

## 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 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21791774

研究課題名（和文） 全血流動下における血栓形成と炎症の連鎖に関わる分子機構解明

研究課題名（英文） Investigation of molecular mechanism involved in the chain of thrombus and inflammation under whole blood flow

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：炎症と血栓形成の関連を観察するために、敗血症によって凝固障害が生じた症例の血液検体における炎症と血栓形成の指標として、血管内皮細胞から放出されるフォンウィルブランド因子（VWF）のプロペプチド（VWF-pp）の変動を観察した。炎症性マーカーであるサイトカインのうち、腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）と VWF-pp は有意に相関し、また VWF が高値である際には血栓形成を制御する酵素 ADAMTS-13 活性が消費により著減していることが確認され、両者の比は疾患の生理学的重症度と有意に相関した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the association between inflammation and thrombus formation, we observed the variation of von Willebrand Factor propeptide (VWF-pp), which is released from endothelial cell by inflammatory stimuli in sepsis-induced coagulopathy human cases. VWF-pp correlated with the variation of TNF- $\alpha$ , one of the typical inflammatory cytokine. Furthermore, VWF-pp inversely correlated with the ADAMTS-13, which regulates the excessive thrombus formation by cleaving VWF released from endothelial cells by inflammation. The ratio of ADAMTS-13 to VWF-pp was well correlated to the disease severity, such as SOFA score.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学／炎症／血栓

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症の病態生理において微小血栓形成は多臓器不全へと発展する重要な機序である。敗血症において、こうした血栓形成が如何に生じるかに関して数多くの報告がある。しかしこれらの報告は全て静止系での検討であり、敗血症における血栓形成を動的に検討したものはない。

## 2. 研究の目的

我々は、全血流動下で種々の炎症因子と血管内皮細胞の関係をフローチャンパー上で形成されるフィブリン血栓を観察し、炎症関連モレキュルと血栓形成の関係を質的量的に分析し、炎症に関連した因子と血栓形成の関係を検討することを本研究の目的としている。

### 3. 研究の方法

1) 炎症と血栓形成の実臨床における関連を観察するために、敗血症に伴う播種性血管内凝固症候群の患者血液 (day1, 3, 5, 7) を用いて VWF propeptide (VWF-pp) の測定を ELISA 法にて行い、他の各種マーカーとして ADAMTS-13, IL-6, TNF- $\alpha$ , P-selectin も測定し、ICU28 日目の予後や APACHE-II スコア、SOFA スコアなどの受傷度評価による臓器不全との関連を検討する。

2) 培養血管内皮細胞をヒスタミンや TNF- $\alpha$  を用いて刺激し、発現する VWF を ELISA 法を用いて測定し、Control との差を検討する。また、これらの条件下で生育した血管内皮細胞上に浮遊血小板液をポンプで吸引しながら動的に観察し、内皮細胞上でどのように血栓が形成されていくのかを観察する。

### 4. 研究成果

1) 敗血症性 DIC (播種性血管内凝固症候群) 症例における VWF-PP と他の炎症/血栓マーカーとの関連

対象は 27 例であった (年齢  $70.2 \pm 16.0$  歳、男性 16 例)。基礎疾患は腹腔内感染症が 18 例、肺炎が 2 例、尿路感染症が 3 例、熱傷創部感染が 2 例、その他 2 例であった。全例が重症敗血症ないし敗血症性ショックの状態、全例が日本救急医学会の提唱する急性期 DIC スコアを満たしていた。重症度を示す APACHE-II スコアは  $21.0 \pm 7.3$ 、SOFA スコアは  $11.1 \pm 3.3$  であった。ICU28 日目の転帰は生存が 19 例、死亡が 8 例であった。

エントリー時の VWF-pp 値は  $293.8 \pm 153.8\%$  と著明に高値を示しており、VWF を制御する ADMATS-13 活性は  $24.9 \pm 8.5\%$  と低下していた。炎症性サイトカインである IL-6 は  $3541.0 \pm 6151.0$  pg/ml、TNF- $\alpha$  は  $17.6 \pm 35.1$  pg/ml と著明に上昇しており、血管内皮細胞障害を示す P-selectin は  $111.5 \pm 81.8$  ng/ml、VWF 抗原も  $212.3 \pm 86.3\%$  と著明に上昇していた。

VWF-pp は day 1 が最も高く、以後減少していき、一方 VWF を制御する ADMATS-13 活性は day 1 が最も低く、その活性は徐々に改善傾向が認められた。これらの結果は炎症による血管内皮細胞刺激によって、放出された過剰な VWF によって微小血管内で凝固亢進へ傾く状態を ADMATS-13 が制御することによって、防ぐ生体のメカニズムが作用することを示していると考えられた。一方、同じ炎症という刺激によって刺激された血管内皮細胞から放出された VWF 抗原や P-selectin にはそうした傾向は認められなかったが、これは、

図1 VWF-propeptide

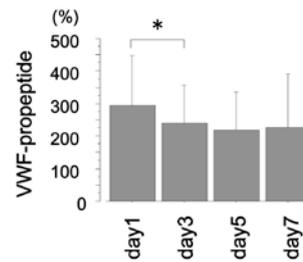


図2 ADAMTS13

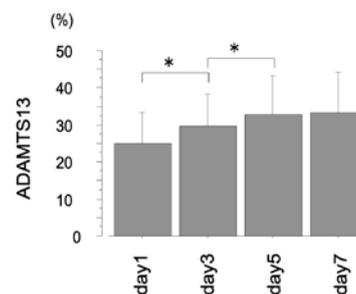
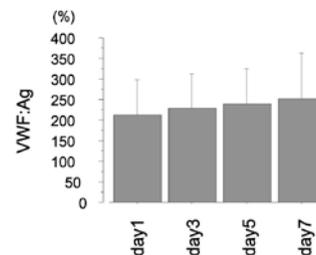
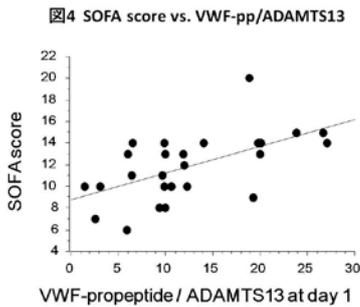


図3 VWF:Ag



VWF や P-selectin の血中半減期が長いことが関連していると考えられる。VWF-pp は血中半減期が 1 から 2 時間と非常に短いため、炎症による血管内皮細胞障害のマーカーとしては非常に有用と考えられる。

また、生理学的重症度スコアである SOFA スコアとの相関においては、VWF-PP、ADAMTS-13 の比が最も良好な相関を呈することが確認できた。これは、敗血症という病態において炎症による血管内皮細胞障害からの凝固亢進が多臓器への障害に関連していることの新たな裏付けになり得ると考えられる。



2) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell; HUVEC) 上の VWF における血栓形成モデル作成の試み

培養した HUVEC を TNF- $\alpha$  で刺激して VWF を発現させ、浮遊血小板液の流動下で血小板が付着する状態を観察するために、まず刺激する TNF- $\alpha$  の濃度を設定するため静止系での HUVEC 刺激実験を行った。

ヒスタミン 25  $\mu$ M で 24 時間刺激すると発現する VWF-PP の 450nm での吸光度は 0.3 から 0.4 程度であるが、100  $\mu$ /ml から 10,000  $\mu$ /ml の TNF- $\alpha$  で 24 時間刺激すると、VWF-PP はヒスタミンの約 1.5 倍の VWF が出現することが確認できた。

図 5a HUVEC 刺激試験\_\_ヒスタミン

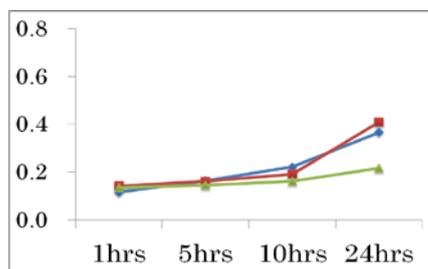
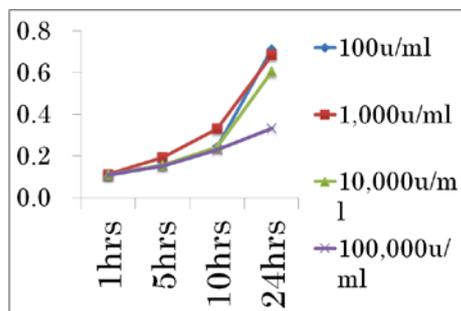
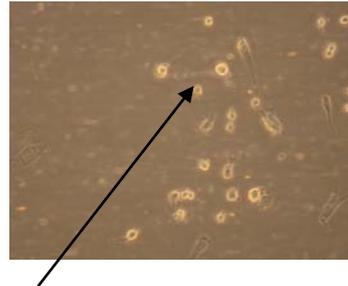


図 5bHUVEC 刺激試験\_\_TNF- $\alpha$



ここで HUVEC を刺激する TNF- $\alpha$  の濃度を 1000u/ml と設定して、流動下での VWF と血小板の動的な観察を行うこととした。

図 6



発現した VWF 上に血小板がビーズ状に付着した状態が確認される。

しかし、すべての HUVEC に VWF が発現する訳ではなく、また、ある一定以上の流速(?)では、培養 HUVEC までもがはがれて流れてしまうなどの現象が続くため、現在も本実験のモデルを作成中である。

#### 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 1 件)

① 矢田憲孝、西尾健治、関匡彦、福島英賢、瓜園泰之、畑倫明、奥地一夫

敗血症性 DIC に対する遺伝子組み換えトロンボモジュリンの凝固炎症への影響. 日本救急医学会雑誌 2011; 22(9): 749-757.

図

[学会発表] (計 6 件)

① 福島英賢、浅井英樹、矢田憲孝、渡邊知朗、伊藤真吾、関匡彦、瓜園泰之、西尾健治、奥地一夫. 敗血症患者における血中 von Willebrand Factor Propeptide の変動. 37 回日本集中治療医学会学術集会. 4/3/2010, 広島.

② 福島英賢、西尾健治、高野啓佑、渡邊知朗、伊藤真吾、関匡彦、瓜園泰之、畑倫明、奥地一夫. 敗血症患者における血中 ADAMTS-13 と von Willebrand Factor Propeptide の変動. 第 38 回日本集中治療医学会学術集会. 24/2/2011, 横浜

③ Fukushima H, Nishio K, Okuchi K, Isonish A, Matsumoto M, Fujimura Y, Takano K, Asai H, Watanabe T, Ito S, Seki T, Urizon Y, Hata M, Shida Y, Matsui H, Sugimoto M. Transition of plasma VWF propeptide, VWF and ADAMTS-13 in patients with septic DIC. 23<sup>rd</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 26/7/2011, Kyoto

- ④ Yada N, Nishio K, Asai H, Watanabe T, Seki T, Ueyama T, Fukushima H, Urizono Y, Hata M, Okuchi K. Therapeutic effect of recombinant thrombomodulin on the hemostasis and inflammatory response in patients with septic DIC. 23<sup>rd</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 26/7/2011, Kyoto
- ⑤ Fukushima H, Nishio K, Watanabe T, Seki T, Matsui H, Sugimoto M, Matsumoto M, Fujimura Y, Okuchi K. The ratio of ADAMTS-13 to VWF-Propeptide can reflect the disease severity and the extent of inflammation of the patients with severe sepsis or septic shock. 53<sup>rd</sup> American Society of Haematology Annual Meeting and Exposition. 12/12/2011, San Diego.
- ⑥ Yada N, Nishio K, Fukusima H, Seki T, Urizono Y, Hata M, Asai H, Doi M, Matsui H, Sugimoto M. Arecombinat thrombomodulin improves hemostasis disturbance and inflammation in septic patients with DIC. 53<sup>rd</sup> American Society of Haematology Annual Meeting and Exposition. 12/12/2011, San Diego.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし