

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592095
 研究課題名 (和文) フォンヴィレブランド因子切断酵素による血栓形成制御に関する研究
 研究課題名 (英文) Study for the regulation of thrombogenesis by von Willebrand factor cleaving enzyme
 研究代表者
 西尾 健治 (NISHIO KENJI)
 奈良県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：60254489

研究成果の概要：怪我をして出血すると、人は出血を抑え止血するために血液を凝固させる。この凝固反応は絶妙に調節され、体内では血液を凝固させず血管内を循環させ、何かあると凝固が進行するようになっている。この凝固反応が強すぎると心筋梗塞や脳梗塞などの血栓症をおこしてしまう事になる。この絶妙な調節をしている因子の一つと考えられる、von Willebrand factor (フォンヴィレブランド因子) 切断酵素であるADAMTS13に注目し研究を行なった。そして、ADAMTS13が止血血栓の形成は抑制しないが、その血栓の血管内腔への進展を抑制し、血管閉塞を防止している可能性を明らかにした。そしてさらに、ADAMTS13ノックアウトマウスを用い、ADAMTS13が血小板血栓形成抑制と抗炎症作用により脳虚血再灌流障害を抑制していることを示し、ADAMTS13が出血傾向を伴わない脳梗塞治療・予防薬、抗血栓・抗炎症剤となりうる可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：VWF, ADAMTS13

1. 研究開始当初の背景

近年の死因の上位を占める心筋梗塞や脳梗塞などに対して、従来血液凝固阻害薬や抗血小板薬が使用されてきたが、個人に応じた至適量の決定が困難であり、元来これらの薬剤は止血血栓形成も抑制するため、副作用である出血傾向に悩まされて

きた。そこで止血血栓形成は抑制しないが、病的血栓形成は抑制するという薬剤の開発が待たれている。

我々は従来の血液凝固阻害薬や抗血小板薬に対し、第3種の薬剤開発を夢とし、さらなる動脈血栓の形成のメカニズムを明らかにするため、von Willebrand 因子

(VWF) に注目し研究を行ってきた。この VWF は傷害された動脈のような流速の速い血管にできる止血血栓形成の first step に必要で、血小板が傷害により露出された血管内皮下組織に粘着するための橋渡しをするものである。最近、この VWF を切断し VWF の長さを調節することにより VWF の機能を調節している蛋白-VWF 分解酵素 ADAMTS13-が発見された。ADAMTS13 機能障害では動脈の微小血栓が全身に惹起される血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)がおこることが知られ、この蛋白は生体内で実際に VWF 機能を調節している蛋白である事を示している。すなわち ADAMTS13 は抗血小板血栓剤として働く可能性が推測される。

以上の背景により ADAMTS13 と VWF の機能連関を明らかにする事が動脈血栓の予防・治療に繋がるものと推察された。

2. 研究の目的

VWF は 2050 のアミノ酸よりなる一つの subunit が多重に重合した状態で血液中を循環している蛋白である。Subunit には A1A2A3 と 3つの A ドメインが連続的に並んでおり、ADAMTS13 は A2 ドメインを切断する。しかし、ADAMTS13 が A2 ドメインを切断するには、in vitro の環境においては VWF を尿素やグアニジンにより人為的に stretch するか、A2 ドメインの ADAMTS13 作用部だけの truncation mutant を作成する必要があった。これらより、生体内で ADAMTS13 が VWF を切断するには、VWF が血流により stretch されることが重要である事が示唆されていた。さらに我々は血小板が VWF に結合することにより ADAMTS13 による VWF の切断が亢進する事も見出した。そこで、今回 ADAMTS13 が in vitro において flow chamber システムを用い、全血流動下での血小板と VWF と ADAMTS13 の機能連関を明らかにする事を第 1 の目的とした。また in vivo においては、ADAMTS13 機能障害で生じる TTP が脳障害を呈する事と、マウスの脳虚血再灌流モデルでは微小血小板血栓が認められることより、ADAMTS13 ノックアウトマウ

スを用い脳虚血再灌流障害と ADAMTS13 の関連を明らかにする事も第 2 の目的として実験を行なった。

3. 研究の方法

(1) 全血流動下フローチェンバーによる ADAMTS13 機能の観察

ガラスプレートにコラゲンや VWF を固相化し、ガasket とともにフローチェンバーに組み込み、リアルタイム共焦点走査顕微鏡にセットし、血小板などを蛍光標識した全血をシリンジポンプでチェンバー内に種々のずり速度となるように流して、血小板血栓形成を体積や密度を測定して観察した。場合により各種抗体を蛍光標識して血小板血栓の質的診断も行なった。

(2) マウスを用いた脳虚血再灌流実験

脳虚血再灌流傷害モデルは閉塞した血管を再開通しても再び血流が途絶する no reflow 現象を再現できるモデルとして知られ、脳の末梢に血小板を主体とした血栓が生じる事が原因とされる。今回われわれはこの再灌流障害に ADAMTS13 が関与しているかどうかを検証するために実験を行なった。ADAMTS13 ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスを用いて、左総頸動脈より栓子を左内頸動脈から左中大脳動脈 (MCA) へと進入させて、30 分間 MCA を閉塞 (MCAO) 後、栓子を引き抜き MCA を再灌流させ、MCA 灌流領域の脳表血流変化、24 時間後の脳梗塞体積、組織の変化を両群マウスで比較検討した (図 1)。

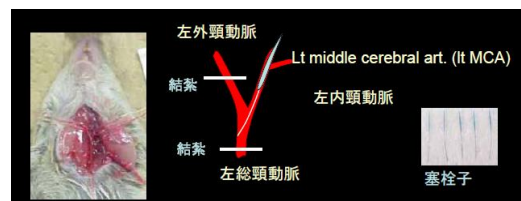


図 1 30 分左中大脳動脈閉塞 (MCAO) 後再灌流実験

左総頸動脈より内頸動脈へと栓子を挿入し、左中大脳動脈(MCA)を閉塞させ、30 分後栓子を引き抜き、Willis 動脈輪を介し対側より左 MCA へと血流を再灌流させて、MCA に灌流される脳表の血流速、また 24 時間後の脳梗塞体積を、wild type と ADAMTS13 ノックアウトマウスで比較した。

4. 研究成果

(1) 全血流動下フローチェンバーによる ADAMTS13 機能の観察

① ADAMTS13 活性を阻害する抗体存在下・非

存在下でのコラゲン上血小板血栓形成を比較することにより ADAMTS13 の影響を観察した。

低ずり応力下での血小板血栓形成には抗体の存在下・非存在下では差が無かったが、高ずり応力下 12000S^{-1} 下での血小板血栓形成では、ADAMTS13 の機能を抑制すると、血小板血栓がコントロールに比べ大きくなる事が示された (図 2)。

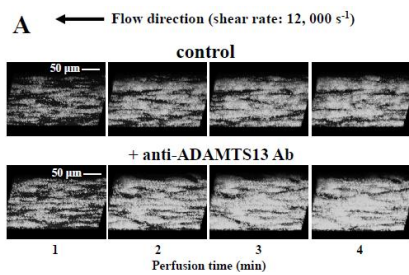


図 2 高ずり応力下血小板血栓形成に対する抗 ADAMTS13 阻害抗体の影響

コラゲンを固着させたガラスプレート上に蛍光標識した血小板を含む全血をずり速度が 12000S^{-1} の条件で流し、4 分間血小板血栓の形成を観察した。コントロールの上段比し、ADAMTS13 阻害抗体存在下では下段に示すように血小板血栓の増大を認めた。

他に計 10 人の全血を使用しても同様の結果であった。この成果は血小板血栓形成制御に ADAMTS13 がリアルタイムに関与しているという新たな ADAMTS13 機能の存在を世界で初めて証明するきっかけとなった。

②血小板血栓の質的診断 (血栓形成に対する ADAMTS13 活性の関与)

蛍光標識された 2 種の抗体を用いて高ずり応力下で形成される血小板血栓を染色し共焦点顕微鏡で観察し血栓の質的診断を行なった。2 種の抗体は ADAMTS13 が働いた時だけ VWF と反応する抗 VWF 抗体 (N10 抗体: VWF の A2 ドメインの ADAMTS13 によって切断された断端を認識する、赤色蛍光) と一般の抗 VWF 抗体 (緑色蛍光) である。結果は図 3 で示すように抗 N10 抗体に血小板血栓は染まり、それも血栓表面で染まることが示された。すなわちこの方法により ADAMTS13 活性の可視化に成功し、ADAMTS13 が血小板血栓形成時に血栓表面で働いていることが示された。

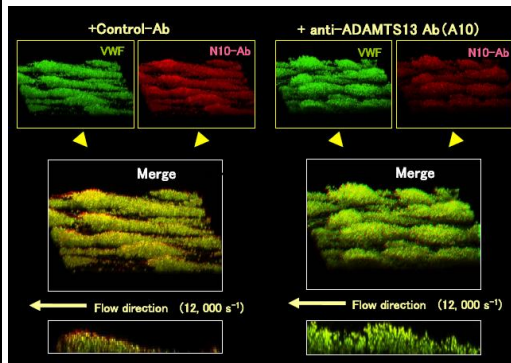


図 3 高ずり応力下で形成された血小板血栓の質的解析
図 1 で形成された血小板血栓を抗 VWF 抗体 (緑色) と抗 N10 抗体 (赤色) にて 2 重染色をおこなった。図 2 A の右 2 枚は ADAMTS13 阻害抗体存在下の血小板血栓で左 2 枚はコントロールであるが、N10 抗体は ADAMTS13 によって切断された VWF のみに反応するので抗 ADAMTS13 阻害抗体存在下では赤色が弱く ADAMTS13 が働いていないのがわかる。一方コントロールでは血栓が赤く染まり、ADAMTS13 が働いているのが分かる。図 2 B、2 C は図 2 A をそれぞれの画像を融合したものであるが、抗 ADAMTS13 阻害抗体存在下では緑色であるが、コントロールでは黄色に染まっており、図 2 C の血栓断面像では赤色が血栓表面に位置しているが分かる。すなわち血栓形成表面で ADAMTS13 優位に働いている。

③ADAMTS13 活性とずり応力の関係

続いて種々のずり応力と ADAMTS13 の活性の関係を観察した。図 2 で示した方法にて ADAMTS13 の活性を血小板血栓の表面で観察することが出来たので、ずり応力を変化させて ADAMTS13 の活性程度を観察した。

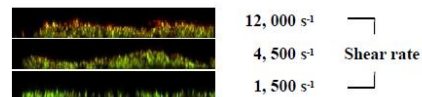


図 4 ずり応力と ADAMTS13 活性の関係

ずり応力を 12000S^{-1} 、 4500S^{-1} 、 1500S^{-1} と変化させて図 2 と同様の方法で ADAMTS13 活性発現を可視化し、ずり応力と ADAMTS13 活性の関係を観察したところ、 1500S^{-1} のずり速度ではほとんど ADAMTS13 は働いておらず、 12000S^{-1} で旺盛に働いていることが示された。

図 4 で示すように、ずり応力が増加すればするほど ADAMTS13 の活性発現が増加している事を示した。

④結論 (血小板血栓と ADAMTS13 の関係)

—in vitro 実験—

これらの事より ADAMTS13 は血小板血栓が形成されていくその瞬間にもずり応力依存性に働いているという新たな機能を証明できたと考える。これまでに議論されてきた ADAMTS13 の機能は、内皮細胞より分泌された

巨大なまでに VWF subunit が重合した VWF を適度な長さに調整することであったが (図 5)、今回の研究において画期的な ADAMTS13 の抗血栓機能明らかとなったわけである。つまり図 6 に示すように傷害された血管の血管内皮下組織に粘着した VWF と血小板は止血血栓を形成した後、血栓は増大し続けるが、

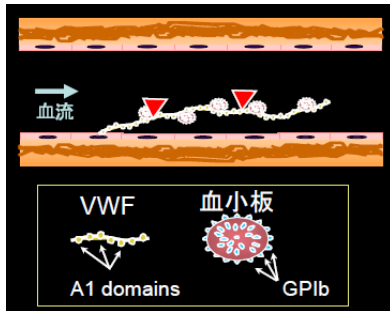


図 5 血管内皮細胞より分泌された巨大 VWF の ADAMTS13 による切断

血液循環中の VWF は適度な長さに調節されているが、血管内皮より分泌された巨大 VWF は血小板が多数粘着し stretch され ADAMTS13 により切断されることが知られている。

血栓の内腔進展にしたがい血栓表面に流れる血流の流速は速くなり、血栓表面の血小板にかかるずり応力は増大する。血小板にかかるずり応力の増大にしたがい VWF は stretch され ADAMTS13 により切断されやすくなると言う分子機構の存在が推測される。

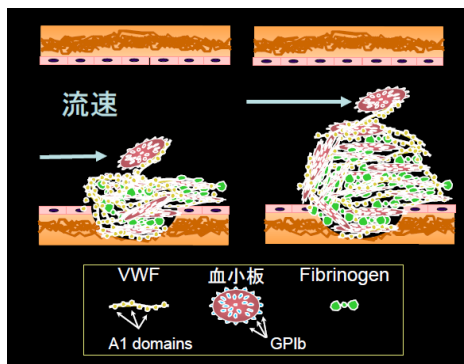


図 6 血小板血栓の血管内腔進展に対する ADAMTS13 の抑制作用

血管が傷害され血管内皮下組織が露出されるとまずは VWF が粘着し、その VWF に血小板が粘着、その血小板の上にまた VWF が粘着するというプロセスを繰り返して血小板血栓は増大していくが、そのまま増大していくと血管を閉塞する病的血栓となってしまう。その止血血栓から病的血栓への移行を ADAMTS13 が制御している。つまり血栓の内腔進展に従い、血小板の受けるずり応力は増大し、それに伴いより進展された VWF が ADAMTS13 に切断される。

以上より、ADAMTS13 は止血血栓には影響を与えず、止血血栓から病的血栓となって血管閉塞のみ抑制する、つまり出血はしないが血栓形成は抑制するという、夢の薬剤となる可能性を秘めている事が明らかとなった。

(2)マウスを用いた脳虚血再灌流実験

我々はさらに ADAMTS13 の生体内での働きを検証するために、ADAMTS13 ノックアウトマウスを用い、30 分間の中大脳動脈虚血再灌流障害実験をおこなった。

①再灌流後の脳表面血流速度

図 7 に示すように再灌流後の脳血流は ADAMTS13 ノックアウトマウス群 (KO) はワイルドタイプマウス群 (WT) に比し再灌流後より徐々に低下し 30 分以内に有意に低下した。

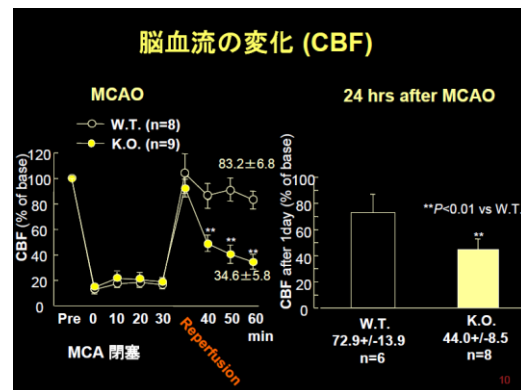


図 7 MCAO 後の脳血流変化

左中大脳動脈 MCA が灌流する脳表の血流を LASER ドップラーで測定したところ、中大脳動脈閉塞時 (MCAO) にはワイルドタイプマウス群 (WT) も ADAMTS13 ノックアウトマウス群 (KO) も血流は前値 (Pre) に比較して 20% 前後に低下したが、再灌流時 (Reperfusion) には両群共に前値に戻ったが、KO 群では WT 群より徐々に有意に低下し 20 分から 30 分後には前値の 3 分の 1 程度となった。この低下は 24 時間後も持続していた。

この現象は脳虚血再灌流障害時に KO 群では血小板血栓が WT 群より多量に生じて血流速度がより低下する事を示している。つまり、再灌流障害では、一過性虚血で傷害された血管内皮上に血小板血栓が形成され、血栓は徐々に大きくなり内腔に進展していくと、血栓はより大きいずり応力を受けるようになる。そして既述のフローチェンバー実験で示した理論のように、ADAMTS13 の活性が発現されて、血栓表面の VWF が切断され血栓の成長が制御されるが、ADAMTS13 活性の欠如した

KO 群では必ず応力依存性に ADAMTS13 活性が発現されず、血小板血栓の内腔進展を防げず、血管閉塞を来たしていると考えられる。

②MCAO24 時間後の脳梗塞体積

MCAO 後 24 時間で生じている脳梗塞の体積を KO 群、WT 群で比較したところ、KO 群では有意に脳梗塞が大きかった。また生存率には両群間では差がなかった (図 8)。

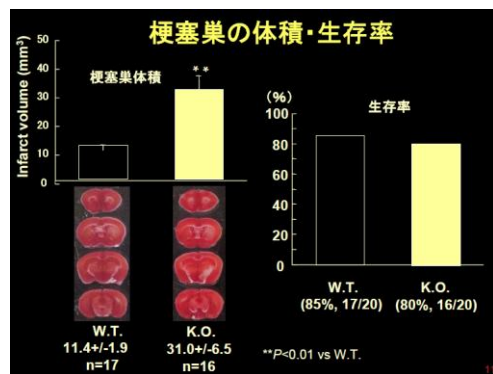


図 8 脳梗塞巣の体積と生存率 (WT 群 vs KO 群)

MCAO24 時間後に大脳を取り出し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を行なった。TTC は活動しているミトコンドリアに取り込まれるので、活動の停止した細胞には TTC の赤い色を取り込まれず白くぬけるが、この領域を脳梗塞と判断して体積を計算した。脳梗塞は大脳皮質には殆ど認められず基底核に認められたが、KO 群では WT 群に比し、有意に脳梗塞巣の体積が増加していた。しかしながら生存率では有意さが無かった。また出血などの病変は認められなかった。

この事は ADAMTS13 が脳虚血再灌流障害発症に重要な役割を果たしている事を示している。同様な現象は脳梗塞の病変、特に梗塞周囲においても生じていると考えられるので、ADAMTS13 は脳梗塞患者に投与されると梗塞巣の減少に寄与する可能性が示唆される。つまり ADAMTS13 は脳梗塞患者の予防や治療に有効である可能性があり、前述したように出血傾向を示さず、夢の薬となる可能性がある。

以上、ADAMTS13 機能解析を in vitro おいて行ない、止血血栓が病的血栓へ移行するのを ADAMTS13 が制御していること、そしてその理論をマウスを用いた in vivo 実験にて証明した。これらの事実は ADAMTS13 の抗炎症作用を考えると、まったく新たな ADAMTS13・VWF を機軸とした抗血栓・抗炎症薬の開発を切り開くものと期待される。

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 2 件)

- ① Yasuaki Shida, Kenji Nishio, Mitsuhiro Sugimoto, Tomohiro Mizuno, Masaaki Hamada, Seiji Kato, Masanori Matsumoto, Kazuo Okuchi, Yoshihiro Fujimura and Akira Yoshioka. Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions Blood 111:1295-1298, 2008 (査読有)
 - ② 杉本充彦、志田泰明、西尾健治. 血流量における ADAMTS13 活性発現機構 血液・腫瘍科 56:717-723, 2008 (査読無)
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 西尾健治、福島英賢、奥地一夫、志田泰明、杉本充彦、吉岡章. 血流影響下 ADAMTS13 活性発現メカニズム. 第 35 回日本救急医学会総会 (大阪府大阪市、平成 19 年 10 月 17 日)
 - ② 志田泰明、杉本充彦、水野智寛、濱田匡章、吉岡章、西尾健治、奥地一夫、加藤誠司、松本雅則、藤村吉博. 血流下での ADAMTS13 による壁血栓成長制御メカニズム— 速度との機能連関解析. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会 (三重県志摩市、平成 19 年 11 月 16 日)
 - ③ 西尾健治、藤岡政行、福島英賢、奥地一夫、坂野史明、小亀浩市、宮田敏行. AMTS13 による脳虚血再灌流障害抑制効果. 第 36 回日本救急医学会総会 (北海道札幌市、平成 20 年 10 月 13 日)
 - ④ Kenji Nishio, Masayuki Fujioka, Kazuhide Hayakawa, Kenichi Mishima, Michihiro Fujiwara, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yasuaki Shida, Mitsuhiro Sugimoto, Hidetada Fukushima, Kazuo Okuchi. ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage. The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology (San Francisco, USA 2008, December 8th)
 - ⑤ Kenji Nishio, Masayuki Fujioka, Kazuhide Hayakawa, Kenichi Mishima, Michihiro Fujiwara, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata,

Yasuaki Shida, Mitsuhiko Sugimoto,
Hidetada Fukushima, Kazuo Okuchi.
Neuroprotective role of ADAMTS13
on ischemia-reperfusion injury.
The 14th Meeting on Thrombosis &
Rheology. (Tokyo, Japan, 2009
March 14th)

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・准教授

研究者番号：60254489

(2) 研究分担者

福島 英賢 (FUKUSHIMA HIDETADA)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90347568