

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591129

研究課題名 (和文) 血流状況下における VWF-ADAMTS13 の機能連関の解析

研究課題名 (英文) Analysis of functional relationships between VWF and ADAMTS13 under blood flow conditions

研究代表者

杉本 充彦 (SUGIMOTO MITSUHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80192128

研究成果の概要：心筋梗塞をはじめとした致死的な動脈血栓症は、止血因子である von Willebrand 因子 (VWF) が主役を演じて成立する。本研究では血流下における ADAMTS13 による VWF 機能制御メカニズムを解析した。その結果、VWF、血小板、ADAMTS13 および、ずり応力の 4 者による ADAMTS13 の VWF 制御メカニズムは、止血機転が機能した後に血管閉塞のみを特異的にブロックするユニークなものであり、止血機能と抗血栓機能とが両立する新世代型の抗血栓症戦略の可能性を示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：血栓・止血学、動脈血栓症、VWF, ADAMTS13

## 1. 研究開始当初の背景

昨今、本邦では死因としての血栓性疾患の占有率が悪性新生物を上回る勢いで増大しており、血栓症に対する社会的な関心が高まっている。心筋梗塞や脳梗塞をはじめとした致死的な動脈血栓症は、血流の鬱滞状況で生じる静脈血栓症とは異なり、早い血流下 (高いずり速度下) で成立することが知られている。この高ずり速度下での血栓形成には von Willebrand 因子 (VWF)

の機能に依存した血小板凝集が主役を演じることが明らかになっており、高ずり速度下での VWF 機能の適正な制御が致死的な動脈血栓症対策にもっとも重要と考えられる。

ごく最近、VWF 機能は生体では、VWF 切断因子 (ADAMTS13) で制御されていることが判明した。この因子の機能不全は VWF 機能の過剰昂進に直結し、TTP (Thrombotic thrombocytopenic purpura) や

TMA(Thrombotic microangiopathy)などの血栓症を引き起こすことが明らかになった。したがって、「VWF 機能の適正な制御」を最終ターゲットとする動脈血栓症形成メカニズムの解明においては、VWF および ADAMTS13 両者の機能連関の解明が不可欠であると考えられる。

## 2. 研究の目的

私たちはここ数年、*in vitro* で血栓形成過程をリアルタイムに観察、血小板凝集および血液凝固を包括的に評価・解析する新しいフローチャンバー実験システムを確立し、生体状況に最も近いと考えられる全血流動状況下における壁血栓形成メカニズムの解明を進めてきた。特に VWF のずり速度依存性機能の解明を中心とした研究成果を世界に向けて発信してきている。本研究では、ここまでの成果をさらに発展させるべく、全血流動状況下で ADAMTS13 のずり速度依存性機能の解明および、VWF と ADAMTS13 との高ずり速度下での機能連関の解明を目的とし、新機軸の抗動脈血栓症戦略を展開する。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず、フローチャンバーシステムを基盤とした「さまざまなずり速度の全血流動状況下での ADAMTS13 活性測定法」を確立した。本研究の基盤となる既報のフローチャンバーシステムは、われわれの施設に完備しているが、以下にこのシステムの概要を簡単にのべる；コラゲンや VWF フラグメントなどの生理的な血管内皮下組織構成成分をガラスプレートに固相化し、ガスケットとともにフローチャンバーに組み込む。このチャンバーをリアルタイム共焦点走査顕微鏡にセットし、全血をシリンジポンプで一定速度に吸引しチャンバーに流す。研究のターゲットとなる蛍光標識された物質の血栓形成過程における動態を、全血流動状況下に検索するものである。同時に、リアルタイム画像データをコンピュータに取込み、3次元画像解析ソフトを用いて詳細に解析する。このフローシステムに、松本雅則らのグループが最近開発した静止系 ELISA による ADAMTS13

活性測定法 (Kato S,etal,Transfusion

46;1444-1452, 2006) をドッキングさせ、新規の血流下での ADAMTS13 活性評価系を確立した。この方法の基本原理は、ADAMTS13 による VWF 切断で生じる VWF 切断断端の C 末端部位を特異的に認識するモノクローナル抗体(N10)を利用するものである。すなわち、この抗体は ADAMTS13 が VWF を切断した場合のみ VWF に反応するため、蛍光標識された抗体を経時的に血流状況下で形成しつつある血栓に反応させて、形成血栓における ADAMTS13 の VWF 切断活性を評価した。同時に、種々の血流状況下での血栓形成程度・血栓体積を測定することで、間接的に ADAMTS13 の抗血栓活性を評価した。

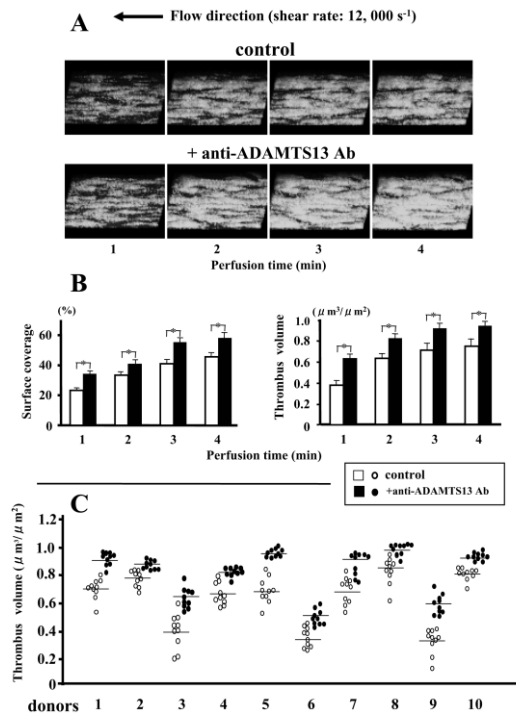
## 4. 研究成果

活性を完全にブロックする抗 ADAMTS13 抗体を用いた阻害実験で、高ずり速度血流状況下の固相化コラゲン上での血小板血栓形成過程における ADAMTS13 機能を評価した。12,000  $s^{-1}$  という極めて高いずり速度での血液環流において、ADAMTS13 活性をブロックした場合のコラゲン上での血栓形成はコントロールに比較して迅速かつ有意に亢進していた(図 1)。

この成績は、ADAMTS13 が高ずり応力下における血栓成長を制御していることを明確に示している。すなわち、ADAMTS13 の機能としては、血管内皮細胞から放出直後の ULVWF を切断することはすでに明らかになっていたが、これに加えて、ADAMTS13 は高ずり応力下での血栓形成現場で VWF を切断し、リアルタイムに VWF 機能ならびに血栓成長を制御していることが判明したのである。

注目すべきは上述の成績が、12,000  $s^{-1}$  という極めて高いずり速度下でのものである点である。通常の血小板機能研究におけるフロー実験では 1,000  $s^{-1}$  以上が高ずり速度と定義され、実際、1,000  $s^{-1}$  以上のずり速度下での血小板粘着・凝集は完全に VWF-GP Ib 相互作用に依存する。しかしながら、私たちのフロー実験では、VWF-GP Ib 相互作用を惹起するに十分な通常の高ずり速度 (1,500  $s^{-1}$ ) 下では ADAMTS13 活性を把握することはできな

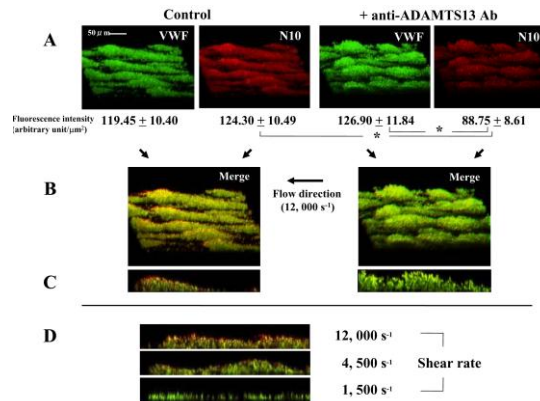
った。すなわち、ADAMTS13によるVWF切断には、VWF-GP Ib結合反応よりもはるかに高いずり応力が要求されると考えられた。



**図1 高ずり応力下での血栓生成における抗ADAMTS13機能阻害抗体の効果** (A)コラゲン上での経時的血栓形成像はコントロール(上段)に比較して明らかに抗ADAMTS13抗体存在下(下段)で亢進している。(B)血栓の表面占有率および血栓体積のStatisticな解析、および、(C)10人のコントロール血液供給者の血栓体積の解析でも、上述の成績が確認された

引き続き、この極めて高いずり速度条件(12,000 s<sup>-1</sup>)で形成された血栓内のどの部位で実際にADAMTS13がVWFを切断しているのかをKatoらの作製したユニークなモノクローナル抗体(N10)を用いて検討した。N10抗体は、VWF A2ドメインの切断部位(Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>)がADAMTS13によって切断した後に露出するTyr<sup>1605</sup>を特異的に認識する(図5)。すなわち、N10抗体はインタクトなA2ドメインには結合せず、ADAMTS13に切断されたVWFにのみ反応するため、この抗体の反応性はADAMTS13のVWF切断活性をダイレクトに反映する。形成された血栓に対するこの抗体の反応性を検索したところ、血流に直接暴露され、かつ血栓成長の前線基地である血栓表面部で優先的にVWFが切断されていることが判明し

た(図2)。さらに、この血栓外表面部に優先的なADAMTS13によるVWF切断は、ずり速度が高いほど顕著であった。血流に直接暴露する血栓成長先進部では、VWFに血小板が結合することで、ずり応力によるVWFマルチマーへのストレッチング効果が増強され、切断部位であるA2ドメインがより露出することが推定された(図2)。

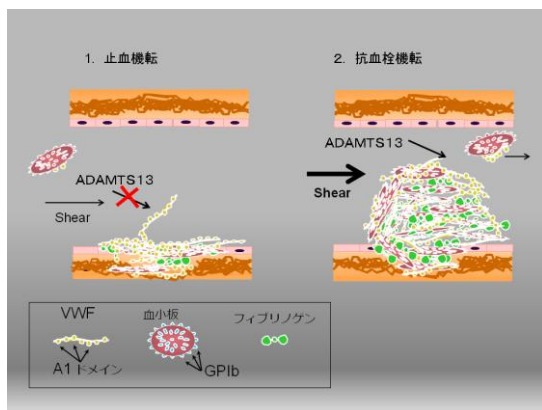


**図2 高ずり応力下で形成された血栓におけるADAMTS13によるVWF切断活性の解析** (A) 12,000 s<sup>-1</sup>の高ずり速度下で形成された血栓をN10抗体(赤色)と全VWFポリクローナル抗体(緑色)で2重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。得られた水平画像のシリーズをパイルアップして三次元画像を構築した。(B) 2色の画像を融合させたイメージでは、蛍光強度の高い色に優位に染色され、2色の蛍光強度がほぼ等しい場合は黄色となる。コントロール血栓は全体的に黄色調に観察され、抗ADAMTS13阻害抗体存在下で形成された血栓は緑色優位に染色されている。(C) B画像の縦断面: コントロール血栓では、血栓の外表面辺縁が優位に赤く染色されているが、抗ADAMTS13阻害抗体を添加した場合にはこの傾向は著明ではない。これらの成績は、ずり応力に直接暴露され、かつ、On-goingに血小板結合反応が起こっている血栓外表面辺縁で優先的にADAMTS13によるVWF切断が進展していることを示している。(D) さまざまなずり応力下で形成されたコントロール血栓の2重染色縦断面画像: ADAMTS13による血栓外表面辺縁での優先的なVWF切断は、より高いずり速度で顕著であり、ADAMTS13のずり応力依存性機能特性を示している。

これらの成績から、ADAMTS13のずり応力依存性の機能特性、および、ずり応力によるADAMTS13によるVWF切断活性増幅メカニズムが明らかとなった。以上の成績から、以下の「ADAMTS13のずり応力依存性機能特性に基づく止血メカニズム制御理論」が構築された(図3)。

血管壁が傷害を受けた場合、血小板が粘

着・凝集することで壁血小板血栓を形成し血管傷害部位の修復を図る。この止血メカニズムは生体からの血液喪失を防御し、生命維持に必須である。逆に、壁血栓が血管内腔に大きく成長した場合、最終的には血管閉塞→血液遮断→臓器不全をひきおこし生命の危機となる（血栓症）。したがって、このメカニズムは生体において精密に制御されているはずである。今回の私たちの成績は、少なくとも高ずり応力下での止血メカニズムの制御機転をバイオメカニクスの観点から解明できたと考えている。



**図3 ADAMTS13のずり応力依存性機能特性に基づく止血メカニズム制御理論** 高ずり応力下で、血管損傷部位におけるVWF依存性の血小板粘着・凝集が進行する（止血機転）。血小板粘着・凝集反応の進行につれ、徐々に血栓が増大していく。これにともない、血管内腔のフリースペースが狭小化することになり、結果として局所ずり応力が高くなる。同時に、血流に直接暴露する血栓成長先進部では、VWFの血小板結合ともなつてずり応力のADAMTS13活性増幅効果が飛躍的に亢進する。すなわち、血栓が成長すればするほど、ADAMTS13の血栓成長ストッパー（制御）機能が増幅されて致命的な血管閉塞を回避させる（抗血栓機転）。

高ずり応力で、まずVWF-GPIIb相互作用が促進され、VWF依存性の血小板粘着・凝集が進行する（止血機転）。血小板粘着・凝集の初期相のこの時点ではADAMTS13の機能は未ださほど活発ではない。血小板粘着・凝集反応の進行につれ、徐々に血栓が大きくなっていき、血管内腔のフリースペースが狭小化することになる。ずり応力の定義「血管腔が狭いほどずり応力が高い」から考えると、結果として血栓の増大に呼応して局所ずり応力が高くなる。理論的には、閉塞直前の血管腔におけるずり応力は無限大に上昇して

いるはずである。同時に、血流に直接暴露する血栓成長先進部では、VWFへのOn-goingな血小板結合でADAMTS13によるVWF切断活性が飛躍的に亢進する（図3）。

言い換えれば、血栓が成長すればするほど、ADAMTS13の血栓成長ストッパー（制御）機能が増幅されて致命的な血管閉塞を回避させることになる（抗血栓機転）。

すなわち生体では、VWF、血小板、およびADAMTS13の三者が、ずり応力のタクトの下で絶妙なハーモニーを奏でて、致命的な動脈閉塞を防御しつつ適正な止血血栓形成を司っていると想定されるのである。

このメカニズムが、心筋梗塞を引き起こす冠動脈などの細動脈血栓症にも直ちに適応できるか否かは未だ議論の余地があるが、少なくともTTPの病因論を明確に説明できるものと考えている。心筋梗塞やストロークなどの致命的な動脈血栓症に対する抗血栓症戦略の命題は「可能な限り出血リスクを減じて、効果的に病的血栓症を防ぐ」であるが、一般的な抗血小板療法や抗凝固療法による従来型の抗血栓戦略は出血傾向を助長する。

これに対して、今回明らかとなったADAMTS13のずり応力依存性機能特性は、止血機転が機能した後に血管閉塞のみを特異的にブロックするユニークなものであり、止血機能と抗血栓機能の両立の可能性を提示している。したがって今後、ADAMTS13分子は抗血栓症戦略の構築に重要な地位を占める可能性がある。

#### 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 4 件）

- ① Yasuaki Shida, Kenji Nishio, Mitsuhiko Sugimoto, Tomohiro Mizuno, Masaaki Hamada, Seiji Kato, Masanori Matsumoto, Kazuo Okuchi, Yoshihiro Fujimura and Akira Yoshioka. Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions *Blood* 111:1295-1298, 2008 (査読有)
- ② 杉本充彦、志田泰明、西尾健治. 血流下

における ADAMTS13 活性発現機構  
血液・腫瘍科 56:717-723, 2008 (査読無)

- ③ 杉本充彦, フローチャンバーシステムを用いた血栓形成メカニズムの解析—ADAMTS13による血小板血栓制御機構—. 日本血栓止血学会雑誌 19:814-821, 2008 (査読無)
- ④ 藤村吉博, 松本雅則, 植村正人, 杉本充彦, 小亀浩市, 宮田敏行. 動脈血栓症の制圧—VWF-GPIIb軸依存性血小板血栓形成を調節するADAMTS13の基礎・臨床病態解析. 最新医学 64:290-321, 2009(査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Mitsuhiko Sugimoto. Functional imaging of von Willebrand factor as a thrombogenic surface specific under high shear blood flow. The 5<sup>th</sup> Aso International Meeting (Kumamoto, 2007, May 18<sup>th</sup>)
- ② 志田泰明, 杉本充彦, 水野智寛, 濱田匡章, 吉岡章, 西尾健治, 福島英賢, 奥地一夫, 加藤 誠司, 松本雅則, 藤村吉博. 全血流動状況下におけるADAMTS13活性発現メカニズムの解析. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会 (神奈川県横浜市, 平成19年10月11日)
- ③ 志田泰明, 杉本充彦, 水野智寛, 濱田匡章, 吉岡章, 西尾健治, 奥地一夫, 加藤誠司, 松本雅則, 藤村吉博. 血流下でのADAMTS13 による壁血栓成長制御メカニズム—ざり速度との機能連関解析. 第30回日本血栓止血学会学術集会(三重県志摩市, 平成19年11月16日)
- ④ Kenji Nishio, Masayuki Fujioka, Kazuhide Hayakawa, Kenichi Mishima, Michihiro Fujiwara, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yasuaki Shida, Mitsuhiko Sugimoto, Hidetada Fukushima, Kazuo Okuchi. ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage. The 50<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (San Francisco, USA 2008, December 8<sup>th</sup>)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 充彦 (SUGIMOTO MITSUHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80192128

(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