

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591104
 研究課題名（和文）モノクローナル抗体による TMA 治療モデルの確立
 研究課題名（英文）Regulation of thrombotic microangiopathic anemia (TMA) by controlling von Willebrand factor function by specific monoclonal antibody
 研究代表者
 松下 正（MATSUSHITA TADASHI）
 名古屋大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：30314008

研究成果の概要：

VWF マルチマーを分解する ADAMTS13 の欠乏はマルチマーのダウンサイジング機構破綻=VWF 機能の過剰をきたすと考えられる。ADAMTS13 ノックアウトマウス を von Willebrand 因子 (VWF) 血中濃度が高い CAST/Ei マウスとの交配により血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)様の血栓症を自然発症させ、我々が見いだしたがマウス VWF に交差反応する抗ヒト VWF モノクローナル抗体 5D2 をこれに直接投与、病態の修飾を観察し、「VWF 機能亢進症」である TMA の抗 VWF 抗体による病態制御の基盤的な知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯学

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：①遺伝子②動物③血栓症④血栓・止血学⑤von Willebrand 因子⑥ADAMTS13

1. 研究開始当初の背景

血栓性微小血管障害 (thrombotic microangiopathy, TMA) は、破碎赤血球、血小板減少、臓器機能障害を呈する難治性の疾患群で、その病態の本態は①細血管障害性溶血性貧血、②破壊性血小板減少、③細血管内血小板血栓による臓器障害の3つであると考えられる。

放出直後の von Willebrand factor (VWF) のは超巨大分子構造 (unusually large VWF multimer, UL-VWFM) をとり、高い血小板結合能があるため、過剰な血小板凝集を起こし、血管を閉塞する。ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloprotease and thrombospondin type 1 motifs 13) は、UL-VWFM を限定分解し、VWF の活性を制御す

る。血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) では、ADAMTS13 に対する自己抗体 (インヒビター) により UL-VWFM が切断されず血栓症を起こすと考えられている。

TTP に対しては血漿交換療法が有効であることが以前より知られているが、TTP では抗 ADAMTS13 インヒビターが存在し、血漿交換が奏功する理由は ADAMTS13 の補充および抗 ADAMTS13 抗体の除去であると考えられる。しかし UL-VWFM は血小板血栓の中に取り込まれ、TTP 発症中の患者血漿からは UL-VWFM がむしろ減少することが知られており、血漿交換によって効果的に除去されるかどうかははっきりわかっていない。事実血漿交換は、有効例でも数回以上の実施が

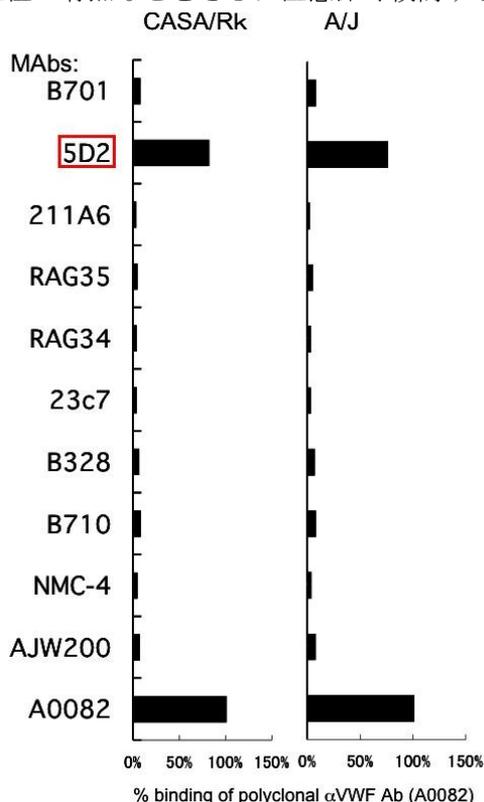
必要で、また一次的に改善するものの、増悪・寛解を繰り返す難治例も多い。UL-VWFは病的血栓形成においては非常に重要な役割を担っており、ADAMTS13の低下だけではなくVWFの過剰がTMA発症に重要であることが強く示唆される。特筆すべきはTTP以外のTMAでは血漿交換が有効でないことで、TMAの本態がVWF機能亢進ならば、本来治療ターゲットとすべきはVWFであり、VWFを効果的に制御することができれば単にADAMTS13を補充する場合に比べてより効果的なTMAの治療、予防に直結するのではないかと考えられる

2. 研究の目的

病態の本質であるVWFの血小板GPIb結合部位であるVWF A1ドメインを狙ってVWFそのものを制御するという治療的試みはこれまで行われていない。一方抗VWFモノクローナル抗体は動物モデルにおいて広い安全域を有することが報告されており、TMA以外の血栓症においても臨床応用が期待されている(図3-4)。本研究ではVWFの血栓症発症における役割を病態的側面から再検討を行う。すなわちTMA発症におけるVWFの役割を明らかにするために5D2をADAMTS13ノックアウトマウスに投与、ADAMTS13低下+VWF過剰がTMAの本態であることを示し、抗VWF抗体によるTMA病態制御の基盤的な知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

CAST/Eiマウスをジャクソン研究所(米国)より移入し、ADAMTS13^{-/-}マウスに対し2回以上の交配を実施してCAST/Eiバックグラウンドとし、血小板数、腎糸球体微小血栓の有無などをさらに注意深く検討する。



また抗体5D2 10μg/gマウス体重を尾静脈より投与、マウスの病的表原型解析を進め、各種血栓症誘発モデルについて、各臓器での血栓形成ならびに組織障害を観察する

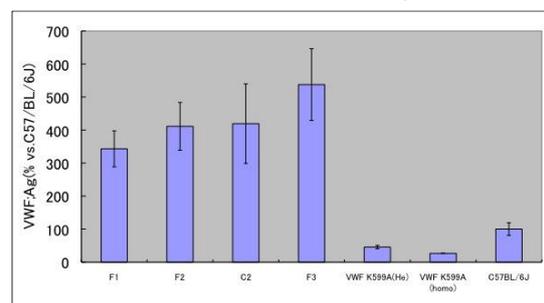
4. 研究成果

Full lengthマウスVWFを発現させ、保有する抗体のスクリーニングを行い、抗体5D2がマウスVWFにヒトVWFに対するのと同程度に反応することを見いだした(下図)。

またADAMTS13^{-/-}マウスにつき、まず129/SVバックグラウンドのものを国立循環器病センター宮田敏行博士より供与を受け、繁殖に成功した。一方、CASA/Rkマウスは現在ジャクソン研究所(米国)が供給を停止しているため同系統のCAST/Eiを移入、ADAMTS13^{-/-}マウスに対し2回以上の交配を行った。

一方、陰性コントロールとしてGPIb結合能を欠くノックインマウスを準備した。これはVWFのexon28(A1 domainをふくむ)においてLys599(ヒト配列番号)をAlaに置換(K599A mutation)したノックインマウスで、Lys599はA1ドメインのGPIb結合面の中心であるため、K599Aにより、VWFは他の機能を残してGPIb結合能のみを完全に失う。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。

次に野生型を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連れ、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(下図)。



一方、ADAMTS13ノックアウトマウスにおける血小板数はコントロールの52%と低下しており、この系がTTPを自然発症する系であることが示唆された。

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 23 件)

- [1] Hayata, K., Nakayama, T., Matsushita, T., and Sakano, K., A New Binding Assay of von Willebrand Factor and Glycoprotein Ib Using Solid-Phase Biotinylated Platelets, *J Pharmacol Sci* (Epub ahead of print) (2008). 査読有
- [2] Kashiwagi, T., Matsushita, T., Ito, Y., Hirashima, K., Sanda, N., Fujimori, Y., Yamada, T., Okumura, K., Takagi, A., Murate, T., Katsumi, A., Takamatsu, J., Yamamoto, K., Naoe, T., and Kojima, T., L1503R is a member of group I mutation and has dominant-negative effect on secretion of full-length VWF multimers: an analysis of two patients with type 2A von Willebrand disease, *Haemophilia* 14 (2008) 556-563. 査読有
- [3] Kunishima, S., Matsushita, T., Hamaguchi, M., and Saito, H., Identification and characterization of the first large deletion of the MYH9 gene associated with MYH9 disorders, *Eur. J. Haematol.* 80 (2008) 540-544. 査読有
- [4] Nakayama, T., Matsushita, T., Yamamoto, K., Mutsuga, N., Kojima, T., Katsumi, A., Nakao, N., Sadler, J. E., Naoe, T., and Saito, H., Identification of amino acid residues responsible for von Willebrand factor binding to sulfatide by charged-to-alanine-scanning mutagenesis, *Int J Hematol* 87 (2008) 363-370. 査読有
- [5] Okumura, K., Fujimori, Y., Takagi, A., Murate, T., Ozeki, M., Yamamoto, K., Katsumi, A., Matsushita, T., Naoe, T., and Kojima, T., Skewed X chromosome inactivation in fraternal female twins results in moderately severe and mild haemophilia B, *Haemophilia* 14 (2008) 1088-1093. 査読有
- [6] Ozlu, F., Kyotani, M., Taskin, E., Ozcan, K., Kojima, T., Matsushita, T., Yapicioglu, H., Takagi, A., Sasmaz, I., Satar, M., and Narli, N., A neonate with homozygous protein C deficiency with a homozygous Arg178Trp mutation, *J Pediatr Hematol Oncol* 30 (2008) 608-611. 査読有
- [7] 西野正人, 松井太衛, 松下正, 松本雅則, 毛利博, 藤村吉博, 本邦における von Willebrand 病患者調査報告 日本血栓止血学会誌 19 (2008) 311-318. 査読有
- [8] 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤

井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫, インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン, 日本血栓止血学会誌 19 (2008) 520-539. 査読有

[9] 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫, わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する 3 年間の継続調査予後因子に関する検討, 日本血栓止血学会誌 19 (2008) 140-153. 査読有

[10] 松下正, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 田中一郎, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫, インヒビターのない血友病患者の急性出血, 処置・手術における凝固因子補充療法のガイドライン, 日本血栓止血学会誌 19 (2008) 510-519. 査読有

[11] Fontayne, A., De Maeyer, B., De Maeyer, M., Yamashita, M., Matsushita, T., and Deckmyn, H., Paratope and epitope mapping of the antithrombotic antibody 6B4 in complex with platelet glycoprotein Ibalph α , *J Biol Chem* 282 (2007) 23517-23524. 査読有

[12] Kunishima, S., Yoshinari, M., Nishio, H., Ida, K., Miura, T., Matsushita, T., Hamaguchi, M., and Saito, H., Haematological characteristics of MYH9 disorders due to MYH9 R702 mutations, *Eur J Haematol* 78 (2007) 220-226. 査読有

[13] Kyotani, M., Okumura, K., Takagi, A., Murate, T., Yamamoto, K., Matsushita, T., Sugimura, M., Kanayama, N., Kobayashi, T., Saito, H., and Kojima, T., Molecular basis of antithrombin deficiency in four Japanese patients with antithrombin gene abnormalities including two novel mutations, *Am J Hematol* 82 (2007) 702-705. 査読有

[14] Sanda, N., Fujimori, Y., Kashiwagi, T., Takagi, A., Murate, T., Mizutani, E., Matsushita, T., Naoe, T., and Kojima, T., An Spl binding site mutation of the PROS1 promoter in a patient with protein S deficiency, *Br J Haematol* 138 (2007) 663-665. 査読有

[15] Yamamoto, K., Kojima, T., Takeshita, K., Matsushita, T., and Takamatsu, J., Pitavastatin attenuates the upregulation of tissue factor in restraint-stressed mice, *Thromb Res* 120 (2007) 143-144. 査読有

[16] Yanada, M., Matsushita, T., Asou, N., Kishimoto, Y., Tsuzuki, M., Maeda, Y.,

Horikawa, K., Okada, M., Ohtake, S., Yagasaki, F., Matsumoto, T., Kimura, Y., Shinagawa, K., Iwanaga, M., Miyazaki, Y., Ohno, R., and Naoe, T., Severe hemorrhagic complications during remission induction therapy for acute promyelocytic leukemia: incidence, risk factors, and influence on outcome, *Eur J Haematol* 78 (2007) 213-219.

査読有

[17] 林睦晴, 松下正, 遺伝子改変動物から学ぶ血栓症 致死性アンチトロンビンノックアウトマウスの低濃度組織因子発現マウスによるレスキュー, *血栓と循環* 15 (2007) 142-146. 査読有

[18] 鈴木隆史, 松下正, 堀越泰雄, 新井盛大, 福武勝幸, 嶋緑倫, 血友病製剤 2007 年版, *日本血栓止血学会誌* 18 (2007) 71-86. 査読有

[19] 真弓俊彦, 和田英夫, 松下正, 西脇公俊, 青木克憲, 上山昌史, 小倉真治, 高松純樹, 丸山一男, 丸藤哲, 齋藤英彦, 臨床医の DIC に対する診療の現状 第 1 回東海 DIC up to Date アンサーパッド集計より, *日本血栓止血学会誌* 18 (2007) 619-626. 査読有

[20] 白幡聡, 嶋緑倫, 岡敏明, 天野景裕, 花房秀次, 瀧正志, 三間屋純一, 松下正, 高松純樹, 日笠聡, 小阪嘉之, 須賀健一, 酒井道生, 梶原真清恵, 高田昇, 吉岡章, 国内における遺伝子組換え活性型凝固 VII 因子製剤(注射用ノボセブ)の高用量単回投与に関する臨床研究第 I 相試験結果 安全性についての報告, *日本血栓止血学会誌* 18 (2007) 614-618. 査読有

[21] 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫, わが国におけるインヒビター保有先天性血友病患者に対するバイパス止血療法の現状, *日本血栓止血学会誌* 18 (2007) 627-639. 査読有

[22] 嶋緑倫, 瀧正志, 天野景裕, 岡敏明, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 白幡聡, 凝固因子製剤の種類がインヒビター発現に及ぼす影響, *日本血栓止血学会誌* 18 (2007) 87-88. 査読有

[23] 松下正, 血友病インヒビターはどこまでわかってきたか?どこまで治療できるか? 免疫寛容療法の実態と展望, *日本血栓止血学会誌* 18 (2007) 438.

[学会発表] (計 7 件)

[1] Matsushita, T, Current status of hemophilia care in Japan in 2008 East Asia

Hemophilia Forum, (2008.11.7), Seoul.

[2] 田中亮子, 中島大輔, 柏木隆宏, 三田直美, 藤森祐多, 山田貴之, 奥村薫, 勝見章, 山本晃士, 松下正, 高松純樹, 高木明, 村手隆, 小嶋哲人, 先天性プロテイン C 欠損症 7 家系における遺伝子解析, 日本血栓止血学会学術集会 (2007.11.15-17) 三重県志摩市 463.

[3] 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫, インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン案, 日本血栓止血学会学術集会 (2007.11.15-17) 三重県志摩市 468.

[4] 松下正, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 藤井輝久, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 三間屋純一, 田中一郎, 吉岡章, 嶋緑倫, 血友病患者の凝固因子補充療法の標準化, 日本血栓止血学会学術集会 (2007.11.15-17) 三重県志摩市 468.

[5] 山本晃士, 松下正, 勝見章, 小嶋哲人, 高松純樹, リバビリン併用の C 型肝炎治療中に劇的な出血の改善を認めたインヒビター陽性血友病 A の 1 例, 日本血栓止血学会学術集会 (2007.11.15-17) 三重県志摩市 529.

[6] 奥村薫, 山田貴之, 柏木隆宏, 三田直美, 藤森祐多, 田中亮子, 中島大輔, 松下正, 小関道夫, 高木明, 村手隆, 小嶋哲人, X 染色体の不活性化を伴う女兒血友病 B の分子病態解析, 日本血栓止血学会学術集会 (2007.11.15-17) 三重県志摩市 467.

[7] 中山享之, 松下正, 直江知樹, 齋藤英彦, Alanine scanning mutagenesis を用いた von Willebrand Factor における sulfatide 結合部位の同定, 日本血液学会総会 (2007.11.15-17) 三重県志摩市 1017.

[図書] (計 1 件)

[1] 松下正, 血友病の止血治療-血友病 B, in *みんなに役立つ血友病の基礎と臨床*, in 白幡聡, (Ed.), 医薬ジャーナル社, 2008, pp. 148-157.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 正 (MATSUSHITA TADASHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 30314008

(2) 研究分担者

勝見 章 (KATSUMI AKIRA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号: 80378025