

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461445

研究課題名(和文) 後天性 von Willebrand 症候群 (AvWS) の動物モデルによる病態解明

研究課題名(英文) Animal models and hemostatic pathophysiology of acquired von Willebrand syndrome (AvWS)

研究代表者

松下 正 (Matsushita, Tadashi)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30314008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：後天性フォン・ヴィレブランド症候群(Acquired von Willebrand Syndrome;以下AvWS)は類例のない出血症状・発症パターンを呈する近年確立されつつある新たな疾患概念である。本研究ではVWD・AvWSのモデルマウスを検討し、AvWSにおける特異的な発症機序の病態の解明と、単なる補充療法を超えた最適な治療法の開発を目指し、特にVWD、AvWSにおいて外因系凝固反応を活性化した際の、トロンビン生成試験(TGT)、ROTEM (Rotation thromboelastgram)の各パラメーターの変化と出血傾向を観察し、特にAvWSに治療の有効性を評価することができた。

研究成果の概要(英文)：Acquired von Willebrand Syndrome (AvWS) has a unique bleeding symptom, that has not been observed in other hemostatic disorders. This study had a strategic approach to establish AvWS animal models and aimed to unveil the specific mechanisms underlining the development of AvWS bleeding diathesis. Our recent clinical observation indicated that activation of extrinsic pathways had some potential in controlling bleeding in patients with AvWS. We therefore observed the unique pattern of thrombin generation assay and ROTEM (Rotation thromboelastgram) assays to enable the novel therapeutic approach to this disorder.

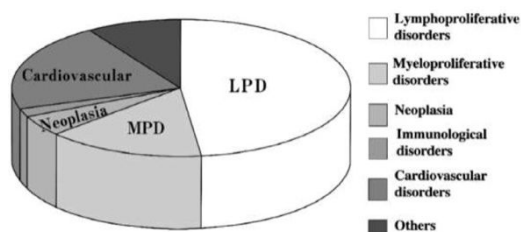
研究分野：血栓止血学

キーワード：von Willebrand因子 von Willebrand病 AvWS 血友病

1. 研究開始当初の背景

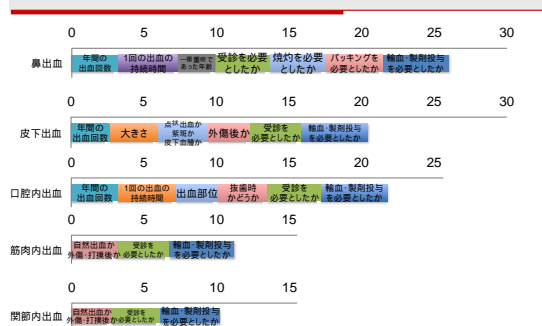
家族歴、既往歴の無い出血性後天性凝固異常症は従来稀であったが、近年高齢化に伴い次第に増えつつあり、しばしば致命的であるので、これらに対しては早期診断、早期治療が不可欠である。中でも最も高頻度である後天性血友病 A(約 1.5 人/100 万人/年; Collins ら, 2007)に対しては近年臨床的な側面からその management の改革が進み、本邦においても診療ガイドラインが作成されている(田中、松下ほか, 2011)。これに比して AvWS は後天性血友病に次ぐ発症頻度であると考えられるが、未だその病態、臨床実態にはきわめて不明な点が多く、特に日本では従来本症候群への注目度が低かったため、見逃されていることが多く、実際の発症頻度はもっと高い可能性が考えられる。

図1 AvWSの基礎疾患



毛利博, (2003) 日本血栓止血学会誌 14(2), 82-90

AvWSの診断における症状の有用性の評価(5点満点) -1



AvWSの診断における症状の有用性の評価(5点満点) -2



以下 日本血栓止血学会学術情報化委員会 2013シンポジウム VWD診療ガイドライン: 開発, アンケート調査結果の報告

Simon らが初めて報告して以来、本症候群では、基礎疾患があることが特徴的とされてきた(図 1) 本症候群の臨床症状としては皮膚粘膜出血が主体であり、時に消化管毛細血管拡張症を伴う消化管出血を認めることもあるなど、先天性 von Willebrand 病(以下 VWD)との類似点も多いが、その病態は大き

く異なる。研究代表者らは日本血栓止血学会会員に対しアンケート調査を行い、専門家が AvWS を考える症状としてどのようなものを考えるのか問うたところ、実に様々な回答が得られた(左図)。

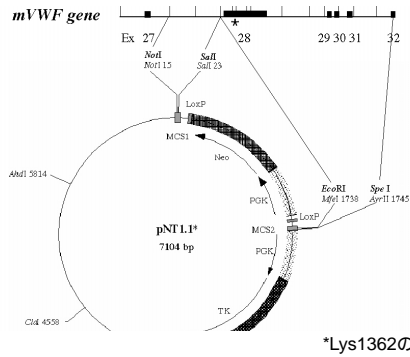
AvWS では、あくまでも VWF は血管内皮細胞や骨髄巨核球から正常に分泌されている。提唱されている発症機序には大きく分けて免疫学的機序、流体力学的機序による ADAMTS13 の過剰活性、VWF の血小板、組織、腫瘍細胞などへの吸着の 3 つが考えられる。このうち、では VWF の機能部位を認識する抗体(インヒビター)による機能の阻害とともに、その免疫複合体が網内系への取り込みにより循環血液中より除去されることが考えられる。また、これらの抗体の認識部位は、血小板膜糖蛋白(GP)Ib 結合ドメインあるいはコラゲン結合ドメインであるとの報告もある(Mohri, 1998)。

の機序によるものはほとんど心血管病、特に大動脈弁狭窄症(AS)に伴うもので、諸外国では報告が比較的多いが、本邦では少ない。大動脈狭窄などにより血流の乱れが生じ、高ずり応力下で血栓傾向をきたし、血栓部位で高分子量マルチマーが大量に消費されることにより、VWF が低下し AvWS の病態を来すと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では VWD・AvWS のモデルマウスを検討し、AvWS における得意な出血症状の発症機序とその病態の解明と、単なる補充療法を超えた最適な治療法の開発を目指した。インヒビターを保有する先天性 VWD の type 3 症例(VWF 完全欠損例)においてだけではなく、インヒビター力価の高い AvWS 症例では DDAVP や VWF 濃縮製剤が有効でなく、出血コントロールに難渋する。このような治療抵抗性の AvWS には活性型第 VII 因子製剤の有用性も報告されてきている(Friederich, 2001)。我々も治療経過中に抗 VWF インヒビターを発生した vWD(Type3)患者を経験し、rFVIIa の有効性を報告している(鈴木ら 輸血細胞治療学会 2012)。rFVIIa は外因系凝固のイニシエーターであり、内因系凝固障害をバイパスさせることから、VWD や血小板無力症などの一次止血異常症にはフィットしないと考えられてきたが、実際には治療抵抗性の血小板無力症に多く使用され、欧州と我が国で認可された治療方法となっている。rFVIIa は活性化血小板上の第 X 因子を活性化することから、血小板を中心とした一次止血機構に一定の寄与をしているものと考えられる。このような VWD、AvWS における外因系凝固機能を活性化した際のトロンビン生成試験(TGT)、ROTEM(Rotation thromboelastogram)の各パラメーターの変化と出血傾向を観察し、特に AvWS における治

療の有効性を評価することとした。

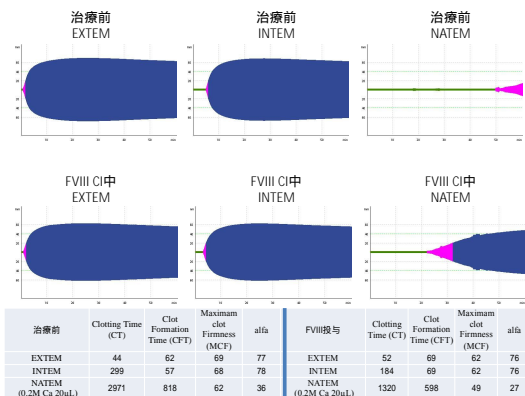


3. 研究の方法

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(上図)。

本研究計画では、ヒト第VIII因子製剤投与後、各タイミングで採血、PPPを用いて、ROTEMおよびトロンビン生成試験(TGT)を実施、TGT各パラメーターの変化を観察、AvWSに対するrFVIIaを用いた治療の有効性を評価した。



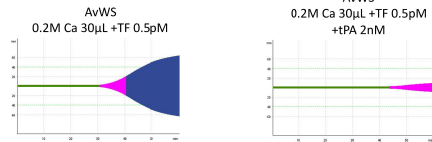
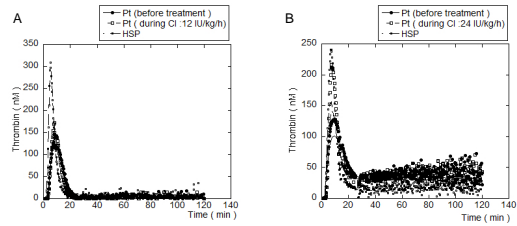
ROTEMでは終濃度18.75mM CaCl₂においてヒトTF(終濃度0.5pM)添加後の全血(300μL)凝固パターンをフィンガルリンク社製ROTEM解析装置をもちいて行った。TGAはCalibrated automated thrombography (Thromboscope BV; フィンガルリンク社)を用い、390nmで惹起した蛍光光度計により

測定した。

4. 研究成果

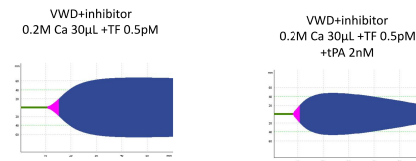
インヒビターを有する先天的VWDでは下図のようにNATEMのみが異常を示し、FVIII continuous infusion (FVIII CI)によってわずかな改善が示されていた。EXTEM, INTEMに顕著な変化はなく、VWDの止血異常は血友病などの凝固障害とは大きく異なることが示唆された(左下図)。

同様な傾向はTGAにおいてもみられた(下図)。

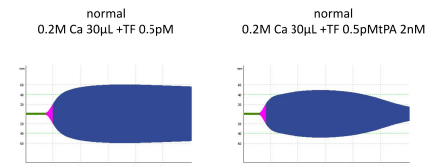


	Clotting Time (CT)	Clot Formation Time (CFT)	Maximum clot firmness (MCF)	alfa angle
AvWS tPA-	1838	574	72	32
AvWS tPA 2nM	2576	-	9	-

一方、AvWSのEXTEMでは、VWD+inhibitorよりも極端に不良であった。さらにTFにて凝固反応惹起後tPAを添加して抗線溶性を観察した系では(上図)、きわめて抗線溶性が弱かった。



	Clotting Time (CT)	Clot Formation Time (CFT)	Maximum clot Firmness (MCF)	alfa angle
VWD+inhibitor tPA-	637	274	67	48
VWD+inhibitor 2nM	453	186	47	56



	Clotting Time (CT)	Clot Formation Time (CFT)	Maximum clot Firmness (MCF)	alfa angle
normal tPA-	449	144	60	63
normal tPA 2nM	349	134	48	64

一方、VWD+inhibitor では抗線溶性を正常 plasma と同様にたもっており、AvWS の特徴的な出血症状には抗線溶性の弱さにも起因する可能性が考えられた(前ページ右下2図)。以上のことより、AvWS 血漿における凝血学的動態は一樣でなく、先天性 VWD と大きく異なる可能性がモデルにおける観察においても予想された。

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 6 件)

1. Kanematsu T, Suzuki N, Yoshida T, Kishimoto M, Aoki T, Ogawa M, Kagami Y, Kiyoi H, Matsushita T, Kunishima S. A case of MYH9 disorders caused by a novel mutation (p.K74E). Ann Hematol. 2016 Jan;95(1):161-3. doi: 10.1007/s00277-015-2506-9. 査読有
2. Kishimoto M, Suzuki N, Murata M, Ogawa M, Kanematsu T, Takagi A, Kiyoi H, Kojima T, Matsushita T. The first case of antithrombin-resistant prothrombin Belgrade mutation in Japanese. Ann Hematol. 2015 Oct 19. [Epub ahead of print] 査読有
3. 松下正、血友病治療の手段とその進歩 臨床血液 (0485-1439)56巻10号 Page2100-2109(2015.10)、doi:10.11406/rinketsu.56.2100 査読有
4. Ihara A, Suzuki N, Matsushita T, Ichinose A. [Acquired von Willebrand syndrome in a patient with immune thrombocytopenic purpura]. Rinsho Ketsueki. 2015 Jul;56(7):901-4. doi: 10.11406/rinketsu.56.901. Japanese. 査読有
5. Ishizu Y, Ishigami M, Suzuki N, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Katano Y, Hirooka Y, Ishikawa T, Matsushita T, Goto H. Endoscopic treatment of esophageal varices in hemophiliac patients with liver cirrhosis. Gastrointest Endosc. 2015 Apr;81(4):1059-60. doi: 10.1016/j.gie.2014.11.043. 査読有
6. Yoshioka A, Ishii E, Ueno T, Usami I, Kobayashi M, Kobayashi R, Sotomatsu M, Shirahata A, Suzuki T, Taki M, Ishida Y, Matsushita T, Shima M, Nogami K, Sakai M, Kigasawa H, Fukutake K. The International Immune Tolerance Induction Study and its follow-up study on Japanese hemophilia A patients with inhibitors. Int J Hematol. 2015 Apr;101(4):362-8. doi: 10.1007/s12185-015-1734-z. 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. 全血凝固分析装置ROTEMの基礎的検討 龜山 なつみ, 鈴木 伸明, 高津 真由美, 山本

ゆか子, 前田 奈弥, 杉浦 由姫乃, 鈴木 敦夫, 梶浦 容子, 松本 祐之, 松下 正 第16回日本検査血液学会学術集会 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市 2015.7.11-12

2. エクソーム解析によるvon Willebrand病遺伝子解析の一例 三田 直美, 鈴木 伸明, 梶浦 容子, 中村 栄男, 松下 正 第16回日本検査血液学会学術集会 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市 2015.7.11-12

3. von Willebrand病の検査と日常診療 松下 正 第16回日本検査血液学会学術集会 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市 2015.7.11-12

4. 新規変異を有するMYH9異常症の1例 兼松 毅, 鈴木 伸明, 小川 実加, 岸本 磨由子, 國島 伸治, 松下 正 第37回日本血栓止血学会学術集会 甲府市総合市民会館 山梨県甲府市 2015.5.21-23

5. 血小板無力症に同定されたGPIIb遺伝子のミスセンス変異とスプライス変異の複合ヘテロ変異解析 橋本 恵梨華, 村田 萌, 榎山 愛弓, 河村 奈美, 小塚 敏弘, 中田 悠紀子, 長谷部 瞭, 高木 夕希, 水谷 直貴, 高木 明, 國島 伸治, 松下 正, 小嶋 哲人 第37回日本血栓止血学会学術集会 甲府市総合市民会館 山梨県甲府市 2015.5.21-23

6. 深部静脈血栓症で発症しアンチトロンビン抵抗性を示した本邦初Prothrombin Belgrade変異の一家系 岸本 磨由子, 鈴木 伸明, 村田 萌, 小川 実加, 兼松 毅, 高木 明, 小嶋 哲人, 松下 正 第37回日本血栓止血学会学術集会 甲府市総合市民会館 山梨県甲府市 2015.5.21-23

7. プロトロンビン変異による新たなアンチトロンビン抵抗性変異の候補解析 村田 萌, 水谷 直貴, 高木 夕希, 長谷部 瞭, 小塚 敏弘, 中田 悠紀子, 榎山 愛弓, 河村 奈美, 橋本 恵梨華, 高木 明, 松下 正, 小嶋 哲人 第37回日本血栓止血学会学術集会 甲府市総合市民会館 山梨県甲府市 2015.5.21-23

8. 凝固第VIII因子インヒビターとその対策 松下 正 第37回日本血栓止血学会学術集会 甲府市総合市民会館 山梨県甲府市 2015.5.21-23

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

竹下 享典 (KYOUSUKE, TAKESHITA)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70444403

鈴木 伸明 (NOBUAKI, SUZUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70637686