

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008-2010

課題番号：20590794

研究課題名（和文）重症肝疾患における ADAMTS13 の動態解析と制御機構の解明

研究課題名（英文）Determination of ADAMTS13 and its regulation mechanism
in severe liver disturbance

研究代表者

植村 正人（UEMURA MASAHIRO）

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90151836

研究成果の概要（和文）： von Willebrand 因子特異的切断酵素（ADAMTS13）が著減すると、血小板と最も反応性に富む超高分子量 VWF マルチマーが増加し、主要諸臓器の微小循環障害が惹起される。本研究では ADAMTS13 を軸に、ADAMTS13 の低下と VWF 依存性血小板凝集、肝微小循環障害から多臓器不全という新しい観点から重症肝障害の病態形成を見直し、ADAMTS13 の動態解析と制御機構の面から臓器・組織障害の本態に迫り、新規治療の開発をめざす。

研究成果の概要（英文）： ADAMTS13 is a metalloproteinase produced exclusively in hepatic stellate cells and specifically cleaves highly multimeric von Willebrand factor (VWF). Deficiency of ADAMTS13 results in accumulation of unusually large VWF multimers (UL-VWFM) in plasma, in turn induces platelet clumping or thrombi under high shear stress, followed by microcirculatory disturbances. The present study is to elucidate further understanding of the pathophysiology of liver injury and hepatic failure from the point of the decrease in ADAMTS13 and the increase in VWF-dependent platelet aggregations and subsequent sinusoidal microcirculatory disturbance and multiorgan failure. These investigations based on the determination of ADAMTS13 and its regulation promise to bring further understanding of the pathogenesis of advanced liver disturbances, and offer new insight for development of therapeutic strategies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
平成 21 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
平成 22 年度	800,000 円	240,000 円	1,040,000 円
年度			
年度			
総計	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

研究代表者の専門分野：消化器・肝臓病学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：ADAMTS13, 肝星細胞, 微小循環障害, 多臓器不全, 肝不全, 肝硬変, 劇症肝炎, アルコール性肝炎, インヒビター

1. 研究開始当初の背景

(1) ADAMTS13は近年脚光を浴び、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は本酵素が低下した病態であることが明らかにされた。ADAMTS13は、血小板と最も反応性に富む超高分子量VWFマルチマー (unusually large VWF multimer, UL-VWFM) を分解するが、本酵素活性が低下するとUL-VWFMが増加し、血小板血栓形成傾向となり諸臓器の微小循環障害が惹起される。重篤な急性ならびに慢性肝疾患では血小板減少と共に、肝を始めとする諸臓器の微小循環障害が出現し、多臓器不全が招来するが、その発生機序は未だ十分解明されていない。

(2) 研究代表者は平成17年度～19年度に基盤研究(C)「ADAMTS13の解析と重症肝疾患における微小循環障害の発生機序の解明」の下、ADAMTS13に対する特異的モノクロナール抗体を作成し、本酵素が肝星細胞で産生されることを明らかにした。一方、重症肝障害では、ADAMTS13の基質であるVWF抗原の血漿レベルは著増し、肝細胞脱落後の線維化部に一致してVWF抗原が強く表出される。すなわち、急性・慢性肝障害時には類洞内皮細胞からVWF抗原の産生が高まり、VWF抗原を分解するADAMTS13が類洞内皮細胞を裏打ちする肝星細胞で産生されることを鑑みると、ADAMTS13の産生・活性動態は肝障害時における類洞内微小循環障害、肝障害の進展に重要な役割を担っている可能性が想定される。劇症肝炎肝組織における類洞内凝固の存在、肝硬変進展と共に門脈・肝静脈血栓が高率である事実はこの仮説を指示する。

(3) 研究代表者は本学輸血部との共同研究により、慢性肝疾患、アルコール性肝炎、

重症アルコール性肝炎、急性肝炎、急性肝不全、特発性門脈圧亢進症、造血幹細胞移植後に合併するveno-occlusive disease

(VOD)の血漿ADAMTS13活性が低下することを見出し、本学消化器外科との共同研究により、肝移植後早期の血小板減少には、血漿ADAMTS13活性の著減が関与し、ischemic-reperfusion injuryおよび早期拒絶の一要因になる可能性を指摘した。さらに、進行した肝硬変、重症アルコール性肝炎、多臓器不全合併劇症肝炎死亡例における血漿ADAMTS13活性はTTPに匹敵する程度にまで著減する症例が存在し、本酵素活性の低下が肝不全の発症・進展および多臓器不全合併に関与する可能性を指摘した。

しかし、重症肝障害においてなぜADAMTS13活性が低下するのか、本酵素活性著減時に真に類洞内微小循環障害が出現し、それが肝障害の発症・進展、多臓器不全合併に関与しているのかは不明である。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、肝疾患における血漿ADAMTS13活性を測定し、臨床病理学的検討をさらに発展させると共に、重症肝障害におけるADAMTS13活性低下機序および本酵素活性著減時における類洞内微小循環障害、肝障害の発症・進展、多臓器不全合併の関与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ADAMTS13活性低下の機序を解明する為に、臨床的には、検出し得たインヒビターが抗体依存性か非依存性かを検討し、後者の場合、サイトカイン、エンドトキシン(Et)、好中球エラスターゼ活性(PMNE)とADAMTS13

活性との関連を検討する。実験的には、ADAMTS13ノックアウト(KO)マウスを用いて急性・慢性肝不全モデルを作成し、肝障害、多臓器不全の程度、ADAMTS13、VWF 抗原の表出動態を Wild type と対比検討する。また、培養肝星細胞の ADAMTS13 産生・分泌動態を検討する。

4. 研究成果

(1) 重症肝疾患における血漿ADAMTS13活性動態と意義およびADAMTS13活性低下機序

肝硬変末期では、血漿ADAMTS13活性はTTPと同程度にまで著減(<3%)し、TTPで検出された本酵素に対するIgG抗体を証明した。すなわち、TTP合併肝硬変と明らかなTTPの臨床徴候を呈さない末期肝硬変を区別することは困難であり、ADAMTS13活性が著減、IgGインヒビター陽性末期肝硬変はTTP類似状態あるいは” subclinical TTP” という疾患概念を提唱した。一方、本酵素活性中等度～軽度低下(3%～50%)ではインヒビター活性はmarginal zone (0.5 -1.0 BU/ml)であり、IgG抗体を検出し得なかった。同様にアルコール性肝炎、重症アルコール性肝炎、急性肝炎重症型、劇症肝炎においても、本酵素活性中等度～軽度低下例ではインヒビター活性はmarginal zoneでIgG抗体陰性であった。これら非依存性ADAMTS13活性低下には、高サイトカイン血症、高Et血症、PMNE活性の高値が、ADAMTS13活性低下と密に関連することを見出した。なお、健常人にエタノール負荷後の血漿ADAMTS13活性は、ALDH2遺伝子正常ホモ接合体に比し、ヘテロ接合体においてより高度に低下することを観察している。また、重症急性膵炎(SAP)発症早期に血漿ADAMTS13活性は低下し、これがSAPの重症度、膵灌流障害の一役を担っている可能性を指摘した。

(2) ADAMTS13-KOマウスを用いての検討

GALN+LPS投与急性肝不全マウスにおいて、肝は広範囲な出血性壊死を呈し、投与後9, 12, 15時間の死亡率は、wildマウスではそれぞれ65%, 65%, 71%であったのに対し、KOマウスでは9時間で94%に達し、KOマウスでは早期により進んだ肝障害をもたらす結果が得られた。また、GALN+LPS投与急性肝不全ラットでは、投与後12-24時間に血小板低下、ADAMTS13活性著減、UL-VWFM出現と共に、広範囲にVWF陽性病巣を確認した。

(3) 培養肝星細胞におけるADAMTS13の表出・分泌動態

不死化した肝星細胞の cell line ではADAMTS13は染色されるが、薬剤刺激後の培養液中に分泌されるADAMTS13は極微量であることを確認した。現在、初代培養肝星細胞を用いて、培養液中ならびに肝星細胞内のADAMTS13の動態を検討中である。

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 16 件)

(1) 英文原著

- ① Uemura M, Fujimura Y, Ko S, et al. Determination of ADAMTS13 and its clinical significance for ADAMTS13 supplementation therapy to improve the survival of patients with decompensated liver cirrhosis. *Int J Hepatol.*, 2011, in press.
- ② Uemura M, Fujimura Y, Ko S, et al. Pivotal role of ADAMTS13 function in liver diseases. *Int J Hematol.*, 2010, 91:20-29.
- ③ Ishikawa M, Uemura M, Matsuyama T, et al. Potential role of enhanced cytokinemia and plasma inhibitor on the decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with alcoholic hepatitis: relationship to endotoxemia. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2010, 34:S25-33.

- ④ Uemura M, Fujimura Y, Matsuyama T, et al. Potential role of ASDAMTS13 in the progression of alcoholic hepatitis. **Current Drug Abuse Reviews**, 2008, 188-196.
- ⑤ Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, et al. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. **Thromb Haemost**. 2008, 99: 1019-1029.
- ⑥ Morioka C, Uemura M, Matsuyama T, et al. Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. **Scand J Gastroenterol**. 2008, 43:1387-1396.
- ⑦ Horii M, Uemura S, Uemura M, et al. Acute myocardial infarction as a systemic prothrombotic condition evidenced by increased von Willebrand factor protein over ADAMTS13 activity in coronary and systemic circulation. **Heart Vessels**, 2008, 23:301-307
- ⑧ Kojima H, Sakurai S, Yoshiji H, Uemura M, et al. The role of radixin in altered localization of canalicular conjugate export pump Mrp2 in cholestatic rat liver. **Hepatol Res**, 2008, 38:202-210.
- ⑨ Kojima H, Sakurai S, Uemura M, et al. Disturbed colocalization of multidrug resistance protein 2 and radixin in human cholestatic liver diseases. **J Gastroenterol Hepatol**. 2008, 23:120-128.
- ⑩ 植村正人, 藤村吉博, 福井 博. 『Annual Review 消化器』2011. 急性膵炎重症化と血漿 ADAMTS13 活性. 中外医学社, 林 紀夫, 日比紀文, 上西紀夫, 下瀬川 徹偏, 2011, pp237-244.
- ⑪ 森岡千恵, 植村正人, 高谷広章, 他. 重症急性膵炎における ADAMTS13 活性の動態とその臨床的意義. **消化器内科**. 2010, 52:200-208.
- ⑫ 石川昌利, 植村正人, 松山友美, 他. アルコール性肝炎における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態—重症度と多臓器不全合併との関連において, アルコールと医学生物学, 2009, 28:77-85.
- ⑬ 藤村吉博, 松本雅則, 植村正人, 他. 動脈血栓症の制圧: VWF-GPIb 軸依存性血小板血栓形成を調節する ADAMTS13 の基礎・臨床的解析. **日本医師会雑誌**, 2009, 137:2519-2521.
- ⑭ 藤村吉博, 植村正人. 肝産生酵素 ADAMTS13 と血栓症. **臨床血液**, 49:1420-1433.
- ⑮ 藤村吉博, 松本雅則, 植村正人, 他. 第45回 2008年度 ベルツ賞受賞論文. 動脈血栓症の制圧へ: VWF-GPIb 軸/ADAMTS13 依存性血小板血栓症の分子メカニズムの解明と制御. **最新医学**, 2008, 64:132-163.
- ⑯ 植村正人, 藤村吉博. 血液浄化療法の臨床 2009. 単純血漿交換・二重膜濾過血漿交換・血漿吸着—血液疾患. 88. TTP. 東京医学社, 2008, p421-427.
- [学会発表] (計 21 件)
- (1) 国際学会
- ① Ishikawa M, Uemura M, Matsuyama T, et al. Potential Role of Enhanced Cytokemia and Endotoxemia on the Decreased Activity of Plasma ADAMTS13 in Patients with Alcoholic Hepatitis. The 50th American Society of Hematology. 2008年12月7日, San Francisco
- ② Ishikawa M, Uemura M, Matsuyama T, et al. Plasma endotoxin concentration and ADAMTS13 activity in patients with alcoholic hepatitis: relationship to the

severity of liver disturbance and multiple organ failure. 第 2 回日米共同アルコール関連問題ワークショップ, 2008 年 9 月 17 日, 横浜.

(1) 国内学会

シンポジウム

- ① **植村正人**. 重症肝臓疾患と ADAMTS13. 第 29 回日本アフエレーシス学会(シンポジウム), 2008 年 11 月 23 日, 広島.
- ② **植村正人**, **藤村吉博**, **福井 博**. 重症肝・膵疾患における多臓器不全の病態解析-ADAMTS13 を中心に. 第 94 回日本消化器病学会総会(ワークショップ), 2008 年 5 月 9 日, 福岡.

パネルディスカッション

- ① 森岡千恵, **植村正人**, **福井 博**. 重症急性膵炎における ADAMTS13 の動態とその臨床的意義. 第 51 回日本消化器病学会大会, 平成 21 年 10 月 15 日, 京都.

一般演題

- ① 高谷広章, **植村正人**, 藤本正男, 他. 肝不全における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態. 第 16 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 平成 22 年 11 月 12 日, 橿原.
- ② 森岡千恵, **植村正人**, 北川 洗, 他. 内視鏡的逆行性胆管膵管造影検査(ERCP)前後における ADAMTS13 活性と VWF 抗原. 第 52 回日本消化器病学会大会, 平成 22 年 10 月 15 日, 横浜.
- ③ 高谷広章, **植村正人**, **松本雅則**, 他. 肝硬変における ADAMT13 活性と予後に関する検討—Child score, MELD score との対比. 第 14 回日本肝臓学会大会, 平成 22 年 10 月 13 日, 横浜.
- ④ 藤本正男, **植村正人**, 石川昌利, 他. 急

性肝不全における顆粒球エラスターゼと血漿 ADAMTS13 との関連. 第 14 回日本肝臓学会大会, 平成 22 年 10 月 13 日, 横浜.

- ⑤ 藤本正男, **植村正人**, 松山友美, 他. アルコール性肝炎における顆粒球エラスターゼと血漿 ADAMTS13 活性との関連. 第 46 回日本肝臓学会総会, 平成 22 年 5 月 27 日, 山形.
- ⑥ 森岡千恵, **植村正人**, 藤本正男, 他. 重症急性膵炎における顆粒球エラスターゼと血漿 ADAMTS13 活性との関連. 第 96 回日本消化器病学会総会, 平成 22 年 4 月 24 日, 新潟.
- ⑦ 藤本正男, **植村正人**, 石川昌利, 他. 急性肝不全における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS 1 3 活性の動態. 第 38 回日本肝臓学会西部会, 平成 21 年 12 月 4 日, 鳥取.
- ⑧ 藤本正男, **植村正人**, 松山友美, 他. 肝硬変における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態. 第 13 回日本肝臓学会大会, 平成 21 年 10 月 15 日, 京都.
- ⑨ **植村正人**, **松本雅則**, 松山友美, 他. 進行した肝硬変の ADAMTS13 著減例は血栓性血小板減少性紫斑病と類似している. 第 45 回日本肝臓学会総会, 平成 21 年 6 月 4 日, 神戸.
- ⑩ 藤本正男, **植村正人**, 石川昌利, 他. 急性肝不全における血漿 Et 活性と ADAMT13 活性の動態. 第 35 回日本急性肝不全研究会, 平成 21 年 6 月 3 日, 神戸.
- ⑪ 石川昌利, **植村正人**, 松山友美, 他. アルコール性肝炎における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態—重症度との関連において, 第 95 回日本消化器病学会, 平成 21 年 5 月 8 日, 北海道.
- ⑫ 森岡千恵, **植村正人**, 松山友美, 他. 重症急性膵炎における血漿 ADAMTS13 活

性と超高分子 VWF マルチマーの動態，第 94 日本消化器病学会総会，2008 年 5 月 8 日，福岡。

- ⑬ 松本雅則，植村正人，加藤誠司，他。新鮮凍結血漿 (FFP) の予防投与は造血幹細胞移植後の VOD 発症を予防する。第 44 回日本肝臓病学会総会 2008 年 6 月 6 日愛媛。(プレナリーセッション、優秀演題)，
- ⑭ 石川昌利，植村正人，松山友美，他。アルコール性肝炎における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態—重症度と多臓器不全との関連において。第 28 回アルコールと医学生物学研究会，2008 年 9 月 15 日，横浜。
- ⑮ 石川昌利，植村正人，松本正則，他。肝硬変における血漿 von Willebrand factor multimer と病態解析，第 12 回日本肝臓学会大会，2008 年 10 月 2 日，東京。
- ⑯ 森岡千恵，植村正人，松山友美，他。重症急性膵炎における ADAMTS13 活性と膵 CT 造影不領域との関連，第 50 回日本消化器病学会大会，2008 年 10 月 3 日，東京。(優秀演題)

[図書] (計6件)

- ① 植村正人、山崎正晴、福井 博。別冊 日本臨床新領域別症候群シリーズ 肝・胆道系症候群 (第 2 版) —その他の肝・胆道系疾患を含めて— I 肝臓編 (上) V 肝不全。日本臨床社，2010，pp302-311
- ② 植村正人、森岡千恵、藤本正男、他。厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究 平成20年度～22年度 総合研究報告書 (研究代表者 下瀬川 徹) 「急性膵炎重症化と血漿ADAMTS13活性。東北大学生活共同組合，2010，pp142-153.
- ③ 植村正人、森岡千恵、藤本正男、他。厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究 平成22年度 総括・分担研究報告書 (研究代表者 下瀬川 徹) 「急性膵炎重症化と血漿ADAMTS13活性」。東北大学生活共同組合，2010，pp113-121.
- ④ 植村正人、藤村吉博、福井 博。重症肝・膵疾患における多臓器不全の病態解析—ADAMTS13を中心に— 日本消化器病学会，消化器病学の進歩—原点から未来への情報発信—第94回日本消化器病学会総会記録誌Ⅲ。複合領域，2009，pp262-266.
- ⑤ 植村正人、森岡千恵、藤本正男、他。重症急性膵炎におけるADAMTS13活性の動態とその臨床的意義。厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業，難治性膵疾患に関する調査研究 平成21年度 総括・分担研究報告書，(研究代表者 下瀬川 徹)，2010，pp114-122.
- ⑥ 植村正人、松本雅則、福井 博、他。ADAMTS13の解析と重症肝疾患における微小循環障害の発生机序の解明。平成17年～平成19年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) 研究成果報告書)，2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 正人 (UEMURA MASAHITO)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90151836

(2) 研究分担者

松本雅則 (MATSUMOTO MASANORI)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60316081

福井 博 (FUKUI HIROSHI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：80145838

藤村 吉博 (FUJIMURA YOSHIHIRO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：80118033