

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07420

研究課題名(和文) 癌の増大と転移へのADAMTS13/VWF 因子の影響

研究課題名(英文) Effect of ADAMTS13/VWF factors on cancer growth and metastasis

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1. 腎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。WTではVWF-KOに比べて血清Crは上昇し、組織にても尿管障害が強く、VWFは腎臓の虚血再灌流傷害悪化に関与していると考えられた。WTマウスに対してリコンビナントADAMTS13の投与にて腎臓の虚血再灌流障害は減少し、ADAMTS13は腎臓の虚血再灌流障害の予防や治療手段になりうると考えられた。2. 培養血管内皮細胞から分泌されたVWFに洗浄血小板を流動下で粘着させLLC肺癌細胞をADP存在下で流したところ肺癌細胞はVWF+血小板に粘着した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎機能障害は低酸素、低灌流、薬剤性や各種疾患にて惹起される。その一つである腎虚血再灌流傷害をVWFは惹起、増大させる因子であることが示され、VWFの機能を制御するADAMTS13が虚血再灌流傷害を減少させることが証明された。このことにより、ADAMTS13の投与により腎移植後の腎機能が現状よりもより温存される可能性が示唆され、社会的意義は大きいと考える。また、血管内皮細胞より分泌されたVWFに血小板とADP存在下に癌細胞が粘着することを観察した。VWFの機能を制御するADAMTS13の機能を考えると、ADAMTS13が癌の転移を抑制する可能性を示していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：1. We compared renal ischemia-reperfusion injury in wild type mice (WT) and VWF gene-deleted mice (VWF-KO). In WT mice, renal blood flow at 24 hours after reperfusion was decreased, serum Cr was increased, and tubular damage was stronger in tissues than in VWF-KO, suggesting that VWF is involved in the worsening of renal ischemia-reperfusion injury. In WT mice, recombinant ADAMTS13 improved ischemia-reperfusion injury, suggesting that VWF causes microthrombosis and leukocyte adhesion in renal ischemia-reperfusion injury, and that modulating VWF function by ADAMTS13 may be a means of preventing or treating renal ischemia-reperfusion injury. 2. When LLC lung cancer cells were flowed with washed platelets onto VWF secreted from cultured vascular endothelial cells under flow conditions, the lung cancer cells adhered to VWF and platelets in the presence of ADP.

研究分野：血栓止血学

キーワード：腎虚血再灌流傷害 VWF ADAMTS13 癌細胞

1. 研究の背景

VWFは血管が損傷を受けたときに露呈した内皮下組織に粘着して、循環する血液中の血小板を補足する事により、血小板を血管内皮下組織に粘着・固着させて一次血栓形成を行う血漿巨大糖蛋白質である。この一次血栓形成機能がVWF機能の主体として考えられてきたが、近年、VWFは血栓形成のみならず、局所にて白血球を粘着することなども明らかとなり、各種炎症とも関わっていることが報告されてきた。最近ではさらに、血管形成、平滑筋細胞増殖、腫瘍転移さらには免疫にも関与していることが明らかとなってきた。このVWFの働き、特に一次血栓形成機能を調整しているのが、VWF切断酵素ADAMTS13であり、血管内皮細胞から分泌された超高分子VWFを切断してその長さを調整することにより、VWFの一次血栓形成機能を制御していることが明らかとなっている。そこでわれわれは、ADAMTS13が血栓形成を制御していること、さらにVWFを介して炎症も制御している可能性について検証してきた。

血栓制御機能に関しては、ADAMTS13が血小板血栓形成中の血栓表面においても、ずり応力依存性にVWFを切断しており、血栓の血管内腔進展制御という役割をADAMTS13が担っていることを示し、ADAMTS13が出血傾向を来さない（血管内皮下を一次血栓が埋め尽くす際には、ずり応力が弱くなりVWFを切断せず血栓形成に影響を与えない）が、血栓が血管内腔に増大してしまう病的血栓形成を制御できるという、出血を来さない新たな抗血栓薬になりうる可能性を示唆した（Shida Y, Nishio K, 他8名2番目corresponding author2人のうち1人、Blood 111:1295-1298, 2008）。続いて、ADAMTS13はVWF機能制御により、抗血栓性と抗炎症性を発揮すると考え、その仮説をin vivoで確認するために、虚血と炎症で形成される虚血再灌流傷害（長時間虚血にさらしていると灌流領域は壊死に陥るが、虚血時間を短くして壊死を起こす前に再灌流を起こすと、血管内皮傷害により炎症が惹起されるため、虚血領域よりも広い範囲に傷害が惹起される）に対するADAMTS13の影響を、ADAMTS13ノックアウトマウスなどを用いて各臓器につき検討してきた。これまでに、脳（Fujioka M, Nishio K, 最後, corresponding author 他14名、Blood 115, 1650-1653, 2010）、心臓（Doi M, Nishio K, 7番目、他9人、Thromb Haemost. 108(6):1236-1238, 2012）、肝臓（Urisono Y, Nishio K, 7番目、他10人、Thromb Haemost. 118(4) 700-708. 2018）の虚血再灌流への影響を検討してきたが、すべてADAMTS13ノックアウトで傷害は増大し、ワイルドタイプへのリコンビナントADAMTS13投与により傷害は減少した。

また、現在はがん転移にも注目している。古くより血小板凝集塊やフィブリンクロットが転移を促進し、抗凝固はがん転移抑制に働くことも報告されてきた。癌転移のごく初期、癌細胞の血管内皮細胞への接着に関しては、血管内皮細胞から定期的に分泌されるUL-VWFも関与しているのではないかと推察し、UL-VWFの長さを

調整しているADAMTS13が癌細胞の血管内皮への粘着を抑制し転移を抑制する可能性を考えた。

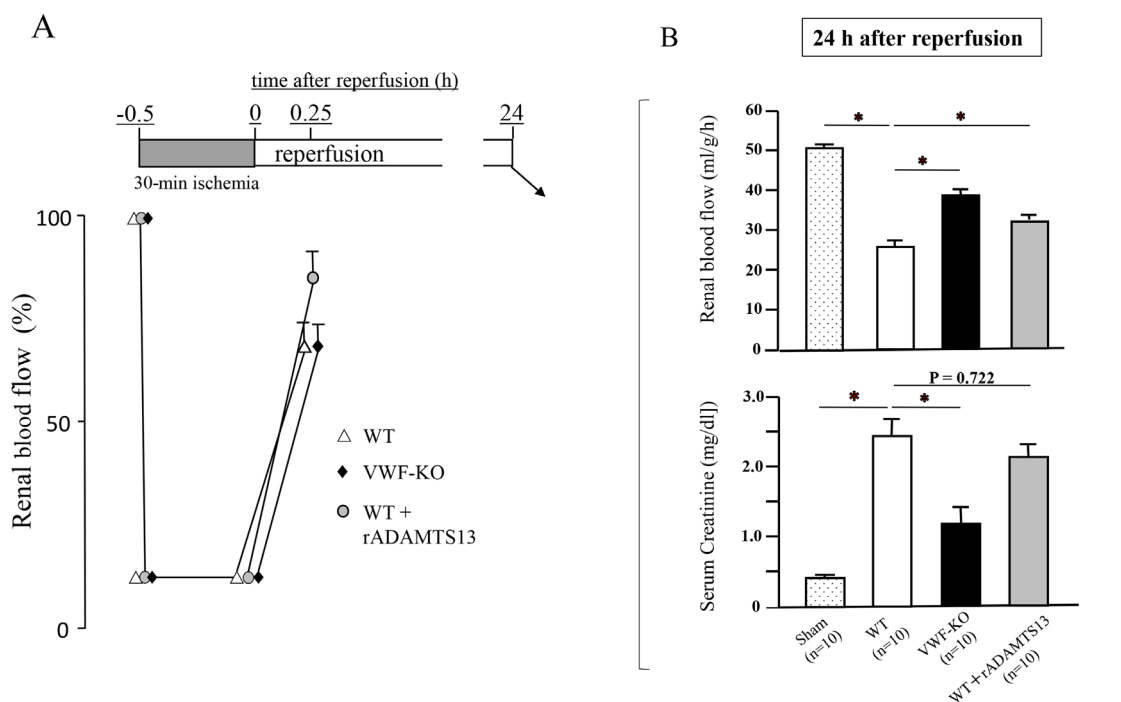
2. 研究の目的

今回は腎臓に注目した。腎移植は虚血再灌流傷害そのものを起こすであろうから、今までと同様にADAMTS13が腎の虚血再灌流傷害を減弱できるのであれば、移植後の腎機能温存に効果があるかもしれないと考え、実験を行った。また、がん転移へのADAMTS13/VWF因子の影響を観察することも行った。

3. 研究の方法

i. 腎臓の虚血再灌流傷害をWild type マウス(WT)、VWF gene-deletedマウス(VWF-KO)および虚血15分前にリコンビナントADAMTS13をWTマウスに注入したマウス (VWF-KO+rADAMTS13) を用いて比較検討した。虚血は片腎を摘出したマウスの腎門部をクリップで30分閉塞し、再開通後15分後と24時間後に腎表面の血流を測定し、血清Cr、腎組織分析 (VWFの免疫染色含む) を行った。

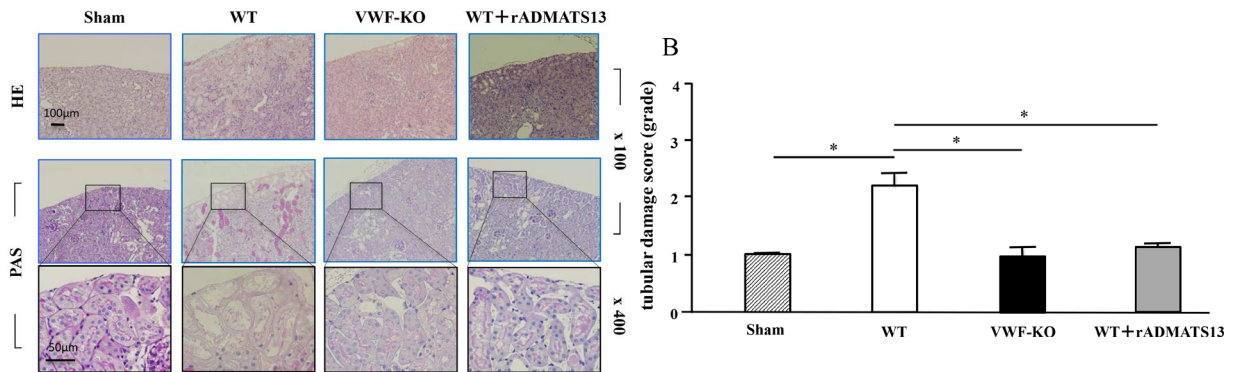
4. 研究成果



図表Aは腎表面の血流を測定したものであるが、それぞれのマウスでは30分の腎動脈虚血後15分で血流は前値の70-80%まで戻っていた。

図表Bでは再灌流後の血流はWTマウスに比して、VWF-KOマウスとWT+rADAMTS13マウスでは有意に高めに保たれており、保たれた血流の速さ呼応するようにVWF-KOマウスでは血清Crの上昇が抑えられていた。

次に組織を示します。HE染色とPAS染色です。そして右の図が尿細管の損傷を各々15枚ずつの範囲からスコア化したものです。



図に示すようにWTマウスでの腎尿細管損傷はVWF-KOマウスやWTにrADMATS13を注入したマウスなど強かった。以上より、VWFは腎虚血再灌流傷害に対して、悪化させる方向に働き、その機能を調節するADAMTS13は腎虚血再灌流傷害を軽減させ得る薬剤になり得ると考えられた。以上よりrADMATS13は腎移植後の腎保護薬として新たなオプションになり得ると推察された。

ii. VWFへの癌細胞粘着実験

フローチェンバー内に血管内皮細胞を培養し、ヒスタミンなどにより血管内皮細胞を刺激してVWFを分泌させ、そこに洗浄血小板を流し同時に培養したLLC肺がん細胞を流動化で添加したが、LLC肺がん細胞は粘着しなかった。そこでADPを添加したところ、肺がん細胞は流動化で血小板が粘着したVWFに粘着した。今後は粘着に関わる因子の分析なども行っていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shiro Ono, Hideto Matsui, Masashi Noda, Shogo Kasuda, Noritaka Yada, Kiyomi Yoshimoto, Masashi Akiyama, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto & Kenji Nishio	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional regulation of von Willebrand factor ameliorates acute ischemia-reperfusion kidney injury in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51013-2	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 N.Nishimura, N. Yada, A. Kakiwaki, A. Sawa, S. Senzaki, H. Kawashima, R. Yoneima, Y. Tai, S. Ono, K. Yoshimoto, K. Nishio
2. 発表標題 The FDP/D-dimer ratio and LDH/Hb ratio are useful to distinguish between TTP and DIC
3. 学会等名 ISTH（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noritaka Yada, Emiko Tsushima, Nobushiro Nishimura, Hiromasa Kawashima, Ryo Yoneima, Shiro Ono, Kiyomi Yoshimoto, Tomoko Onishi, Tomoko Matsumoto, Hidetada Fukushima, Kenji Nishio
2. 発表標題 Coagulation and fibrinolysis waveform analysis may identify the patients susceptible for multiple organ failure and thrombocytopenia in septic DIC
3. 学会等名 ISTH（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A.Kakiwaki, N. Yada, E. Tsushima, Y. Tai, M. Miyamoto, S. Ono, K. Yoshimoto, K. Nishio
2. 発表標題 Red Blood Cells Transfusion Can Improve Hemostatic Dysfunction of Heyde Syndrome
3. 学会等名 ISTH（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------	---------