

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16073

研究課題名(和文)血栓性微小血管症モデルを用いた腎臓の血栓形成におけるADAMTS13の役割解明

研究課題名(英文) Analysis of a role of ADAMTS13 regarding thrombus formation in kidney

研究代表者

吉田 瑤子 (YOSHIDA, YOKO)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90649443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ADAMTS13は止血因子であるvon Willebrand因子の特異的切断酵素である。本研究は、全身のADAMTS13機能不全が血栓性微小血管症(TMA)における腎障害あるいはTMAを介さない腎障害の発症・進展に影響を及ぼすか否かを明らかにすること、さらには腎局所における同酵素の役割解明を目的とした。その結果、全身のADAMTS13欠損(KO)マウスに腎炎モデルを導入したところ、KOマウスにおける有意な生存率の低下とTMA様症状の出現を認めたため、現在、より詳細な解析を進めている。本研究の成果は、ADAMTS13を介した腎臓における血栓制御機構の解明に寄与することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADAMTS13-VWFと腎臓との関係性は未だ不明な点が多く、本研究の成果はADAMTS13を介した腎臓における血栓制御機構に新たな知見をもたらすことが期待される。また近年、先天性の血栓性血小板減少性紫斑病患者への新規治療薬として遺伝子組み換え型ADAMTS13の有効性が期待されているが、本研究の成果は将来的にこのような薬剤の腎臓における治療効果を提示し得る可能性を秘めており、社会的にも重要性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：ADAMTS13 is a specific cleaving protease of von Willebrand factor (VWF), which is a blood glycoprotein involved in hemostasis and thrombosis. In this study, we aim to clarify the effect of ADAMTS13 deficiency on kidney failure (with or without thrombotic microangiopathy) and the role of ADAMTS13 expressed in the kidney. Consequently, we revealed that some kind of challenge related to renal damage led to decreased survival and TTP-like symptoms in ADAMTS13 deficient mice. The results of this study may provide insights into the molecular mechanisms of ADAMTS13-mediated antithrombotic effect in the kidney.

研究分野：血栓止血学

キーワード：ADAMTS13 VWF 腎炎

1. 研究開始当初の背景

血栓性微小血管症 (Thrombotic microangiopathy, TMA) は細血管症性溶血性貧血、血小板減少、臓器障害 (主に腎臓や脳) を 3 主徴とする疾患の病理学的診断名である。この TMA に含まれる代表的な疾患として、血栓性血小板減少性紫斑病 (Thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) がある。TTP は全身の細小血管に血小板血栓が生じることで発症し、これは止血因子である VWF の特異的切断酵素: ADAMTS13 の酵素活性が著減することに起因する。VWF は多量体構造を形成する巨大な血漿糖蛋白質で、主に血管内皮細胞で産生され循環血漿中に放出されるが、放出直後は超高分子量 VWF 重合体 (ultra-large VWF multimer: UL-VWFM) 構造を有し、高い血小板凝集能をもつ。この UL-VWFM の分子サイズを減じ、病的血栓を抑制する酵素が ADAMTS13 である。

腎臓は TTP の主要標的臓器であり患者の約 7 割で腎障害を認めるが、ADAMTS13-VWF がどのような機序で腎臓における血栓形成に関与するかは明らかにされていない。全身の ADAMTS13 欠損 (KO) マウスを用いた TMA モデルの報告は過去に 3 報あるものの (引用文献 1, 2, 3) 腎臓について詳細に解析した報告は無く、中には腎障害が顕著でないモデルも存在する。さらに、腎系球体の血管内皮細胞や足細胞、尿細管細胞における ADAMTS13 の発現も確認されているが (引用文献 4) これら腎局所の ADAMTS13 の生理的意義や TMA の腎病変における動態も不明である。

2. 研究の目的

全身の ADAMTS13-KO マウスを用いて TMA モデルや腎障害モデルを作成し、ADAMTS13 欠損が TMA における腎障害や TMA を介さない腎障害における発症・進展に関与するか (加速因子となり得るか) 否かを明らかにするとともに、腎臓の血管内皮細胞や足細胞に発現する ADAMTS13 の生理的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TMA モデルマウスの作成

ADAMTS13-KO マウス及び WT マウスを用いて新規 TMA モデルマウスの樹立を試みた。TMA の評価には (1) 血小板減少、(2) 溶血性貧血、(3) 腎機能障害、(4) 主要臓器における血小板血栓の形成、を指標として用い、経時的な採血・採尿から血液学的解析 (Hb や血小板数) と生化学的解析 (腎機能、尿中アルブミン値及び血中 VWF の定量) を行った。組織学的解析は腎臓、心臓、肝臓、肺を中心に行い、形態学的変化の評価には HE や PAS, Masson & Trichrome 染色を、血栓の評価には PTAH 染色や VWF 抗体による免疫組織染色を用いた。

(2) 腎障害モデルマウスの作成

ADAMTS13-KO 及び WT マウスに種々の腎障害モデルマウスを導入し、全身の ADAMTS13 欠損が腎障害の程度、腎臓における血栓形成に与える影響を探索した。血液学的・生化学的解析や形態学的変化の評価は、上述の TMA モデルマウスと同様の方法を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) TMA モデルマウスにおける評価

ADAMTS13-KO マウス及び WT マウスを用いて新規 TMA モデルマウスの樹立を試みた。その結果、KO マウスにおいて TMA の臨床的特徴である Hb の減少や BUN の上昇を認め、新規 TMA モデルの樹立が期待された。しかしながら、WT マウスにおいても KO と同様の傾向を示す個体が少なからず存在し、両者に有意差は認められなかった。また、一部の KO マウスにおいて腎臓や心臓、肝臓、肺組織に血小板血栓の形成を認めたものの個体差が大きく、WT マウスでも軽度の血栓を認めた。これらの結果から、今回申請者が用いた負荷では新規 TMA モデルの樹立は難しいと判断し、TMA 病態における腎臓の詳細な解析には至らなかった。

(2) 腎障害モデルマウス (5/6 腎摘・シスプラチン腎症) における評価

5/6 腎摘による進行性腎障害モデルとシスプラチン投与による腎障害モデルについて検討したものの、ADAMTS13-KO 及び WT マウスでは、血圧や腎機能 (BUN, Cr や尿中アルブミン尿値) に有意な差を認めなかった。腎組織学的評価においても両群に差を認めなかった。本結

果より、全身の ADAMTS13 欠損単独では上記モデルの腎障害進展に影響を与える可能性が低いことが示唆された。

(3) 腎炎モデルマウスにおける評価

古くから免疫・炎症システムと血栓形成機構は密接に関連することが知られているが、近年、VWF 切断を介した ADAMTS13 の抗炎症作用が着目されている（引用文献 5）。これらの報告から着想を得て ADAMTS13-KO マウスに腎炎モデルを導入したところ、意外なことに KO マウスにおいて有意な生存率の低下、さらには TMA 様症状（血小板数や Hb の低下、主要臓器における血栓像）の出現を認めた。現在、本モデルの詳細な解析を実施している。

本研究課題においては、当初計画していた方法では TMA モデルの樹立をなし得なかった。そこで、ADAMTS13 の抗血栓作用ではなく抗炎症作用に注目して実験を進めたところ、ADAMTS13-KO の腎炎モデルにおいて TMA 様の症状を認めることが明らかとなった。現在、本モデルの分子学的解析を通して、ADAMTS13 による腎臓での血栓制御機構解明を目指している。また、これと並行して B6 系統マウスに適用可能な後天性足細胞障害モデルを ADAMTS13-KO マウスに導入し、腎局所に発現する ADAMTS13 の生理的意義の探索を計画している。

従来、ADAMTS13-KO マウスで病態解析が成されている腎障害モデルは、ストレプトゾシン投与による 1 型糖尿病モデル（引用文献 6）や虚血再還流モデル（引用文献 7）である。一方、腎炎に注目したアプローチは本研究が初めてである。ADAMTS13-KO マウスを用いた TMA (TTP) モデルの樹立といった観点においても、従来モデル (VWF の質や量、血管新生に関連する物質に焦点を当てている) とは一線を画す。このような背景から、本研究で得られた知見は学術的意義が高い。また近年、先天性 TTP 患者への新規治療薬として遺伝子組み換え型 ADAMTS13 の有効性が期待されているが、本研究を通して得られる成果は腎臓における本薬剤の治療効果を提示し得る可能性を秘めており、社会的にも重要性が高いと考えられる。

< 引用文献 >

1. Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, Homeister J, Lamb CB, Desch KC, Zhang W, Tsai HM, Wagner DD, Ginsburg D. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest.* 115, 2752-2761, 2005
2. Schiviz A, Wuersch K, Piskernik C, Dietrich B, Hoellriegel W, Rottensteiner H, Scheiflinger F, Schwarz HP, Muchitsch EM. A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood.* 119, 6128-6135, 2012
3. Erpenbeck L, Demers M, Zsengellér ZK, Gallant M, Cifuni SM, Stillman IE, Karumanchi SA, Wagner DD. ADAMTS13 Endopeptidase Protects against Vascular Endothelial Growth Factor Inhibitor-Induced Thrombotic Microangiopathy. *J Am Soc Nephrol.* 27, 120-131, 2016
4. Manea M, Kristoffersson A, Schneppenheim R, Saleem MA, Mathieson PW, Mörgelin M, Björk P, Holmberg L, Karpman D. Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 138, 651-662, 2007
5. Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, Walsh MT, Scheiflinger F, Wagner DD. ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med.* 205, 2065-2074, 2008
6. Dhanesha N, Doddapattar P, Chorawala MR, Nayak MK, Kokame K, Staber JM, Lentz SR, Chauhan AK. ADAMTS13 retards progression of diabetic nephropathy by inhibiting intrarenal thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37, 1332-1338, 2017.
7. Zhou S, Jiang S, Guo J, Xu N, Wang Q, Zhang G, Zhao L, Zhou Q, Fu X, Li L, Patzak A, Hultström M, Lai EY. ADAMTS13 protects mice against renal ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation and improving endothelial function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 316, F134-F145, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yoshida Y, Kato H, Ikeda Y, Nangaku M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Pathogenesis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 99-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.RV17026.	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 Saito D, Watanabe E, Ashida A, Kato H, Yoshida Y, Nangaku M, Ohtsuka Y, Miyata T, Hattori N, Oda S.	4. 巻 1
2. 論文標題 Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With the p.Ile1157Thr C3 Mutation Successfully Treated With Plasma Exchange and Eculizumab: A Case Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Crit Care Explor.	6. 最初と最後の頁 e0008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/CCE.0000000000000008.	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 Sugawara Y, Kato H, Yoshida Y, Fujisawa M, Kokame K, Miyata T, Akioka Y, Miura K, Hattori M, Nangaku M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Novel CFHR2-CFHR1 Hybrid in C3 Glomerulopathy Identified by Genomic Structural Variation Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney Int Rep.	6. 最初と最後の頁 1759-1762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ekir.2019.09.008	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 Yoshida Yoko, Kato Hideki, Ikeda Yoichiro, Nangaku Masaomi	4. 巻 26
2. 論文標題 Pathogenesis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 99 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.RV17026	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 Matsumoto Takeshi, Toyoda Hidemi, Amano Keishirou, Hirayama Masahiro, Ishikawa Eiji, Fujimoto Mika, Ito Masaaki, Ohishi Kohshi, Katayama Naoyuki, Yoshida Yoko, Matsumoto Masanori, Kawamura Naohisa, Ikejiri Makoto, Kawakami Keiki, Miyata Toshiyuki, Wada Hideo	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical Manifestation of Patients With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With the C3 p.I1157T Variation in the Kinki Region of Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis	6. 最初と最後の頁 1301 ~ 1307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1076029618771750	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 Fujisawa Madoka, Kato Hideki, Yoshida Yoko, Usui Tomoko, Takata Munenori, Fujimoto Mika, Wada Hideo, Uchida Yumiko, Kokame Koichi, Matsumoto Masanori, Fujimura Yoshihiro, Miyata Toshiyuki, Nangaku Masaomi	4. 巻 22
2. 論文標題 Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1088-1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-018-1549-3	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 Nakamura Hiroyuki, Oku Kenji, Ogata Yusuke, Ohmura Kazumasa, Yoshida Yoko, Kitano Etsuko, Fujieda Yuichiro, Kato Masaru, Bohgaki Toshiyuki, Amengual Olga, Yasuda Shinsuke, Fujimura Yoshihiro, Seya Tsukasa, Atsumi Tatsuya	4. 巻 164
2. 論文標題 Alternative pathway activation due to low level of complement factor H in primary antiphospholipid syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 63 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2018.02.142	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 Yamamura Tomohiko, Nozu Kandai, Ueda Hiroaki, Fujimaru Rika, Hisatomi Ryutaro, Yoshida Yoko, Kato Hideki, Nangaku Masaomi, Miyata Toshiyuki, Sawai Toshihiro, Minamikawa Shogo, Kaito Hiroshi, Matsuo Masafumi, Iijima Kazumoto	4. 巻 63
2. 論文標題 Functional splicing analysis in an infantile case of atypical hemolytic uremic syndrome caused by digenic mutations in C3 and MCP genes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 755-759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0436-9	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 Yoshida Yoko, Matsumoto Masanori, Yagi Hideo, Isonishi Ayami, Sakai Kazuya, Hayakawa Masaki, Hori Yuji, Sado Toshiyuki, Kobayashi Hiroshi, Fujimura Yoshihiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Severe reduction of free-form ADAMTS13, unbound to von Willebrand factor, in plasma of patients with HELLP syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1628 ~ 1631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2017006767	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 Yoshida Yoko, Kato Hideki, Nangaku Masaomi	4. 巻 3
2. 論文標題 Atypical hemolytic uremic syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Renal Replacement Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41100-016-0088-1	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田瑠子、西裕志、稲城玲子、南学正臣
2. 発表標題 免疫学的腎炎モデルにおける血栓制御機構の関わり
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田瑠子
2. 発表標題 抗Factor H自己抗体による非典型溶血性尿毒症症候群
3. 学会等名 第26回自己抗体と自己免疫シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida Yoko
2. 発表標題 Severe reduction of free-form ADAMTS13, unbound to von Willebrand factor, in plasma of patients with HELLP syndrome
3. 学会等名 第40回 日本血栓止血学会（招待講演）
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関