◆トピックス◆

ADAMTS13 の脳梗塞治療薬としての可能性

西尾 健治*

西尾健治

A possible new therapeutic strategy with ADAMTS13 for cerebral infarction

Kenji NISHIO*

1982 年 自治医科大学医学部卒業
1987 年 奈良県立医科大学小児科医員
1992 年 博士 (医学)
1993 年 奈良県立医科大学救急医学教室
講師
2000 年~2003 年
ワシントン大学医学部ハワード
ヒュー研究所
2005 年 奈良県立医科大学救急医学教室
助教授

Key words: ADAMTS13, middle cerebral artery occlusion, reperfusion injury, cerebral infarction

1. 背景

死因の上位を占める心筋梗塞や脳梗塞などに対して、従来血液凝固阻害薬や抗血小板薬が使用されてきたが、個人に応じた至適容量の決定が困難であり、またこれらの薬剤は元来止血血栓形成も抑制するため、副作用である出血傾向に悩まされてきた。そこで止血血栓形成は抑制しないが、病的血栓形成は抑制するという薬剤の開発が待たれている。これらの一見相反する効果が期待できそうなのが ADAMTS13 による von Willebrand 因子 (VWF) -血小板 GPIIb 系のモデレーションである。

2. ADAMTS13 の機能

VWF は subunit が種々に重合した形で血液中に存在するが、傷害により露出された血管内皮下組織に粘着して血小板粘着を誘導し、止血血栓形成の first step をつかさどる。この VWF の生理的活性は、より重合した長い VWF で強く、短い VWF は活性を消失する。この VWF の長さ依存性の働きを VWF の切断により調節しているのが VWF 切断酵素である ADAMTS13 である。ADAMTS13 は VWF が伸展された時のみ VWF

を切断できるが、血管内皮細胞で産生された巨大な VWF が血管内皮細胞に固定された形で分泌されると、すぐに血小板が粘着して VWF は血流の中で伸展されて ADAMTS13 により切断される¹⁾。この VWF の長さ調節の機能低下は、正常以上に重合した長い VWF [urtra-large (UL)-VWF] の増加を来し、全身の血小板血栓形成を特徴とする TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) を生じる。一方、機能亢進は小さな VWF の増加を招き、止血血栓の形成が障害されて出血傾向を特徴とする VWD (von Willebrand 病) を生じる。

3. ADAMTS13 の新たな機能

最近我々は、ADAMTS13 が血小板血栓形成中の血栓表面においても VWF を切断しており、その活性発現は必ず応力依存性であるという ADAMTS13 の新たな機能を発見し報告した²⁾。つまり傷害時に露出した血管内皮下組織を止血血栓が埋め尽くして、血栓が血管内腔に進展しだした時から、VWF は伸展されやすくなり、ADAMTS13 によって切断されやすくなるわけである。さらに血栓が内腔に進展するに従い、血栓表面を流れる血流は速くなることを考えると、血栓表面の VWF はより伸展されて、より切断され

*奈良県立医科大学救急医学教室 [〒 634-8522 奈良県橿原市四条町 840]
Department of Emergency and Critical Care Medicine, Nara Medical University
[840 Shijo-Cho, Kashihara City, Nara 634-8522, Japan]
Tel: 0744-29-8911 Fax: 0744-22-5992 e-mail: knishio@naramed-u.ac.jp

図1 MCAO後の脳血流変化
左中大脳動脈MCAが灌流する脳表の血流をLASERドップラーで測定したところ、中大脳動脈閉塞時(MCAO)にはワイルドタイプマウス群(WT)もADAMTS13ノックアウトマウス群(KO)も血流は前値(Pre)に比較して20%前後に低下したが、再灌流時(Reperfusion)には両群共に前値に戻った。その後KO群ではWT群より徐々に血流が有意に低下し20分から30分後には前値の3分の1程度となった。この低下は24時間後も持続していた。

図2 脳梗塞巣の体積と生存率(WT群 vs KO群)
MCAO24時間後に大脳を取り出し、2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を行なった。TTCは活動しているミトコンドリアに取り込まれるので、活動の停止した細胞にはTTCの赤い色を取り込まれず白くぬけるが、この領域を脳梗塞と判断して体積を計算した。脳梗塞は大脳皮質には殆ど認められず基底核に多く認められたが、KO群ではWT群に比し、有意に脳梗塞巣の体積が増加していた。しかしながら生存率では有意差は認めなかった。また出血などの病変も認められなかった。

やすくなり、止血血栓の内腔進展がADAMTS13により制御されるシステムの存在が推定される。以上よりADAMTS13は止血機能には影響を与えず、病的血栓形成を制御するという新たな抗血栓薬となりうる可能性が示唆された。

4. ADAMTS13の抗炎症性

さらにADAMTS13は炎症反応と凝固反応を関連付ける分子としても注目されている。ADAMTS13ノックアウトマウスでは好中球粘着能と遊走能が亢進しており、ADAMTS13が炎症を制御している可能性が報告された³⁾。

以上を踏まえ、ADAMTS13の抗血栓性と抗炎症性を検証するために、炎症と血栓形成反応の生体モデルであるマウス脳虚血再灌流実験を、ADAMTS13ノックアウトマウスを用いた⁴⁾。

5. マウスを用いた脳虚血再灌流実験

ADAMTS13ノックアウトマウス(KO)とワ

イルドタイプマウス(WT)を用いて、左総頸動脈より栓子を左内頸動脈へと侵入させ、左中大脳動脈(MCA)入口部を30分間閉塞(MCAO)させた。その後、栓子を引き抜きWillis動脈輪を介し対側より左MCAへと血流を再灌流させ、左MCA灌流領域の脳表血流変化、24時間後の脳梗塞体積、組織の変化を両群マウスで比較検討した。

1) 灌流後の脳表面血流速度

図1に示すように再灌流後の脳血流はADAMTS13ノックアウトマウス群(KO)はワイルドタイプマウス群(WT)に比し再灌流直後より徐々に低下し30分以内に有意に低下した。

この現象は脳虚血再灌流障害時にKO群では血小板血栓が微小循環領域で多量に生じて血流速度が低下したと考えられる。つまり、再灌流障害では、一過性虚血で傷害された血管内皮上に分泌されたUL-VWFもしくは血管内皮下組織に結合したVWFに血小板が粘着して血小板血栓が形成されていくが、ADAMTS13存在下では血栓が大きくなるようにするのに従いより大きいずり応力を受

組織所見(PTAH染色)

図3 組織所見 (WT 群 vs KO 群)

上段は PTAH 染色の弱拡大であるが、KO 群では WT 群に比し多数の血栓 (黒矢印：PTAH 陽性でフィブリンを含む) が認められ、下段の強拡大でも同様の傾向を認めた。また多数の炎症細胞浸潤を KO 群では認める (白矢印：弱拡大においては壊死周辺部においても炎症細胞浸潤が KO 群で多いのがわかる)。また KO 群においては PTAH 染色と同部位を抗 VWF 抗体による免疫染色にて観察したが血栓は抗 VWF 陽性で VWF に富むものであることがわかる。

けた血栓表面の VWF が切断され血栓の成長が制御されと考えられた。一方、ADAMTS13 活性の欠如した KO 群では血小板血栓の内腔進展を防げず、血管閉塞を来していると考えられた。

2) MCAO24 時間後の脳梗塞体積と生存率

MCAO 後 24 時間で生じている脳梗塞の体積を KO 群、WT 群で比較したところ、KO 群では有意に脳梗塞が大きかった。また生存率には両群間では差がなかった (図 2)。

この事は ADAMTS13 が脳虚血再灌流障害発症に重要な役割を果たしている事を示している。同様な現象は脳梗塞の t-PA による開通時や梗塞病変周囲においても生じていると考えられるので、ADAMTS13 は脳梗塞患者に投与されると梗塞巣の減少に寄与する可能性が示唆される。つまり ADAMTS13 は脳梗塞患者の予防や治療に有効である可能性があり、前述したように出血傾向を示さず、夢の薬となる可能性がある。

3) MCAO24 時間後の脳組織 (PTAH 染色と免疫染色)

KO 群においては WT 群に比較して PTAH 染色陽性 (フィブリンが陽性) となる微小血栓が

多く、より広範囲にその周囲に組織壊死を認め、また炎症細胞の浸潤も多かった。同じ個所を抗 VWF 抗体を用いて免疫染色を行ったが、これらの微小血栓は VWF を豊富に含む血栓であることが明らかとなり、KO 群で梗塞範囲をより大きくした原因は VWF を多く含む血小板血栓と白血球の過剰浸潤であることが推定された (図 3)。また異常出血は認めなかった。

6. ADAMTS13 の脳梗塞治療薬としての可能性

以上、*in vitro* 実験において推定されたように ADAMTS13 が血小板血栓が病的血栓へと進展するのを制御していることが推測された。

脳虚血再灌流障害は 6 時間以上の虚血で生じる脳梗塞範囲より 4 時間虚血の方が範囲が広くなる。これは血栓のみならず炎症反応も虚血再灌流障害の形成に関与していることを示しており、今回の結果も踏まえると ADAMTS13 は炎症をも制御していることが推察された。続いて我々は WT マウスにリコンビナントヒト ADAMTS13 を投

与し4時間虚血により虚血再灌流障害を観察したところ、梗塞範囲が激減しているのも観察している。以上の結果はADAMTS13が脳梗塞のt-PAとの同時投与薬または治療薬、さらには予防薬となる可能性を示しており、ADAMTS13・VWFを機軸としたまったく新たな抗血栓・抗炎症薬の開発を切り開くものと期待される。

Disclosure of Conflict of Interests

The author indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA : ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* **100** : 4033-4039, 2002.
- 2) Shida Y, Nishio K, Sugimoto M, Mizuno T, Hamada M, Kato S, Matsumoto M, Okuchi K, Fujimura Y, Yoshioka A : Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. *Blood* **111** : 1295-1298, 2008.
- 3) Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, Walsh MT, Scheifflinger F, Wagner DD : ADAMTS13 : a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med* **205** : 2065-2074, 2008.
- 4) Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Kunizawa A, Irie K, Higuchi S, Nakano T, Muroi C, Fukushima H, Sugimoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujiwara M, Okuchi K, Nishio K : ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage : a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* **115** : 1650-1653, 2010.