

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592313

研究課題名（和文）ADAMTS13 の血液流動下における活性発現と抗炎症作用

研究課題名（英文）Anti-inflammatory and anti-coagulant function of ADAMTS13 expressed under blood flow

## 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（和文）：ADAMTS13 は VWF を切断することにより、VWF の機能を抑制しているが、我々は血管傷害部位での止血血栓形成過程においても、止血血栓の内腔進展を抑えている可能性があることを明らかにしてきた。この過程において、ずり応力依存性に ADAMTS13 の活性が発現されることより、おそらく ADAMTS13 は血管内皮下組織への血小板粘着は抑えず血栓が内腔進展しだした時に VWF を切断して血栓形成を抑制しており、これらの性質は一般の抗血小板薬のような出血傾向を生じない抗血栓剤となりうる可能性を示唆していた。そこでマウス中大脳動脈閉塞モデル（MCAO）を用いて虚血と炎症の結果である脳虚血再灌流障害に対する ADAMTS13 の抑制効果を検証した。*Adamts13*<sup>-/-</sup>マウスにおいては、MCAO 後再灌流領域の血流低下と梗塞範囲の拡大を認めた。さらに ADAMTS13 ノックアウトマウスでは MCAO 施行後、血液中の HMGB1 が上昇しており、蛍光免疫染色にて梗塞辺縁部 penumbra 領域の炎症細胞では HMGB1 と MPO（myeloperoxidase）が co-expression されていた。すなわち ADAMTS13 は脳内における血栓形成のみならず、炎症の制御にかかわっていることが推定された。またリコンビナントヒト ADAMTS13 をワイルドタイプマウスに投与し、MCAO 実験を行うと、梗塞範囲が非投与群より減少した。以上より ADAMTS13 は出血傾向の副作用を有さない抗炎症・抗血栓剤となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The function of von Willebrand factor (VWF) is essential for normal hemostasis and regulated by ADAMTS13 which cleaves VWF to smaller less-active forms. We recently found that ADAMTS13 limits thrombus growth at the on-going thrombus generation process, leading speculation that the excessive function of VWF mediated by ADAMTS dysfunction may link to arterial thrombosis in the microcirculation in many diseases.

We investigated the effects of ADAMTS13 on ischemia-reperfusion injury using a 30-minute middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in *Adamts13*<sup>-/-</sup> and wild-type mice. After reperfusion, the regional cerebral blood flow in the ischemic cortex was decreased markedly in *Adamts13*<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type mice, which also resulted in a larger infarct volume for *Adamts13*<sup>-/-</sup>. Furthermore, brain ischemia induced more prominent activation of inflammatory cells co-expressing high-mobility group box1 (HMGB1) and myeloperoxidase (MPO) in the cortical ischemic penumbra of *Adamts13*<sup>-/-</sup> mice. Thus, *Adamts13* gene deletion aggravated ischemic brain damage, suggesting that ADAMTS13 may protect the brain from ischemia and inflammation by regulating VWF-platelet interactions after reperfusion.

Moreover, a recombinant human ADAMTS13 infused to wild type mice before 4 hours' occlusion significantly reduced infarct volume without cerebral bleeding complications. These results indicate that ADAMTS13 could be an anti-inflammatory and anti-coagulant agent for prevention or treatment for many diseases, especially for stroke.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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

心筋梗塞や脳梗塞などの血栓性疾患は近年の死因の上位を占めており、その治療法に関して精力的な研究がなされている。ステントなどによる物理的な血栓除去以外の薬剤による治療には様々な制限がある。たとえば、血栓溶解剤 tPA は3時間半以内に投与をしなければならず、また出血傾向に悩まされたり虚血再灌流傷害により血栓が溶解されても症状が改善しないこともある。さらに従来の血液凝固阻害薬や抗血小板薬は、個人に応じた至適容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いる。そこで止血血栓形成は抑制せず、出血傾向はきたさないが、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。

動脈血栓形成に重要な役割を果たすのが von Willebrand 因子 (VWF) である。VWF は血管内皮より分泌され、多数の subunit が重合した形で血漿中に存在する糖蛋白である。傷害された動脈を止血修復するため、血小板と血管内皮下組織の橋渡しをして、血小板を血管内皮下組織に粘着させる働きを持っているが、この VWF の機能は subunit のより重合したより長い VWF の方が強く、VWF 切断酵素 ADAMTS13 により切断され機能を調節されている。最近我々は血小板血栓が形成されていく過程においても、血栓の表面でずり応力依存性に ADAMTS13 が働いて、血栓の内腔進展を制御

しているという新たな機能を発見した。つまり、ADAMTS13 は血小板が粘着した VWF が血流により伸展されると VWF を切断するので、止血血栓が血管内皮下組織を埋め、血管内腔に進展してきた時に働くわけで、ADAMTS13 機能が過剰となっても止血は保たれた抗血栓薬として働く可能性が推測された。

また血小板や VWF は白血球を粘着することが知られており、局所への VWF-血小板粘着を抑制する ADAMTS13 は抗血栓のみならず抗炎症薬として働く可能性が示唆されている。実際 ADAMTS13 ノックアウトマウスでは白血球の粘着や遊走の亢進が指摘されている。

以上の背景により ADAMTS13 と VWF の機能連関を明らかにし、生体内における抗血栓性と抗炎症性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

マウスの MCAO 脳虚血再灌流モデルでは虚血再灌流傷害により微小血小板血栓が形成されるが、脳卒中を模倣するものと考え、ADAMTS13 ノックアウトマウスやリコンビナントヒト ADAMTS13 を投与した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

3. 研究の方法

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が、虚血と炎症により障害が惹起されるものと考えられている。今回われわれはこの虚血と炎症により惹起される再灌流障害に ADAMTS13 と VWF がどのように関与しているのかを検証するために実験を行なった。

① 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を両群マウスで比較検討した。

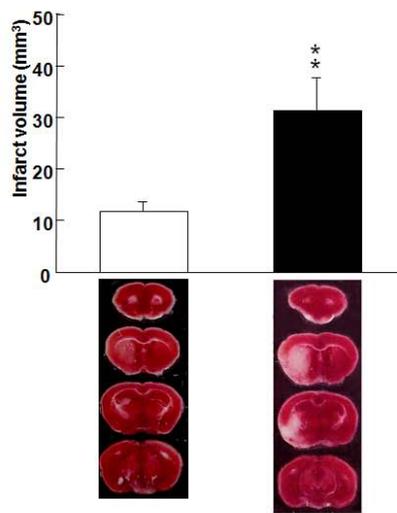
② 脳組織をフィブリン血栓を染めるために PTAH 染色と抗 VWF 抗体による免疫染色を行い両群マウスで比較した。

③ 両群マウスの脳組織を抗 HMGB1 抗体や抗 MPO (myeloperoxidase) 抗体で染色し、脳の炎症の程度を観察する。

④ リコンビナントヒト ADAMTS13 をワイルドタイプのマウスに注入し、ワイルドタイプマウスの ADAMTS13 血中濃度を注入前の約 2.5 倍、約 12.5 倍になるよう調整したマウスを用意し、4 時間の MCAO を実施し、ADAMTS13 の効果を検討した。

#### 4. 研究成果

① 30 分 MCAO による脳梗塞体積の比較 (ワイルドタイプ+/+ VS ADAMTS13 ノックアウト-/-)

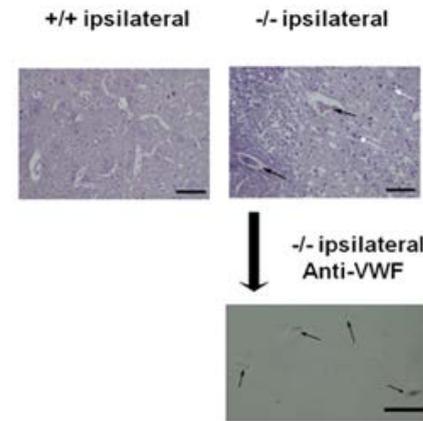


梗塞巣の体積は ADAMTS13 ノックアウトマウスではワイルドタイプマウスに比し有意に増加していた。これにより ADAMTS13 が虚血再灌流傷害に関与しており、その制御に役立っていることが示唆された。

② 脳梗塞巣の染色

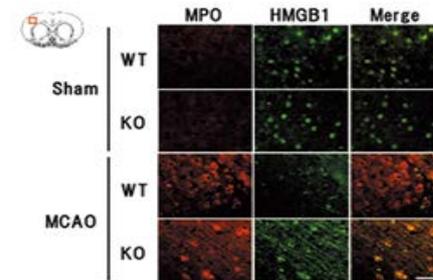
ワイルドタイプマウス+/+においてはごく軽

度の梗塞巣を認め、ADAMTS13 ノックアウトマウス-/- においてはより広範囲に梗塞が認められた。



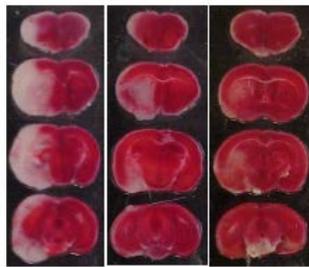
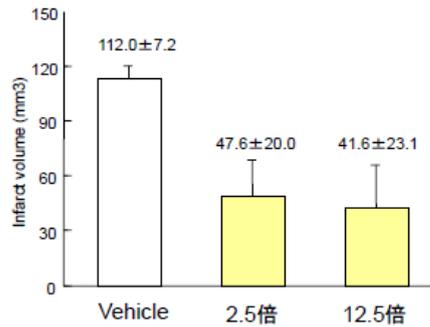
ADAMTS13 ノックアウトマウス-/-では矢印で示すようにフィブリンに富む血栓形成が多く認められ、その血栓は抗 VWF 抗体にて染色された。これらのことは、ADAMTS13 ノックアウトマウスで認められた梗塞巣の拡大は、VWF に富む微小血栓すなわち血小板血栓の形成が増加し、惹起されたものと推察された。

③ 炎症細胞の抗 MPO および抗 HMGB1 抗体による蛍光免疫染色



ノックアウトマウスでは血液中の HMGB1 濃度の上昇が認められ、蛍光免疫染色にて梗塞辺縁部 penumbra の炎症細胞では HMGB1 と MPO (myeloperoxidase) が co-expression されて増加しており、ADAMTS13 ノックアウトマウスでは脳内の炎症が活性化されていると考えられた。さらに血液中の HMGB1 が上昇していたことより、全身の炎症も亢進していると考えられた。すなわち ADAMTS13 は炎症の制御にかかわっていることが推定され、これら炎症の亢進もノックアウトマウスでの梗塞巣拡大に寄与しているものと推察された。

④ リコンビナントヒト ADAMTS13 のワイルドタイプマウスへの注入による 4 時間 MCAO 後の虚血再灌流傷害への影響



Vehicle 2.5倍 12.5倍

ADAMTS13 の血中濃度が正常の 2.5 倍または 12.5 倍となるようにリコンビナントヒト ADAMTS13 を注入して MCAO を行ったところ、梗塞範囲は明らかに縮小化していた。また ADAMTS13 の上昇による出血傾向も認められなかった。

以上より ADAMTS13 は抗血栓作用と抗炎症作用により虚血再灌流傷害を抑制しており、非生理的な量の注入により虚血再灌流傷害抑制効果が認められた。すなわち ADAMTS13 は出血傾向を伴わない脳卒中抑制薬となりうるのみならず、抗血栓薬・抗炎症薬としてさまざまな病態に対しての治療薬になりうると思われた。

##### 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 4 件)

- ① Masayuki Fujioka, Takafumi Nakano, Kazuhide Hayakawa, Keiichi Irie, Yoshiharu Akitake, Yuya Sakamoto, Kenichi Mishima, Carl Muroi Yasuhiro Yonekawa, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Kenji Nishio Kazuo Okuchi, Katsunori Iwasaki, Michihiro Fujiwara, Bo K. Siesjo ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and

neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci* 査読有 2012, DOI 10.1007/s10072-011-0913-9 (online first)

- ② 西尾健治 ADAMTS13 欠損マウスを用いた脳虚血再灌流障害の解析 血栓と循環 査読無 19(2): 250-253 2011
- ③ 西尾健治 ADAMTS13 の脳梗塞治療薬としての可能性 血栓止血誌 査読有 21(4): 405~408, 2010
- ④ 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, and Nishio K. ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* 査読有 115: 1650-1653, 2010.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Fukushima H, Nishio K, Watanabe T, Seki T, Matsui H, Sugimoto M, Matsumoto M, Fujimura Y, Okuchi K The Ratio of ADAMTS13 to VWF-Propeptide Can Reflect the Disease Severity and the Extent of Inflammation of the Patients with Severe Sepsis or Septic Shock 53<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition 2011 年 12 月 12 日 San Diego
- ② 西尾健治, 藤岡政行, 福島英賢, 植山徹, 坂野史明, 小亀浩市, 宮田敏行, 奥地一夫 脳梗塞モデルに対する ADAMTS13 の効果—マウスを用いた in vivo 実験系による検討—37 回 日本救急医学総会 2009 年 10 月 30 日 盛岡市 発表形式 口演
- ③ K. Nishio, M. Fujioka, K. Hayakawa, K. Mishima, M. Fujiwara, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, Y. Shida, M. Sugimoto, T. Ueyama, H. Fukushima, K. Okuchi PROTECTIVE PROPERTY OF ADAMTS13 IN A MOUSE-MODEL OF ISCHEMIC STROKE XXII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis - Boston, July 11 - 16, 2009
- ④ 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 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 平成 21 年 6 月

6日 小倉

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