

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790687
 研究課題名 (和文) ADAMTS13 変異マウスを用いた血栓性血小板減少性紫斑病
 発症修飾要因の探索
 研究課題名 (英文) Utilizing the ADAMTS13-mutant mice to identify modifiers of
 thrombotic thrombocytopenic purpura
 研究代表者
 坂野 史明 (BANNO FUMIAKI)
 国立循環器病センター研究所・脈管生理部・室員
 研究者番号：00373514

研究成果の概要 (和文)：ADAMTS13 は血小板接着蛋白質フォンビルブランド因子の断片化を担う血漿プロテアーゼである。我々は ADAMTS13 研究におけるモデル動物として、ADAMTS13 完全欠損マウス、C末端ドメイン欠損マウスを樹立した。本研究ではまず、ADAMTS13 変異マウスの血小板血栓形成能を解析し、ADAMTS13 の完全欠損は過剰血栓形成傾向をもたらすこと、C末端ドメインは高ずり応力下血小板血栓形成を効率よく抑制するために必須となることを明らかにした。さらに、マウス中大脳動脈閉塞モデルを用いて、脳虚血再灌流障害に及ぼす ADAMTS13 の影響を解析した結果、ADAMTS13 は再灌流後の微小循環障害を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：ADAMTS13 is a plasma protease that specifically cleaves von Willebrand factor. We generated *Adamts13*-deficient mice and *Adamts13*-congenic mice that have the C-terminally truncated ADAMTS13 instead of the full-length form. In this study, we analyzed platelet thrombogenesis in *Adamts13*-mutant mice. Our results revealed that ADAMTS13 is critical for limiting platelet thrombus formation and the C-terminal domains of ADAMTS13 are required to sufficiently down-regulate thrombogenesis under high shear stress. We also investigated the role of ADAMTS13 on brain ischemia-reperfusion injury using a transient middle cerebral artery occlusion model in *Adamts13*-deficient mice. The results indicated that ADAMTS13 protect the brain from ischemia-reperfusion injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：遺伝子、酵素、生体分子、動物

1. 研究開始当初の背景

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は血小板減少と溶血性貧血を主症状とし、発熱、精神神経症状、腎障害を伴う重篤な全身性疾患である。患者血漿中には血小板接着タンパク質フォンビルブランド因子 (VWF) のホモマルチマーが超高分子量で検出される。VWF の血小板接着凝集活性は分子量が大きい程強く、超高分子量 VWF (UL-VWF) マルチマーによる過剰血小板凝集が TTP 発症の基盤となると考えられている。健常人では、UL-VWF マルチマーは速やかに断片化されるため、循環血中には存在しない。近年、この断片化を担う酵素 ADAMTS13 が同定され、本酵素活性の欠乏が TTP の原因となることが明らかにされた。我々は ADAMTS13 研究におけるモデル動物として、ADAMTS13 欠損マウスおよび C 末端ドメイン欠損マウスを樹立した。ADAMTS13 欠損マウスでは、血中に UL-VWF マルチマーが検出され、易血栓形成傾向にあるが、TTP を自然発症しない。一方、C 末端欠損マウスの血中には UL-VWF マルチマーは検出されないが、コラーゲン-エピネフリン溶液の静注により惹起される消耗性血小板減少が野生型マウスに比べて顕著であることが判明していた。

2. 研究の目的

本研究では、平行板型フローチャンバー法および生体顕微鏡観察法を用いて、ADAMTS13 変異マウスの血小板血栓形成能を解析し、生理的条件下での血小板接着・凝集過程における ADAMTS13 とその C 末端ドメインの役割を明らかにする。さらに、ADAMTS13 欠損マウスに一過性の脳虚血を惹起し、再灌流後の脳障害への影響を検証することにより、血栓性疾患における ADAMTS13 の病態生理的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ADAMTS13 変異マウスの血小板血栓形成能の解析

①平行板型フローチャンバー法

全長型 ADAMTS13 をもつ野生型マウス、ADAMTS13 欠損マウスおよび C 末端欠損マウスより採血し、メパクリンを添加して全血中の血小板を蛍光ラベルした。平行板型フロー

チャンバーに I 型コラーゲンを固相化したカバーガラスを装着し、蛍光顕微鏡にマウントした。このチャンバー内にマウス全血サンプルをずり速度が異なる条件で流し、固相化コラーゲン表面上に形成される血小板血栓の体積を経時的に測定した。

②生体顕微鏡観察法

マウス洗浄血小板を調製後、カルセイン AM を用いて蛍光ラベルした。蛍光ラベル血小板を野生型および ADAMTS13 変異マウスに静注後、トリプロモエタノール麻酔下に腹部を切開、腸間膜を露出させて、蛍光顕微鏡にて動静脈を経時観察した。血管障害部位での血小板血栓形成能は、10%塩化鉄溶液に浸漬した濾紙を腸間膜動脈上に 5 分間静置することにより生じた内皮障害部位にて、直径 30 μm 以上の血栓が形成されるまでの時間 (血栓形成開始時間) および血管が完全閉塞するまでの時間 (血管閉塞時間) を測定、評価した。また、活性化内皮上への血小板接着は、ヒスタミンまたは DDAVP 溶液を腹腔内投与し、腸間膜静脈内皮上での血小板接着を観察、評価した。

(2) ADAMTS13 の脳虚血再灌流障害抑制機能の解析

野生型および ADAMTS13 欠損マウスの左内頸動脈から塞栓子を挿入して中大脳動脈 (MCA) を 30 分間閉塞後、塞栓子を引き抜いて MCA を再灌流した。レーザードップラー血流計を用いて、虚血-再灌流前後の大脳皮質血流量を測定した。MCA 閉塞 24 時間後、脳組織を回収し、TTC 染色により脳梗塞巣の体積を測定した。また、脳切片の PTAH 染色および抗 VWF 抗体を用いた免疫染色を行い、梗塞組織を観察、解析した。

4. 研究成果

(1) ADAMTS13 変異マウスの血小板血栓形成能の解析

平行板型フローチャンバー解析の結果、ADAMTS13 欠損マウスでは、ずり速度 1000 s^{-1} および 5000 s^{-1} における血小板血栓形成がいずれも野生型マウスに比べて顕著に亢進していた。また生体顕微鏡観察により、ADAMTS13 欠損マウスでは、塩化鉄血管障害部

位での血栓形成開始時間および血管閉塞時間が著明に短縮することがわかった。さらに、血管内皮細胞内に貯留された UL-VWF マルチマーの放出を促進する薬剤（ヒスタミンおよび DDAVP）をマウスに投与し、活性化内皮細胞上での血小板接着過程を生体顕微鏡下に観察すると、ADAMTS13 欠損マウスでは、活性化内皮上に長く紐状に連なった血小板接着が観察され、UL-VWF マルチマー依存性の血小板接着が進行することが示唆された。しかし、接着血小板が凝集塊へと進展することは無かったことから、血管内皮が保持された環境下では、病的血栓形成までには至らないと考えられる。したがって、ADAMTS13 は血管障害部位での過剰血小板血栓形成の抑制に必須であり、ADAMTS13 欠損に血管障害性の刺激が重なることで TTP が起こると考えられる。

C 末端欠損マウスの血栓形成を平行板型フローチャンバーで解析すると、 1000 s^{-1} の血栓形成は正常であったが、 5000 s^{-1} の血栓形成が亢進していた。したがって、C 末端ドメイン欠損 ADAMTS13 は、生理的血流条件下に VWF を切断する活性を保持するが、その活性は完全ではなく、高ずり応力下の血小板血栓形成抑制活性が低下していることが示唆された。さらに生体顕微鏡解析の結果、C 末端欠損マウスでは活性化血管内皮上での血小板接着の亢進は見られず、塩化鉄血管障害部位での血栓形成開始時間も正常であるが、血管閉塞が野生型マウス比べて早く起こることが判明した。測定した血管のずり速度は、当初 $1000\text{--}1500\text{ s}^{-1}$ であるが、生じた血栓が大きくなるにつれ、血管内腔が狭まり、ずり速度が局所的に上昇する。やはり C 末端欠損マウスでは、高ずり応力下での血栓形成抑制能が低下しているため、血管閉塞時間が短縮したと考えられる。最近、ADAMTS13 の C 末端ドメインは切断部位から遠位の VWF ドメインとの相互作用に関わることが報告されており、高ずり応力下の VWF 切断を促進するための補助的な基質結合領域としての機能を担っていることが予想される。

(2) ADAMTS13 の脳虚血再灌流障害抑制機能の解析

MCA 閉塞による脳虚血再灌流解析の結果、野生型マウスでは、再灌流後に脳血流量が回復するのにに対し、ADAMTS13 欠損マウスでは、

再灌流直後から血流量が低下し、再灌流 24 時間後まで血流低下が持続した。また、MCA 閉塞 24 時間後の脳梗塞巣は、ADAMTS13 欠損マウスで顕著に拡大していた。PTAH 染色及び VWF 免疫染色による解析の結果、ADAMTS13 欠損マウスの脳梗塞巣には VWF 陽性の血栓および炎症細胞の浸潤が多数観察された。したがって、ADAMTS13 は虚血-再灌流障害による脳血流障害を緩和することで、脳梗塞巣の拡大を抑制すると考えられる。虚血性脳血管障害に対する新規治療薬として ADAMTS13 を活用できる可能性が示唆される。

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 5 件）

- ① 坂野史明, 小亀浩市, ADAMTS13 の C 末端ドメイン欠損マウス, *血栓と循環*, 査読無, 18, 4-7 (2010).
- ② Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Kunizawa A, Irie K, Higuchi S, Nakano T, Muroi C, Fukushima H, Sugimoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujiwara M, Okuchi K, Nishio K, ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: A possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating post-ischemic hypoperfusion, *Blood*, 査読有, 115, 1650-1653 (2010).
- ③ Banno F, Chauhan AK, Miyata T, The function of ADAMTS13 in thrombogenesis in vivo: insights from mutant mice, *Int J Hematol*, 査読有, 91, 30-35 (2010).
- ④ Banno F, Chauhan AK, Kokame K, Yang J, Miyata S, Wagner DD, Miyata T, The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation, *Blood*, 査読有, 113, 5323-5329 (2009).
- ⑤ 坂野史明, 小亀浩市, 奥田智彦, 本田繁則, 宮田茂樹, 加藤恒, Chauhan AK, 富山佳昭, Wagner DD, 宮田敏行, 血栓形成制御における ADAMTS13 とその C 末端ドメインの生理的意義, *JSPN News Letter*, 査読無, 23, 22-23 (2009).

[学会発表] (計 11 件)

- ① 松本幸子, 神出計, 坂野史明, 河野雄平, 宮田敏行, 低用量テルミサルタンは Regulator of G protein signaling-2 (RGS2) 欠損マウスの高血圧性血管障害を改善する-Rgs2 遺伝子多型診断と降圧薬選択の可能性について-, **第 32 回日本高血圧学会総会**, 2009 年 10 月, 大津プリンスホテル.
- ② Banno F, Chauhan AK, Kokame K, Yang J, Miyata S, Wagner DD, Miyata T, Imaging analysis of platelet thrombus formation in Adamts13-mutant mice, **The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXII Congress**, 2009 年 7 月, Boston Convention & Exhibition Center, USA.
- ③ Nishio K, Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Fujiwara M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Shida Y, Sugimoto M, Ueyama T, Fukushima H, Okuchi K, Protective property of ADAMTS13 in a mouse-model of ischemic stroke, **The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXII Congress**, 2009 年 7 月, Boston Convention & Exhibition Center, USA.
- ④ Mirosław Rybaltowski, 鈴木優子, 田中晶, 坂野史明, 宮田敏行, 浦野哲盟, Intra-vital imaging analysis of platelet adhesion to vascular wall in ADAMTS13 KO mice, **第 32 回日本血栓止血学会学術集会**, 2009 年 6 月, 北九州国際会議場.
- ⑤ 西尾健治, 藤岡政行, 福島英賢, 坂野史明, 小亀浩市, 宮田敏行, 植山徹, 志田泰明, 杉本充彦, 奥地和夫, ADAMTS13 の神経保護作用-脳虚血再灌流障害マウスモデルを用いて-, **第 32 回日本血栓止血学会学術集会**, 2009 年 6 月, 北九州国際会議場.
- ⑥ Nishio K, Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Fujiwara M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Shida Y, Sugimoto M, Fukushima H, Okuchi K, ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage, **50th ASH Annual Meeting and Exposition**, 2008 年 12 月, Moscone Center, USA.
- ⑦ Rybaltowski M, Mogami H, Suzuki Y,

Ihara H, Banno F, Miyata T, Urano T, Intra-vital imaging analysis of platelet adhesion to injured vascular wall through von Willebrand factor, **第 55 回中部生理学会**, 2008 年 10 月, 愛知医科大学.

- ⑧ 西尾健治, 藤岡政行, 福島英賢, 坂野史明, 小亀浩市, 宮田敏行, 奥地和夫, ADAMTS13 による脳虚血再灌流障害抑制効果, **第 36 回日本救急医学会学術集会**, 2008 年 10 月, ロイトン札幌.
- ⑨ 坂野史明, Anil K. Chauhan, 小亀浩市, Denisa D. Wagner, 宮田敏行, 生体内での血小板血栓形成制御における ADAMTS13 とその C 末端ドメインの重要性, **第 70 回日本血液学会総会**, 2008 年 10 月, 国立京都国際会館.
- ⑩ Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M, Clinical implications of ADAMTS-13 polymorphisms, **The 5th Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis**, 2008 年 9 月, Grand Copthorne Waterfront Hotel, Singapore.
- ⑪ 坂野史明, 小亀浩市, 奥田智彦, 本田繁則, 宮田茂樹, 加藤恒, Anil K. Chauhan, 富山佳昭, Denisa D. Wagner, 宮田敏行, 血栓形成制御における ADAMTS13 とその C 末端ドメインの生理的意義, **第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会学術集会**, 2008 年 8 月, 千里ライフサイエンスセンター.

[図書] (計 1 件)

- ① Banno F, Miyata T, Biology of an antithrombotic factor-ADAMTS13, **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008**, Springer, 162-176 (2008).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 史明 (BANNO FUMIAKI)

国立循環器病センター研究所・脈管生理部・室員

研究者番号 : 0 0 3 7 3 5 1 4