慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Von Willebrand 因子切断酵素(ADAMTS-13) の発現部位に関する検討
Sub Title	
Author	鈴木, 美佐子
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.1 (2005. 3) ,p.8-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050302-0008

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Von Willebrand因子切断酵素（ADAMTS-13）の発現部位に関する検討

鈴木　美佐子

内容の要旨

Von Willebrand因子（VWF）は血栓止血機構における重要な因子でありその血栓形成能はマルチマー構造に依存している。血管内皮由来のVWFマルチマーは血漿中でVWF切断酵素（ADAMTS-13）により分解され、血小板血栓形成能が制御されている。現在まで、ADAMTS-13の発現部位に関しては種々の臓器におけるmRNA発現の報告はあるものの血小板での発現の有無に関する言及はない。VWFが血小板に結合するという現象は血小板血栓形成の上で必須のものであり、VWFの15～25%が血小板α顆粒中に存在していることに着目し、血小板におけるADAMTS-13の発現と血小板での局在を検討した。また、全長mRNAが肝臓で特異的に発現していることから血漿ADAMTS-13は肝臓由来であろうと考えられているが、現在まで肝臓でのADAMTS-13の産生についての証明はされていない。肝硬変患者血漿でのADAMTS-13酵素活性は健常血漿に比し低下しており、生体肝移植により血漿ADAMTS-13の酵素活性が変化したという臨床報告を考慮し、我々はADAMTS-13の肝細胞での発現の有無についての検討を行った。まずウェスタンブロットを用い血小板におけるADAMTS-13タンパクの発現を確認し、フローサイトメトリーにより、permeabilization処理前後の血小板の反応性を比較することにより血小板の内部にADAMTS-13が存在することを確認した。さらに抗ADAMTS-13モノクローナル抗体を用いた血小板凍結超薄切片による免疫電顕法でα顆粒内の局在を示した。またRT-PCRにより血小板でのADAMTS-13mRNAの発現を示し、得られたcDNAの塩基配列が、ADAMTS-13 cDNA（exon1-7）であることを確認した。次に血漿ADAMTS-13の由来に関する検討の一環として肝臓に着目し、正常肝細胞ならびに肝細胞癌の細胞株、肝組織において免疫組織染色を行い、肝細胞の細胞質におけるADAMTS-13の発現を確認した。HepG2細胞の培養上清を用いたウェスタンブロットにてADAMTS-13タンパクの発現を確認し、HepG2がADAMTS-13を合成し培養上清に分泌する可能性が示唆された。またRT-PCRにて正常肝細胞ならびに肝細胞癌の細胞株でADAMTS-13 mRNAの発現を認めた。これらの結果より、血小板ADAMTS-13が血栓止血機構において局所でVWFを制御している可能性が示唆された。また血漿ADAMTS-13の起源として肝細胞での産生が示唆され、今後肝機能とADAMTS-13の相関、各種疾患におけるADAMTS-13の動態等を検索することにより、血栓形成に関与するADAMTS-13の特性にさらなる知見が加わることと考えられる。

論文審査の要旨

Von Willebrand因子（VWF）の血栓形成能はマルチマー構造に依存しており、VWFマルチマーは血漿中でVWF切断酵素（ADAMTS-13）により分解され、血小板血栓形成能が制御されている。VWFと血小板の結合は血小板血栓形成の上で必須であり、VWFの15～25%が血小板α顆粒中に存在することに着目し、血小板におけるADAMTS-13の発現と局在を検討した。また、全長mRNAが肝臓で特異的に発現していることから血漿ADAMTS-13は肝臓由来と推定されているが、肝臓でのADAMTS-13の産生は証明されていないため肝細胞での発現の有無について検討を行った。ウェスタンブロットでADAMTS-13蛋白が血小板に含まれていることを示した後、フローサイトメトリーによりADAMTS-13が血小板内部に存在することを確認した。さらに免疫電顕法でα顆粒内の局在を示した。またRT-PCRにより血小板でのADAMTS-13mRNAの発現を示し、得られたcDNAの塩基配列は、ADAMTS-13 cDNAと一致した。次に正常肝細胞、HepG2、肝組織で免疫組織染色を行い、肝細胞の細胞質におけるADAMTS-13の発現を確認した。HepG2の培養上清を用いたウェスタンブロットでADAMTS-13蛋白の発現を確認、HepG2がADAMTS-13を合成し培養上清に分泌する可能性が示唆された。またRT-PCRにて正常肝細胞、HepG2でADAMTS-13 mRNAの発現を認め血漿ADAMTS-13の起源として肝細胞における産生の可能性が強く示唆された。

審査では、血小板ADAMTS-13蛋白量について質問があり、ウェスタンブロットの結果より1 ng/2×10^7個血小板と推定されるが、蛋白量と機能の相関については今後の検討を要すると回答された。また血小板の活性化とADAMTS-13の関係についての質問に、α顆粒内のVWFはトロンビンまたはADP刺激により血小板から血漿中に放出される。血小板のADAMTS-13がVWFのサイズを制御している可能性が考えられ、血小板活性化時のADAMTS-13の動態を研究する必要があると回答された。また肝細胞での蛋白発現の証明にHepG2の培養上清を用いた理由について正常肝細胞は継代不可能であり肝細胞の生合成と分泌のモデルとしてHepG2を用いたと回答された。

以上のように、本研究はさらに検討すべき課題を残すものの血小板におけるADAMTS-13の局在を新規に証明した点、ADAMTS-13の肝細胞での発現を明らかにした点において血栓止血機構の研究上、価値ある研究と評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　池田　康夫
　　病理学　岡田　保典　発生・分化生物学　須田　年生
衛生学公衆衛生学　大前　和幸
学力確認担当者：
　審査委員長：岡田　保典

試問日：平成16年12月24日