

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10126

研究課題名(和文) 血流下での血管内皮細胞の応答機構と血液凝固第VIII因子の機能発現

研究課題名(英文) The response of endothelial cells and the function of coagulation factor VIII under flow conditions

研究代表者

志田 泰明 (Shida, Yasuaki)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10721566

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)：止血に必須の凝固因子である第VIII因子(FVIII)や血小板粘着凝集に関わるフォン・ヴィレブランド因子(VWF)は血管内皮細胞で産生されることが知られているが、その詳細な機序は不明である。今回我々は血流がこれらの因子産生に及ぼす影響を独自の還流装置を用いて検討した。血流により血管内皮細胞は形態変化を起こすだけでなく、VWFやFVIIIの産生を亢進させた。また層流や乱流などの血流形式によっても異なることが判明した。新たな止血制御機構の解明であり、またFVIIIやVWF因子製剤の効率良い製造にも応用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

止血に必須の凝固因子である第VIII因子(FVIII)や血小板粘着凝集に関わるフォン・ヴィレブランド因子(VWF)は血管内皮細胞で産生されることが知られているが、その詳細な機序は不明である。今回我々は血流がこれらの因子産生に及ぼす影響を独自の還流装置を用いて検討した。血流により血管内皮細胞は形態変化を起こすだけでなく、VWFやFVIIIの産生を亢進させた。また層流や乱流などの血流形式によっても異なることが判明した。新たな止血制御機構の解明であり、またFVIIIやVWF因子製剤の効率良い製造にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Coagulation factor VIII (FVIII) and von Willebrand factor (VWF) are essential factors for hemostasis. Although these proteins are produced in endothelial cells, the detailed mechanism is not known. We evaluated the influence of shear stress created by the blood flow on the production of FVIII and VWF. Shear stress not only changed the shape of endothelial cells but also accelerated the production of FVIII and VWF. Furthermore, the pattern of blood flow such as laminar and oscillatory flow had distinct effects on the production. These results identified the novel regulatory mechanism of hemostasis and, moreover, are applicable to improved efficiency of the production of FVIII and VWF.

研究分野：血液

キーワード：血液 血流 血栓止血 凝固因子

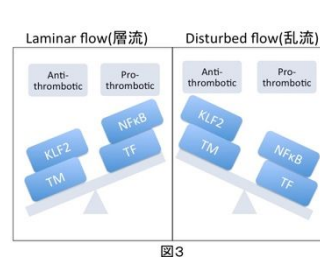
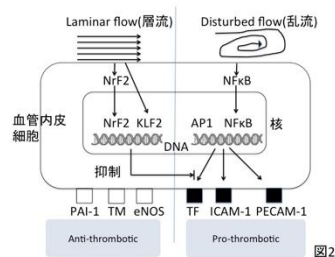
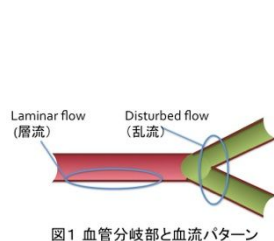
1. 研究開始当初の背景

(1) 血管内皮細胞とFVIII産生

血液凝固因子第VIII因子 (FVIII) は欠損により重篤な出血性疾患である血友病Aを発症する。FVIIIは微量かつ不安定なタンパクであり検出が技術的に困難である。そのため他の凝固因子と異なりFVIIIの産生部位には血管内皮細胞や肝細胞など諸説あり、長きにわたり議論されてきたが、近年では血管内皮細胞であるという報告が多い。von Willebrand factor (VWF)は血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生される。血液中ではFVIIIはVWFと結合して複合体を形成し、不安定なFVIIIを分解から保護して安定化する。他の凝固因子が肝細胞で産生されることと異なり、FVIIIがVWFと同じ血管内皮細胞で産生されるとすれば合理的な産生機構であると考えられるが、どの時点で、血管内皮細胞内のどの部位でVWFと結合しているのか等の機構は全く不明である。

(2) 血流と血管内皮細胞

血管内皮細胞は全身の血管内腔を覆って存在している細胞であり、血液はその中を澁みなく流れている。血管内皮細胞は不必要な凝固を発生させない目的で抗血栓性を備えているが、ひとたび血管内皮に損傷や炎症機転が生ずると、これに反応して血管内皮細胞は性格を「抗」血栓から「向」血栓へと転じる。近年、これまで考えられてきた機械的、化学的刺激に加えて、血流により生じるずり応力がこの制御機構に影響していることが明らかになってきた。動脈硬化や血栓症は血管分岐部に好発する現象が知られているが、この理由の一つとして分岐部での乱流が考えられている。一方、血管が一直線の部位では血流は層流であり血管内皮は動脈硬化から守られている (図1)。最近の報告によると、一方向性の層流により抗血栓、抗炎症の役割を担うThrombomodulin (TM) やプロテインC の発現が活性化することが知られている。逆に、乱流にさらされた血管内皮細胞はTissue Factor (TF)、Platelet endothelial adhesion molecule 1 (PECAM-1+) を発現するなど、炎症性サイトカインやトロンビンにより刺激を受けた際と同様に「向」血栓性の反応を見せる (図2)。このような血流に対する反応の決定に寄与する転写因子として代表的なものがKruppel-like factor 2 (KLF2) と Nuclear factor B (NF B) である。様々な炎症反応は最終的にNF Bの核内集積、DNAへの結合から細胞の反応へとつながるとされる。乱流刺激がNF Bを活性化させ、最終的にTF等の発現に結びつくと予想される。KLF2は、NF Bの働きを抑制することにより作用発現すると考えられている。結果として上記のように血流刺激により血管内皮細胞の「抗」および「向」血栓性が変化すると考えられる (図3)。しかしFVIIIやVWF産生に及ぼす血流刺激の影響については報告が無い。



(3) 血流と血栓

血栓は静止下である試験管内で長らく研究されてきたが、実際の生体内では血栓は血流下で形成される。低ずり応力下では従来の検査結果に基づく理論が概ね適用されるが、高ずり応力下では通常の凝固反応のようなタンパク間の化学反応は進行しがたい。VWFは唯一高ずり応力下においてその止血能を増強するタンパクである。VWFは血管損傷部位に露出したコラーゲンに結合して血流により引き伸ばされると、VWF内の血小板結合部位(A1ドメイン)が露出し、流れてくる血小板と結合する(Shida Y; Blood 2014)。次に粘着した血小板にVWFが結合し、そのVWFに血小板が結合する形でVWF-血小板中心に血栓形成が行われていく(Shida Y; Blood 2008)。このような高ずり応力下においても凝固反応は血小板血栓を強固にする形で血栓形成に影響すると考えられる。FVIIIはVWFと共に血中に存在する唯一の凝固因子であり、血栓形成に最も関与している凝固因子であると考えられるが、その詳細な機構は不明である。

## 2. 研究の目的

血管内皮細胞は全身の血管を覆っている細胞であり、von Willebrand factor(VWF)や血液凝固因子第VIII因子(FVIII)の産生部位と考えられている。血流により生じる高ずり応力刺激は血管内皮細胞の形態を変化させるが、VWFやFVIIIなどの凝固関連因子のタンパク産生に影響を及ぼすかどうかは明らかでない。我々は血流による血管内皮細胞での凝固因子産生機構を明らかにし、血友病やVWDの新規の病態解析を行う。また、産生されたVWFやFVIIIはFVIII/VWF複合体を形成して血中に存在するが、VWFは高ずり応力下、FVIIIは低ずり応力下で主に働くとされているタンパクであり、実際のFVIII/VWFの結合や解離という相互作用が血流下血栓形成に及ぼす影響は未だ明らかでない。我々は血流下でのFVIII、VWFを中心とした血栓形成機構の解析し、産生から機能までを包括的に評価し、新規の血栓制御戦略を行っていく。

## 3. 研究の方法

ibidi社の循環ポンプシステムを使用し、種々の血管内皮細胞を種々の条件下にてフローチャンパー内で培養し、FVIIIやVWFの発現をELISAにて評価する。また免疫染色にて、これらの蛋白発現様式を可視化して評価する。

## 4. 研究成果

HUVECsを用いて層流、乱流のパターンかつ流速がhigh, lowのパターンで、血流がHUVECsに及ぼす影響を、血流下培養後にパラホルムアルデヒドで細胞を固定したのち、免疫染色を行ない、細胞形態変化の観察、細胞骨格の変化の観察、およびFVIII、VWFの発現量、発現形式の検討を行なった。(1)層流では細胞形態の変化が血流に沿っておきやすく、乱流では一定の方向性をみなかった。おそらく乱流方向に沿って変形していると思われる。層流でも血流がhighの方がlowに比べてその傾向が顕著であった。(2)形態変化にともない、細胞骨格の変形が認められた。細胞が一見変化していなくても、lowの血流であっても、血流により細胞骨格の変化が認められた。(3)VWF量は静止下に比べて層流で増加していたが、乱流では静止下と同等であった。FVIII量は静止下<層流<乱流という結果であった。血流がVWFとFVIIIの発現に影響を与えており、かつそれぞれのタンパクの産生は別の機序によって調節されていることが示唆された。細胞外へ放出されたVWF、FVIIIの測定も試みた。培養液中のVWF、FVIIIの濃度を一定条件で濃縮して測定した。FVIII、VWFはいずれも培養液中で測定感度未満であった。還流ポンプで培養できる細胞数に限界があるため、現在使用できるELISAでは感度が不十分である可能性はあるが、細胞からのVWF、FVIIIの放出はわずかにとどまると考えられた。(4)さいごに血管内皮細胞のこれらの変化が、血栓性に関連しているかどうかを検討するため、Tissue factorやNFkappaBを同様に免疫染色にて測定した。Tissue factorは層流では低下し、乱流で増加した。NFkappaBは層流で低下し、さらに乱流で低下した。NFkappaBが上昇すればTissue factorは上昇すると予想していたが、反する結果であったため、今後はこれらのメカニズムを検討していく予定である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yuka Kondo Yasuaki Shida Tomoaki Ishikawa Koji Yada Masahiro Takeyama Midori Shima Keiji Nogami	4. 巻 25(1)
2. 論文標題 A case of moderate haemophilia A with inhibitor, carrying the p.R1800H mutation, complicated with juvenile idiopathic arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haemophilia	6. 最初と最後の頁 51,54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hae.13648.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nogami K, Matsumoto T, Yada K, Ogiwara K, Furukawa S, Shida Y, Takeyama M, Shima M.	4. 巻 181(4)
2. 論文標題 Factor (F)VIII/VIIIa enhances global haemostatic function in the co-presence of bypassing agents and FVIII among patients with haemophilia A with inhibitor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 528,536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.15209.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nogami K, Matsumoto T, Yada K, Ogiwara K, Furukawa S, Shida Y, Takeyama M, Shima M	4. 巻 ahead of printing
2. 論文標題 Factor (F)VIII/VIIIa enhances global haemostatic function in the co-presence of bypassing agents and FVIII among patients with haemophilia A with inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Haematol	6. 最初と最後の頁 ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.15209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yagi H, Yamaguchi N, Shida Y, Sugimoto M, Tubaki K, Fujimura Y, Matsumoto M	4. 巻 159
2. 論文標題 Highly elevated plasma level of von Willebrand factor accelerates the formation of platelet thrombus under high shear stress in plasma with deficient ADAMTS13 activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Thromb Res	6. 最初と最後の頁 91-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2017.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yaoi H, Shida Y, Ogiwara K, Hosokawa K, Shima M, Nogami K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Role of red blood cells in the anemia-associated bleeding under high shear conditions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Haemophilia	6. 最初と最後の頁 750-758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hae.13252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hiroaki Yaoi, Yasuaki Shida, Keiji Nogami, Takehisa Kitazawa, Midori Shima
2. 発表標題 Impaired thrombus formation of von Willebrand Disease under high shear flow condition is improved by factor FVIIIa mimetic bispecific antibody(emicizumab)
3. 学会等名 world federation of hemophilia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢追博章, 志田泰明, 野上恵嗣, 北沢剛久, 嶋緑倫
2. 発表標題 VWD 各病型におけるEmicizumab の高ずり応力下での止血効果
3. 学会等名 第40回 日本血栓止血学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢追博章, 志田泰明, 野上恵嗣, 北沢剛久, 服部有宏, 嶋 緑倫
2. 発表標題 抗FIXa/FX-bispecific抗体 (Emicizumab) のType2N von Willebrand病での血流下血栓形成能の改善効果
3. 学会等名 第39回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroaki Yaoi, Yasuaki Shida, Takehisa Kitazawa, Kunihiro Hattori, Midori Shima, Keiji Nogami
2. 発表標題 FVIIIa Mimicking Bispecific Antibody (emicizumab) Improved Thrombus Formation of Type 2N von Willebrand Disease under Both High and Low Shear Conditions
3. 学会等名 International society of thrombosis and haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroaki Yaoi, Yasuaki Shida, Takehisa Kitazawa, Kunihiro Hattori, Midori Shima, Keiji Nogami
2. 発表標題 Activated FVIII Released From FVIII/WWF Complex Facilitates Thrombus Development Under Flow Condition
3. 学会等名 East Asia hemophilia forum (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuaki Shida, Hiroaki Yaoi, Takehisa Kitazawa, Kunihiro Hattori, Midori Shima, Keiji Nogami
2. 発表標題 Factor VIIIa mimetic bispecific antibody (emicizumab) improves thrombus formation of von Willebrand disease under high shear flow condition
3. 学会等名 East Asia hemophilia forum (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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	野上 恵嗣  (Nogami Keiji)  (50326328)	奈良県立医科大学・医学部・准教授    (24601)	