

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790354

研究課題名(和文) 静脈血栓塞栓症におけるフォンウィルブランド因子とADAMTS-13の役割

研究課題名(英文) The role of ADAMTS-13 and von Willebrand factor in venous thromboembolism.

研究代表者

盛口 清香 (Moriguchi, Sayaka)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90468041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：静脈血栓塞栓症は、深部静脈血栓による肺動脈閉塞で発症する重篤な循環障害である。臨床研究で抗血小板薬の有効性が示されているが、静脈血栓への血小板の関与は明確ではない。本研究では、血小板の機能発現に重要なVWFとその制御蛋白について検討した。

深部静脈血栓症症例を用いた免疫組織化学では、血栓にはフィブリン、血小板、VWF、FVIIIが多く存在した。抗FVIII抗体(中和抗体)は血流フローチャンバー上の血小板粘着凝集を減少させたが、VWF、ADAMTS-13の関与は明確ではなかった。家兔頸静脈血栓モデルでは、FVIIIは静脈血栓サイズを促進し、血小板・フィブリンの陽性面積を増大させた。

研究成果の概要(英文)：Venous thromboembolism is a severe circulatory disorder that develops by occlusion of the pulmonary artery via deep venous thrombosis. The efficacy of anti-platelet agents is shown in the prevention of venous thromboembolism in some clinical studies. However, involvement of platelet and venous thrombosis is not clear. The present study investigates the von Willebrand factor (VWF), which is important to functional expression of platelet, and their control protein. Immunohistochemical study of deep venous thrombosis shows that venous thrombi is positive for fibrin, platelet, VWF and Factor VIII. Anti-FVIII antibody (Neutralizing antibody) reduced the platelet aggregation on flow chamber system, but not Anti-VWF antibody or Anti-ADAMTS-13. In rabbit venous thrombosis model, FVIII promoted the venous thrombus size, and increased the positive area of the platelet and fibrin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：血栓症 静脈血栓

1. 研究開始当初の背景

静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism: VTE) は、下肢等の深部静脈に形成された血栓が、肺動脈を塞栓して生じる致死的な疾患である。本邦では稀とされてきたが、臨床診断技術の進歩により、本比較的高い頻度で発症していること、また震災被災地では高率に発生することから、その病態解明と予防・治療の確立が緊急の課題となっている。

VTE の発症には、先天的あるいは後天的な血栓性素因に加え、長時間に及ぶ血流うっ滞による凝固活性亢進が重要で、フィブリンと赤血球に富んだ赤色血栓が形成されると一般に理解されている。しかし、申請者の人体病理学的検討においては、VTE 患者の血栓には数多くの活性化血小板が含まれており、特に、静脈壁の付着部では血小板とフィブリンから成る白色血栓の像を呈している (*Histol Histopathol.* 2009)。この所見は、動脈血栓形成同様、静脈においても血栓の形成初期の血小板の活性化及び粘着・凝集が重要であることを示唆している。

申請者は、人体病理の立場から血栓症の病態解明に取り組んでおり、特に血小板の凝集分子であるフォンウィルブラント因子 (von Willebrand factor: VWF) と、その分解酵素である A disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type 1-motif-13 (ADAMTS-13) に着目し研究を進めてきた。これまでに、動脈硬化により狭窄し、流速が増大した動脈の血栓形成には、

(1) 血小板と VWF の結合が必須であること

(2) VWF はマルチマー構造を有しており、より高分子量の VWF ほど血小板凝集作用が強いこと

(3) ADAMTS-13 は VWF を低分子量に切断することによって動脈血栓症の発症を制御していること

を明らかにした (*Am J Cardiol* 2006, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 2004, *Atherosclerosis* 2009)。また、静脈血栓においては、VWF が凝固 VIII 因子 (FVIII) を血小板上に集積させ、血栓の増大・成長を促進することを明らかにしてきた (*Histol Histopathol.* 2009, *Thromb Res.* 2009, 2010)。更に、これらの検討において、VWF と ADAMTS-13 が静脈血栓内に存在することを見出した。

国内外の動向として、ADAMTS-13 は流速の

速い血管において作用し、流速の遅い静脈での生理作用は乏しいと理解されている。VWF と ADAMTS-13 の血栓症における検討は、アテローム血栓症と称される急性心筋梗塞や脳梗塞など、動脈における検討がほとんどである。これまでに、静脈血栓形成には、血液凝固系因子が重要であると考えられている。一方、臨床研究で、静脈血栓塞栓症の予防に抗血小板薬の有効性が示されているが、静脈血栓に血小板がどの程度存在し、関与するのか明確ではない。

本研究では、血小板の機能発現に重要な VWF 及び ADAMTS13 を含む VWF の制御蛋白に着目し、静脈血栓症の発症機序についての検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、VWF 及び ADAMTS13 を含む VWF の制御蛋白 (組織因子・凝固 VIII 因子など) について、人体病理標本 (剖検症例・吸引血栓)、血流フローチャンバー、及び VTE 動物モデルを用いて、静脈血栓症の発症機序を人体病理学的立場より解析し、VTE 発症機序の解明と新たな治療法への展開を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 人体病理標本を用いた解析

VTE 症例の剖検標本、治療により吸引採取された下肢静脈および肺動脈血栓標本において VWF と各種 VWF 制御蛋白の共局在、血小板、フィブリン、白血球、赤血球との局在性を免疫組織化学で検討する。

(2) ヒト静脈血の VWF と VWF 制御蛋白 (ADAMTS-13) の検出

治療により吸引された静脈血栓と静脈血液を用いて、VWF と ADAMTS-13 の抗原量と活性を測定する。VWF についてはマルチマーパターンを解析し、静脈における VWF の存在状態及び ADAMTS-13 活性化の程度を評価する。

(3) 血流フローチャンバーによる機能解析

申請者は血栓形成をリアルタイムで可視化できるフローチャンバーを独自に構築している (*Atherosclerosis* 2009)。このチャンバーは、任意に速度を設定することが可能であり、うっ滞した深部静脈を想定した静脈速度下で、VWF 及び各種 VWF 制御蛋白が血栓のどこに局在し、血栓形成の過程でどのように関与するのかを明らかにする。

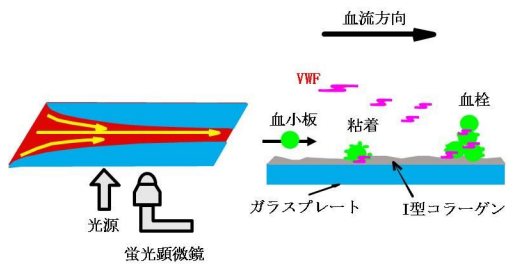
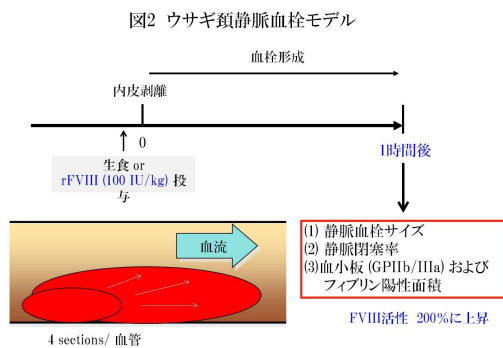


図1 血液フローチャンバーシステム

(4) 動物モデルによる抗血栓作用と出血傾向の評価

申請者らが作成した VTE の動物モデル (*Thromb Res.* 2010) を用いて、静脈血栓における VWF と各種 VWF 制御蛋白の関与を明らかにする。ADAMTS-13 の中和抗体を用いて、血中の VWF サイズ (高～低分子量) を調整し、静脈血栓の形成における VWF と ADAMTS-13 の相互作用を明らかにする。併せて、ADAMTS-13 機能抑制による出血時間、血小板機能、血液凝固能を評価する。



4. 研究成果

(1) 深部静脈血栓症症例の病理組織標本を用いて VWF、A disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type 1-motif-13 (ADAMTS-13)、血小板、組織因子、凝固 VIII 因子、フィブリンの局在・発現を免疫組織化学的手法で検討した。静脈血栓形成部には、フィブリンに加えて、血小板、VWF、FVIII が多く存在した (図 3)。一方、ADAMTS-13 や組織因子は極わずかであった。

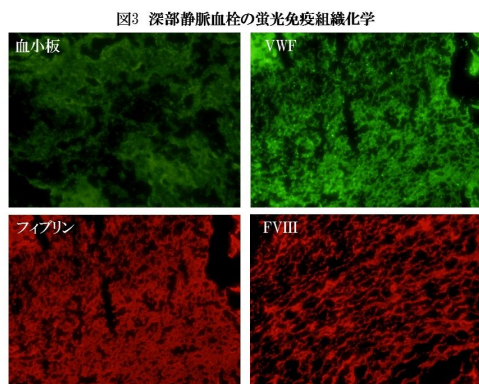


図3 深部静脈血栓の蛍光免疫組織化学

(2) 健康人から採取した血液に抗 VWF 抗体、抗 ADAMTS-13 抗体、抗 FVIII 抗体 (中和抗体) を添加し、大腿静脈レベルの血流速度に設定した血流フローチャンバー上で灌流し、血小板粘着凝集の早期過程をリアルタイムで解析した。抗 FVIII 抗体は血小板の粘着凝集を減少させた (図 4) が、VWF、ADAMTS-13 の関与は明確ではなかった (図 5)。

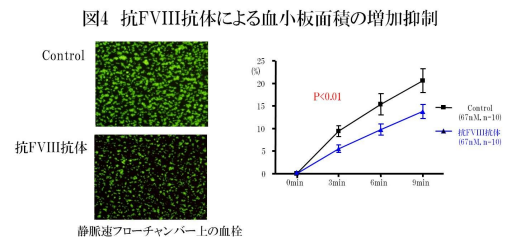


図4 抗FVIII抗体による血小板面積の増加抑制

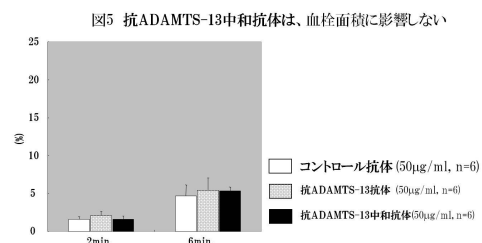


図5 抗ADAMTS-13中和抗体は、血栓面積に影響しない

(3) 家兔頸静脈血栓モデルにおいて、凝固 VIII 因子は静脈血栓サイズを促進し、血小板・フィブリンの陽性面積を増大させること、VWF は血小板粘着よりも FVIII の供給に重要であることを確認した。

今後、家兔静脈血栓モデルにて ADAMTS-13 の中和抗体を用いた実験を予定している。

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 2 件)

1 盛口清香、浅田祐士郎 血小板と動脈硬化 Pharma Medica. 査読なし, 30:2012. 21-26.

2 Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y et al (14 人, 5 番目). Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. PLoS One. 査読有り, 23:2014. e86426.

〔学会発表〕(計 2 件)

1 松田俊太郎、冠動脈の血栓サイズはプラーク破綻の大きさと組織因子発現の程度に相關する 第 35 回日本血栓止血学会学術総会、

2013年5月30日～6月1日、山形

2 Shuntaro Matsuda, Human coronary thrombus formation is associated with degree of plaque disruption and expression of tissue factor and hexokinase II in atherosclerotic plaques. XXIVth congress of the international society on thrombosis and haemostasis, 2013年6月29日～7月4日、オランダ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

盛口清香 (MORIGUCHI SAYAKA)

宮崎大学・医学部附属病院病理診断科・助教

研究者番号：90468041