



【日本血栓止血学会サイト お役立ちリンク集】

日本血栓止血学会サイトに掲載しているおすすめコンテンツのリンクをご紹介します。

- ・ [診療ガイドライン](#)
- ・ [研修医のお役立ち論文コンテンツ](#)
- ・ [用語集](#)

本編は次ページより掲載しております。

グリコカリクスが関与する血管内腔の抗血栓性とその障害

射場敏明*



射場敏明

Glycocalyx regulates the intravascular hemostasis

Toshiaki IBA

要約: 近年、血管内皮上に存在するグリコカリクス (glycocalyx) の役割が注目されている。プロテオグリカン (proteoglycan) やグリコプロテイン (glycoprotein)、糖鎖などからなるこの構造は、血管内腔の血液凝固を抑制しているだけでなく、血小板や好中球の血管内腔への接着を制御したり、血管透過性を調節したり、ずり応力などの力学的刺激を感知するなど、多彩な機能を担っていることが明らかにされてきた。極めて繊細かつ脆弱なグリコカリクスの研究は、技術的課題もあってこれまで十分な進展がみられなかった。しかし最近になって検査手法の進歩にともない、ようやく新しい展開がみられるようになってきた。そしてグリコカリクスは敗血症や虚血再灌流障害といった急性疾患のみならず、糖尿病や動脈硬化などの慢性疾患においても、病態形成においても重要な役割を演じていることが明らかにされた。本稿ではグリコカリクスの構造や機能、疾病との関連などについて最近の知見を紹介する。

1984 (S59) 年3月 順天堂大学医学部卒業
1987 (S62) 年4月 順天堂大学医学部外科学第二講座 助手
1989 (H元年) 6月 千葉大学医学部救急部集中治療部 専攻生
1989 (H元年) 9月 エール大学血管外科 客員研究員
1997 (H9) 年11月 順天堂大学医学部外科学第二講座 講師
2006 (H18) 年11月 順天堂大学医学部救急災害医学研究室 助教授
2007 (H19) 年12月 順天堂大学医学部救急災害医学研究室 教授

Key words: glycocalyx, syndecan, glycosaminoglycan, heparin sulfate, antithrombin

1. グリコカリクスの構造と機能

血管内皮細胞の表面にはグリコカリクス (glycocalyx) とよばれる構造体が存在しており、血栓形成や炎症反応を調節している¹⁾。グリコカリクスはプロテオグリカン (proteoglycan) やグリコプロテイン (glycoprotein) などの膜結合部分 (コアタンパク) に糖鎖と血漿タンパクが結合する構造や、直接細胞膜には結合しないヒアルロン酸 (hyaluronan) などの糖鎖構造で構成されている²⁾ (図1)。電子顕微鏡による観察では、内皮細胞に密生したヒゲのようにみえるグリコカリクスは、極めて脆弱な構造体であり、内皮

細胞で合成された後に細胞表面に発現し、やがて血中に剝離するという新陳代謝を繰り返している。グリコカリクスは内皮細胞表面以外にも、隣接する内皮細胞との間隙や基底膜側にも存在しているが、このうち内皮細胞間隙は内皮細胞裂 (endothelial cleft, ETC) と呼ばれ、後述するようにこの部位におけるグリコカリクスの存在が物質の透過性制御に重要な役割を担っている³⁾。

a. プロテオグリカン

プロテオグリカンにはシンデカン (syndecan) やグリピカン (glypican)、ビグリカン (biglycan) などの種類があり、代表的なプロテオグリカンであるシンデカンは膜貫通型のコアプロテインと、その細胞外ドメインに結合するグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAGs) と称される糖鎖構造で構成されている。GAGs の代表はヘパラン硫酸 (heparin sulfate) とコンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate) で、前者

*責任者連絡先:
順天堂大学救急・災害医学
〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1
Tel: 03-3813-3111, Fax: 03-3814-5421
E-mail: toshiiba@juntendo.ac.jp

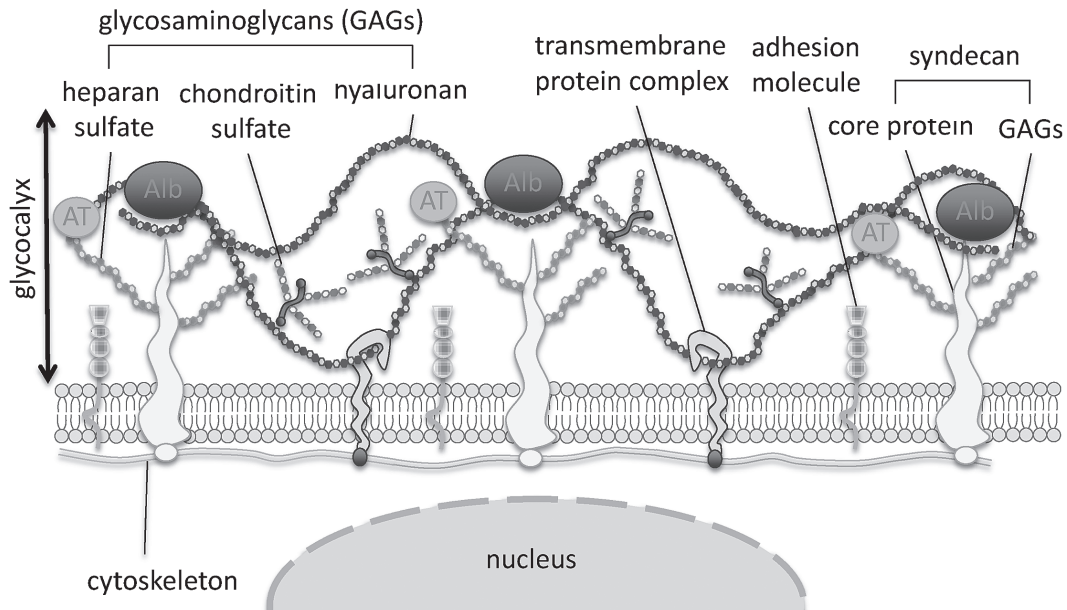


図1 血管内皮細胞状のグリコカリクス

血管内皮細胞上にはグリコカリクスと総称される構造が存在している。グリコカリクスを構成しているのは細胞膜に固定したプロテオグリカンと接着分子などのグリコプロテイン、それに細胞膜と直接結合していないヒアルロン酸である。このうちプロテオグリカンの代表であるシンデカン⁴は、膜を貫通するコアプロテインとこれに結合したヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸など、グリコサミノグリカンと称される糖鎖構造で構成されている。そしてヘパラン硫酸にはアンチトロンビンや成長因子、さらにサイトカイン類などが結合し、それぞれの結合刺激がコアプロテインの細胞質ドメインを介して、内皮細胞に情報伝達されることが知られている。

AT: antithrombin, Alb: albumin

が50–90%を占めている。そしてヘパラン硫酸にはアンチトロンビンや活性化プロテインC、tissue factor pathway inhibitor (TFPI)などの凝固制御因子が結合することが知られており、血管内腔の抗凝固活性維持に貢献していると考えられる⁴⁾。さらに興味深いことに、グリコカリクスはわずり応力や機械的進展などの物理的刺激の受容体(メカノセンサー)としても機能し、ストレスファイバーの形成やコラーゲンやフィブロネクチンといった細胞外基質への細胞接着を調節している。また物理的刺激は、血管内皮からのnitric oxide (NO)を放出させて血管抵抗を調節していることも報告されている³⁾。糖鎖構造のうちヘパラン硫酸は、transforming growth factor- β (TGF- β)やvascular endothelial growth factor (VEGF)など、各種の成長因子のリガンドとしても機能しており、血管の再生のみにとどまらず、細胞分化や組織の形態形成に機能していることが報告されている⁵⁾。

シンデカンには1–4まで、4つのサブタイプが存在することが知られており、膜貫通構造のうち細

胞外ドメインではそれぞれのシンデカンに3–9のヘパラン硫酸、あるいはコンドロイチン硫酸が結合している。そして細胞質ドメインは、リン酸化やプロテインキナーゼCとの結合や活性化を介して、種々の刺激を細胞内に情報伝達していることが明らかにされてきた。すなわちシンデカンはサイトカイン受容体としても機能しており、ヘパラン硫酸に結合したサイトカインはシンデカン⁴を介して内皮細胞機能の調節を行っている。Ishiguroらは⁶⁾、シンデカン-4ノックアウトマウスは野生型マウスに比べてエンドトキシンショックに陥りやすく、死亡率も高いことを見だし、その理由としてノックアウトマウスではシンデカン-4の欠損により、野生型でみられるシンデカン-4とTGF- β の結合による炎症制御機能が低下していることを挙げている。すなわちTGF- β は敗血症の際にみられるIL-1 β やTNF α といった炎症性サイトカインの過剰産生を抑制しているが、シンデカン-4の減少もしくは欠落によりTGF- β による、このような抑制が働かなくなるとい

うものである。

b. ヒアルロン酸

GAGsに絡みつくように存在するコアプロテイン非結合型高分子ポリマーであるヒアルロン酸は、保水性に富みアルブミンやフィブリノゲンなどの血漿タンパクの保持に寄与していると考えられている。血漿中のアルブミンの保持のメカニズムについては、ETCに存在する陰性荷電を帯びたヒアルロン酸結合アルブミンが、同じ荷電状態の血漿中のアルブミンと反発することや、GAGsを構成する硫酸基が同じく陰性帯電しているため、アルブミンと反発してETCを通過できないことなどが考えられている。しかし内皮細胞障害に伴ってGAGsが剥離すれば、物理的な間隙の拡大とともに電気的な抵抗もなくなって、アルブミンは容易に血管外に透過していくことが想定される。このメカニズムについては糸球体血管内皮細胞を用いた実験で研究されている。それによると糸球体血管内皮細胞は直径50–100 nmの有窓構造を有し、表面は陰性荷電をもつGAGsで覆われ、尿中にアルブミンが逸脱しにくい構造を有しているとのことである。しかし糖尿病や急性腎障害(acute kidney injury, AKI)では、高血糖や酸化ストレスによってGAGsが減少し、それに伴ってアルブミンが尿中に漏出ようになる。よってこの現象を利用すれば、尿中の微量アルブミンを測定して尿中アルブミン/尿中クレアチニン比(urinary albumin/creatinine ratio, ACR)を算出することにより、糖尿病性腎症や急性腎障害の程度を判断することが可能になる⁷⁾。

c. グリコプロテイン

プロテオグリカンとともに細胞膜に直接結合してグリコカリクスを構成するグリコプロテインの代表はセレクチンやインテグリンなどの接着分子類である。これらの発現状態は病態によって様々に変化し、白血球や血小板の血管内皮への接着を調節している。ここで興味深いのは、接着分子類はプロテオグリカンよりも長さが短いため、生理的な状態ではプロテオグリカンに被覆されて血球と接触しにくい構造になっている点である。しかし、炎症などの刺激でプロテオグリカンが剥離すると、血球は露出した接着分子と直接接触するようになり、内皮細胞に接着できるようになる(図2)。言い換えれば白血球

はプロテアーゼや活性酸素を放出してプロテオグリカンと剥離させることによって着地の地ならしを行い、引き続いて内皮に接着してさらに障害を進行させていくわけである。

2. グリコカリクスの形態と観察

グリコカリクスは極めて不安定かつ脆弱な構造体であり、その形態やサイズは観察方法によって報告ごとに異なっている⁸⁾。たとえば初期の透過型電顕による観察では、厚さ数十 nmとされていたが、固定法を変更して観察を行うと、5 μm 以上の厚みがあるとも報告されている⁹⁾。いずれにしても電子顕微鏡下では固定標本の観察しかできず、自然な状態におけるグリコカリクスの観察は不能である。これに対し、より生理的な状態におけるグリコカリクスの厚みを推定する方法として、生体顕微鏡を用いて赤血球と内皮細胞間の距離を計測することが試みられた。この手法で測定されたグリコカリクスの厚みは0.4–0.5 μm ということであり、想定されていたよりも薄かったことから、光学顕微鏡における回折空間分解能の限界が関係していると考えられた。そこで上記以外の方法として共焦点レーザースキャンや2光子レーザースキャンによる方法など、より洗練された観察手技が試みられた。その結果、後者による測定ではマウスの頸動脈のグリコカリクスは厚さ4.5 μm ということであったが¹⁰⁾、同時にグリコカリクスの厚さは種差や動脈、静脈、血管の太さなどによっては相当に異なることも予想された。さらにグリコカリクスの研究を困難にしているのは、静的な状態と血流の存在下ではグリコカリクスの発現状態が全く異なることである¹¹⁾。たとえばわれわれが培養内皮細胞において蛍光抗体を用いて行った観察では、静的な培養条件下では細胞表面のシンデカンを検出することできず、またヘパラン硫酸などのGAGsを検出することも不能であった。しかし、同じ培養内皮細胞にヒストンなどの障害因子を加えて内皮間隙を拡大させると、そこにシンデカン-1や-4の発現が観察され、静的状態でもシンデカンはETCに存在しており、細胞間接着に機能していることが想定された(図3)。このような結果から、*in vitro*の研究結果をもって生体内のグリコカリクスの状態を

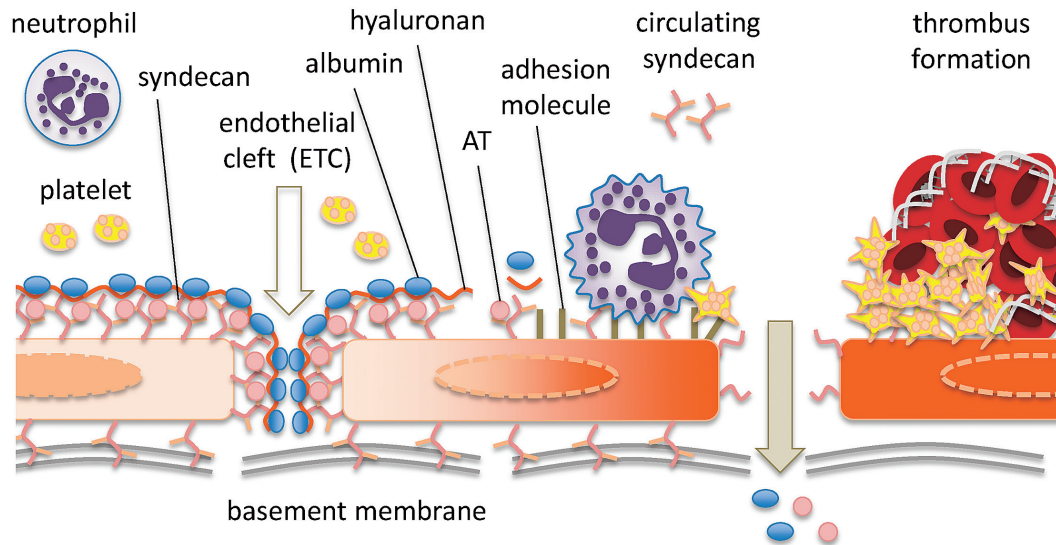


図2 正常状態と障害時におけるグリコカリクスの発現状態

血管内皮細胞の表面を覆っているグリコカリクスは隣接する内皮細胞との間隙部分である内皮細胞裂(ETC)にも存在している。きわめて脆弱なグリコカリクスは、種々の炎症性刺激や環境の変化によって容易に剥離して内皮表面には接着分子が露出し、血球細胞の接着を容易にしている。また ETC におけるグリコカリクスの障害は血管透過性亢進の原因になっている。AT: antithrombin

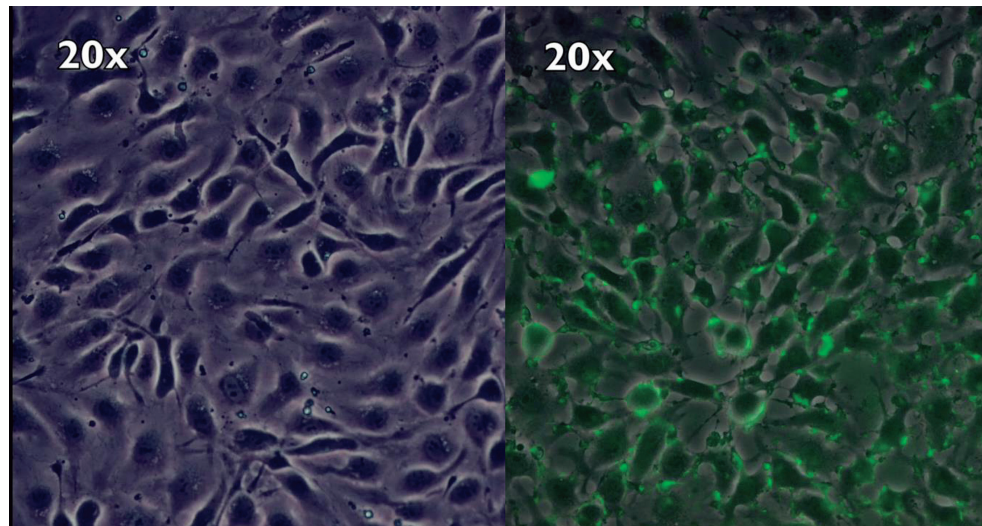


図3 正常状態と障害時におけるシンデカン-1 の発現状態

正常状態の血管内腔は単層の内皮細胞ですきまなく裏打ちされており、細胞間隙はみられない。静的な状態で培養した血管内皮ではシンデカン-1 や-4 で蛍光染色を行っても蛍光は認められず、シンデカンの発現はみられない(左)。しかし培養液中にヒストンを少量加えて内皮細胞に傷害を加え、細胞間隙が開かれると細胞間に存在するシンデカン-1 が緑色に染色される。そして培養液中でシンデカン-1 を定量すると、無刺激下では測定限界以下であったシンデカン-1 濃度の増加が確認される。

推定することは困難であると考えられ、このことは今後この領域の研究を行っていく上で注意が必要な点である。

3. バイオマーカーとしてのグリコカリクス

脆弱な構造物であるグリコカリクスは種々の刺激

で容易に剥離して血中に遊離する。そこで最近では、このことを利用して血中を循環するグリコカリクスの各要素を測定することにより、病態解析や診断に役立てようとする試みがある。たとえば糖尿病や動脈硬化などの慢性疾患、そして外傷や敗血症、虚血再灌流障害などにおける測定結果が報告されておりバイオマーカーとしての有用性が認知されつつある^{12, 13)}。グリコカリクスが血中に遊離するメカニズムとしては、敗血症においては好中球をはじめとする顆粒球系の細胞はエラスターゼをはじめとするタンパク分解酵素や活性酸素種を放出してコアタンパクを分解し、また形質細胞はヘパラーゼやマトリックスメタロプロテイナーゼによってGAGsを分離させることが報告されている¹⁴⁾。それ以外にも高血糖状態ではグリコカリクスの分解が促進され、糖尿病患者ではグリコカリクス層が菲薄化することが報告されている¹⁵⁾。さらに虚血再灌流障害ではpHの変化により分解が促進されることも報告されている。そもそもグリコカリクスは、抗凝固や線溶機能、血球接着など、血管内皮の重要な機能を担っており、またタンパク質の保持や血管透過性を制御していることから、血中においてこれらを定量すれば内皮機能障害を推定できることが期待されている¹⁶⁾。先に述べたようにシンデカンファミリーには、4つのサブタイプが存在する。このうちシンデカン-4はアンチトロンビン結合分子として広く認知されている。それぞれのシンデカンは分布に特性があり、たとえば血管内皮細胞の細胞間や基底膜側にはシンデカン1, 2, 4の発現が認められる。Johanssonらは¹⁷⁾、シンデカン-1が内皮障害や高濃度のカテコラミン投与にともなって高値となることを予想し、外傷後の転帰を予測するマーカーとしての評価を行った。しかしシンデカン-1は、死亡率の独立した予測因子ではあったものの、オッズ比は1.01[95%CI: 1.00–1.02]であり、その有用性については検討の余地が残るという結果であった。一方、Ostrowskiらは¹⁸⁾、重症敗血症184例においてシンデカン-1とthrombelastography(TEG)を測定し、これらが敗血症においてみられる過凝固状態を反映していることを報告している。またこれとは別にThorevskaらは¹⁹⁾、ICUに入室した重症患者104人においてactivated clotting time(ACR)を測定し、69%にACRの増加を認めたこと

を報告している。彼らによれば、ACRにより院内死亡をAcute Physiology and Chronic Health Evaluation II score(APACHE II score)やSequential Organ Failure Assessment Score(SOFA score)と同程度に予測できるということである。

4. シンデカンとアンチトロンビン

生理的な抗凝固物質であるアンチトロンビンには、以前から抗凝固作用のみならず抗炎症作用がみられることが知られていた²⁰⁾。そのメカニズムについては、アンチトロンビンがシンデカン-4のヘパラン硫酸に結合することによって、その刺激が血管内皮細胞におけるプロスタサイクリン(prostacyclin, PG I₂)産生を促進し、PG I₂が好中球や血小板の血管内皮細胞への接着および炎症反応を抑制すると考えられてきた。アンチトロンビンについては、ヘパリンを併用することにより抗炎症効果が減弱することが報告されているが、これについてはアンチトロンビンのヘパラン硫酸結合部位がヘパリンとの結合部位と共有であるため、ヘパリンを併用するとシンデカン-4への結合が阻害されるためと説明されている²¹⁾。

これとは別にアンチトロンビンによるシンデカン-4の保護効果が注目されている。マトリプターゼ(matriptase)は、II型膜貫通セリンプロテアーゼファミリーに属するトリプシン様プロテアーゼで、基質として細胞外マトリックスや細胞接着分子、成長因子様タンパク質、シンデカンなどを分解することが知られているが、内皮細胞表面でシンデカン-4に結合したアンチトロンビンは、このマトリプターゼの活性を制御することで、シンデカンの分解・遊離を抑制することが報告されている²²⁾。

著者の利益相反(COI)の開示：

研究費(受託研究、共同研究、寄付金等)(小野薬品工業)

文献

- 1) Van Teeffelen JW, Brands J, Stroes ES, Vink H: Endothelial glyocalyx: sweet shield of blood vessels. *Trends Cardiovasc Med* 17: 101–105, 2007.
- 2) Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Eg-

- brink MG: The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* **454**: 345–359, 2007.
- 3) Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio AR, Adembri C: Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care* **19**: 26, 2015.
 - 4) Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Strokes ES: The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol* **16**: 507–511, 2005.
 - 5) Alexopoulou AN, Multhaupt HA, Couchman JR: Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 505–528, 2007.
 - 6) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Iwase M, Yoshikai Y, Yanada M, Yamamoto K, Matsushita T, Nishimura M, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T: Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem* **276**: 47483–47488, 2001.
 - 7) Singh A, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE, Mathieson PW: Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol* **18**: 2885–2893, 2007.
 - 8) Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M: Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res* **87**: 300–310, 2010.
 - 9) Ebong EE, Macaluso FP, Spray DC, Tarbell JM: Imaging the endothelial glycocalyx in vitro by rapid freezing/freeze substitution transmission electron microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 1908–1915, 2011.
 - 10) Vink H, Duling BR: Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* **79**: 581–589, 1996.
 - 11) Potter DR, Jiang J, Damiano ER: The recovery time course of the endothelial cell glycocalyx in vivo and its implications in vitro. *Circ Res* **104**: 1318–1325, 2009.
 - 12) Henrich M, Gruss M, Weigand MA: Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalyx. *ScientificWorldJournal* **10**: 917–923, 2010.
 - 13) van Golen RF, van Gulik TM, Heger M: Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* **52**: 1382–1402, 2012.
 - 14) Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AH, Chappell D: Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br J Clin Pharmacol* **80**: 389–402, 2015.
 - 15) Lopez-Quintero SV, Cancel LM, Pierides A, Antonetti D, Spray DC, Tarbell JM: High glucose attenuates shear-induced changes in endothelial hydraulic conductivity by degrading the glycocalyx. *PLoS ONE* **8**: e78954, 2013.
 - 16) Lennon FE, Singleton PA: Hyaluronan regulation of vascular integrity. *Am J Cardiovasc Dis* **1**: 200–213, 2011.
 - 17) Johansson PI, Stensballe J, Rasmussen LS, Ostrowski SR: A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. *Ann Surg* **254**: 194–200, 2011.
 - 18) Ostrowski SR, Haase N, Müller RB, Möller MH, Pott FC, Perner A, Johansson PI: Association between biomarkers of endothelial injury and hypocoagulability in patients with severe sepsis: a prospective study. *Crit Care* **19**: 191, 2015.
 - 19) Thorevska N, Sabahi R, Upadya A, Manthous C, Amoteng-Adjepong Y: Microalbuminuria in critically ill medical patients: prevalence, predictors, and prognostic significance. *Crit Care Med* **31**: 1075–1081, 2003.
 - 20) Iba T, Saitoh D: Efficacy of antithrombin in preclinical and clinical applications for sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care* **2**: 66, 2014.
 - 21) Opal SM, Kessler CM, Roemisch J, Knaub S: Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. *Crit Care Med* **30**: S325–S331, 2002.
 - 22) Chen YW, Xu Z, Baksh AN, Wang JK, Chen CY, Swanson R, Olson ST, Kataoka H, Johnson MD, Lin CY: Antithrombin regulates matriptase activity involved in plasmin generation, syndecan shedding, and HGF activation in keratinocytes. *PLoS One* **8**: e62826, 2013.