

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591133
 研究課題名（和文）マイクロポート植え込み血友病Aマウスを用いた抗原特異的免疫寛容誘導機序の解明
 研究課題名（英文）Development of immune-tolerance induction by continuous infusion of FactorVIII using micro-injection system in murine hemophilia A
 研究代表者：
 窓岩清治（MADOIWA SEIJI）
 自治医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70296119

研究成果の概要：血友病臨床においてインヒビター陽性患者に対するインヒビターの制御方法は克服すべき重要課題である。血友病Aマウスに対して、植え込み型マイクロポートを用いた持続的抗原暴露システムを導入し、安定的な頻回投与を実現するモデルを作製した。0.05 単位/g 体重、5 回/週での第 VIII 因子投与群（連続投与前抗第 VIII 因子抗体価、 1.8 ± 0.4 BU/mL）において、連続投与後の抗第 VIII 因子抗体ピーク値 $5,621.3 \pm 1,115.6$ BU/mL（暴露回数 61.0 ± 13.4 回）で、抗第 VIII 因子抗体力価がピーク値の 20%未満となる暴露回数は 163.3 ± 26.7 回であった。血友病Aマウスに対し持続的抗原暴露システムを導入し、第 VIII 因子の安全な頻回および連続投与を実現させることにより、免疫寛容誘導マウスモデルの作製が可能であると考えられた。本研究の成果は、臨床的なインヒビター陽性血友病症例における第 VIII 因子の頻回投与により誘導される免疫寛容誘導機序の解明に繋がるものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：血友病A・インヒビター・免疫寛容・マイクロポートシステム・ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

血友病Aは、血液凝固第 VIII 因子（以下第 VIII 因子と略す）をコードする遺伝子の変異

により引き起こされる先天性出血性疾患である。血友病A患者は、第 VIII 因子の補充を目的とした第 VIII 因子製剤の自己注射療

法の普及により、関節内出血や筋肉出血などの重篤な出血症状から解放されるようになった。しかしながら、第 VIII 因子インヒビター陽性血友病 A 患者は、補充療法の止血効果が消失ないし激減することにより止血管理がきわめて困難となるために、常に致死的な出血の危険性に晒されている。ステロイド剤やカルシニューリンインヒビターなどを用いた免疫抑制療法は、第 VIII 因子インヒビターのみを特異的に制御するのではなく、患者の免疫機能を全般的に低下させてしまう。第 VIII 因子インヒビター陽性血友病 A 患者に対する免疫寛容誘導療法 (Immune tolerance induction therapy) は、第 VIII 因子製剤の大量、頻回の投与によりインヒビターの消失をはかる特異的かつ根治を目指した治療法である (Brackmann HH, et al. Lancet 1977)。免疫寛容誘導療法開始時のインヒビター力価が成功率の決定づける因子として重要であるとされるものの、免疫寛容誘導に用いる第 VIII 因子投与量、診断から免疫寛容誘導までの期間や治療開始年齢などとの関連性については、必ずしも明らかにされていない (DiMichele DM, et al. Thromb Haemost 2002)。現在の血友病臨床において、インヒビター陽性患者に対するインヒビターの制御方法は克服すべき重要課題であり、副作用および経済効率の観点を含めた投与方法の確立とともに、頻回投与に伴う抗原特異的な免疫寛容誘導に到る機序についての解析が極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

血友病 A マウスに植え込み型マイクロポートシステムを導入し、安定的な頻回投与を実現することにより抗原特異的な免疫寛容が誘導されるマウスモデルの確立と免疫寛容誘導機序を解明する。(1) 易出血性マウスに

対して、経皮経頸静脈的にカテーテル先端を上大静脈に留置し背部皮下にマイクロポート本体を植え込む技法の確立、(2) Bonn プロトコール (Brackmann HH, et al. Haemophilia 1999) や Malmö プロトコール (Freiburghaus C, et al. Haemophilia 1999) などの臨床試験において免疫寛容誘導療法開始時のインヒビター力価と免疫寛容誘導成功率との関連が指摘されていることを考慮し、適切な抗第 VIII 因子インヒビター力価を有する感作マウスの作成、(3) 免疫寛容を誘導し得る第 VIII 因子の投与量および投与頻度を (1) および (2) において作製したマウスモデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

1) インヒビターを有する血友病 A 症例に対して第 VIII 因子抗原の頻回投与により誘導される免疫寛容の機序を解明するために、血友病 A マウスにイソフルレン吸入麻酔下で実体顕微鏡を併用しながら、前頸部に皮下切開を加え頸静脈を露出させた上で、カットダウン法により 1Fr カテーテルを挿入した。さらにカテーテル先端部を上大静脈に留置した後に、マイクロポート本体部 (チタニウム合金、Instech 社製) をマウス背部皮下に植え込み固定した。

2) ヒト第 VIII 因子精製抗原を、本マイクロポートシステムを介して頻回投与した。抗原量 (0.05-0.15 単位/g 体重) や投与間隔 (3 回/週~連日) を変えることにより免疫寛容の誘導条件を検討した。免疫寛容誘導開始時のインヒビター力価が、免疫寛容誘導の成否に関与するという臨床的観点から、第 VIII 因子感作マウスをその抗体価により high responder (主として 10BU/mL 以上) 群と low responder (主として 10BU/mL 未満) の群に分け、両群間での免疫寛容誘導率を比較検討し

た。

3) マウス血清中の第 VIII 因子インヒビターの力価は Bethesda 法を用いて測定し、産生抗体量および産生抗体のサブタイプは精製第 VIII 因子を抗原とした ELISA 法にて測定、さらにウエスタンブロッティング法により抗原認識部位を解析した。

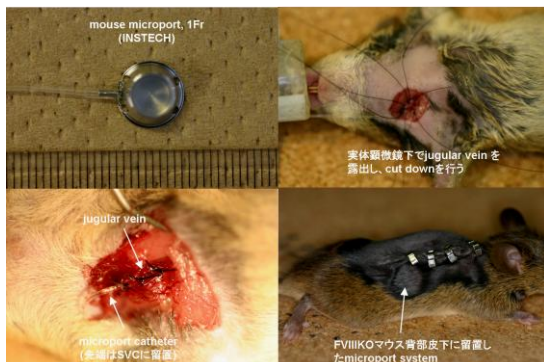
4) マウス脾臓からリンパ球を単離し、3H-チミジンの取り込み率を指標とし第 VIII 因子の *in vitro* 刺激によるリンパ球刺激試験を行うとともに、CD4 陽性細胞における IL-2, IL-4, IL-10 および IFN- γ などのサイトカイン産生を ELISA 法により解析を行った。

4. 研究成果

本動物モデルでは、臨床例では不可能である胸腺、脾臓、リンパ節および骨髄など免疫担当組織におけるリンパ系細胞の機能や動態を直接的に扱うことができるため、詳細な免疫寛容誘導の機序を解析できる有利性がある。

1) 易出血性である血友病 A マウスに対して、経皮経頸静脈的にカテーテル先端を上大静脈に留置し背部皮下にマイクロポート本体を植え込む安全で再現性のある手術技法を確立した(図)。

上大静脈マイクロポート植え込みによる血友病 A マウスモデル(Madoiwa S, et al.)



2) 0.05 単位/g 体重、5 回/週での第 VIII 因子投与群(連続投与前抗第 VIII 因子抗体価、 1.8 ± 0.4 BU/mL)において、連続投与後の抗第 VIII 因子抗体ピーク値 $5,621.3 \pm$

$1,115.6$ BU/mL (暴露回数 61.0 ± 13.4 回)で、抗第 VIII 因子抗体力価がピーク値の 20% 未満となる暴露回数は 163.3 ± 26.7 回であった。

3) 連続投与開始前の抗体価 (high responder 群と low responder 群) による免疫応答に差異はみられなかった。

4) IgG サブクラス解析では、IgG1 の変動はみられないが、抗体価低下時期において IgG2a および IgG2b の有意な低下がみられた。

5) 単離リンパ球を用いた *in vitro* CD4+T 細胞増殖試験では、免疫寛容誘導期マウスより採取したリンパ球において有意な増殖活性の低下を認めた。

これらのことから、血友病 A マウスに対し持続的抗原暴露システムを導入し、第 VIII 因子の安全な頻回および連続投与を実現させることにより、免疫寛容誘導マウスモデルの作製が可能であると考えられた。本研究の成果は、臨床的なインヒビター陽性血友病症例における第 VIII 因子の頻回投与により誘導される免疫寛容誘導機序の解明に繋がるものと考えられる。

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 12 件)

- ① Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Hakamata Y, Dokai M, Makino N, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 811-24. 査読・有
- ② Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, Okada H,

- Takeshita S, Sakata T, Kokame K, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res.* 2009; 124: 14-8. 査読・有
- ③ Yano Y, Ohmori T, Hoshide S, Madoiwa S, Yamamoto K, Katsuki T, Mitsunashi T, Mimuro J, Shimada K, Kario K, Sakata Y. Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in patients on dual antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad. *Eur Heart J.* 2008; 29: 1729-38. 査読・有
- ④ Ohmori T, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Madoiwa S, Mitomo K, Suzuki H, Hasegawa M, Mimuro J, Sakata Y. Phenotypic correction of hemophilia A by ectopic expression of activated factor VII in platelets. *Mol Ther.* 2008; 16: 1359-65. 査読・有
- ⑤ Niwa K, Mimuro J, Miyata M, Sugo T, Ohmori T, Madoiwa S, Tei C, Sakata Y. Dysfibrinogen Kagoshima with the amino acid substitution gammaThr-314 to Ile: analyses of molecular abnormalities and thrombophilic nature of this abnormal molecule. *Thromb Res.* 2008; 121: 773-80. 124(1)14-18. 2008. 査読・有
- ⑥ Mimuro J, Niimura M, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ono T, Ohmori T, Madoiwa S, Okada K, Matsuo O, Sakata Y. Unbalanced expression of ADAMTS13 and von Willebrand factor in mouse endotoxemia. *Thromb Res.* 2008; 122: 91-7. 査読・有
- ⑦ Kimura A, Ohmori T, Kashiwakura Y, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Shimazaki K, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y. Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain. *Stroke.* 2008; 39: 3411-7. 査読・有
- ⑧ YYin T, Takeshita S, Sato Y, Sakata T, Shin Y, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Kojima T, Madoiwa S, Sakata Y, Murata M, Ikeda Y, Miyata T. A large deletion of the PROS1 gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 2007; 98: 783-9. 査読・有
- ⑨ Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y. Silencing of a targeted protein in in vivo platelets using a lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2266-72. 査読・有
- ⑩ Madoiwa S, Someya T, Hironaka M, Kobayashi H, Ohmori T, Mimuro J, Sugiyama Y, Morita T, Nishimura Y, Tarumoto T, Ozawa K, Saito K, Sakata Y. Annexin 2 and hemorrhagic disorder in vascular intimal carcinomatosis. *Thromb Res.* 2007; 119: 229-40. 査読・有
- ⑪ Madoiwa S. [Malignancy and venous thromboembolism]. *Rinsho Ketsueki.* 2007; 48: 371-6. 査読・無
- ⑫ Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y. Essential

roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells*. 2007; 25: 115-24.

査読・有

[学会発表等] (計 19 件)

- ① 窓岩清治、田中英之、松浦司郎、大森 司、三室 淳、坂田洋一、青木慎也：敗血症 DIC における血栓溶解機構のモニタリングとその臨床的意義 第9回 TTM フォーラム 2009年3月7日 東京
- ② 窓岩清治：癌患者と静脈血栓症-癌と凝固線溶系-敗血症 DIC における白血球エラストラーゼによる血栓溶解機構の解析 肺塞栓症研究会ランチョンセミナー 2008年11月29日 東京
- ③ 窓岩清治、土海桃子、柏倉裕志、石渡 彰、大森 司、諏合輝子、三室 淳、田中英之、松浦司郎、坂田洋一：敗血症 DIC における白血球エラストラーゼによる血栓溶解機構の解析 第31回日本血栓止血学会学術集会 2008年11月22日 大阪
- ④ Seiji Madoiwa, Takayuki Sejima, Jun Mimuro, Tsukasa Ohmori, Yoichi Sakata : Regulation of plasminogen activator - plasmin system and inflammation 31st Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Haemostasis (President Symposium) November 21 2008, Osaka, Japan
- ⑤ 窓岩清治：DICをどう捉えるか-プロテアーゼによる血栓溶解と病態 第1回アンチトロンビンとプロテアーゼフォーラム 2008年11月8日 札幌
- ⑥ 窓岩清治：Cancer associated thrombosis の診断と治療 日本血液学会(シンポジウム) 2008年10月10日 京都
- ⑦ 窓岩清治：静脈血栓塞栓症予防のゆくえ-

第二ステージ 抗凝固療法 日本麻酔科学会第 55 回学術集会 (シンポジウム)

2008年6月12日 横浜

- ⑧ 窓岩清治 坂田洋一：感染症 DIC を考慮した厚生労働省診断基準の改訂試案 日本血栓止血学会学術標準化委員会 2008 (シンポジウム) 2008年2月16日 東京
- ⑨ 窓岩清治、新村真則、土海桃子、柏倉裕志、石渡 彰、牧野伸子、大森 司、諏合輝子、三室 淳、坂田洋一、岡田清孝、上嶋 繁、松尾 理：プラスミノゲンは白血球の接着活性を制御し、敗血症における臓器障害を回避させる 第30回日本血栓止血学会学術集会 2007年11月17日 三重
- ⑩ 窓岩清治：線溶系からみた血栓性疾患の病態-プラスミンと白血球エラストラーゼの血栓溶解への関わり- 第30回日本血栓止血学会学術集会ランチョンセミナー 2007年11月17日 三重
- ⑪ 窓岩清治：マウスモデルを用いた血友病 A インヒビター産生制御の検討 第30回日本血栓止血学会学術集会 (シンポジウム) 2007年11月15日 三重
- ⑫ 窓岩清治、山内忠彦、小林英司、柏倉裕志、石渡 彰、大森 司、三室 淳、坂田 洋一、胸腺組織を標的とした血友病 A インヒビター産生制御の基礎的検討 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会 2007年10月11日 横浜
- ⑬ 窓岩清治、布宮 伸、大森 司、三室 淳、坂田洋一 PAI-1は敗血症DICの生命予後を規定する 第8回日本検査血液学会 2007年7月21日 福井
- ⑭ Seiji Madoiwa, Tsukasa Ohmori, Jun Mimuro, Yoichi Sakata : Annexin 2 mediated fibrinolysis induces fatal

hemorrhagic disorder in transitional cell carcinoma with vascular intimal carcinomatosis. 1st Japanese-Polish - German Joint Meeting on Coagulation and Fibrinolysis, July 13 2007, Dresden, Germany

- ⑮ Seiji Madoiwa, Tadahiko Yamauchi, Eiji Kobayashi, Yoji Hakamata, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Tsukasa Ohmori, Jun Mimuro, Yoichi Sakata : Induction of Factor VIII Specific Unresponsiveness by Intrathymic Factor VIII Injection in Murine Hemophilia A. XX1st Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, July 8 2007, Geneva, Switzerland
- ⑯ 窓岩清治, 布宮 伸, 小野智子, 大森 司, 三室 淳, 坂田洋一 : 敗血症 DIC における PAI-1 と生命予後との関係 第 1 回 SIRS-DIC 研究会 2007 年 6 月 22 日 宇都宮
- ⑰ 窓岩清治: 血栓溶解機構からみた DIC の病態と診断 第 10 回日本臨床救急医学会総会ランチョンセミナー 2007 年 5 月 17 日 神戸
- ⑱ 窓岩清治: サイトカン・ストーム、特に敗血症における白血球エラスターゼの役割 第 1 回サイトカイン・ストーム研究会 2007 年 3 月 29 日 宇都宮
- ⑲ 窓岩清治, 大森 司, 三室 淳, 坂田洋一, 北島 勲, 岡田清孝, 上嶋 繁, 松尾 理, 一瀬白帝, 内山真一郎, 朝倉英策, 江口 豊, 浦野哲盟, 山本晃士, 桜井錠治, 馬場光広 : フィブリン分解産物の標準化に向けて 日本血栓止血学会学術標準化委員会 2007 (シンポジウム) 2007 年 2 月 17 日 東京

〔図書〕 (計 0 件)
〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計◇件)
〔その他〕
ホームページ等
<http://www.jichi.ac.jp/shiketsu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窓岩 清治 (MADOIWA SEIJI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 70296119

(2) 研究分担者

小林 英司 (KOBAYASHI EIJI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 00245044
大森 司 (OHMORI TSUKASA)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 70382843