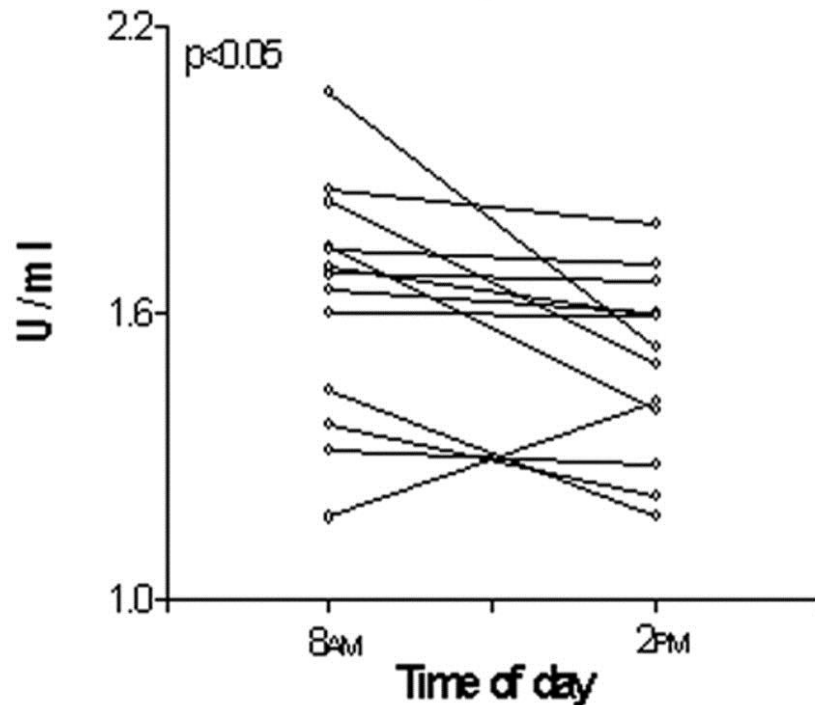
*Calculated whole-blood concentration. PAI = plasminogen activator inhibitor; PT = prothrombin; t-PA = tissue-type plasminogen activator.

2. 血液凝固因子の日内リズム

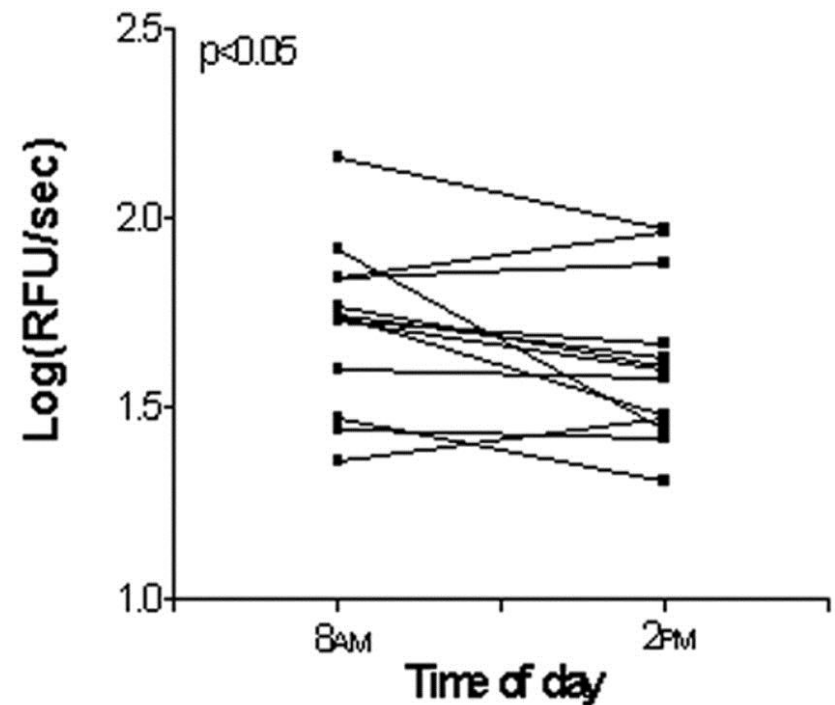
動脈、静脈における血栓形成において、
いずれにおいてもフィブリノーゲン、
トロンビン生成、第Ⅶ因子など
午前中に亢進する。

健常人の午前中における第Ⅶ因子は 午後に比し高い値を示す

A - TFPI activity

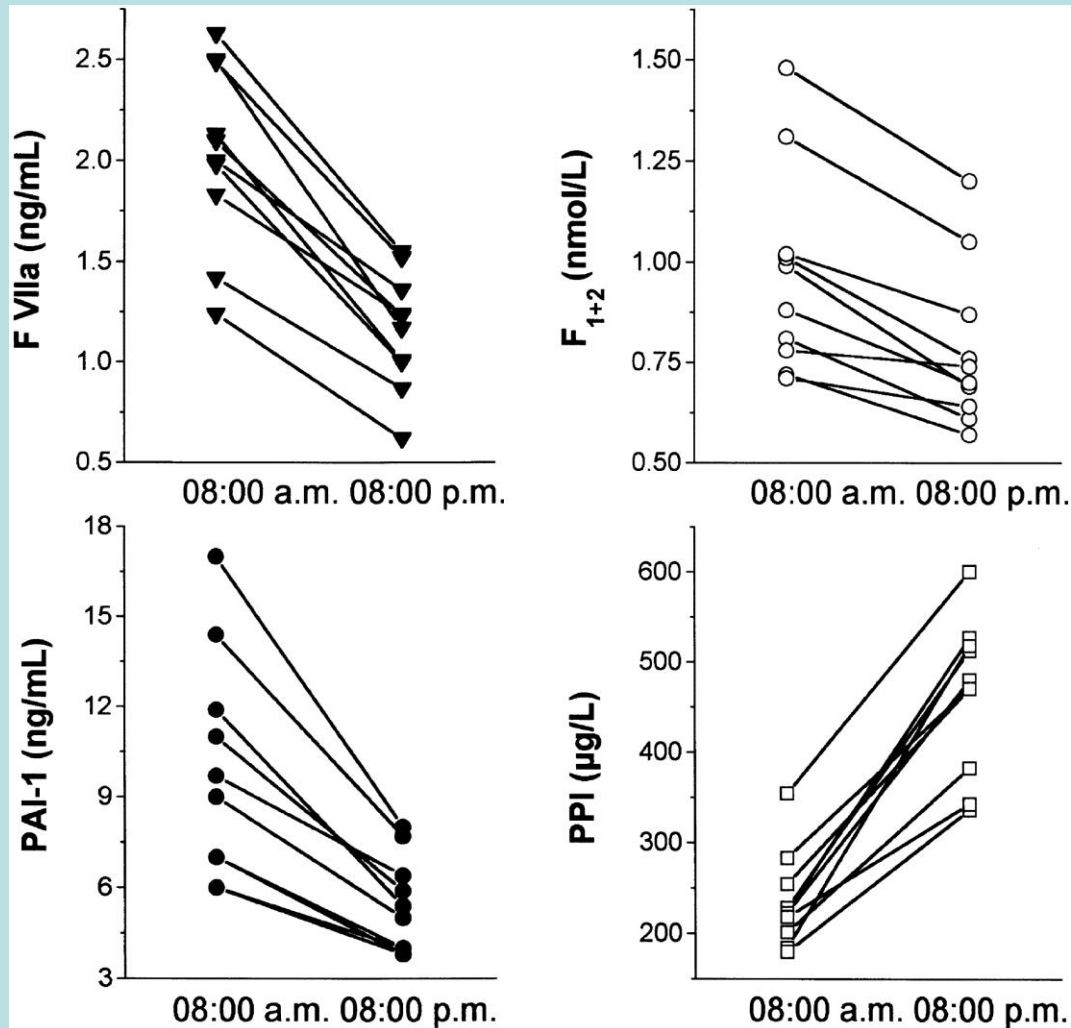


B - FVII activity



Individual variations of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI; A) and Factor VII (B) activity in healthy humans.

健常人におけるトロンビン生成量は午前が高値



Morning hypercoagulability and hypofibrinolysis. Diurnal variations in circulating activated factor VII, prothrombin fragment F1+2, and plasmin-plasmin inhibitor complex.

Kapiotis S et al. *Circulation*. 1997;96:19-21

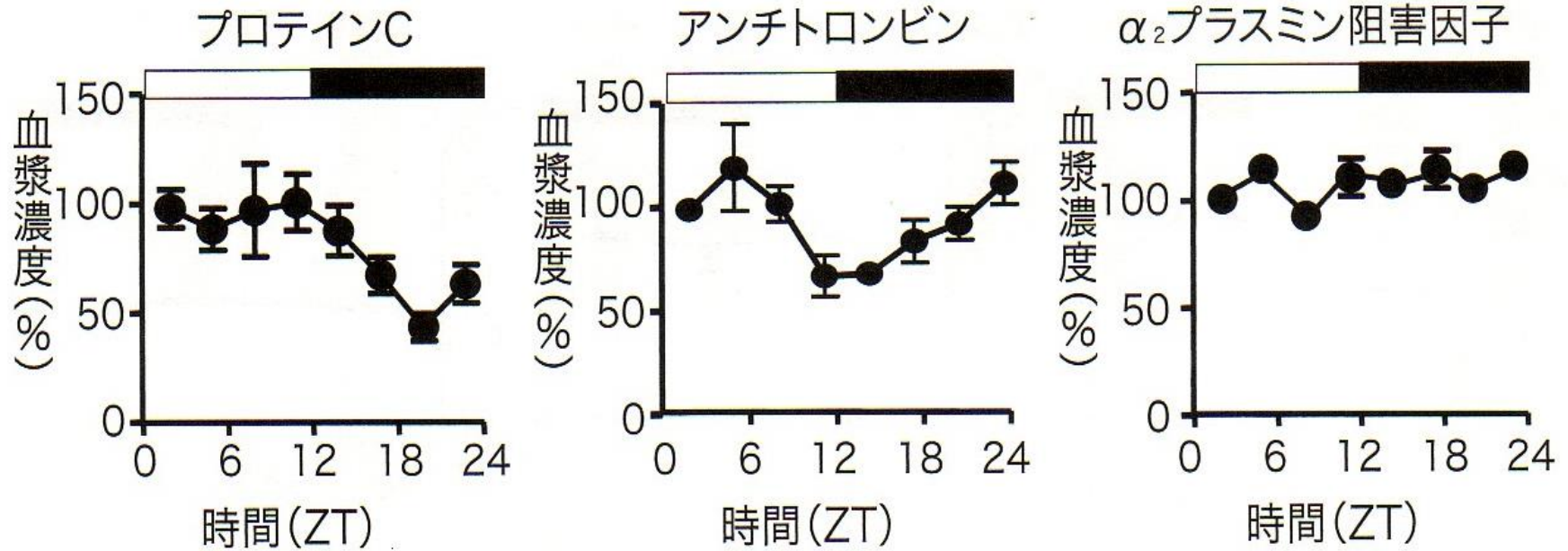
3. 血液凝固制御因子

**Circadian Variations in Natural Coagulation Inhibitors
Protein C, Protein S and Antithrombin in Healthy Men:
A Possible Association with Interleukin-6.**

Ündar L : Thromb Haemost.1999, 81(4):571-5

ヒトにおいては、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビン、
外因系凝固インヒビター(TFPI)、などは日内変動を示す。

マウス血漿中のプロテインCとアンチトロンビンは日内変動を示す

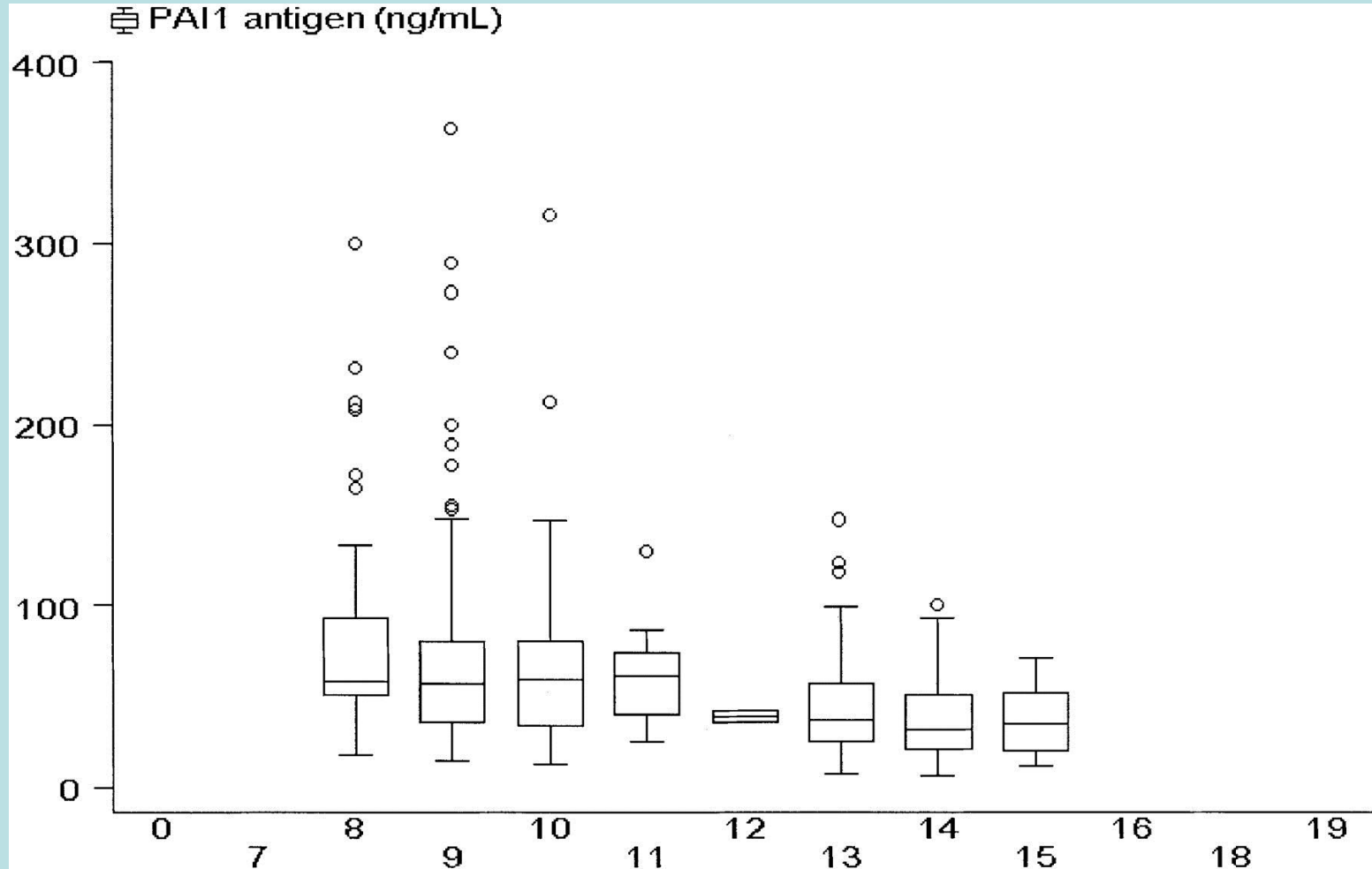


Ohkura N et al. Chronobiol Int 24: 651-69 (2007)

4. 血液線溶系因子

1. 線溶系因子のうち、PAI-1の日内リズムが大きく明確である。
2. PAI-1は種々の疾患により遺伝子転写レベルで産生が影響を受ける。

PAI-1 antigen concentrations according to the time of day



van der Bom J G et al. Blood 2003;101:1841-1844

The 4G5G polymorphism in the gene for PAI-1 and the circadian oscillation of plasma PAI-1.

van der Bom JG. Blood.2003 Mar 1;101(5)

ヒトPAI-1遺伝子の発現量を規定する転写調節領域には**4G/5G遺伝子多型**が存在する。

疫学的には**4G/4G型の対立遺伝子**で血中PAI-1が高く、**血栓症のリスクが高い**。

PAI-1の日周発現を調節しているE-boxと**4G/5G多型領域**は重複しており、時計分子によるPAI-1発現の日内変動の制御に、この多型が影響している。

The 4G5G polymorphism in the gene for PAI-1 and the circadian oscillation of plasma PAI-1.

van der Bom JG: Blood. 2003;101(5):1841-4.

Table 2. Plasma concentration of PAI-1 antigen in samples collected before and after noon for the different genotypes

	4G4G	4G5G	5G5G
Subjects visiting before noon, n	57	57	32
PAI-1 (95% CI) ng/mL	79 (68-92)	62 (54-72)	59 (49-71)
Subjects visiting after noon, n	33	61	23
PAI-1 (95% CI) ng/mL	40 (33-49)	41 (37-47)	40 (32-51)

Values (adjusted for age and sex) are numbers or means (95% confidence intervals) calculated on log-transformed data, back-transformed into the original scale.

4G4G indicates homozygous for the 4G allele; 4G5G, heterozygous; and 5G5G, homozygous for the 5G allele.

Genetic polymorphisms and thrombotic disorders in the Japanese population.

Murata M. Fibrinolysis and Proteolysis.; 14. 155-164, 2000.s

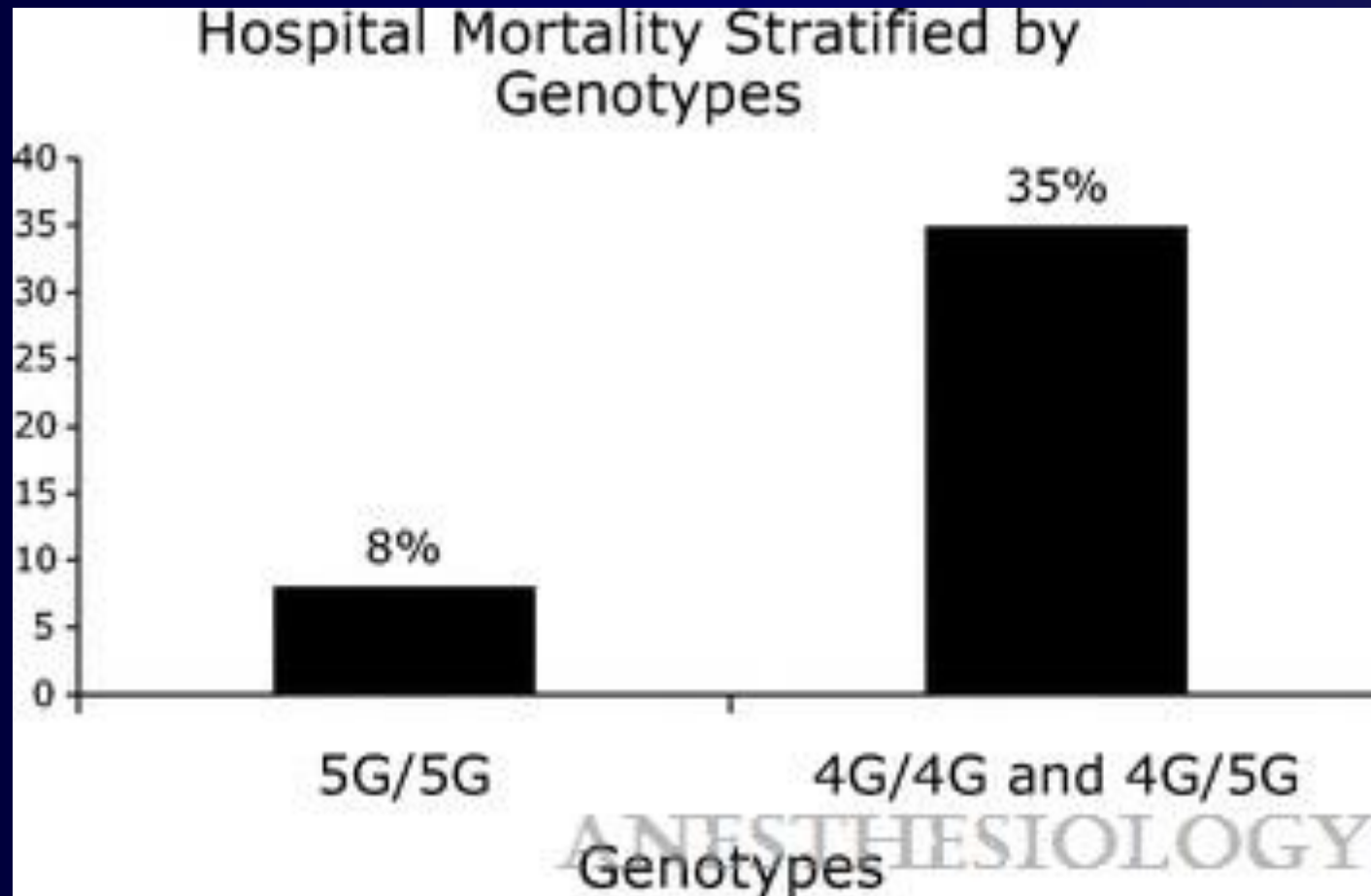
表5A PAI-1 タイピング結果

	n	PAI-1 Genotype			allele frequency		P value
		4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G	
CVD	228	93(40.3%)	111(48.7%)	24(10.5%)	0.65	0.35	0.9178
A	49	20(40.8%)	24(49.0%)	5(10.2%)	0.65	0.35	0.9704
L	122	56(45.9%)	55(45.1%)	11(9.0%)	0.68	0.32	0.8117
T	23	5(21.7%)	15(65.2%)	3(13.1%)	0.54	0.46	0.1461
NIDDM	290	108(37.2%)	145(50.0%)	37(12.8%)	0.62	0.38	0.3537
ASO/TAO	98	29(29.6%)	54(55.1%)	15(15.3%)	0.57	0.43	0.0575
AAA	36	14(38.9%)	16(44.4%)	6(16.7%)	0.61	0.39	0.5033
ASO	42	11(26.2%)	26(61.9%)	5(11.9%)	0.57	0.43	0.1255
TAO	9	1(11.1%)	6(66.7%)	2(22.2%)	0.44	0.56	0.1380
Control	284	121(42.6%)	134(47.2%)	29(10.2%)	0.66	0.34	

CVD : 脳血管障害, A : アテローム血栓性脳梗塞, L : ラクナ梗塞, T : TIA (一過性脳虚血発作), NIDDM : 2型糖尿病, AAA : 腹部大動脈瘤, ASO : 閉塞性動脈硬化症, TAO : 閉塞性血栓血管炎

4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with mortality in intensive care unit patients with severe pneumonia.

Sapru A: *Anesthesiology*. 2009; 110(5):1086-91.



The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications.

Glueck CJ: Metabolism. 2000 Jul;49(7):845-52.

**4G/4G保有妊婦は重篤な妊娠中毒症に罹患する
ケースが多い**

The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia.

Yamada N: J Hum Genet. 2000;45(3):138-41.

4G/5G遺伝子多型性は重篤な妊娠子癇と関連する

Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography.

Ossei-Gernig N: Arterioscler Thromb Vasc Biol.1997 ;17(1):33-7.

Table 4.

Relationship Between Genotype and MI in Patients With Single-Vessel or Multivessel Disease

Genotype	No MI	MI
4G/4G	36 (24%)	59 (35%)
4G/5G	65 (43%)	73 (48%)
5G/5G	49 (33%)	26 (17%)

- Number of patients with percentage frequencies is in parentheses.

$$\chi^2=11.1, df=2, P=.004.$$

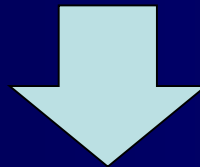
生活習慣病と血栓

生活習慣病(糖尿病、肥満、高血圧、高脂血症....)



易血栓性

インシュリン、グルココルチコイド、VLDL、グルコース、
中性脂肪、TNF- α 、TGF- β などの炎症性サイトカイン



PAI-1の増加

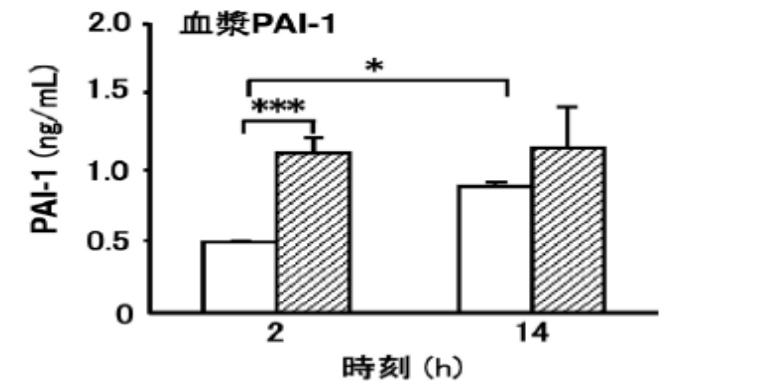
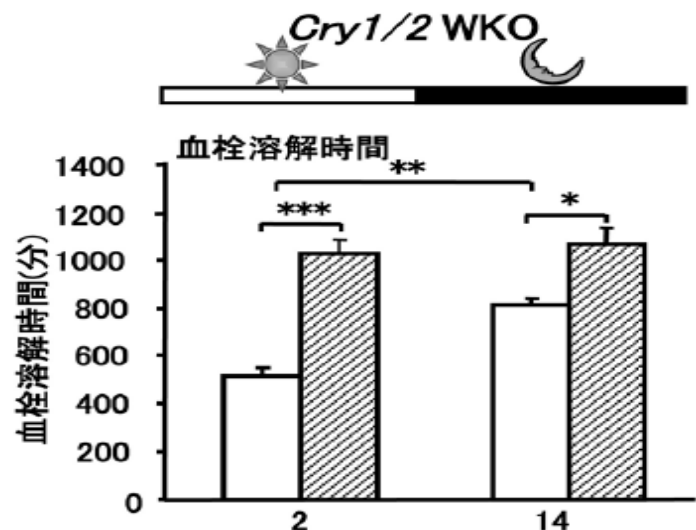
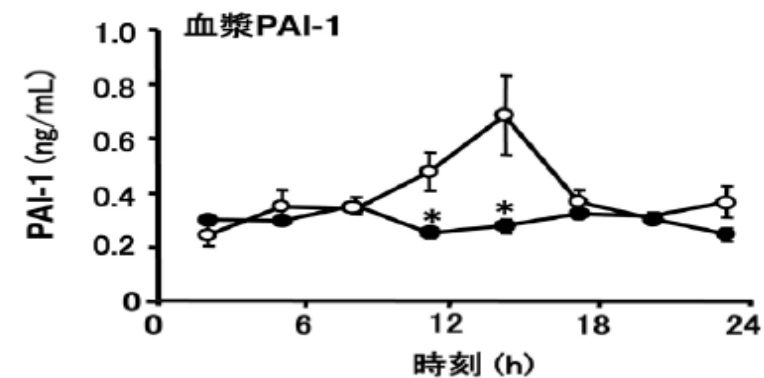
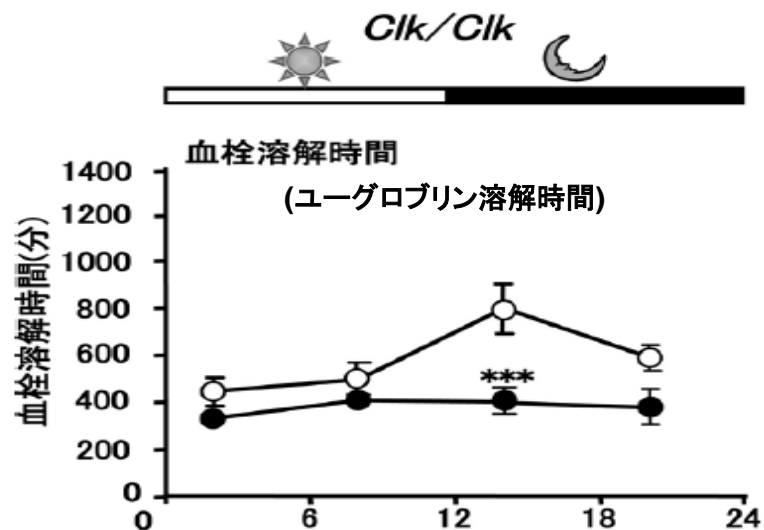
4G/5G遺伝子多型と抗血栓症や
冠動脈疾患発症とは相関する。

Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1阻害薬

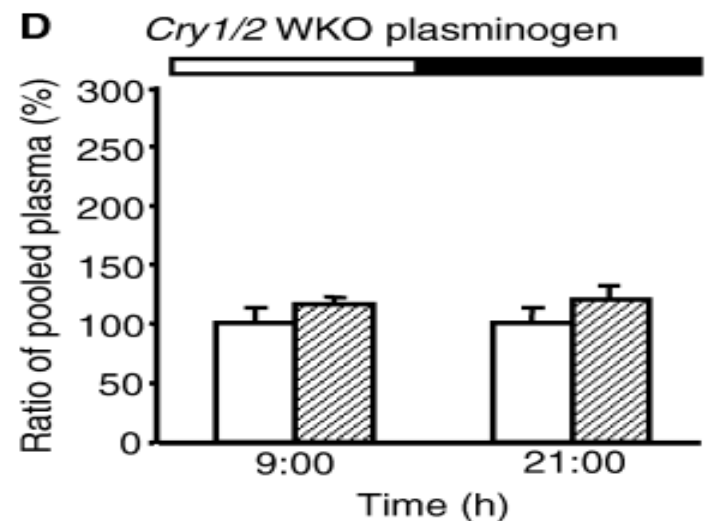
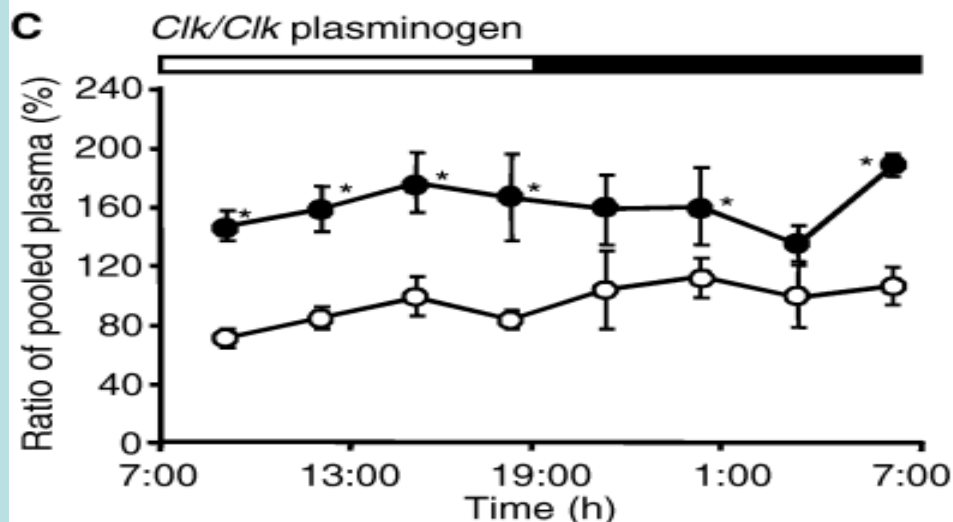
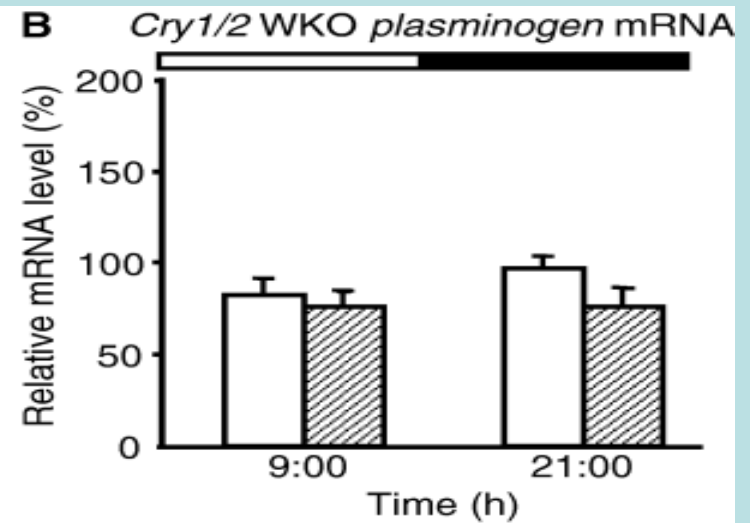
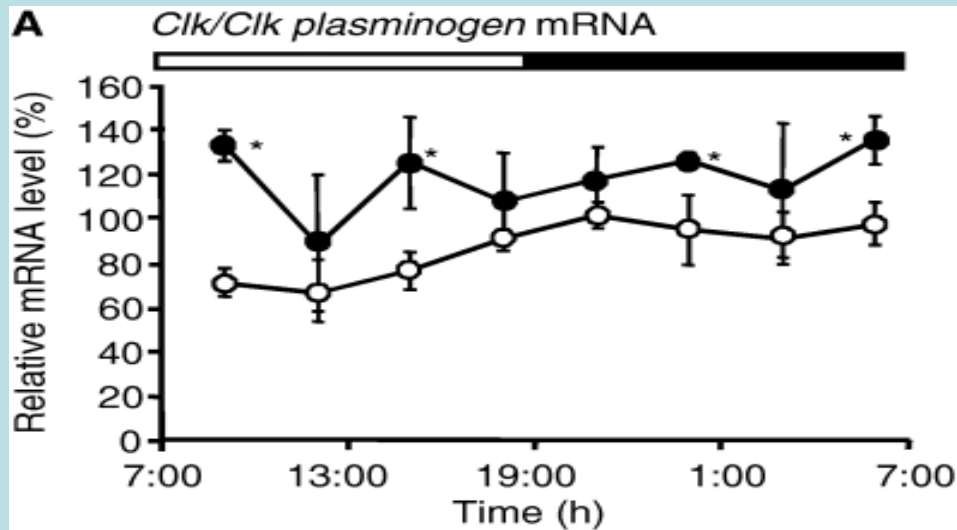
日本人における4G/5Gの割合

	4G/4G	4G/5G	5G/5G
割合(%)	40	50	10
PAI-1(ng/ml)	87	62	42

線溶活性の日内リズムと血中PAI-1濃度



Circadian clock molecules CLOCK and CRYs modulate fibrinolytic activity by regulating the *PAI - 1* gene expression



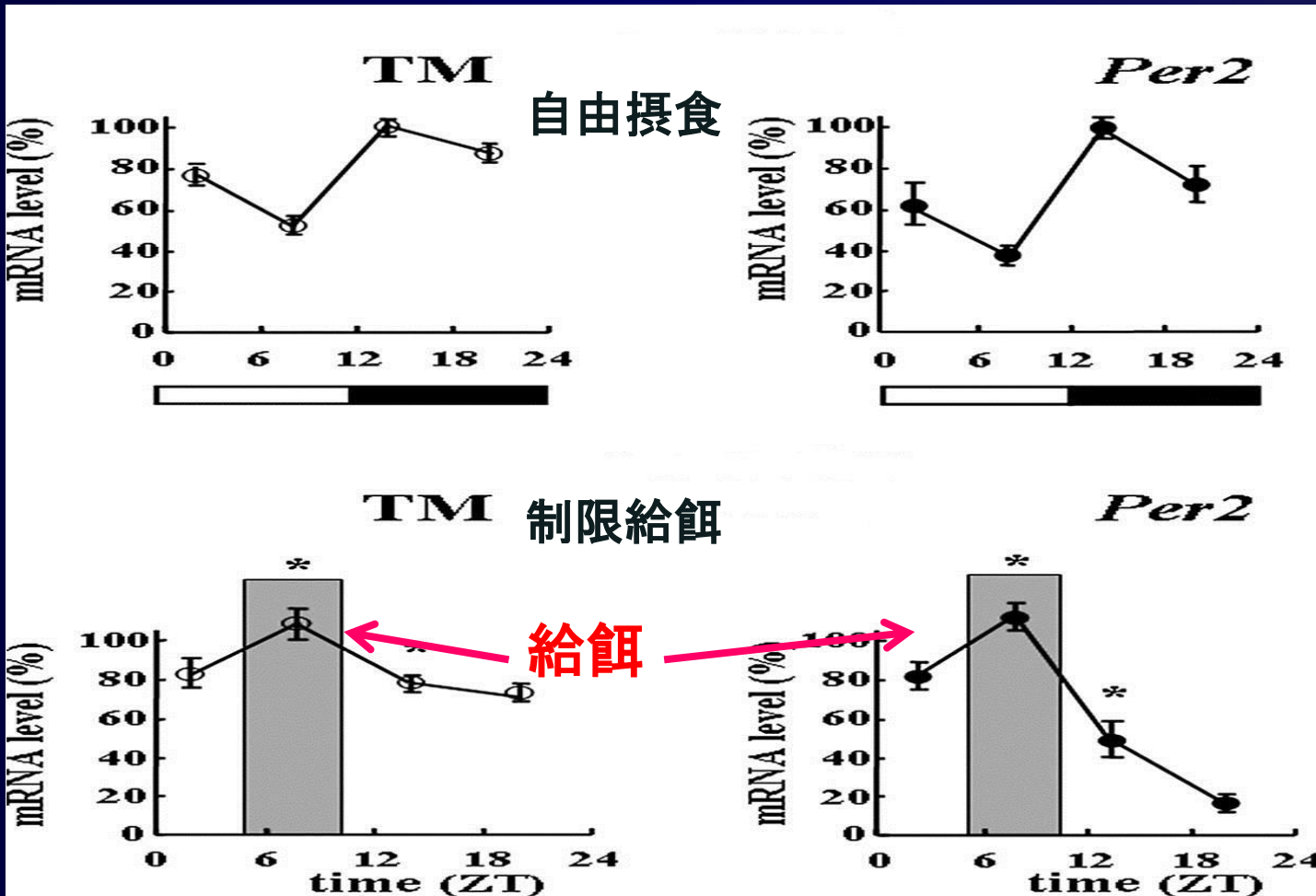
マウスにおける血液凝固系

1. マウスにおける凝固因子について、大きな日内リズムは確認されていない。
2. 時計遺伝子変異マウスでも野生型マウスと血中濃度やmRNAで大きな差は認められていない

時計遺伝子は凝固系へ関連する因子には大きな影響を与えない

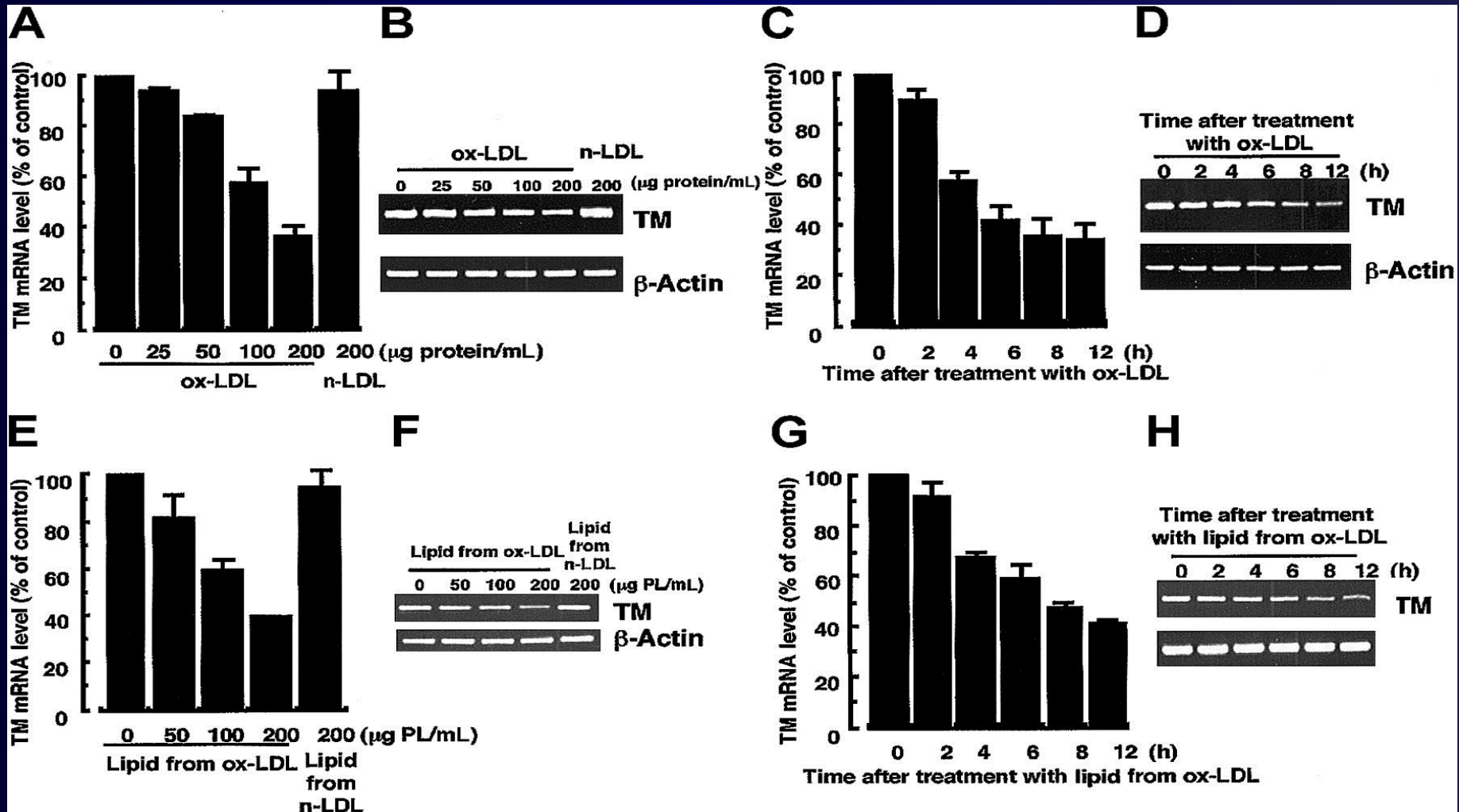
Thrombomodulin mRNA発現の概日リズム 給餌制限により時間的位相を生じる

mRNA発現量

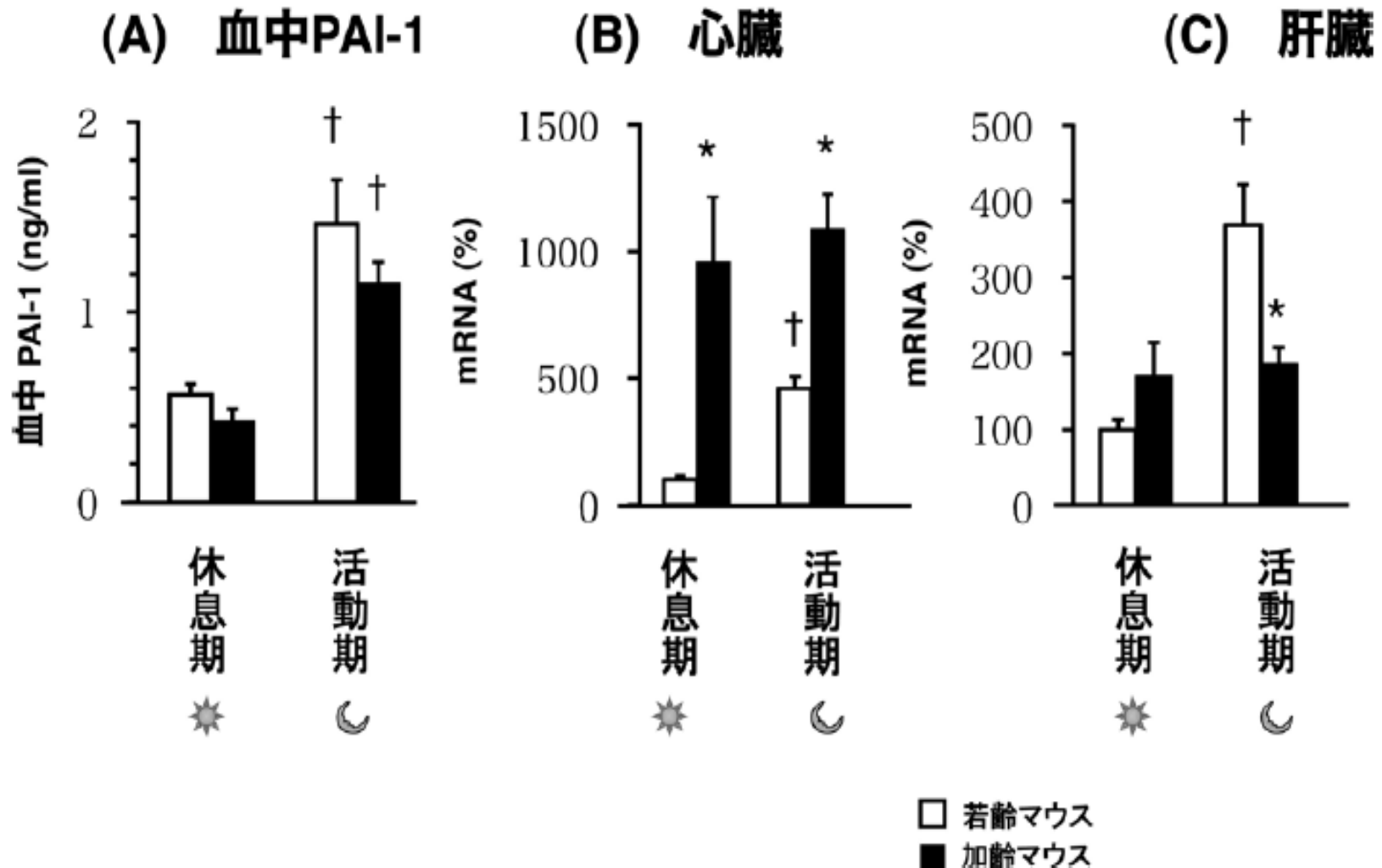


(マウス肺)

酸化LDLは臍帯静脈内皮細胞におけるTM発現を抑制する

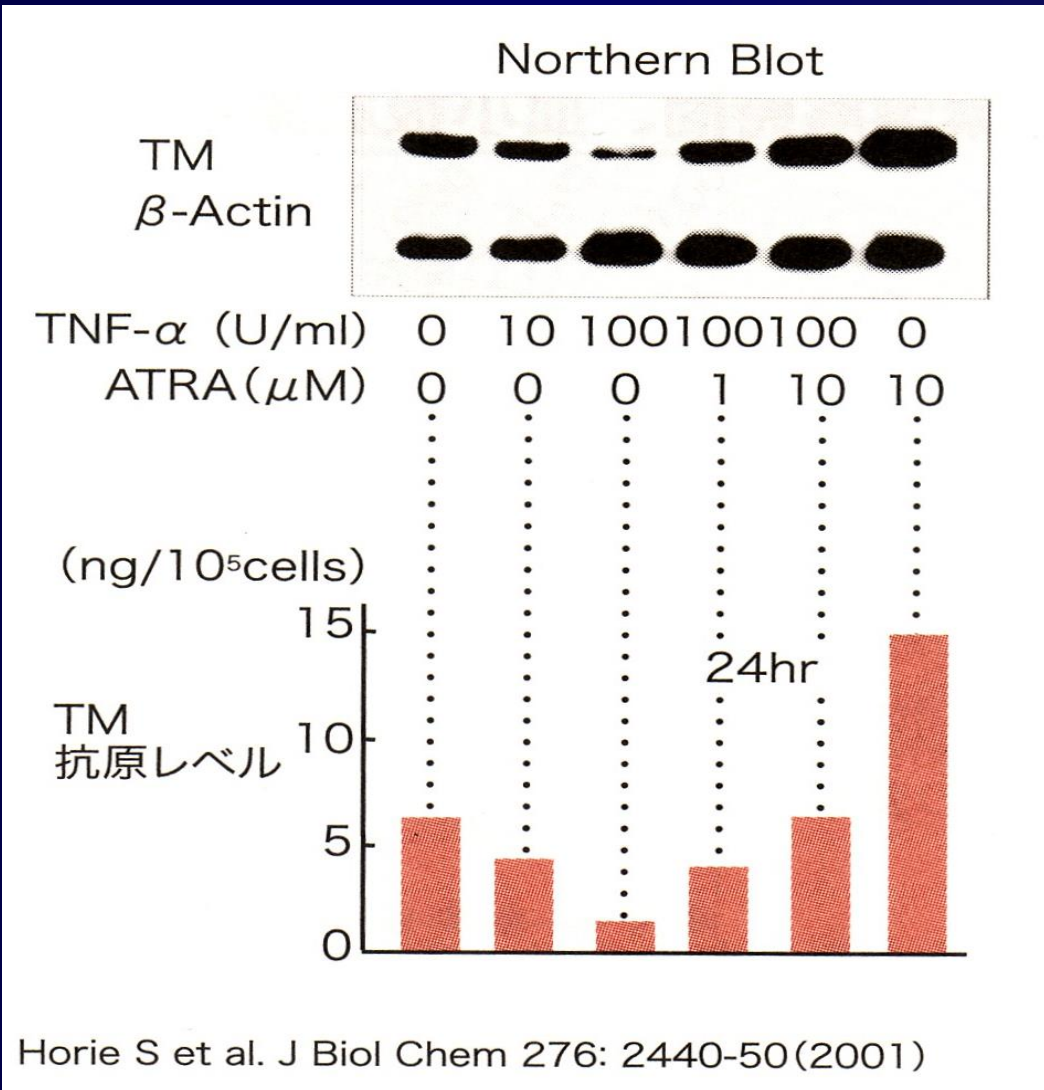


PAI-1の加齢に伴う発現変化



TM発現を増加させるには

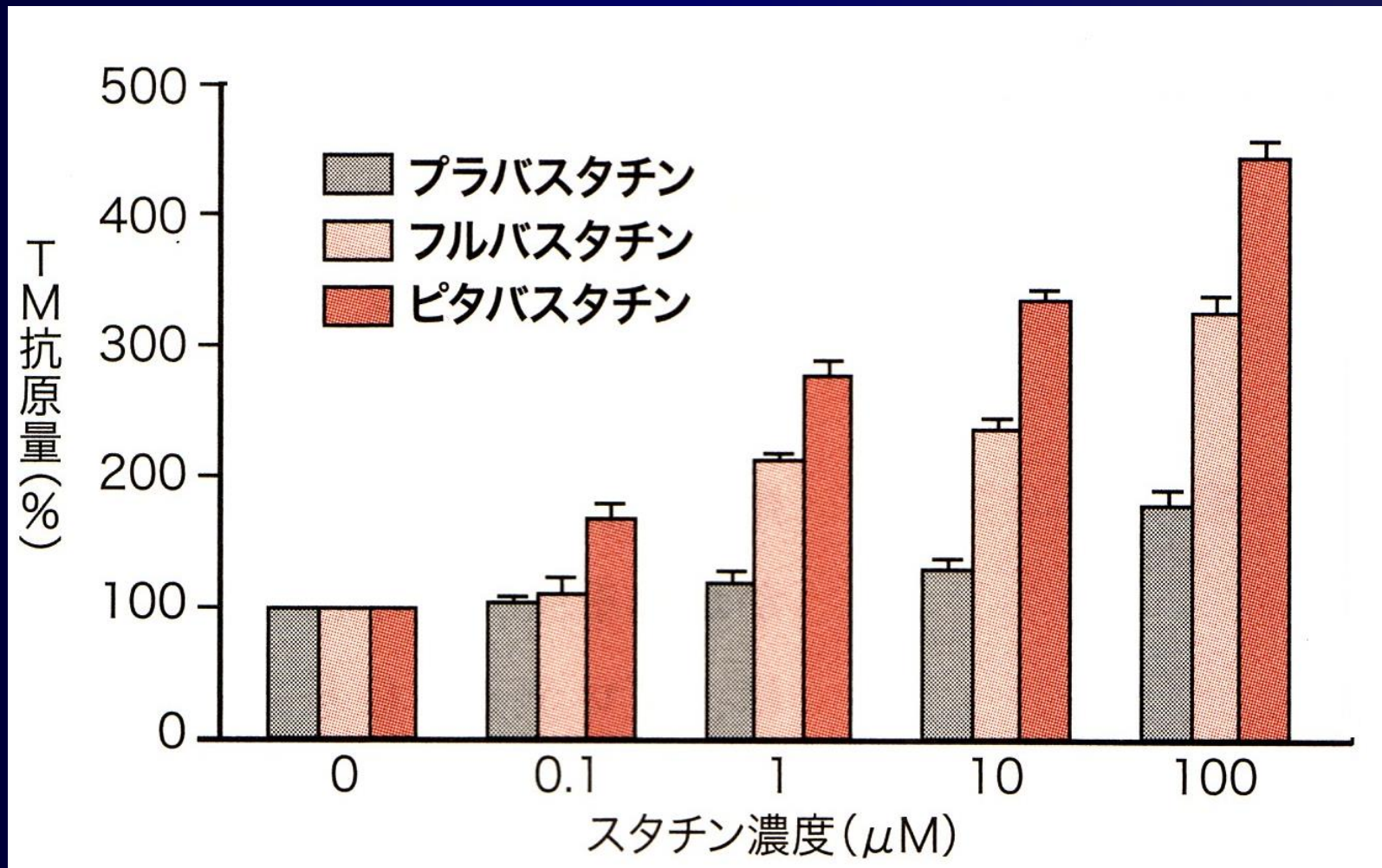
TM抗原
発現
レベル



ATRA: 全トランスレチノイン酸(ビタミンAやβカロテンの代謝産物)

出典(時間栄養学:香川靖雄)

スタチンは血管内皮細胞表面に トロンボモジュリンを増加させる



血管内皮細胞において炎症反応のトリガーとなる遺伝子発現を制御する。

PAI-1の抑制 とトロンボモジュリン発現の増加

Direct Evidence for **Pitavastatin** Induced Chromatin Structure Change in the KLF4 Gene in Endothelial Cells

T Maejima. *PLoS One*. 2014 May 05;9(5).

東京大学先端研 システム生物医学ラボラトリーゲノムサイエンス部門、児玉達彦、大阪大学、木村宏、シンガポールゲノム研究所、コネチカット州立大学ジャクソンラボラトリー、自治医科大学、興梠貴英、総合研究大学院大学、田辺秀之、東京農工大学、遠藤章

内皮細胞に対する影響をトランスクリプトーム解析した結果から、

- 1) eNOS などの血管弛緩を誘導する遺伝子の誘導
- 2) ET-1 などの血管収縮遺伝子の抑制
- 3) **トロンボモジュリン**など抗凝固活性を有する遺伝子の誘導
- 4) IL-8、MCP-1 などの炎症性因子、**PAI-1** などの**血栓形成促進遺伝子の発現抑制**

スタチンは血管内皮細胞表面に
発現するTMの低下を防止する

しかし、

SPARCL試験(アトルバスタチン)
出血性脳卒中既往例では
再発率が5倍以上

SPARCL: Prespecified and Post-Hoc Analyses



Prespecified Analysis	Atorvastatin (n=2365) n (%)	Placebo (n=2366) n (%)	HR (95% CI)	P-value
Primary Endpoint	265 (11.2)	311 (13.1)	0.84 (0.71, 0.99)	.03
Fatal Stroke	24 (1.0)	41 (1.7)	0.57 (0.35, 0.95)	.03
Non-fatal Stroke	247 (10.4)	280 (11.8)	0.57 (0.73, 1.03)	.11
Post-Hoc Analysis				
Ischemic	218 (9.2)	274 (11.6)	0.78 (0.66, 0.94)	.01
Hemorrhagic	55 (2.3)	33 (1.4)	1.66 (1.08, 2.55)	.02

*Treatment effect from Cox proportional hazards models with pre-specified adjustment for geographical region, entry event, time since entry event, gender, and baseline age.

HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

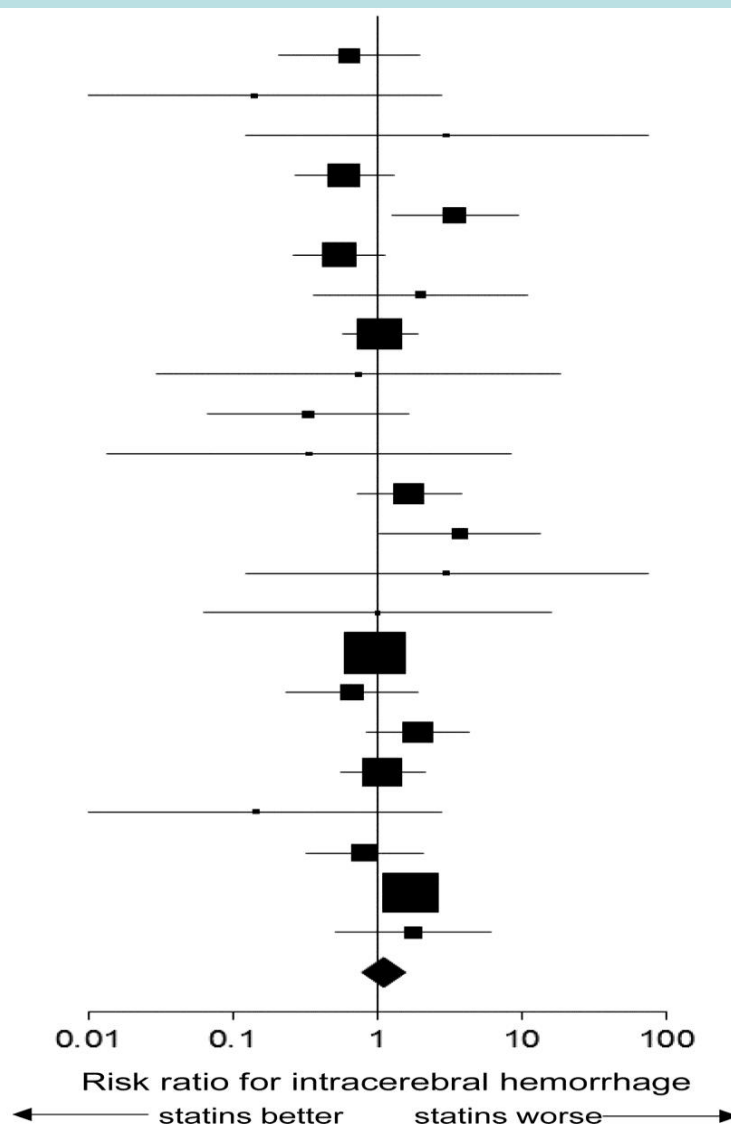
The SPARCL Investigators: *N Engl J Med*. 2006;355:549-559.

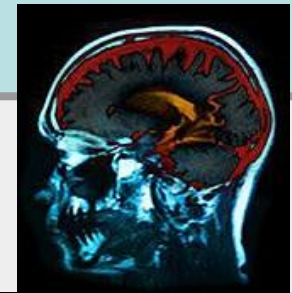
トロンボモジュリン発現
時間が**薬剤に依存し、**
出血傾向になる可能性
がある

Meta-analysis of randomized trials of statins and intracerebral hemorrhage.

Hackam D G et al. *Circulation*. 2011;124:2233-2242

Trial	RR (95% CI)	Weight
4D	0.64 (0.21 to 1.96)	3.9
ACAPS	0.14 (0.01 to 2.75)	0.7
AFCAPS	3.00 (0.12 to 3.62)	0.6
ALERT	0.59 (0.27 to 1.28)	6.5
ALLHAT	3.42 (1.26 to 9.27)	4.7
ASCOT	0.55 (0.26 to 1.14)	7.0
ASPEN	1.98 (0.36 to 10.9)	1.9
AURORA	1.04 (0.57 to 1.91)	8.8
Bone et al	0.74 (0.03 to 18.3)	0.6
CARE	0.33 (0.07 to 1.65)	2.2
CLAPT	0.34 (0.01 to 8.34)	0.6
CORONA	1.66 (0.72 to 3.80)	6.1
GISSI-HF	3.69 (1.03 to 13.2)	3.2
GISSI-P	2.99 (0.12 to 73.6)	0.6
GREACE	1.00 (0.06 to 16.0)	0.8
HPS	0.96 (0.65 to 1.41)	12.5
JUPITER	0.67 (0.24 to 1.87)	4.4
LIPID	1.89 (0.84 to 4.24)	6.2
MEGA	1.09 (0.56 to 2.11)	7.9
MIRACL	0.14 (0.01 to 2.78)	0.7
PROSPER	0.81 (0.32 to 2.04)	5.2
SPARCL	1.68 (1.09 to 2.60)	11.6
SSSS	1.75 (0.51 to 6.00)	3.4
Overall	1.10 (0.86 to 1.42)	100





From: **Statin Use Following Intracerebral Hemorrhage: A Decision Analysis**

Greenberg S:

Arch Neurol. 2011;68(5):573-579. doi:10.1001/archneurol.2010.356

Table 3. Results of Base-Case Decision Analysis

Prior ICH Location and Setting	Quality-Adjusted Life-Years	
	No Statin Therapy	Statin Therapy ^a
Lobar ICH		
Primary prevention	6.8	4.6
Prior myocardial infarction	6.2	4.4
Prior ischemic stroke	6.0	4.2
Deep ICH		
Primary prevention	13.0	12.2
Prior myocardial infarction	11.2	11.0
Prior ischemic stroke	10.6	10.3

^aAssuming a relative risk of 1.68 for intracerebral hemorrhage (ICH).

まとめ

1. 凝固線溶系は日内変動を示し、PAI-1、TMは午前中に活性が高い。
2. 健康ならば、午前中の血液凝固のバランスが均衡しているが、糖尿病、動脈硬化などによりPAI-1の増加、TM発現が低下する。
3. PAI-1には4G/5G遺伝子多型性があり、血栓症との関連がある。
4. TM発現は偏食生活により、午前より夜に位相シフトする。
5. TMの低下は、食物由来のVitA、 β カロテンなどで予防しうる。
6. 薬剤投与によるTMの是正は、薬剤依存状態になり易く、夜間に出血傾向となる可能性もある。