

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10103

研究課題名(和文) VWF/ADAMTS-13/F 制御軸による極低出生体重児の脳室内出血の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology of intraventricular hemorrhage in extremely low birth weight infants by VWF/ADAMTS-13/FVIII axis

研究代表者

西久保 敏也 (NISHIKUBO, TOSHIYA)

奈良県立医科大学・医学部・病院教授

研究者番号：20208169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：極低出生体重(VLBW)児の脳室内出血(IVH)は、上衣下層の出血が起点となり、酸素を要する呼吸障害を合併したVLBW児に合併しやすい。  
臍帯静脈は脳内血管の類似血管と考えられるので、成熟児とVLBW児の臍帯静脈血管内皮細胞を剥離・培養し、過酸化水素水が凝固関連因子のmRNAの発現に及ぼす影響を検討した。  
その結果、組織因子とプラスミノゲン活性化阻害因子-1のmRNAは、成熟児とVLBW児でともに発現量が有意に増加していた。すなわち、凝固系の活性化と線溶系の抑制が示唆された。その結果、フィブリン塊の産生促進と分解抑制が惹起され、上衣下層の静脈細枝の出血に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、極低出生体重児における酸素毒性は、主として未熟児網膜症や慢性肺疾患の重症化に関係しているとされてきた。今回の研究結果は、呼吸障害を有する極低出生体重児における脳室内出血の発生機序として、酸素由来のスーパーオキシドやヒドロキシラジカルなどのフリーラジカルが血管内皮細胞に作用して、凝固亢進と線溶抑制を惹起することによる、IVH発症機序の可能性が示唆された。児への過剰酸素投与を予防することはIVH発症予防にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Intracerebroventricular hemorrhage (IVH) in very low birth weight (VLBW) infants is more likely to occur in VLBW infants with oxygen-induced respiratory distress due to hemorrhage in the subependymal layer.

Since umbilical veins are considered to be similar to blood vessels in the brain, umbilical vein endothelial cells of mature and VLBW infants were detached and cultured, and the effect of hydrogen peroxide solution on the expression of mRNA of coagulation-related factors was examined.

As a result, the expression levels of tissue factor and plasminogen activation inhibitor-1 mRNA were significantly increased in both mature and VLBW infants. That is, activation of the coagulation system and suppression of the fibrinolysis system were suggested. As a result, it was suggested that the production of fibrin clot was promoted and the degradation was suppressed, and that it might be involved in hemorrhage of venous venules in the subependymal layer.

研究分野：新生児、血液凝固

キーワード：極低出生体重児 脳室内出血 臍帯静脈血管内皮細胞 組織因子 PAI-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 出生体重 1,500g 未満の極低出生体重児 (very low birth weight infant) (VLBW 児) の脳室内出血 (intraventricular hemorrhage: IVH) は、児の生命予後や神経学的予後を左右する重篤な合併症である。

(2) しかしながら、VLBW 児における血液凝固制御軸を基点とした検討は、採血が困難であることや採血量の制限などのため、解明が遅れている。

(3) 臍帯血管は、脳内血管の類似血管と考えられるが、VLBW 児の臍帯血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) を用いた検討は、検体確保の問題などから報告がない。

#### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、一次止血として重要な、血小板の損傷血管壁との結合に必須の血漿糖蛋白；フォン・ヴィレブランド因子 (von Willebrand factor: VWF)、VWF を特異的に切断する酵素

(A Disintegrin-like and Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motifs 13; ADAMTS-13) および血液凝固第Ⅷ因子 (FVIII) に着目した。VWF は主に血管内皮細胞から、ADAMTS-13 は主に肝星細胞から産生され、血中に分泌される。また、FVIII は主に肝類洞内皮細胞から産生・分泌され、血中で VWF と結合して安定化した状態で存在する。本研究では、これら 3 因子の発現動態および相互作用について、成熟児と VLBW 児との間での比較検討を行う。

(2) IVH は、側脳室の上衣下層 (germinal matrix) の破綻を起点に生後 3 日以内に発症しやすい。また、IVH は、生後早期の酸素投与や人工呼吸管理が必要な呼吸障害を有する VLBW 児に発症しやすいことから、酸素投与に伴う活性酸素の影響について、成熟児と VLBW 児間での比較検討を行う。

#### 3. 研究の方法

(1) VLBW 児の血漿中には、270 kD の VWF が重合して形成された 15,000kD 以上の高分子マルチマー (unusually-large VWF multimer; UL-VWFM) が存在する。また、VWF は血管内皮細胞で産生された後、同細胞の細胞質に存在するバイベル・パラデー小体にプールされるが、酢酸デスマプレシン (DDAVP) 投与など種々の刺激を受けてその小体から血中に放出される。実験では、成熟児および VLBW 児の臍帯をデスパーゼで剥離・採取することで樹立した HUVEC を培養し、ADAMTS-13 非存在下に、DDAVP 刺激にて HUVEC から放出された VWF と血漿 VWF の構造・機能解析の比較検討を行った。

(2) 成熟児および VLBW 児の臍帯から樹立した HUVEC を培養し、強力な酸化力を持つヒドロキシラジカルを生成する過酸化水素水 ( $H_2O_2$ ) を培地内に添加したのち、細胞での VWF、ADAMTS-13、FVIII、組織因子 (tissue factor: TF)、プラスミノゲン活性化因子阻害因子-1 (plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1)、インターロイキン-6 (interleukin-6: IL-6) および腫瘍壊死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ : TNF  $\alpha$ ) の各遺伝子発現量を real-time PCR 法にて定量比較した (添加前、添加 3, 6 時間後)。

#### 4. 研究成果

(1) 成熟児の HUVEC を用いて、DDAVP 添加後の HUVEC 培養上清中に VWF が存在することをリストセチン凝集法と抗 VWF 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法で確認した。さらにこの VWF 放出は、V2 受容体拮抗薬の添加により、濃度依存性に減少した。この VWF を 6% アガロースで電気泳動し VWF のサブユニット解析を行ったところ、270 kD のサブユニットに加えて、正常 VWF には認めない低分子フラグメントを検出した。同様に SDS-アガロース電気泳動法によるマルチマー解析では、血漿 VWF と異なる低分子マルチマー構造を呈した。以上のことから、DDAVP 添加で得られた VWF は試験操作過程で構造変化が生じることが判明した。

(2) 成熟児および VLBW 児由来 HUVEC の  $H_2O_2$  添加に対する遺伝子発現変化。

① VWF と FVIII は、成熟児と VLBW 児の両者共、 $H_2O_2$  添加による mRNA の発現量の増加を認めなかった (図 1)。

② 一方、外因系凝固反応の開始因子である TF と、線溶抑制因子である PAI-1 は、成熟児と VLBW 児の両者共、 $H_2O_2$  添加 3 時間でその mRNA 発現が有意に増加した (図 2)。

③ 炎症性サイトカインの検討では、IL-6 は  $H_2O_2$  添加による mRNA の発現増加は成熟児と VLBW 児で共に認めなかったが、VLBW 児は成熟児よりも有意にその基礎発現量が少なかった。一方、TNF  $\alpha$  は、有意差は認めなかったものの、VLBW 児では  $H_2O_2$  添加で mRNA の発現増加傾向を示すとともに、基礎発現量も成熟児よりも高かった (図 3)。

④ 以上の結果から、酸化ストレスは、成熟児と VLBW 児の両者で、VWF や FVIII の発現に与える影響は少ないが、外因系凝固活性を促進することに加えて、線溶系を抑制することから、フィブリン形成の促進・分解遅延に関与する可能性が示唆された。

高嶋らは「脳室上衣下層の静脈は、脳室上衣下静脈へ流入する短い細枝からなっているためうっ

滞の影響は大であると思われる」と報告している。従って、今回の研究結果と併せて、呼吸障害を有するVLBW児における生後早期のIVH発症には、呼吸障害の治療として行う人工呼吸管理に伴う胸腔内圧上昇が静脈還流障害を生じて上衣下層の細静脈のうっ滞を惹起するとともに酸素投与によるフィブリン形成促進と分解遅延作用が相まって、上衣下層の静脈細枝が破綻し出血を生じる可能性が示唆された。

⑤酸化ストレスのサイトカイン発現に及ぼす影響は、成熟児とVLBW児間で相違を認めた。特に、VLBW児のHUVECではTNF $\alpha$ の基礎発現量が高く、H2O2添加によるさらなる発現量増加した。TNF $\alpha$ は血管内皮細胞におけるPAI-1産生を増強する作用を有するとの報告もあることから、VLBW児では成熟児に比べ、線溶が抑制され血栓傾向が増強している可能性が示唆されるが、その詳細な機序解明に向け今後更なる検討が必要である。

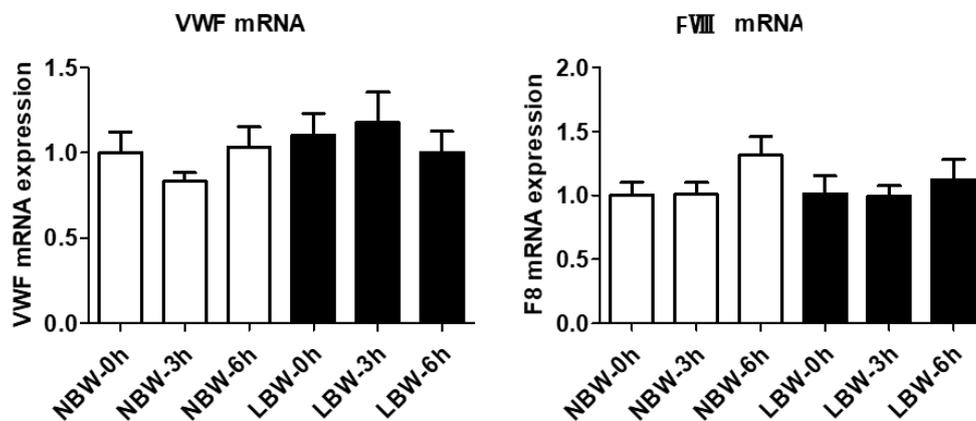


図1. VWFとFVIIIの遺伝子発現の継時的推移 (NBW: 成熟新生児、LBW: 極低出生体重児)

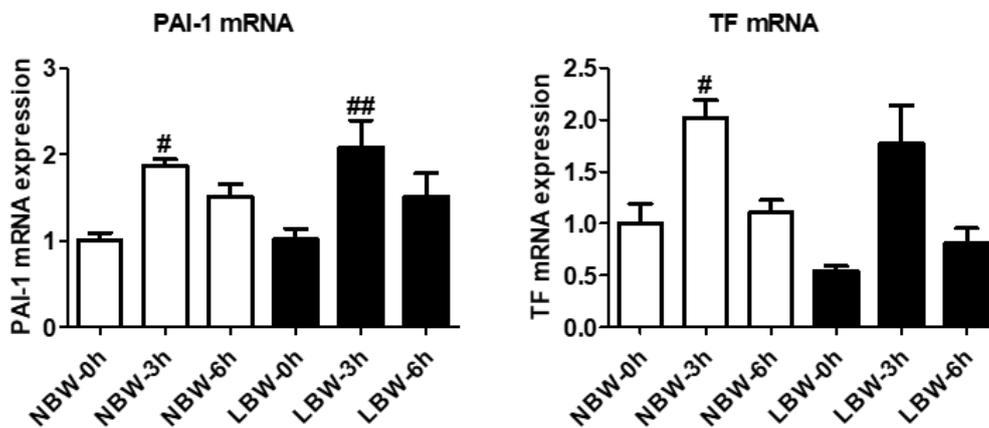


図2. TFとPAI-1の遺伝子発現の継時的推移 (NBW: 成熟新生児、LBW: 極低出生体重児)  
(#:  $p < 0.05$ , ##:  $P < 0.01$ )

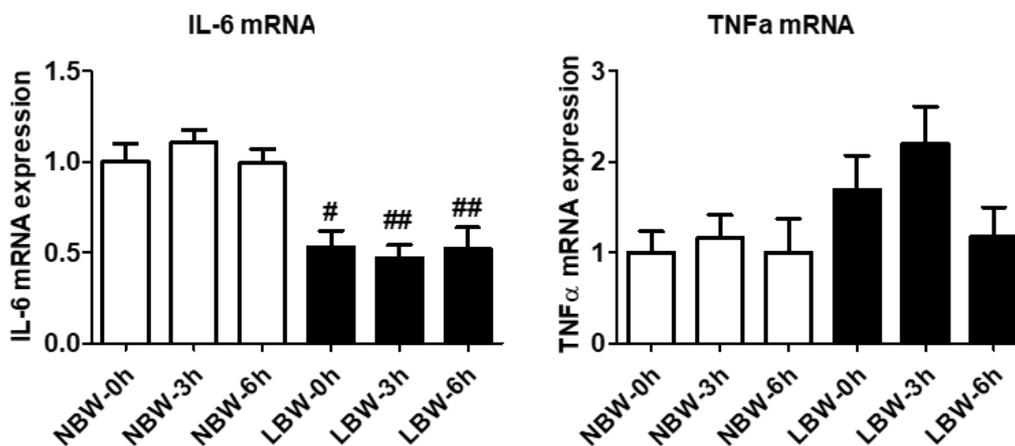


図3. IL-6とTNF $\alpha$ の遺伝子発現の継時的推移 (NBW: 成熟新生児、LBW: 極低出生体重児)  
(#:  $p < 0.05$ , ##:  $P < 0.01$ )

<引用文献>

①高嶋幸男、田中健蔵、未熟脳の脳室上衣下層の微小血管構築と組織線溶活性、脳と発達、4巻、1972、44-49

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中島 由翔, 釜本 智之, 西久保 敏也, 他	4. 巻 54
2. 論文標題 難治性新生児乳び胸を合併した極低出生体重児の2例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本周産期・新生児医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1115-1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 釜本 智之, 西久保 敏也	4. 巻 44
2. 論文標題 【病態・疾患別でまなぶ新生児の薬剤 臨床のギモンに答えるQ&A付き】 (5章)その他、NICUで使用するくすり 血液凝固系	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neonatal Care	6. 最初と最後の頁 409-414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森本 千裕, 西久保 敏也, 家根 旦有, 他	4. 巻 31
2. 論文標題 先天性難聴の遺伝学的検査	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 奈良県医師会医学会年報	6. 最初と最後の頁 13-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西久保 敏也	4. 巻 31
2. 論文標題 新生児の呼吸・栄養管理の変遷と展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 奈良県医師会医学会年報	6. 最初と最後の頁 8-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西久保 敏也	4. 巻 81巻増刊
2. 論文標題 小児の治療指針】 新生児 出血性疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 988-991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsujii N, Nishikubo T. et al	4. 巻 60
2. 論文標題 Barth syndrome associated with triple mutation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 385-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takatani T, Nishikubo T. et al	4. 巻 40
2. 論文標題 Relationship between frequency spectrum of heart rate variability and autonomic nervous activities during sleep in newborns.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Dev.	6. 最初と最後の頁 165-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitoshi-Uebayashi EY, Nishikubo T. et al	4. 巻 486
2. 論文標題 Modelling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease-specific iPSCs	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 613-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.05.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川口 千晴, 西久保 敏也, 白幡 聡, 高橋 幸博	4. 巻 26
2. 論文標題 新生児仮死および感染症に起因した新生児DIC症例の凝固線溶系検査所見と予後の関連	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本産婦人科・新生児血液学会誌	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西久保敏也	4. 巻 80巻増刊
2. 論文標題 【小児科ケースカンファレンス】 新生児疾患 新生児血小板減少症(	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 176-179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimoto E, Ito Y, Sakakibara T, Nishikubo T	4. 巻 61
2. 論文標題 Early treatment using betaine and methionine for a neonate with MTHFR deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 1265-1266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西久保敏也	4. 巻 50
2. 論文標題 ビタミンK欠乏症	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 688-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西久保敏也	4. 巻 49巻増刊
2. 論文標題 生後1ヵ月頃 ビタミンK2シロップは何回飲む必要がありますか?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 624-625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西久保敏也, 近藤さつき, 高谷恒範, 高橋幸博	4. 巻 49
2. 論文標題 非侵襲的コミュニケーション手段の開発と評価 心拍変動による自律神経解析を中心に.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 1647-1650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大塚 敬太, 西久保 敏也, 利根川 仁, 西本 瑛里, 中川 隆志, 釜本 智之, 内田 優美子, 榊原 崇文, 坂本 修, 高橋 幸博	4. 巻 120
2. 論文標題 新生児期に著明な脳萎縮をきたしたメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素欠損症	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本小児科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1488-1494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 白幡 聡, 高橋 幸博, 茨 聡, 大賀 正一, 樺山 知佳, 河井 昌彦, 川口 千晴, 沢田 健, 高橋 大二郎, 瀧正志, 長江 千愛, 西久保 敏也, 水上 尚典, 日本産婦人科・新生児血液学会, 新生児DIC診断・治療指針作成ワーキンググループ	4. 巻 25
2. 論文標題 新生児DIC診断・治療指針2016年版	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本産婦人科・新生児血液学会誌	6. 最初と最後の頁 3-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tatsumi K, Nishikubo T, Okada K, Mizuguchi N, Okumoto K, Fujito H, Takafuji Y, Ishida M, Kawao N, Matsuo O, Kaji H
2. 発表標題 Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency prevents the neonatal chronic lung disease in mice
3. 学会等名 国際血栓止血学会2019 (ISTH) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsumi K, Nishikubo T, Okada K, Mizuguchi N, Okumoto K, Takafuji Y, Ishida M, Kawao N, Shima M, Matsuo O, Kaji H
2. 発表標題 The involvement of fibrinolytic system in the development of neonatal chronic lung disease in mice
3. 学会等名 第81回 日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 千晴, 西久保 敏也, 高橋 幸博
2. 発表標題 Thrombelastographyを用いた低温下での止血機能解析
3. 学会等名 第29回日本産婦人科・新生児血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辰巳公平、西久保敏也、岡田清孝、水口信行、奥本勝美、藤東温子、高藤義正、石田昌義、河尾直之、松尾 理、嶋 緑倫、梶 博史
2. 発表標題 新生児慢性肺疾患病態への線溶系因子の関与
3. 学会等名 第29回 日本病態生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辰巳公平、西久保敏也、岡田清孝、水口信行、奥本勝美、藤東温子、高藤義正、石田昌義、河尾直之、松尾 理、梶 博史
2. 発表標題 新生児慢性肺疾患病態へのplasminogen activator inhibitor-1の関与
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西久保 敏也、釜本智之、中川隆志、内田優美子、高橋幸博
2. 発表標題 臍帯血管内皮細胞由来VWFの基礎的検討
3. 学会等名 第122回日本小児科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋幸博、内田優美子、林 環、釜本智之、中川隆志、利根川 仁、西本瑛里、谷 有貴、川口千晴、西久保敏也
2. 発表標題 重症仮死に伴う新生児DICの血小板指数
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西本 瑛里、高橋 幸博、西久保 敏也、 他
2. 発表標題 心拍変動による自律神経機能
3. 学会等名 第63回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 利根川 仁, 高橋 幸博, 西久保 敏也、他
2. 発表標題 当院における出生体重1,500g以上の低出生体重児の子宮外発育遅延の検討
3. 学会等名 第63回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 幸博, 倉本 智津子, , 西久保 敏也、他
2. 発表標題 新生児の血小板指標
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辰巳 公平, 西久保 敏也, 岡田 清孝, 他
2. 発表標題 13. 新生児慢性肺疾患病態へのplasminogen activator inhibitor-1の関与
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 遼平, 石原 卓, 西久保 敏也, 他
2. 発表標題 16. 急性巨核芽球性白血病に対して少量シタラピン療法を施行したダウン症の1例
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川 隆志、西久保敏也、他10名
2. 発表標題 当院で出生した極低出生体重児の修正40週での身体発育
3. 学会等名 第121回日本小児科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西久保敏也、井上 隆、他10名
2. 発表標題 NRNデータベースからみた在胎23週から在胎25週の脳室内出血のリスク因子の検討
3. 学会等名 第121回日本小児科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋幸博、西久保敏也、
2. 発表標題 心拍変動による自律神経機能の連続解析
3. 学会等名 第121回日本小児科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 利根川 仁、西久保敏也、他5名
2. 発表標題 妊娠後期に羊水過少を認め、生後早期から腹膜透析を導入した総排泄腔遺残症の1例
3. 学会等名 第53回日本周産期・新生児医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋幸博、西久保敏也、他11名
2. 発表標題 出生体重1,500g未満の新生児DICの臨床的検討 全国アンケート調査との比較
3. 学会等名 第27回日本産婦人科・新生児血液学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 西久保敏也	4. 発行年 2018年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 4
3. 書名 小児の治療指針	

1. 著者名 西久保敏也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 3
3. 書名 今日の治療指針2020年版	

1. 著者名 西久保敏也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 今日の診断指針第8版	

1. 著者名 西久保敏也、嶋緑倫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2
3. 書名 新臨床内科学第10版	

1. 著者名 西久保敏也	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メデイカ出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 新生児学テキスト	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	西本 瑛里  (NISHIMOTO ERI)  (00645591)	奈良県立医科大学・医学部・助教    (24601)	