

氏 名	なかの たかふみ 中野 貴文
学 位 の 種 類	博士（薬学）
報 告 番 号	甲第 1669 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学 位 論 文 題 目	脳梗塞時における血液凝固制御因子 ADAMTS13 の病態生理学的役割の解明と治療への応用
論 文 審 査 委 員	<div> <div> (主 査) 福岡大学 (副 査) 福岡大学 福岡大学 </div> <div> 教授 三島 健一 教授 岩崎 克典 准教授 松尾 宏一 </div> </div>

内 容 の 要 旨

脳梗塞を含む脳血管疾患は、総患者数が約 130 万人であり、脳梗塞による年間死亡者数は約 7 万人と重篤な疾患である（厚生労働省平成 23 年「患者調査の概要」）。また、脳血管疾患は後遺症が生じることから、要介護となる疾患の第一位であり（厚生労働省平成 25 年「国民生活基礎調査の概要」）、社会的問題となっている。そのため、脳梗塞に対する医療ニーズは今後ますます高くなると考えられる。

脳梗塞後の脳内では、血栓の形成により、脳血流量が低下し、急性期には興奮毒性による神経障害や血管内皮細胞障害、脳浮腫、微小循環障害がみられ、亜急性期には炎症反応を中心とした細胞障害が生じるなど複雑な病態が進行する。現在の脳梗塞治療には、組織プラスミノゲンアクチベータ（tissue plasminogen activator; t-PA）を用いた血栓溶解療法が最も有効な手段である。しかし、t-PA のフィブリン溶解作用は、生体内の止血機能にも強く影響を与える。そのため、血管内皮上に傷害が起きている場合、重篤な出血性合併症を引き起こすリスクが高いことから、t-PA は脳梗塞発症後 4.5 時間以上経過した場合には投与禁忌となっている。2) このことから、t-PA を適応できる脳梗塞患者はわずかであり、今後は脳梗塞治療可能時間がより長い有用な血栓溶解薬の登場が求められている。

生体内酵素の ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs 13) は血液凝固因子である vWF (von willebrand factor) を切断することで血栓溶解作用を示す。ADAMTS13 の血栓溶解作用は t-PA とは異なり、血栓の形成により生じるずり応力によって引き伸ばされた vWF のみを切断する。そのため、ADAMTS13 は、病的な血栓のみを溶解し、止血機能への影響は少ないため、脳出血を誘発するリスクが少ない血栓溶解薬となることが期待されている。

そこで、本研究は血栓溶解作用を持つ ADAMTS13 が t-PA よりも有用な脳梗塞治療薬となることを実証するために、①「脳梗塞発症時における内因性 ADAMTS13 の病態生理学的役割」を確認し、②「ADAMTS13 は脳出血を引き起こすことなく、脳梗塞治療効果を示すか」を検討した。また、脳梗塞発症後、亜急性期以降の炎症反応に対して効果を持つことは脳梗塞治療可能時間の拡大につながると考え、③「ADAMTS13 は脳梗塞後の炎症反応に対して効果を示すか」について検討した。

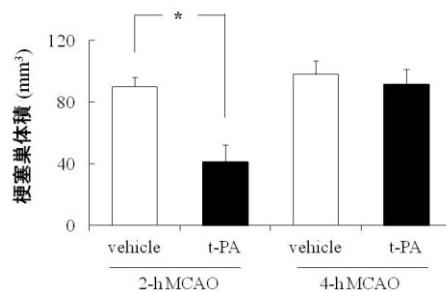


図3. MCA閉塞後2, 4時間後t-PA投与による梗塞巣体積

①「脳梗塞発症時における内因性 ADAMTS13 の病態生理学的役割」

本課題では ADAMTS13 遺伝子を欠損させた ADAMTS13 ノックアウト (ADAMTS13KO) マウスの中大脳動脈を閉塞 (middle cerebral arterial occlusion; MCAO) し、脳梗塞を発症させることで、脳梗塞時に ADAMTS13 が果たす病態生理学的役割を検討した。その結果、ADAMTS13KO マウスはワイルドタイプマウス (WT マウス) に比べて、梗塞巣体積が有意に増加した (図 1)。また、ADAMTS13KO マウスは WT マウスに比べて、脳梗塞後の脳血流量が有意に低下することが明らかとなった (図 2)。これらのことから、内因性 ADAMTS13 は脳梗塞時に血栓の形成を抑制し、脳梗塞の悪化を防ぐ酵素であることが示唆された。

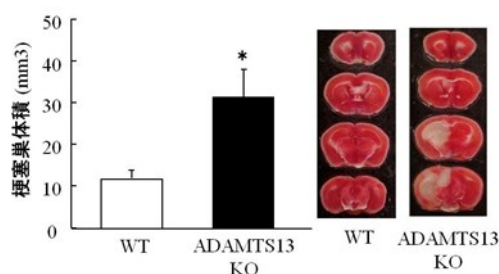


図1. MCA閉塞後の梗塞巣体積

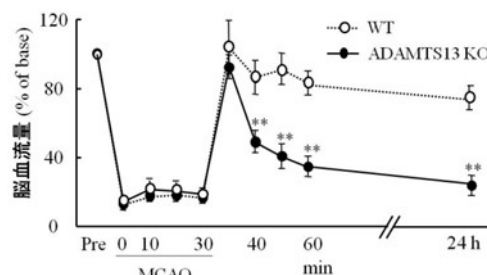


図2. MCA閉塞後の脳血流量変化

②「外因性 ADAMTS13 タンパクは脳出血を引き起こすことなく、脳梗塞治療効果を示すか」

ADAMTS13 タンパクを脳梗塞時に投与し、脳梗塞治療効果を検証した。更に、その治療効果について、t-PA と比較し、脳梗塞治療可能時間が拡大することを確認した。

②-1. t-PA の脳梗塞治療可能時間の検討

マウスに脳梗塞を発症させ、t-PA (10 mg/kg, i.v.) を脳梗塞発症後 2 または 4 時間後に投与し、翌日に梗塞巣体積を評価した。その結果、脳梗塞発症後 2 時間後に t-PA を投与した場合、vehicle 投与群 (生理食塩液, i.v.) に比べて有意に梗塞巣体積を減少させた。一方で脳梗塞発症 4 時間後に t-PA を投与した場合、vehicle 投与群と比べて梗塞巣体積に変化は認められなかった (図 3)。以上の結果から、t-PA の脳梗塞治療可能時間は脳

梗塞発症後 4 時間未満であることが明らかとなった。

②-2. ADAMTS13 タンパクの脳梗塞治療可能時間の検討

上記と同じ条件で ADAMTS13 タンパク (0.1 mg/k, i. v.) を脳梗塞発症後 2 または 4 時間後に投与し, 翌日に梗塞巣体積を評価した。その結果, 脳梗塞発症後 2, 4 時間後に, ADAMTS13 を投与した場合, vehicle 投与群に比べて有意に梗塞巣体積を減少させた (図 4)。以上のことから, 外因性 ADAMTS13 タンパクは脳梗塞に有効

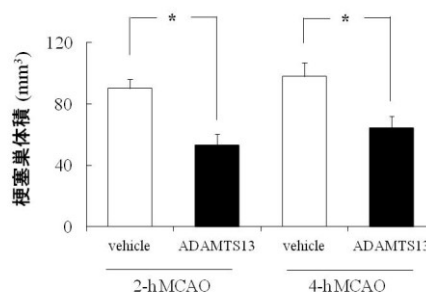


図4. MCA閉塞後2, 4時間後ADAMTS13投与による梗塞巣体積

であること, その治療可能時間は脳梗塞発症後 4 時間以上であり, t-PA より治療可能時間が長いことが示された。

②-3. ADAMTS13 タンパク, t-PA 投与後の脳出血量と脳血流量変化

上記と同じ条件で ADAMTS13 タンパクまたは t-PA を脳梗塞発症後 4 時間後に投与し, 脳出血量と脳血流量を評価した。その結果, t-PA は脳出血を誘発したが, ADAMTS13 は脳出血を誘発しなかった (図 5)。この脳出血誘発の有無が脳梗塞発症後 4 時間後の投与で t-PA が効果を示さなかった要因であったと考えられる。両薬物投与後の脳血流量に関しても ADAMTS13 投与群では, 脳梗塞発症後 24 時間後も継続して脳血流量が改善しているのに対し, t-PA 投与群では一過性の血流改善は認めたものの, 出血性梗塞を示したためか, 脳梗塞発症後 24 時間後には脳血流量の低下が認められた (図 6)。以上より, ADAMTS13 は t-PA より脳出血を伴わず, 長い脳梗塞治療可能時間を持つ可能性があると考えられる。

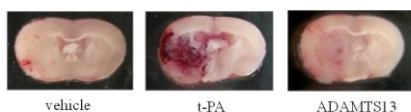


図5. MCA閉塞後4時間後ADAMTS13またはt-PA投与後の脳出血

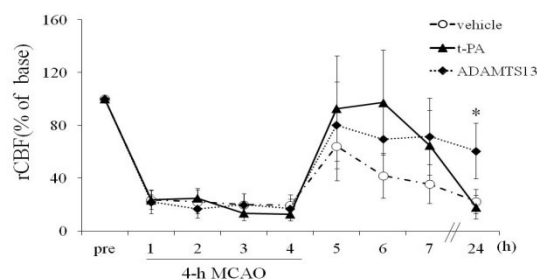


図6. MCA閉塞後4時間後ADAMTS13またはt-PA投与後の脳血流量変化

③「外因性 ADAMTS13 タンパクは脳梗塞後の炎症反応に対して効果を示すか」

脳梗塞後に生じる炎症反応は脳梗塞の予後を悪化させる。炎症性サイトカインの HMGB1 は, MCA 閉塞後の血漿中 HMGB1 濃度がピークに到達する際に, MCA 閉塞による死亡率が最も増加することを確認している (Stroke, 2008;39(3), 951-958)。このことから ADAMTS13 投与により HMGB1 の発現量を減少させることができれば脳梗塞の予後を大きく改善できることが期待できる。そのため, ②-3 の条件で ADAMTS13 タンパクまたは t-PA を脳梗塞発症後 4 時間後に投与し, 血漿中 HMGB1 濃度を測定した。その結果, ADAMTS13 投与群は

vehicle 投与群に比べて有意に低値を示した (図 7). ADAMTS13 は, 1427 アミノ酸残基からなる一本鎖のメタロプロテアーゼであり, 様々なマルチドメインをもつ. その中でも thrombospondin type 1 repeats が, 抗炎症作用に関与していることを培養実験により明らかにした. このように ADAMTS13 は様々な役割を担うマルチドメインを含むため, 更なる可能性も秘めたタンパクであると考えられる.

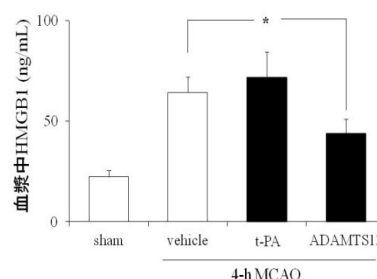


図7. MCA閉塞後4時間後ADAMTS13またはt-PA投与後のHMGB1濃度

以上より, ADAMTS13 は t-PA では効果を示すことのできない MCA 閉塞後 4 時間後の投与でも脳梗塞治療効果を示すことが明らかとなった. ADAMTS13 は必ず応力依存的に血栓溶解を示す特徴から, t-PA 投与で懸念されている脳出血の併発といった問題を克服できる可能性がある. また, ADAMTS13 は血栓溶解作用のみならず, 抗炎症作用も発揮することが明らかとなった. 同じ血栓溶解薬である t-PA には, 抗炎症作用を持つといった報告等はなく, ADAMTS13 は t-PA 以上の治療効果を期待することができる. さらに, 抗炎症作用を備え持つ ADAMTS13 は脳梗塞後亜急性以降まで治療効果を発揮することができ, 脳梗塞治療の重要な課題であった脳梗塞治療可能時間の拡大も期待できると考えられる (図 8).

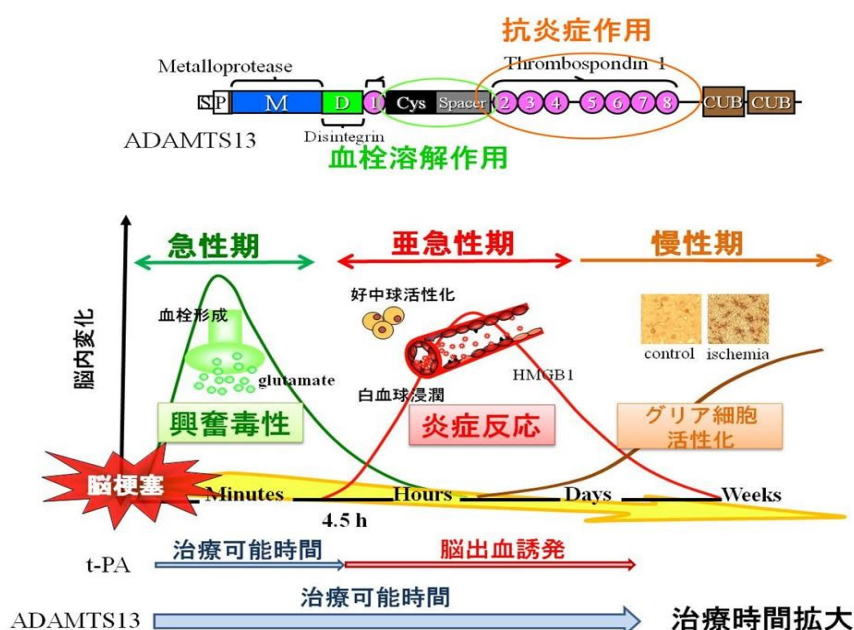


図8. ADAMTS13の各ドメインの効果と脳梗塞治療可能時間

審査の結果の要旨

ADAMTS13(a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs 13)は、1427 アミノ酸残基からなる一本鎖のメタロプロテアーゼで、血液凝固因子である von willebrand factor(vWF) の生体内切断酵素であり、血栓溶解作用を有する。現在の脳梗塞治療は、組織プラスミノゲンアクチベータ(t-PA)を用いた血栓溶解療法が最も有効な手段であるが、投与時間が脳梗塞発症後 4.5 時間以内と短く、脳出血を副作用として伴うことが問題点である。本論文は、上述の問題点を解決するため、ADAMTS13 の脳梗塞治療薬としての可能性を検討した。第一章では「脳梗塞発症時における内因性 ADAMTS13 の病態生理学的役割」を明らかにし、第二章では「ADAMTS13 の脳梗塞治療薬としての有用性」を調べた。さらに、第三章では ADAMTS13 の血栓溶解作用以外の新たな機序として「ADAMTS13 の抗炎症作用機序の解明」について検討した。

(1)脳梗塞発症時における内因性 ADAMTS13 の病態生理学的役割

内因性 ADAMTS13 の生理的役割を調べるために ADAMTS13 遺伝子を欠損させた ADAMTS13 ノックアウトマウスを用いて、中大脳動脈(MCA)を 30 分間閉塞した。その結果、梗塞巣は有意に増加し、MCA 閉塞 24 時間後の脳血流量も低下した。

このことから、生体内にある内因性 ADAMTS13 は脳梗塞時に血栓の形成を抑制し、脳梗塞の悪化を防ぐ酵素であると考えられた。

(2)ADAMTS13 の脳梗塞治療薬としての有用性

ADAMTS13 の脳梗塞治療薬としての有用性を調べるために、4 時間 MCA 閉塞モデルマウスを用いて、t-PA と比較した。外因性の ADAMTS13 タンパクは脳梗塞巣体積を用量依存的に減少し、閉塞 24 時間後の低下した脳血流量も改善した。しかし、脳出血は溶媒群と変わらなかった。一方、t-PA は 2 時間の MCA 閉塞モデルでは梗塞巣体積も脳血流量も改善したが、4 時間の MCA 閉塞モデルでは両測定系とも改善せず、脳出血は溶媒群に比べて増加した。

以上のことから、ADAMTS13 は t-PA より脳出血を伴わず、長い脳梗塞治療可能時間を持つことが示唆された。

(3)ADAMTS13 の抗炎症反応機序の解明

第二章において、ADAMTS13 は脳梗塞治療可能時間を延ばすことが考えられたため、血栓溶解作用以外に新たな機序として抗炎症作用に注目した。その理由として、ADAMTS13 は、多様なマルチドメインをもち、その中でも thrombospondin type 1 (TSP-1)repeats が、抗炎症作用に関与していることが明らかになっている。また、我々は炎症性サイトカインの HMGB1 が、4 時間 MCA 閉塞モデルマウスの病態を反映しているマーカーであることを確認している(Stroke、39(3)、951-958、2008)。

ADAMTS13 は 4 時間 MCA 閉塞によって上昇した血漿中 HMGB1 濃度を抑制した。さらに TSP-1 が ADAMTS13 の抗炎症機序の本体であることを 4 時間 MCA 閉塞モデルマウスとアストロサイトの培養細胞で明らかにした。

以上、本研究は、ADAMTS13 の生体内での生理的な役割と脳梗塞治療薬としての可能性について新しい知見を得ていることから高く評価できる。また、論文業績ならびに公聴会審査における申請者の質疑応答は、学位を授与するのに適切な能力であると判断した。本論文は、今後、ADAMTS13 の脳梗塞治療薬への応用に期待が持たれ、学位論文として十分に評価できるものと判定した。