

平成30年6月18日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10990

研究課題名(和文) 肝臓・腎臓における各種炎症病態形成へのADAMTS13の関与

研究課題名(英文) Involvement of ADAMTS13 in the pathophysiology of several types of inflammation in the liver and the kidney

研究代表者

西尾 健治(NISHIO, KENJI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60254489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓の虚血再灌流傷害をWild type マウス(WT)、VWF gene-deletedマウス(VWF-KO)を用いて比較検討した。VWF-KOでは、WTに比べて、再灌流後の肝血流の回復が良好に保たれALTの減少を認めた。また、組織学的にも、VWF-KOで白血球浸潤と肝細胞壊死範囲が減少しており、intravital imaging でも血管壁をrolling、adheringしている白血球が著明に減少していた。虚血再灌流肝障害はVWFが微小血栓および白血球粘着を惹起して生じており、VWFの機能をADAMTS13によって調整することは、肝虚血再灌流障害の予防や治療手段になりうると思う。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of hepatic ischemia/reperfusion injury (I/R injury), we explored the functional relevance of the VWF and ADAMTS13 molecules in this pathophysiologic condition. Time-course studies during hepatic I/R revealed significantly lower ALT values and greater hepatic blood flow in VWF knock-out mice (VWF-KO) mice than wild type mice (WT). Histological analysis revealed a significantly lesser extent of neutrophil infiltration of VWF-KO. Human recombinant ADAMTS13 significantly improved the I/R injury in WT similar level to VWF-KO. Real-time intravital imaging successfully visualized significantly reduced the number of leukocyte adhering to the vessel wall in VWF-KO mice. Taken together, our results indicate that VWF promotes microthrombosis and neutrophil recruitment and in ischemic mouse liver, critically aggravating reperfusion injury, and suggest that functional regulation of VWF by ADAMTS13 represents a promising therapeutic option for hepatic I/R injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：von Willebrand factor ADAMTS13 ischemia/reperfusion

## 1. 研究開始当初の背景

von Willebrand factor (VWF) は血管が損傷を受けたときに露呈した血管内皮下組織に粘着し、血管内を循環する血小板をとらえ、内皮下組織にリクルートさせる、すなわち一次止血を誘導する中心的な分子である。しかしながら近年、VWF にリクルートされた血小板に白血球が粘着すること、さらに VWF 自身が炎症にも関与していることが知られるようになった。同時に、VWF を切断して VWF の長さを調整することにより VWF 機能を制御している ADAMTS13 が、一時止血のみならず、炎症も制御していることが明らかとなってきた。

われわれは ADAMTS13 が血管内皮細胞より分泌された VWF の長さを調節しているのみならず、コラーゲンに粘着した VWF 上に形成される血小板血栓の表面においても VWF を切断しており、その活性発現は必ずり応力依存性であるという ADAMTS13 の新たな機能を発見し報告した (Shida Y, Nishio K, 2 番目, 他 8 名: Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. Blood 111:1295-1298, 2008)。必ずり応力依存性ということは、止血血栓形成時、血管内皮下を止血血栓が埋め尽くして血栓が血管内腔に進展しだしたときから ADAMTS13 が働きやすくなり、さらに止血血栓の血管内腔への増大に伴い血栓表面に流れる血流の流速は速くなることを考えると、血栓表面の VWF は血栓の増大に伴い切断されやすくなることが推察され、止血血栓内腔進展制御という役割を ADAMTS13 が担っていることが推測された。以上よりこの ADAMTS13 の必ずり応力依存性活性発現は ADAMTS13 が出血傾向を来さない (血管内皮下を止血血栓が埋め尽くす現象には影響を与えないために止血は行われる) が、血栓が血管内腔に増大す

なわち病的血栓形成を制御するという新たな抗血栓薬となりうる可能性を示唆していた。

そこで、われわれは ADAMTS13 のこれらの機能、抗病的血栓性と抗炎症性を in vivo で確認するために、虚血と炎症で形成される脳虚血再還流傷害に対する、ADAMTS13 の影響を検討したところ、ADAMTS13 が凝固および炎症を制御し、脳虚血再灌流障害を抑制している事を見出した (Fujioka M, Nishio K, 最後, 他 14 名 ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage. Blood 115, 1650-1653, 2010) (Fujioka M, Nishio K, 13 番目. Adamts13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. Neurol Sci. 33(5):1107-1115, 2012)。さらに心臓における虚血傷害に対しても ADAMTS13 は傷害を軽減させる方向に働いていることを報告し (Doi M, Nishio K, 7 番目. ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. Thromb Haemost. 108(6):1236-1238, 2012)、脳梗塞と心筋梗塞の予防薬・治療薬となりうることを示してきた。

臨床においては、敗血症患者の入院時 ADAMTS13 活性が低下しているもの程予後が悪く、VWF-propeptide/ADAMTS13 比が高いものほど、今後重症となる傾向にあり重症群の選別に有用であることを報告した (Fukushima H, Nishio K, 2 番目. Ratio of von Willebrand Factor Propeptide to ADAMTS13 Is Associated with Severity of Sepsis. Shock. 39(5):409-414, 2013)。以上より、おそらく ADAMTS13 は全身においても凝固と炎症を抑えているものと考えた。

以上より、VWF-ADAMTS13 が凝固反応と炎症反応に関係していることは明らかであり、

凝固反応と炎症反応の結果である虚血再灌流傷害に組織特異性がないか、肝臓と腎臓においても検討することとした。

## 2. 研究の目的

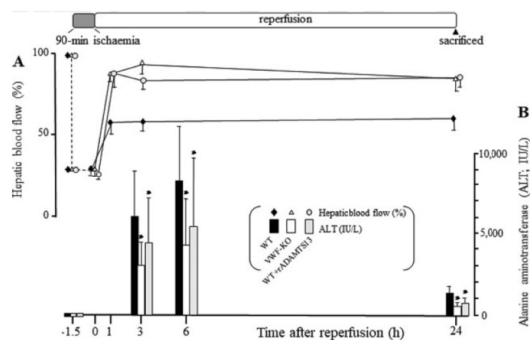
肝虚血再灌流における肝障害は、肝切除や肝移植などの肝臓外科手術や出血性ショックにおいて臨床的予後を規定する因子として極めて重要である。虚血再灌流に伴う臓器障害の発生機序である微小循環障害と炎症において VWF が重要な役割を果たしているかどうかを、マウスの肝虚血再灌流モデルを作成して検討した。

## 3. 研究の方法

Wild type マウス(WT)、VWF gene-deleted マウス(VWF-KO)を用いて、70%部分肝虚血モデルを作成し、90分虚血した。再灌流後、3、6、24時間後に ALT とレーザードップラー血流計を用いて肝血流を測定した。24時間後の肝組織を採取して組織学的検討を行った。肝微小血管における白血球と血小板、血管壁との相互作用を観察するため、再灌流2時間後に real-time intravital imaging system で観察した。

## 4. 研究成果

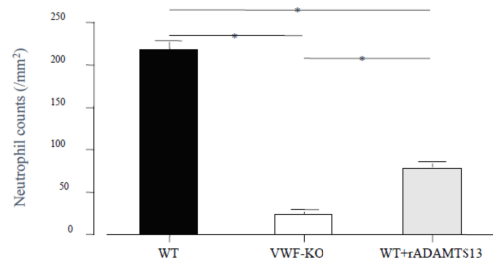
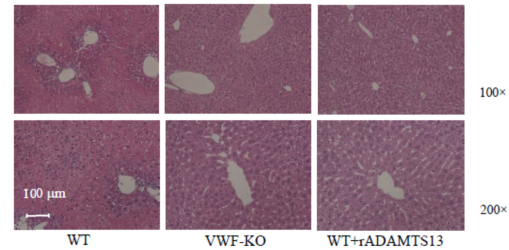
VWF-KO では、WT に比べて、虚血後の ALT の減少を認め、再灌流後の肝血流の回復が良好に保たれていた。



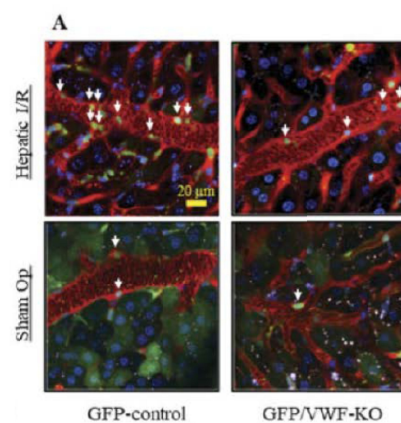
また、WT にヒトリコンピナント ADAMTS13 を加えると、VWF-KO と同様に再灌流後の肝

血流は良好に保たれ、ALT も減少した。組織学的にも、VWF-KO で白血球浸潤と肝細胞壊死範囲が減少していた。

WT に ADAMTS13 を投与すると好中球浸潤の減少を認めた。



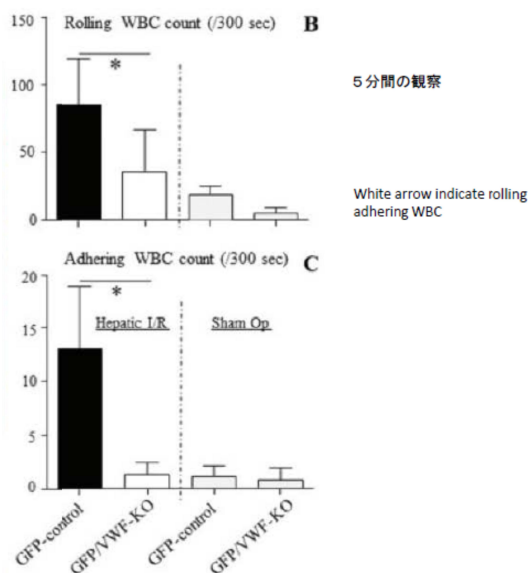
Real-time intravital imaging system で、WT に比べ、VWF-KO では、血管壁を rolling、adhering している白血球が著明に減少していることをとらえることができた。VWF-KO では、類洞を plugging させ、血流を遮断している白血球は減少していた。



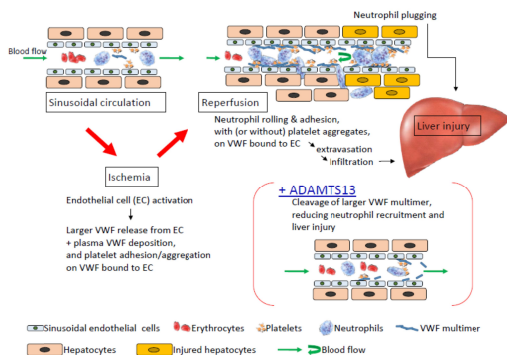
green: cell red: blood flow  
blue: DNA

血管壁に adhering している血小板数や、血小板が付着した白血球の割合も VWFKO で低

下していた。



これらのことから、肝虚血再灌流においても、VWF が肝微小血管と白血球、血小板との間の rolling、adhering、plugging などの相互作用に強く関与し、肝障害に影響を及ぼしていることが明らかになった。



VWFの機能をADAMTS13によって虚血前に投与して調整することは、肝虚血再灌流障害を予防する強力な治療手段としてなりうる可能性があることを示唆しており、場合により、外傷などで再灌流傷害が生じてからでも治療薬となり得る可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Urisono Y, Sakata A, Matsui H, Kasuda S, Ono S, Yoshimoto K, Nishio K, Sho M, Akiyama M, Miyata T, Okuchi K, Nishimura S, Sugimoto M. Von Willebrand Factor Aggravates Hepatic

Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Neutrophil Recruitment in Mice. *Thromb Haemost.* 査読あり 118(4):700-708, 2018.

〔学会発表〕(計 2 件)

Yasuyuki Urisono, Hideto Matui, Shogo Kasuda, Shiro Ono, Kenji Nishio, Masashi Akiyama, Toshiyuki Miyata, Kazuo Okuchi and Mitsuhiro Sugimoto. Functional Relevance of Von Willebrand Factor in Mouse Model of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. 58th American Society of Hematology Annual Meeting. San Diego (USA). 2016年12月03日  
大野 史郎, 松井 英人, 野田 正志, 粕田 承吾, 瓜園 泰之, 松成 泰典, 矢田 憲孝, 西尾 健治, 杉本 充彦  
腎虚血再灌流障害マウスモデルにおけるvon Willebrand因子の機能解析. 第38回日本血栓止血学会学術集会. 奈良2016年06月16日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 健治 (NISHIO KENJI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 60254489

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )