

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592744

研究課題名(和文)敗血症に対するADAMTS13の効果

研究課題名(英文)The effect of ADAMTS13 on the pathophysiology of sepsis

## 研究代表者

西尾 健治(NISHIO, KENJI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60254489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： von Willebrand因子(VWF)とその切断酵素であるADAMTS13のバランスは、凝固や炎症という生体防御機構の発現と密接に絡んでいる。今回はマウスの心筋梗塞モデルを用い、ADAMTS13によるVWF機能抑制が心筋梗塞を抑制することを明らかにした。しかしながら、マウスの盲腸結紮穿刺による敗血症モデルでは、VWFノックアウトマウスでは致死率の上昇が認められ、VWF機能の抑制は生体にとって害になると考えられた。また人の敗血症においてはVWFプロペプチドとADAMTS13の比が、敗血症の重症度と相関し、VWF - ADAMTS13軸が敗血症の病態生理に関与していることが示唆された。

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 plays a role in safeguarding the myocardium from coronary artery ischemia by reducing VWF-dependent inflammation as well as thrombosis. Next we studied VWF contribution to pathophysiology of sepsis using a mouse model of experimental sepsis involving cecal ligation and puncture (CLP). VWF gene-deleted (VWF<sup>-/-</sup>; knock-out: KO) mice showed a significantly lower survival rate than wild-type mice after CLP. From those findings, in different types of inflammation, suppression of VWF function may lead to harm body. We need to study more about these differences.

The ratio of VWF-propeptide to ADAMTS13 is associated with disease severity in patients with severe sepsis or septic shock. It means that it may be possible that correcting the imbalance between VWF and ADAMTS13 could be therapeutically useful.

研究分野：医歯薬学

キーワード： von Willebrand factor ADAMTS13 inflammation infarction sepsis

1. 研究開始当初の背景

我々は生体防御反応のうち凝固反応と炎症反応の関連性とその制御について研究を行ってきた。多種の因子が両反応の形成に関わっているが、特に von Willebrand 因子 (VWF) とその切断酵素である ADAMTS13 に注目してきた。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、止血と組織修復に関連する役目を担っている。この VWF の機能は subunit がより重合した、より長い VWF の方が強く、VWF 切断酵素 ADAMTS13 により適度な長さに切断されて、機能を調節されている。

以前、我々は ADAMTS13 が止血血栓の表面で VWF を切断することにより、血栓の血管内腔への進展を制御しているという新たな機能を発見した。実際生体でもマウスの中大脳動脈虚血再灌流モデルでは、ADAMTS13 が欠如していると、虚血再灌流傷害により生じる VWF 豊富な微小血小板血栓の発育は制御されず、血管閉塞をきたし、炎症も発現して、脳梗塞が悪化する事を報告した。つまり ADAMTS13 は脳の虚血再灌流傷害に対して、血小板血栓形成と炎症発現に抑制的に働き、脳梗塞の新たな治療薬もしくは予防薬になる可能性を示唆した。

以上のことより、脳梗塞と同様に血栓性疾患として有名な心筋梗塞の病態や炎症疾患の最も重篤なものである敗血症の病態と VWF-ADAMTS13 軸との関連性を検討することは、新たな治療法の開発につながるものと考えられ、今回検討をおこなった。

しかしながら、以上の研究は殆ど in vitro であるか、マウスを使用したものであり、人の生体にとって、VWF-ADAMTS13 軸がどれだけ人の敗血症の病態生理にかかわっているのか明らかではない。最近敗血症患者では血液中の ADAMTS13 の濃度が敗血症の生存予後と相関するとの報告がなされたり、ADAMTS13 の機能消失時に VWF が適度に切断されず、血液中に出現するとされる巨大 VWF (Ultra-large multimer VWF, UL-VWF) が、予後不良の敗血症患者で検出されるとの報告などがなされた。先天性 ADAMTS13 欠損症である Upshaw Shullman 症候群患者においては、ADAMTS13 の血中濃度が数パーセントあれば、VWF の機能を調節するには十分であるとされ、敗血症の患者では ADAMTS13 の血中濃度が数パーセントに低下することはまれであり、UL-VWF が出現するという事実は、敗血症による血管内皮傷害により VWF の分泌が亢進して、局所での ADAMTS13 の機能不全が起こっているものと推察した。そこで、血管内皮細胞からの VWF 分泌速度と相関するとされる血中 VWF propeptide (VWF-pp) 濃度と血中 ADAMTS13 濃度の比が、VWF-ADAMTS13 軸のアンバラ

ンスをあらわすのに最も適したものであると考え、敗血症患者の種々の病態を表現するマーカーと VWF-pp/ADAMTS13 比の関連性を検討することとした。

2. 研究の目的

心筋梗塞と VWF-ADAMTS13 軸の関連性を明らかにする。

敗血症と VWF-ADAMTS13 軸の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

-i マウス心筋梗塞モデル

ADAMTS13 ノックアウトマウス (KO) (*Adamts13*<sup>-/-</sup>) とワイルドタイプ (WT) を用い、心臓の冠動脈の前下降枝を結紮して心筋梗塞を作成し、心機能と組織を両群で比較検討した。また ADAMTS13 ノックアウトマウスの一部ではリコンビナントの ADAMTS13 (3mg/マウス) を注入してその効果を観察した。

全てのマウスは 12-14W であり、結紮後 1 週後に心臓エコーにて心機能の評価を行い、また心筋組織を Azan 染色にて染色し、心筋梗塞の面積の割合を infarction ratio としてあらわした。

-ii マウス敗血症モデル

VWF ノックアウトマウス (VWFKO) とワイルドタイプ (WT) を用い、盲腸結紮穿孔による腹膜炎の敗血症を作成し、生存率や組織の比較検討を行う。

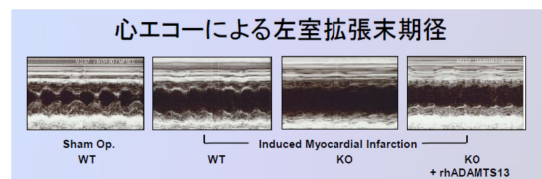
-iii 人の敗血症

人の敗血症患者の血液中 VWF-pp/ADAMTS13 濃度比 (V/A 比) を測定し、腎機能や炎症の程度との相関を検討し、VWF-ADAMTS13 軸の敗血症の病態生理への関与を検討する。

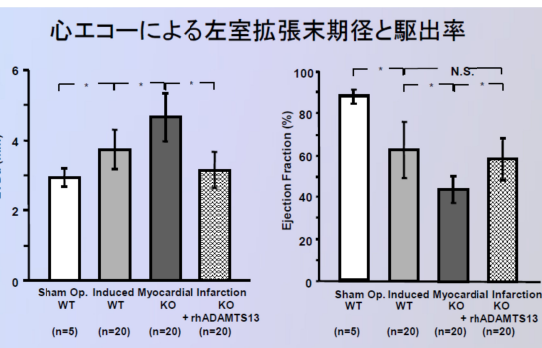
4. 研究成果

-i 心筋梗塞モデル

心筋梗塞を作成したマウスの心臓エコー検

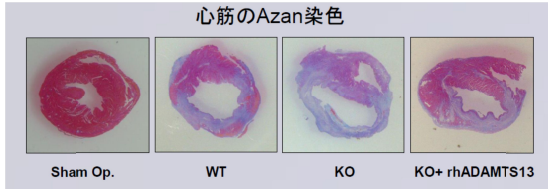


査では図に示すように、Sham オペレーションを施したマウス (Sham Op. WT) では心機能の低下は認めず、ADAMTS13 ノックアウトマウス (KO) ではワイルドタイプ (WT) に

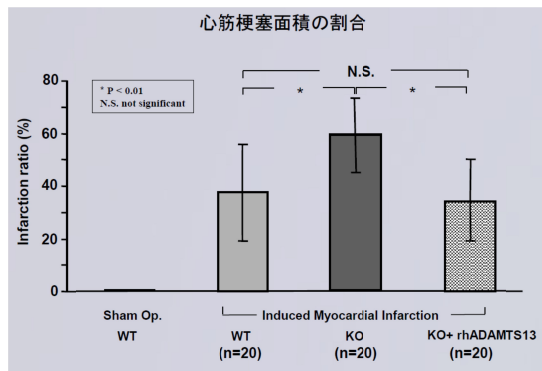


比し、左室拡張末期径 (LVd) はより拡大し ( $p < 0.01$ )、駆出率 (Ejection Fraction) はより低下 ( $p < 0.01$ ) していた。また、拡張期末期径の拡大や駆出率の低下はリコンビナント rhADAMTS13 の注入 (KO+rhADAMTS13) により是正された。

また、組織の検討では、下図に示すように、



Azan 染色で赤く染まっているのが無変化の生きていた心筋組織であり、青く染まっているのが Fibrin、すなわち梗塞した組織と考えられる。このことより梗塞の面積の割合を infarction ratio として表示した。



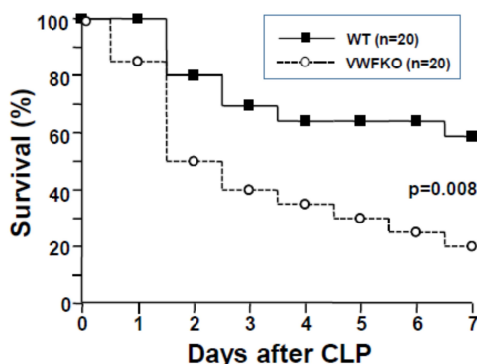
図で示すように、Sham Op. マウスでは心筋梗塞は惹起されず、KO マウスでの心筋梗塞の面積は WT マウスより有意に大きく、その梗塞面積拡大は rhADAMTS13 の注入により WT マウス程度に縮小した。

以上より、ADAMTS13 は脳梗塞と同様に、心筋梗塞の病態生理に深くかかわっており、心筋梗塞の程度を軽減することに役立っていると考えられた。すなわち、ADAMTS13 は心筋梗塞の予防薬もしくは治療薬となりうる可能性が示唆された。

#### - i 敗血症モデル

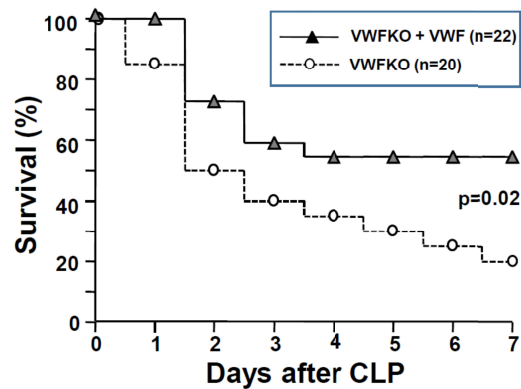
盲腸結紮穿孔による腹膜炎の敗血症モデルでは、予想に反し VWF ノックアウトマウス

#### 敗血症マウスの生存率 (WT vs VWFKO)



(VWFKO) がワイルドタイプ (WT) より生存率が低く、この生存率低下は VWF の注入により是正された。すなわち、この腹膜炎による敗血症モデルでは、生存に VWF が必須であった。すなわち、今までの脳梗塞や心筋梗塞モデルでは VWF/ADAMTS13 バランスを小さくすると病態が改善していたのとは異なっていた。この病態の差につき、現在も研究中である。

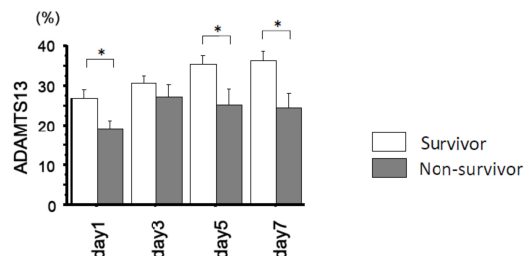
#### 敗血症マウスの生存率 (VWFKO vs VWFKO+VWF)



#### - ii 人の敗血症

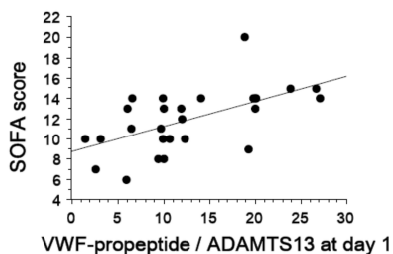
敗血症患者の血中 ADAMTS13 濃度は生存者より非生存者の方が低値を呈した。

#### ADAMTS13 between survivor and non-survivor



VWF-pp/ADAMTS13 比 (V/A 比) が各種敗血症の重症度と関連するか第 1, 3, 5, 7 病日で検討したところ、V/A 比はコントロールの 12 倍まで増加しており第 7 病日においても 7 倍程度に増加し血管内皮障害の持続をうかがわせた。V/A 比は全病日で最高 SOFA スコア・TNF 濃度と相関し、APACHEII スコアとは第 1, 5 病日、Cr 濃度とは第 1, 5, 7 病日において相関した。また 24 時間以内に stage 1 以上の AKI (急性腎障害) を呈した群の方が呈しなかった群より優位に増加していた。以上より V/A 比は敗血症患者の血管内皮障害の程度を表現し、VWF 分泌と ADAMTS13 濃度のアンバランスを呈し、より重症度が高く、血漿交換やリコンビナント ADAMTS13 など ADAMTS13 の活性を補充

## SOFA score vs. VWF-pp/ADAMTS13



する治療などの適応判定に有効な可能性があることが判明した。これらよりVWF-ADAMTS13 軸は敗血症の病態生理にも関与していることが示唆された。

### 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 3件)

Doi M, Matsui H, Takeda H, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M. ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 査読有108:1236-1238, 2012.

Fukushima H, Nishio K, Asai H, Watanabe T, Seki T, Matsui H, Sugimoto M, Matsumoto M, Fujimura Y, Okuchi K. Ratio of von Willebrand Factor Propeptide to ADAMTS13 Is Associated With Severity of Sepsis. *Shock* 査読有39:409-414, 2013.

Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M. Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. *Haematologica* 査読有 2014 Jun 27. pii: haematol. 2014. 109512. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 5件)

Kenji Nishio. A possible new therapeutic strategy with ADAMTS13 for cerebral infarction. SIRIC International Symposium 2012 Perspectives in disease models of the Heart and the Brain of Mice and Men. Seoul (Korea) 2012年07月08日  
Shogo Kasuda, Hideto Matsui, Shiro Ono, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Katsuhiko Hatake and Mitsuhiko Sugimoto. von Willebrand Factor-Dependent Inflammatory Responses in Mouse Septic Model by Cecal Ligation and Puncture. ASH (American Society of Hematology)

meeting San Francisco (USA) 2014年12月07日

福島英賢, 西尾健治, 多田祐介, 北岡寛教, 渡辺知朗, 川井廉之, 関匡彦, 則本和伸, 奥地一夫. 重症敗血症・敗血症性ショックにおける VWF propeptide /ADAMTS13 比は重症度を反映する. 第40回日本集中治療医学会総会. 松本.

2013年2月28日

福島英賢, 西尾健治, 関匡彦, 杉本充彦, 石西綾美, 松本雅則, 藤村吉博, 奥地一夫. VWF propeptide/ADAMTS13 比は敗血症患者の重症度と相関する. 第35回日本血栓止血学会学術集会. 山形 2013年6月1日

Yasunori Matsunari, Masaaki Doi, Hideto Matsui, Kenji Nishio, Hitoshi Furuya, Masahiko Kawaguchi, and Mitsuhiko Sugimoto. Flow-Dependent Functions of Soluble or Immobilized Tissue Factor in Mural Thrombus Formation Mediated by von Willebrand Factor. 2013 ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans (USA). 2013年12月8日

[図書](計 1件)

西尾健治. 敗血症と von Willebrand 因子関連因子 (ADAMTS13 を中心に). 敗血症の診断/治療の実状と病態・メカニズムをふまえた開発戦略 技術情報協会, pp154-157, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~general/index.html>

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・教授

研究者番号：60254489

研究者番号：

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：