

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461593

研究課題名(和文)血管内皮細胞による血流応答機構の解明および新規血栓止血制御戦略の構築

研究課題名(英文)Regulation of the function of endothelial cells by shear stress

研究代表者

志田 泰明 (shida, yasuaki)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10721566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：1) 血流下血栓形成にはvon Willebrand factor (VWF) の影響が強く、血液凝固第VIII因子(FVIII)は単独では血栓形成を改善しなかった。しかしVWFの存在下でFVIIIは血栓形成を改善した。VWFの補助の元でFVIIIは血流下でも凝固能を発揮するものと考えられ、FVIII/VWF結合の重要性が示唆された。2) 血管内皮細胞の血流下培養に成功した。血流がない状況で培養された血管内皮細胞は類円形を示したが、一方向性の層流を受けた血管内皮細胞はその血流に沿って伸展した。方向性の無い乱流刺激を加えたところ、細胞形態の変化は起こるものの一定の傾向がなかった。

研究成果の概要(英文)：1) von Willebrand factor (VWF) plays a dominant role in shear stress mediated thrombus formation. Factor VIII (FVIII) alone did not improve thrombus under high shear. However, in the presence of VWF, FVIII improved thrombus formation, suggesting the importance of FVIII/VWF interaction in thrombus formation under high shear. 2) We succeeded the culture of endothelial cells (ECs) under shear conditions. ECs demonstrated round shape under static condition and string-like elongated shape under laminar shear condition. Under disturbed flow condition which does not have the clear direction, ECs demonstrated various shapes including round shape to elongated shape which does not have the directions.

研究分野：血液

キーワード：血流 ずり応力 凝固 血栓

## 1. 研究開始当初の背景

血液は血管内皮に覆われた血管内を激みなく流れている。しかし、ひとたび血管内皮に損傷、あるいは炎症などによる刺激が生ずると、これに反応して血管内皮は性格を「抗」血栓から「向」血栓へと転じる。近年、これまで考えられてきた機械的、化学的刺激に加えて、血流により生じるすり応力 (Shear stress) がこの制御メカニズムに影響していることが明らかになってきた。血管内皮細胞は静止下で培養すると類円系で一定の方向性がないが、Shear stress 下ではその流れの方向に沿って整列することが知られている。すなわち、血流を感知し、それを細胞骨格の変化に伝える細胞内伝達経路が血管内皮細胞には用意されているのである。実際、動脈硬化や血栓症が起こる部位を見てみると分岐部の乱流が生ずる部位に病変が好発することも血流と血管内皮病変の関連を示唆している。血管が一直線の部位では血管内皮は動脈硬化から守られているが、その一方で分岐部では動脈硬化が起こり、さらなる局所での Shear stress の増大や血流パターンの変化につながっていくのである。

最近の報告によると、一方向性のLaminar flow (層流) により抗血栓、抗炎症の役割を担うendothelial nitric oxidase synthetase (eNOS)、Thrombomodulin(TM) やプロテインC の発現が活性化することが知られている。逆に、Disturbed flow や Oscillatoryflow などと呼ばれる乱流にさらされた血管内皮はTissue Factor(TF)、Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、Platelet endothelial adhesion molecule 1 (PCAM-1) を発現するなど、炎症性サイトカインやトロンピンにより刺激を受けた際と同様にpro-thrombotic 反応を見せ

る (図2)。

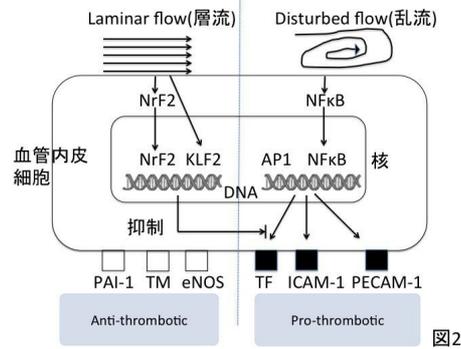


図2

このような血流に対する反応の決定に寄与する転写因子として代表的なものが Kruppel-like factor 2 (KLF2) と Nuclear factor B (NF B) である。様々な炎症反応は最終的にNF B の核内集積、DNA への結合から細胞の反応へとつながっていく。KLF2 の機能発現メカニズムは、NF B の働きを抑制することによって考えられているが、その詳細は依然として不明な点が多く、更なる検討を要する状況である。

## 2. 研究の目的

1) 血流が血管内皮における FVIII や VWF の mRNA 発現や蛋白生成に及ぼす影響の解析

FVIII の産生部位の特定は非常に微量かつ不安定な FVIII 転写物や蛋白のために困難で、肝臓や血管内皮が疑われてきたが未だに結論が出ていない。最近の報告によれば liver sinusoid endothelial cell (LSECs) が主役であり、肝細胞の貢献は限定的である。一方、重篤な肝障害時にも FVIII レベルが保たれていることは、肝以外の血管内皮での FVIII 産生が考えられている。血流環境と FVIII と VWF の発現レベルを検討し、血管内皮の血流応答メカニズムを明らかにしたい。また、同じ血管内皮細胞でも FVIII を発現する細胞としない細胞がある。すなわち組織によって発現が異なっているが、

その理由は明らかではない。我々はその一つの要因として血流の影響を推測している。血管内皮細胞の種類を変えることで組織特異的な発現があるのか検討する。

2) VWF、FVIII の局在、相互作用の検討

FVIII は血中ではそのシャペロンであるVWF とnon-covalent な複合体を形成することにより、その半減期は2 時間から12 時間にまで延長する。FVIII の血中濃度は100ng/ml (~1nM)であるのに対し、VWF は10  $\mu$ g/ml (50nM)である。すなわちFVIII のFVIII-VWF 複合体に対するモル比率は~1:50 である。VWF も血管内皮で産生されるが、FVIII とVWF がどこで出会い、どこで結合するのか、なぜ結合比が~1:50 なのか等は依然として不明である。我々はこの新規FVIII 発現評価系を用いて、血管内皮内でこれらが既に結合しているのか、それとも別々に分泌されたのちに血中で結合するのか、FVIII とVWF の結合が分泌に影響するのか、検討する。

### 3) 血流下血栓形成モデルの開発

血栓形成メカニズムは血流下では静止下と異なるメカニズムをとるが、VWF はこの中で中心的な役割を果たす。VWF は約250kDa の蛋白 (VWF subunit) が多数つらなつた、2000 万Da にもおよぶマルチマーと呼ばれる構造をもつ超巨大分子である。それぞれのVWF subunit がFVIII、コラーゲン、血小板への結合部位およびADAMTS13 (VWF 切断酵素) による切断部位を有しているが、マルチマーがボールのようにまとまった状態で血中を循環しているため、通常は血小板やADAMTS13 とは共存するが反応せず、血管内皮損傷部位に露出するコラーゲンとのみ反応する。コラーゲンと結合したVWF は静脈のような血流が遅い部位では機能は限定的だが、動脈の様な高いShear stressがかかる部

位ではマルチマーが引き延ばされ血小板結合部を露出することで血小板粘着をサポートする。さらに、微小循環や病的狭窄部位などの異常にShear stress が高い部位ではADAMTS13による切断部位が露出し、切断されることでその機能が制御されて過剰な血小板凝集を防ぐ仕組みとなっている。(Shida Y; Blood 2008) このような結果はコラーゲン上でのフロー実験で解明されてきた。上記のように産生されたFVIIIやVWFは血中では複合体で存在する。FVIIIとVWFの結合が血栓形成にどのように役割を果たしているかは明らかではない。

### 3 . 研究の方法

ibidi 社の循環ポンプシステム (図3) を使用し、種々の血管内皮細胞を種々の条件下にてフローチャンバー内で培養し、FVIII やVWF を免疫染色にて、可視化して評価する。



Shear stress: 0.1 - 100 dyne/cm<sup>2</sup>  
Prolonged experiments: up to 5 days

図3 循環ポンプシステム

血管内皮としては様々な細胞が使用可能で

あるが、まずはヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を使用した。これらの細胞を上記のようにshear stress : 5 dyne/cm<sup>2</sup> (low shear), 20 dyne/cm<sup>2</sup> (high shear)、培養時間 : 3日間、血流パターン : 層流、乱流) で培養した。

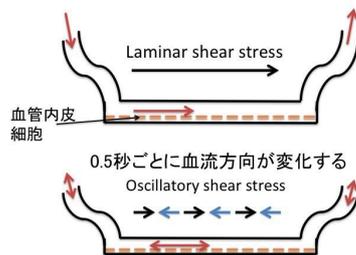


図4 血流下培養実験

同様にibid社によるflow chamberにコーゲンをコーティングし、全血を還流して血流下に形成される血栓を固定後に免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 4 . 研究成果

循環ポンプシステムを用いて血流下に血管内皮細胞を培養することに成功した。血流がない状況で培養された血管内皮細胞は類円形を示したが、一方向性の層流を受けた血管内皮細胞はその血流に沿って伸展した。方向性の無い乱流刺激を加えたところ、細胞形態の変化は起こるものの一定の傾向がなかった。FVIII や VWF の免疫染色を行ったところ、血流により変化が見られた。層流刺激ではいずれも産生が亢進していた。これらの染色部位は重なっており、Weibel-Palade body に一致するものと考えられた。乱流刺激ではこれらの染色が低下しており、産生が低下しているか、もしくは刺激により放出されている可能性が考えられた。いずれにせよ血流はこれらの凝固因子の産生に関与しており、重要な調節因子である可能性が考えられた。また複雑な機構の関与が考えられ、今後の検討課題とした。

血流下血栓形成には von Willebrand factor (VWF) の影響が強く、血液凝固第 VIII 因子(FVIII)は単独では血栓形成を改善しなかった。しかし VWF の存在下で FVIII は血栓形成を改善した。VWF の補助

の元で FVIII は血流下でも凝固能を発揮するものと考えられ、FVIII/VWF 結合の重要性が示唆された。

#### 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5件)

- 1) Yaoi H, Shida Y, Ogiwara K, Hosokawa K, Shima M, Nogami K Role of red blood cells in the anemia-associated bleeding under high shear conditions. Haemophilia 2017 Apr DOI: 10.1111/hae.13252
- 2) Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Shida Y, Takeyama M, Yaoi H, Minami H, Furukawa S, Hosokawa K, Shima M. Assessing the clinical severity of type 1 von Willebrand disease patients with a microchip flow-chamber system. **J Thromb Haemost**. 2016 Apr;14(4):667-74
- 3) The utility of VWF multimer analysis in response to the desmopressin administration for the diagnosis of severe type 1 von Willebrand disease. Takeyama M, Nogami K, Onaka M, Yada K, Shida Y, Shima M. Haemophilia. 2016 Jan 29.
- 4) Successful haemostatic management of replacement of the ascending aorta for type A acute aortic dissection in a patient with mild haemophilia B.

Takeyama M, Nogami K, Shida Y,  
Yada K, Hirose T, Hayata Y,  
Tabayashi N, Taniguchi S, Akasaki  
Y, Kawaraguchi Y, Kawaguchi M,  
Shima M.  
Haemophilia. 2016 Jan 29.

- 5) Shida Y, Rydz N, Stegner D, Brown  
C, Mewburn J, Sponagle K,  
Danisment Ozge, Crawford B, Vidal  
B, Hegadorn C, Pruss C, Nieswandt  
B and Lillicrap D. Analysis of the  
role of von Willebrand factor,  
platelet glycoprotein VI-, and  
 $\alpha_2$   $\beta_1$ -mediated collagen binding  
in thrombus formation. **Blood**.  
2014;124(11):1799-807.

[学会発表](計8件)

- 1) Yaoi H, Shida Y.(mentorship),  
Nogami K., Minami H., Kitazawa T.,  
Hattori K., Shima M.  
Activated FVIII Released From  
FVIII/VWF Complex Facilitates  
Thrombus Development Under High  
Shear Flow Condition Oral  
presentation in the **58<sup>th</sup> American  
Society of Hematology Annual  
Meeting and Exposition**(San Diego,  
California, USA, Dec. 2016)
- 2) Yaoi H, Shida Y.(mentorship),  
Nogami K., Minami H., Kitazawa T.,  
Hattori K., Shima M.  
The mechanism of FVIIIa mimicking  
bispecific antibody (emicizumab)  
under whole blood flow conditions.  
Oral presentation in the **78<sup>th</sup>**

**Japanese Society of Hematology**  
(Yokohama, Japan, Oct.15, 2016)

- 3) Shida Y., Kondo Y., Ishikawa T.,  
Yada K., Takeyama M., Nogami K.,  
Shima M. A case of moderate  
hemophilia A with p.*R1800H* mutation  
complicated with juvenile  
idiopathic arthritis  
**Poster in the Congress of the 25<sup>th</sup>  
International Society on  
Thrombosis and Hemostasis** (Toronto,  
Canada, Jun. 2015)
- 4) Yaoi H., Shida Y., Nogami K.,  
Minami H., Yada K., Takeyama M,  
Matsumoto T, Ogiwara K., Shima M.  
The impact of red blood cells on  
hemostasis under whole blood flow  
conditions  
**Poster in the Congress of the 25<sup>th</sup>  
International Society on  
Thrombosis and Hemostasis** (Toronto,  
Canada, Jun. 2015)
- 5) Yaoi H, Shida Y.(mentorship),  
Nogami K., Minami H., Kitazawa T.,  
Hattori K., Shima M. The mechanism  
of FVIIIa mimicking bispecific  
antibody ACE910 under whole blood  
flow conditions.  
**Oral presentation in the 37<sup>th</sup>  
congress of the Japanese society on  
Thrombosis and Hemostasis**  
(Yamanashi, Japan, May. 2015)

6) Shida Y., Nogami K., Minami H., Yada K., Takeyama M, Matsumoto T, Ogiwara K., Shima M. The impact of Total-Thrombus Analysis System in the management of VWD with severe anemia Poster in the **76<sup>th</sup> Japanese Society of Hematology** (Osaka, Japan, Nov. 2014)

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 :

7) Shida Y., Nogami K., Minami H., Yaoi H., Matsumoto T., Kitazawa T., Hattori K., Shima M. Distinct localization of coagulation factor VIII, von Willebrand factor and factor VIII-mimetic bispecific antibody contributing to thrombus formation under whole blood flow conditions. Poster in the **56<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition**(San Francisco, California, USA, Dec. 2014)

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

8) Shida Y., Rydz N., Brown C., Mewburn J., Sponagle K., Danisment O., Vidal B., Hegadorn C.A., Lillicrap D. Comprehensive characterization of loss and gain-of-function von Willebrand factor collagen binding variants and the role of GPVI using a mouse model system.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

志田 泰明 (SHIDA, Yasuaki)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 10721566

### (2)研究分担者

野上 恵嗣 (NOGAMI, Keiji)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 50326328

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4)研究協力者

( )

Oral presentation in the 37<sup>th</sup> congress of the Japanese society on Thrombosis and Hemostasis (Osaka, Japan, May. 2014)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]