

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 2日現在

機関番号：32665
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780327
 研究課題名（和文）犬の血栓症におけるADAMTS13を用いた新規診断・治療法の確立に向けた基盤研究
 研究課題名（英文）Basic research on establishing of novel diagnosis and therapy using ADAMTS13 in dog with thrombosis.
 研究代表者
 丸山 治彦（MARUYAMA HARUHIKO）
 日本大学・生物資源科学部・助教
 研究者番号：60434106

研究成果の概要（和文）：犬 ADAMTS13 は人 VWF73 を切断することが確認された。また、抗 N10 抗体は、ADAMTS13 による人 VWF73 切断面の C 末端を認識することが明らかとなった。よって、人 VWF73 と抗 N10 抗体から構成されている人 ADAMTS13 活性測定 ELISA キットが、犬の血漿 ADAMTS13 活性測定に応用可能であることが明確となった。さらに、菌血症に罹患した犬の血漿 ADAMTS13 活性は、健康な犬のそれと比較して有意に低下していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Human VWF73 is cleaved by canine ADAMTS13. And the decapeptide of the C-terminal edge of human VWF cleaved by canine ADAMTS13 is recognized by the anti-N10 antibody. Therefore the human ADAMTS13 activity ELISA kit, which consists of human VWF73 and anti-N10 antibody, could be applicable for measurement of plasma ADAMTS13 activity in dogs. Furthermore the ADAMTS13 activity in dogs with bacteremia was significantly lower than that in healthy dogs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：ADAMTS13、犬、血栓症

1. 研究開始当初の背景

ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1 motifs 13) は、メタロプロテアーゼの 1 種であり、VWF を分解することで血中における過剰な血栓形成を抑制している。

現在、人医学では ADAMTS13 の先天的もしくは自己抗体による後天的な活性低下は、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) を代表とする致死的血栓症を誘

発することが明らかとなり、その病態に応じた治療法が確立され予後は大きく改善した。

ヒト ADAMTS13 の最小基質は、VWF の A2 ドメイン内の 73 個のアミノ酸残基である (hVWF73)。そして、ヒト VWF が ADAMTS13 により切断された際に形成される断端を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の抗 N10 抗体が作出された。これらを組み合わせて作製された ELISA キットは、比較的簡便で感度も良

いことから臨床検査として応用されている。

犬においても血栓症は種々の疾患に続発するため日常的に遭遇する疾患であり、致死率も非常に高いことから臨床的重要な疾患である。しかし、現在、犬では TTP を含む ADAMTS13 欠乏による血栓症を生前に診断することは不可能であり、その病態に基づいた治療も選択できない。よって、犬においても血栓症の詳細な病態解明と、それに基づく新規診断・治療指針を確立させる礎となる基礎的研究が切望されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、犬の血漿 ADAMTS13 活性測定法を確立し、血栓好発疾患における臨床的有用性を明らかにすることである。そこで、hVWF73 と抗 N10 抗体から構成されるヒト用 ADAMTS13 活性測定 ELISA キットの犬への臨床応用の可否について検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト VWF73 (GST-hrVWF73-His) の作出

HeLa 細胞から得た DNA を鋳型として VWF73 遺伝子を PCR によって増幅した。増副産物を、N 末端には GST タグ、C 末端には His タグが付加される pGEX6P1 ベクターに組み込み、それを大腸菌 BL21 株にトランスフェクトした。IPTG により蛋白発現を誘導後、溶菌ならびに遠心によって可溶分画と不溶分画に分離した。可溶分画をニッケルコートビーズによる精製を行った後、さらに純度を高めるため GST アフィニティー精製を行った。溶出した hVWF73 は切断反応の基質として使用するため 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) にバッファーを交換した。IPTG 誘導前後の可溶分画ならびに溶出した hVWF73 は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、CBB 染色を行った。

(2) 組換え犬 ADAMTS13 蛋白 (rcADAMTS13) の作出

犬肝臓 cDNA を鋳型として犬 ADAMTS13 mRNA 中の全タンパクコード領域を PCR にて増幅した。PCR 増幅産物をタンパク発現プラスミドベクターである pcDNA 3.1/V5-His に組込んだ (crADAMTS13/pcDNA3.1/V5-His)。crADAMTS13/pcDNA3.1/V5-His を HeLa にトランスフェクトした。トランスフェクト 48 時間後に培養上清を回収し、限界濾過法にて濃縮し、それを犬組換え ADAMTS13 とした。陰性コントロールとして、目的遺伝子を含まない pcDNA 3.1/V5-His をトランスフェクトした培養上清 (NT) を用いた。

(3) 犬 ADAMTS13 のヒト VWF73 の切断能の検討

切断反応には、検体として rcADAMTS13、正常犬プール血漿を用いた。陽性対照として人プール血漿を、陰性対照として NT ならびに加熱により非働化した正常犬プール血漿をそれぞれ用いた。切断反応は既報 (Kokame et al. 2004, Blood) を参考に行った。これら検体 1 μ l を 39 μ l の反応液 (150 ng GST-hrVWF73-His, 5 mM Tris-HCl, 10 mM BaCl₂, and 1 mM amidinophenylmethanesulfonyl fluoride hydrochloride, pH 8.0) に添加し、37°C、1 時間にて切断反応を行った。反応後、8 μ l の SDS sample buffer を加え反応を停止させた。

(4) 抗 N10 抗体ならびに抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロット法によるヒト VWF73 切断産物の検出

(3) の切断産物を 15% SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンに転写した。牛血清アルブミンにてブロッキング後、一枚は HRP 標識抗 GST 抗体 (1:15,000) にて反応させた。もう一方のメンブレンは抗 N10 抗体と反応後、二次抗体である HRP 標識抗マウス抗体と反応させた。化学発光を行い検出した。

(5) 犬におけるヒト ADAMTS13 活性測定 ELISA の再現性の検討

ヒト ADAMTS13 活性 ELISA キットとして、カイノス社製 ADAMTS13 Activity ELISA kit を供した。希釈直線性を評価するため、犬から得た活性が異なる 3 種のクエン酸血漿を、加熱非働化血漿にて段階希釈し、それを検体として二重測定を行った。同時再現性として活性の異なる 3 種の検体を同一プレート上で 6 重測定を行った。日差再現性として 5 日間におたり、同時再現性で使用した検体を用いて 3 重測定を行った。

(6) 犬の菌血症例における血漿 ADAMTS13 活性

犬の臨床例における血漿 ADAMTS13 活性測定に対してカイノス社製 ADAMTS13 Activity ELISA kit が応用可能か否か評価した。菌血症罹患犬 6 例および健常犬 7 例から得たクエン酸血漿を検体として、2 重測定を行い活性値の比較を行った。菌血症は血液培養によって全症例において確認をした。両群の差の検定には Mann-Whitney 検定を用い、 $p < 0.05$ で有意な差とした。

4. 研究成果

(1) ヒト VWF73 (GST-hrVWF73-His) の作出
IPTG 添加により 38 kDa と 28 kDa の分子量の産物が誘導されたことが確認された。ニッケルアフィニティーならびに GST アフィニテ

イー精製によって、hVWF73 に相当する 36 kDa の単一のバンドが確認された (図 1, レーン 1: IPTG 誘導前、2: 誘導後、3: 精製後)。

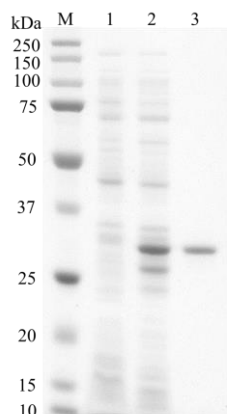


図1

(2) 犬 ADAMTS13 による GST-hVWF73-His 切断能

GST-hVWF73-His 切断産物に相当する 28 kDa のバンドが、rcADAMTS13、犬および人の血漿において、抗 GST 抗体および抗 N10 抗体によるウエスタンブロットにて確認された (図 2, レーン 1: 人血漿、2: 犬血漿、3: rcADAMTS13)。一方、非働化犬血漿および NT において切断産物は確認されなかった (図 2, レーン 4: 非働化犬血漿、5: NT)。

抗 GST 抗体によるウエスタンブロットでは、未切断産物に相当する 36 kDa のバンドがすべての検体において認められた。

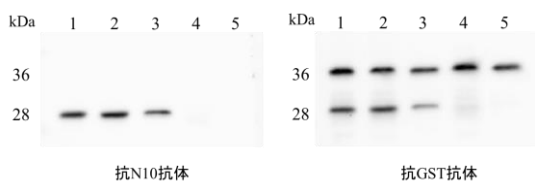


図2

(3) 犬におけるヒト ADAMTS13 活性測定 ELISA の再現性

すべての検体において良好な希釈直線性を認めた (図 3)。同時再現性の CV 値は 3.0-12.4%であった。また、日差再現性の CV 値は 11.5-12.5%であった。

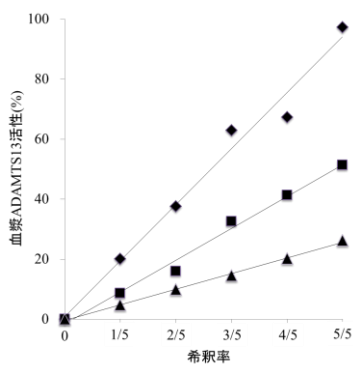


図3

(4) 犬の菌血症例における血漿 ADAMTS13 活性

菌血症群の血漿 ADAMTS13 活性の中央値は 51.0% (範囲: 37.7-68.8%) であり、健常群のそれ (中央値: 75.1%、範囲: 56.8-100.54%) と比較して有意な低下を認めた (図 4) (p=0.014)。

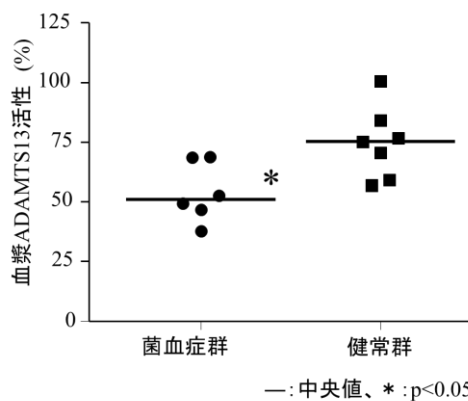


図4

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 丸山 治彦、大竹 大賀、金子 倫子、加納 壘、山谷 吉樹、亘 敏広、鎌田 寛、Evaluation of a human ELISA kit for the measurement of plasma ADAMTS13 activity in dogs, 2012 American College of Veterinary Internal Medicine Forum, 2012 年 5 月 31 日、6 月 1 日、6 月 2 日、米国 ニューオリンズ

② 丸山 治彦、大竹 大賀、金子 倫子、亘 敏広、鎌田 寛、犬 ADAMTS13 活性測定法に関する研究、第 50 回 日本大学獣医学会、2012 年 7 月 1 日、日本大学桜門会館、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~vethome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 治彦 (MARUYAMA HARUHIKO)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号： 60434106

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし