

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591059

研究課題名（和文）

ノックインマウスを用いたVWFのドメイン機能の分離による生体内機能の解析

研究課題名（英文）

Separation of VWF domain function using gene-targeted mice

研究代表者

松下 正 (TADASHI MATSUSHITA)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30314008

研究成果の概要（和文）：

von Willebrand 因子（VWF）の多機能性はドメイン構造を利用することで実現されているが、VWF のノックアウトマウスでは各機能モジュールの生体機能における役割を知ることは難しい。本研究では VWF の GPIb 結合能のみを欠落させたノックインマウス VWFK1362A と VWF ノックアウトマウスを交配・組み合わせ、さらに野生種 CAST/Ei バックグラウンド化することにより、GPIb 結合機能とその他の機能を直接生体内で分離、量的調節を試みた。VWFK1362A は著明な出血傾向を呈し、A1 ドメイン結合能力を欠くことが止血において重要であることが強く示唆された。また CAST/Ei と交配させることにより、VWF 血中濃度は著系に上昇し、この系において VWF 量を調節できることが判明した。VWF^{-/-}マウスと VWFK1362A の交配により VWF^{-/-}K1362A を得たが、不妊傾向と喰殺により交配計画に遅延が発生した。今後死亡成体が現れれば臓器出血の有無を検討することにより、止血における VWF の相対的重要性が確認されると思われる。

研究成果の概要（英文）：

von Willebrand factor is a multi-functional hemostatic factor that plays an important role of primary hemostasis. The VWF multi-function is accomplished by its multi-domain structure and each functional module may contribute to different hemostatic functions. We crossed VWFK1362A knock in mouse of which Lys1362, an important GPIb binding site, is mutated to Ala and VWF^{-/-} mouse to yield the in vivo model of quantitative variations of functional/nonfunctional VWF models. We also introduced CAST/Ei background to increase the basic plasma VWF levels. VWFK1362A showed severe bleeding diathesis, suggesting VWF GPIb binding is pivotal function to maintain hemostasis. Crossing between VWFK1362A and VWF^{-/-} mouse, however, was partially successful, because of infertility and prey. Further investigation would reveal quantitative function of VWF to maintain hemostasis in mammals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：血栓止血学

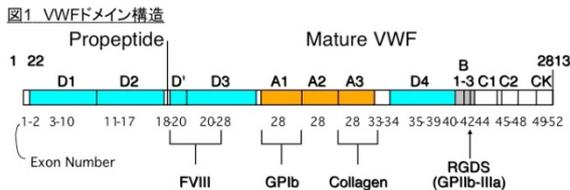
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血友病、von Willebrand 病、von Willebrand 因子、第 VIII 因子、ADAMTS13

1. 研究開始当初の背景

(1) von Willebrand 因子による止血

von Willebrand 因子 (VWF) は巨大な multimer タンパクであり、血漿、血小板 α 顆粒、内皮細胞 Weibel-palade body、内皮下結合組織に存在する。VWF は粘着タンパクであり一般的な凝固因子と異なり酵素機能は持たない。VWF の止血における役割は(1)血小板の内皮下結合組織への粘着を介する一次止血機能(2)凝固第 VIII 因子と結合しこれを安定化することによる内因系凝固因子としての機能(3)コラーゲンへの結合による、Extracllular matrix (ECM)と血小板のブリッジ(4)IIbIIIa 結合能による血小板 IIbIIIa またはインテグリンへの結合と多彩である。これらの機能を実現しているのは 2203 アミノ酸からなるサブユニット内のドメイン構造であり、それぞれの結合相手 (リガンド) への結合部位として提供されている (図 1)。



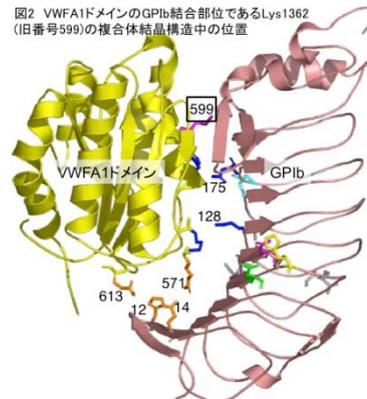
(2) 重症 von Willebrand 病と VWF ドメインの機能

完全欠損型である 3 型 von Willebrand 病 (Type 3 VWD) の臨床症状は主に血小板粘着能が障害されることによるもの：鼻出血、紫斑、口腔内出血などに加えて、第 VIII 因子の血中寿命が著しく短縮する結果、血友病 A と同様な関節内・筋肉内出血を来すことがある。一方 Type 3 VWD のモデルである VWF-ノックアウトマウスは致死的ではなく妊娠、出産可能であり、自然の出血傾向は約 10% の新生仔に腹腔内出血、皮下出血等が見られている。tail bleeding time 10 分以上出血し、FVIII:C は約 20% に低下、FeCl₃ による血栓症モデルでは血小板血栓の形成をほとんど認めない (Denis, C. PNAS, 1998)。

VWF の GPIb 結合部位はドメイン A1 にあり、我々が行った scanning mutagenesis では Lys1362 における mutant では GPIb 結合が全く起こらず、結合部位と考えられた (Matsushita, T. JBC, 1995, 2000)。一方で我々は GP Ib α 鎖の scanning mutagenesis によって GPIb α の VWF 結合部位を Glu128, Glu172, Asp175 と同定している (Shimizu, A, Matsushita, T, et al. JBC 2004)。この結果は VWF-GPIb 複合体の X 線結晶回折結果によって証明された (図 2)。

type 3 VWD 症例では第 VIII 因子活性は <10% と著明に低下しており第 VIII 因子の循

環血液中での安定には VWF との結合が必要である。VWF サブユニットの第 VIII 因子結合部位は N 末端 D3 ドメインに存在する。



(3) 血友病マウスモデルにおける関節出血・関節症の定量

FVIII ノックアウトマウス (Bi, L. Nat Genet 1995, Blood 1996) ではヒト血友病と異なり自然の関節出血はあまり見られず、従来血友病性関節出血モデルとしてはあまり用いられてこなかった。2008 年、Valentino らは 30G の極細ニードルをマウス膝関節 patella 直下から穿刺し出血を起こさせることにより血友病性関節出血・関節症モデルを作成することに成功した (Hakobyan, Haemophilia 2008)。この出血モデルにおいては、puncture を一定にすることが容易なので、ばらつきの少ない関節症症状を再現させることができる。さらに出血が FVIII 因子濃縮製剤輸注により回避されることもヒト病態を再現している

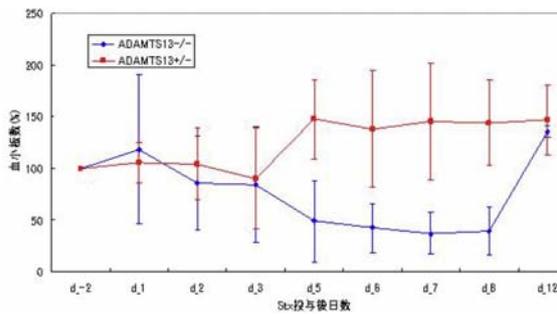
2. 研究の目的

(1) ノックインマウスによる VWF のドメイン機能の切り分けと血中 VWF 量の調節

Motto らは野生マウス種である CASA/RK の VWF 濃度は他のマウスに比べて数倍高く、CASA/RK バックグラウンドにした ADAMTS13-/- では TMA が発症すると報告した (Motto, D. G. JCI 2005)。この現象の原因は不明であるが、野生種である CASA/Rk マウスでは VWF 産生、分泌のいずれかのプロセスにおける何らかの遺伝的制御によって VWF 血中濃度が上昇しているものと推測される。これを利用して、我々は VWFK1362A において発現される mutant の血中濃度を調節できることに着目、VWFK1362A マウスを CAST/Ei と交配させていくことによって GPIb 結合能を欠いたままで、そのほかのリガンドに対する結合能、collagen, IIbIIIa, FVIII に対する結合能を変化させることとした。CAST/Ei について行った検討では Stx (Siga 毒素) 投与によって ADAMTS13 ノックアウトマウスでは著明な

血小板減少を起こした(図 3)。

図3 Stx投与後のADAMTS13ノックアウトマウス血小板数



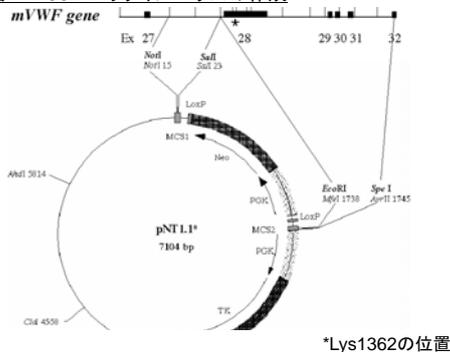
3. 研究の方法

まず VWF^{-/-} と VWFK1362A/1362A の交配を行い、VWF⁻/VWF1362A 個体を得る。一方、CAST/Ei との交配も進め、GPIb 結合能は低いままだが、第 VIII 因子、コラーゲン、IIbIIIa に対する結合能を段階的に変化させる。これらの系について tail bleeding time をはじめとする止血能について検討を行う。

GPIb 結合能を欠くノックインマウスは VWF の exon28 (A1 domain をふくむ) において Lys1362 (ヒト配列番号) を Ala に置換 (K1362A mutation) したノックインマウスで、Lys1362 は我々の mutagenesis を用いた検討により A1 ドメインの GPIb 結合の中心であると考えられるため、K1362A により、このマウスの VWF は GPIb 結合能のみを完全に失っており血小板に結合できないが、第 VIII 因子やコラーゲンに対する結合能は正常と考えられる。

ノックインマウスはエクソン 28 を含むマウス VWF 遺伝子断片中 (イントロン 27) に loxP 配列によって囲まれたネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) とチミジンキナーゼ遺伝子 (TK, イントロン 32) をセットしたポジティブ・ネガティブセレクション用のターゲティングベクターを ES 細胞に transfection して作成され、CAG-Cre マウスと交配後 NeoR 遺伝子を除去した (図 4)。

図4 K1362Aノックインマウスの作成



(1) 交配計画

- ① VWF1362A 血漿中濃度の調節
ADAMTS13^{-/-}マウスを CAST/Ei バックグラウンドのものを作成する。
- ② VWF^{-/-} と VWFK1362A 各系統の交配

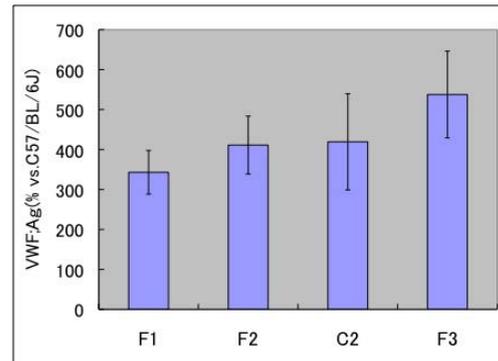
VWF^{-/-}マウスの移入はジャクソン研究所より行い、①で作成した VWFK1362A マウス各世代と交配を行う。

③ F8-との交配

F8-と上記の各 VWF マウスと交配を行う。VWF^{-/-}との交配では VWF^{-/-}X+X-のメスと VWF^{-/-}X-Y のオスが誕生する。両者の交配で VWF^{-/-}X-X-が誕生する可能性があるため、以後は VWF^{-/-}X-X-と VWF^{-/-}X-Y の交配により VWF^{-/-}X-X-と VWF^{-/-}X-Y のどちらかが作出される可能性がある。

マウスの尾の先端部から 3mm の部分を切断

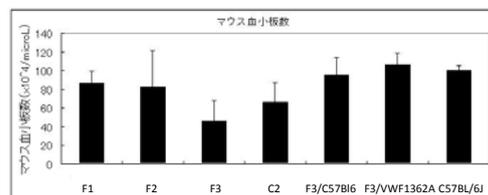
図5 CAST/Ei化によるVWF量の変化



し、尾を生理食塩水に浸水し、出血時間を測定する方法による tail bleeding time を測定する。死亡した成体については臓器出血の有無を検討する。

4. 研究成果

図6 CAST/Ei化による血小板数の変化



現在 CASA/Rk マウスは入手難であり、我々は前研究においてほぼ同一と言える CAST/Ei 系統を使用、ADAMTS13^{-/-}マウスに対し交配を行ったところ VWF 量は増加し (図 5)、血小板数はコントロールの 52% と低下した。(図 6)

これらは C57BL/6 バックグラウンドであるが、CAST/Ei と雑種第一代 (F1) から F2、C2、F3 と CAST/Ei と交配させていくにつれ、VWF 抗原量は野生型を 100%としたときに 342%、411%、419%、537%と増加することがわかった (図 6)。

VWF1362A と CAST/Ei との交配を行い、VWF1362A の血中濃度を段階的に変化させたマウスを作成した。各系統における自然発症の出血傾向については VWFK1362A については尾の先端部から 3mm の部分を切断し、尾を生理食塩水に浸水し、出血時間を測定する方法による tail bleeding time を測定した。バ

ッククロス完了前の VWF^{K1362A} マウスの自然の出血傾向は軽微で、VWF^{-/-}マウスに見られるような臓器出血を呈する個体は見られなかったが、tail bleeding time は9分以上(3/3が出血死)、第VIII活性(chromogenic)は7.5% (n=2)と件頭数は少ないが著明な減少を示した(投稿準備中)。

一方 VWF^{-/-}と VWF^{K1362A} の交配を行った。VWF^{-/-}マウス (Denis, C., et al. PNAS, 1998) は出血傾向を呈するがホモ接合体メスにおいても妊娠可能であり、出産時の出血死はあまり見られないため、ホモ接合体同士の交配を行い、第2世代目に VWF^{-/-}/K1362A を得た。これをもとにさらに F8⁻との交配を計画していたが、24年度も VWF^{-/-}/K1362A メスが予定匹数以上に得られず、当初不妊傾向があったため、交配計画に遅延が発生した。

今後 F8⁻はメスホモ接合体 (以下 X-X⁻) を用意、VWF^{-/-}との交配では VWF^{-/-}, X+X⁻のメスと VWF^{-/-}, X-Y のオスが誕生するが、両者の交配で VWF^{-/-}, X-X⁻ が誕生すれば、VWF^{-/-}, X-X⁻ と VWF^{-/-}, X-Y の交配により VWF^{-/-}, X-X⁻ と VWF^{-/-}, X-Y のどちらかが安定的に作出出来ると考えられる。今後は VWF^{-/-}の妊娠効率が悪く、胎仔が喰殺にあってしまう可能性を考慮し作出を続行できると考えられる。

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10件)

1. Kobayashi S, Matsushita T (他8名3番目) Increased von Willebrand Factor to ADAMTS13 ratio as a predictor of thrombotic complications following a major hepatectomy. Arch Surg. 2012 Oct;147(10):909-17. doi:

10.1001/archsurg.2012.998. 査読有

2. Fujita J, Matsushita T. (他11名10番目) A possible mechanism for Inv22-related F8 large deletions in severe hemophilia A patients with high responding factor VIII inhibitors. J Thromb Haemost. 2012 Oct;10(10):2099-107. doi:

10.1111/j.1538-7836.2012.04897.x. 査読有

3. Miyawaki Y, Matsushita T (他13名12番目) Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. N Engl J Med. 2012 Jun 21;366(25):2390-6. doi:

10.1056/NEJMoa1201994 査読有

4. Shirahata A, Matsushita T (他14名9番目) Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture in haemophilia patients with inhibitors - Phase I trial. Haemophilia. 2012 Jan;18(1):94-101. doi:

10.1111/j.1365-2516.2011.02548.x. 査読有
5. Iwaki T, Matsushita T (他10名7番目) Life-threatening hemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete plasminogen activator inhibitor-1 deficiency in humans. J Thromb Haemost. 2011 Jun;9(6):1200-6. doi:

10.1111/j.1538-7836.2011.04288.x. 査読有
6. Iwase A, Matsushita T (他12名13番目) Successful fertility management of a patient with factor V deficiency: planned transfusion of fresh frozen plasma under infertility treatment. Fertil Steril. 2011 May;95(6):2124.e5-7. doi:

10.1016/j.fertnstert.2011.01.011. 査読有

7. Miyawaki Y, Matsushita T (他10名、10番目) Severe hemophilia A in a Japanese female caused by an F8-intron 22 inversion associated with skewed X chromosome inactivation. Int J Hematol. 2010 Sep;92(2):405-8. doi:

10.1007/s12185-010-0659-9. 査読有

8. Bolliger D, Matsushita T (他3名、4番目) Heterozygous antithrombin deficiency improves in vivo haemostasis in factor VIII-deficient mice. Thromb Haemost. 2010 Jun;103(6):1233-8. doi:

10.1160/TH09-10-0732. 査読有

9. Okada H, Matsushita T (他9名、7番目) A novel splice site mutation in intron C of PROS1 leads to markedly reduced mutant mRNA level, absence of thrombin-sensitive region, and impaired secretion and cofactor activity of mutant protein S. Thromb Res. 2010 May;125(5):e246-50. doi:

10.1016/j.thromres.2009.11.029 査読有

10. Tanaka R, Matsushita T (他11名、7番目) Impaired secretion of carboxyl-terminal truncated factor VII due to an F7 nonsense mutation associated with FVII deficiency. Thromb Res. 2010 Mar;125(3):262-6. doi:

10.1016/j.thromres.2009.09.014. 査読有

[学会発表] (計10件)

1. 静脈血栓塞栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性とそのスクリーニング検査法. 高木明, 宮脇由理, 鈴木敦夫, 藤田絢子, 牧明日加, 奥山恵理子, 村田萌, 村手隆, 松下正, 小嶋哲人. 第34回日本血栓止血学会学術集会 東京 2012.6.8

2. 名古屋大学における血友病Bの血液凝固第IX因子遺伝子解析. 村田萌, 奥山恵理子, 鈴木敦夫, 宮脇由理, 高木明, 村手隆, 松下正, 鈴木伸明, 林磨由子, 齋藤英彦, 小嶋哲人. 第34回日本血栓止血学会学術集会 東京 2012.6.8

- 3.抗VWFインヒビター保有 von Willebrand Disease(VWD)Type3症例における製剤選択. 鈴木 伸明,三田 直美, 松下 正, 小嶋 哲人, 山本 晃士, 勝見 章,林 磨由子, 梶浦 容子, 高津 真由美, 直江 知樹 第60回日本輸血・細胞治療学会総会 福島 2012.5.25
- 4.凝固傷害に対する補充療法 松下正 第18回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム 埼玉 2011.10.21
- 5.重症血友病A 3症例に見られた血液凝固第VIII因子遺伝子イントロン22逆位を伴う特異なX染色体再構成. 藤田 絢子, 牧明日加, 奥山恵理子, 村田 萌, 松下正 他 第73回日本血液学会学術集会 名古屋 2011.10.14
- 6.GPIIb 遺伝子において複合ヘテロ変異を認めた血小板無力症の一症例解析 藤田 絢子, 牧 明日加, 奥山恵理子, 村田 萌, 宮脇 由理, 鈴木 敦夫, 松下 正, 國島 伸治, 高木 明, 小嶋 哲人 第12回日本検査血液学会学術集会 倉敷 2011.7.18
- 7.アンチトロンビン抵抗性を検出するトロンビン不活化動態解析法の開発 高木 明, 宮脇 由理, 鈴木 敦夫, 藤田 絢子, 牧 明日加, 奥山恵理子, 村田 萌, 村手 隆, 松下 正, 小嶋 哲人 第12回日本検査血液学会学術集会 倉敷 2011.7.18
- 8.A case of type 3 von Willebrand Disease who developed anaphylactic anti-VWF inhibitor Nobuaki Suzuki, Naomi Sanda, Tadashi Matsushita, Tetsuhito Kojima, Koji Yamamoto, Akira Katsumi, Kanji Hirashima, Yoko Kajiuura, Mayumi Takatsu, Tomoki Naoe 第72回日本血液学会学術集会 横浜 2010.09.25
- 9.新規複合ヘテロ変異による先天性第V因子欠乏症の一症例 鈴木敦夫, 宮脇由理, 藤森祐多, 高木明, 村手隆, 山本晃士, 松下正, 高松純樹, 小嶋哲人 第11回日本検査血液学会学術集会 東京 2010.07.25
- 10.複合的遺伝子再構成を認めた重症血友病A 症例 宮脇由理, 鈴木敦夫, 藤森祐多, 山田貴之, 高木明, 村手隆, 鈴木伸明, 勝美章, 山本晃士, 松下正, 小嶋哲人 第33回日本血栓止血学会学術集会 鹿児島 2010.04.23

〔図書〕(計14件)

- 1.【知っておきたい内科症候群】血液《血小板・凝固系の異常》播種性血管内凝固症候群 松下正 内科(0022-1961)109(6) 1118-1124 2012.06
- 2.【一般内科医がみる血液疾患 血液専門医との効率的な連携のために】一般内科医が対応できる血液疾患の治療【薬剤使用時の注意事項】処置・手術時の抗凝固薬、抗血小板薬の扱い 松下正 Medicina 48(10) 1798-1802 2011.10.

- 3.【症状からアプローチするプライマリケア】出血傾向(紫斑・点状出血) 松下正 日本医師会雑誌 S159-S163 2011.10
- 4.日本血栓止血学会後天性血友病A診療ガイドライン 田中一郎、天野景裕、松下正、日笠聡、嶋緑倫、瀧正志、他 日本血栓止血学会誌 22(5) 295-322 2011.10
- 5.白血病診療ポケットブック 松下正 中外医学社 318-326 2011.10.
- 6.【DIC診断・治療の最前線】DICの治療 最近のトピックス アンチトロンビン濃縮製剤とヘパリン・ヘパリン類似物質 松下正 医学の歩み 238(1) 121-125 2011.7
- 7.【抗血栓両方の新潮流-作用機序に基づく治療戦略】抗血栓療法の進歩 静脈血栓症における一次予防と二次予防 松下正 カレントセラピー 29(6) 495-499 2011.6
- 8.身近な話題・世界の話 重度出血を有する外傷患者におけるトラネキサム酸の効果(CRASH-2) 無作為化プラセボ比較対照試験 松下正 血液フロンティア/ (株) 医薬ジャーナル社 21(2) 316-318 2011.01
- 9.【徹底ガイド DICのすべて 基礎と診療の最前線】病態生理と病理 消費性凝固障害 松下正 救急・集中治療/ (株) 総合医学社 22 1420-1428 2010.12
- 10.【血管合併症の予防・治療をめぐる】血管合併症の予防・治療をめぐる最新の展開 抗血小板剤・抗凝固療法を中心として 太田寛、松下正、宮地茂、土肥博雄、河北誠 日本臨床内科医会誌/ (一社) 日本臨床内科医会 25(4) 429-443 2010.12
- 11.【血管合併症の予防・治療をめぐる】ワーファリンによる血管合併症の予防・治療におけるマネジメント 検査・処置・手術における取扱い 松下正 日本臨床内科医会誌/ (一社) 日本臨床内科医会 25(4) 444-447 2010.12
- 12.【癌と血栓症】臨床 造器腫瘍と血栓症 松下正 血栓と循環/ (株) メディカルレビュー社 18(4) 269-273 2010.12
- 13.【血液疾患の診かた 血液専門医以外のための血液疾患対応マニュアル】プライマリ・ケア医に必要な血液疾患の知識 血友病 鈴木伸明 松下正 治療/ (株) 南山堂 92(10) 2387-2392 2010.10
- 14.【血栓症】種々の病態と血栓症:最近の進歩 骨髄増殖性疾患と血栓症 松下正 最新医学/ (株) 最新医学社 65(6) 1147-1152 2010.06

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 正 (TADASHI MATSUSHITA)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 30314008

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし