

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850213

研究課題名(和文) 犬の血栓症におけるADAMTS13およびVWFを中心とした病態追究

研究課題名(英文) Research on canine thrombotic disease with focus on ADAMTS13 and VWF

研究代表者

丸山 治彦 (MARUYAMA, Haruhiko)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：60434106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：犬における血栓好発疾患とADAMTS13との関連性を明らかにすることを目的として、腫瘍罹患犬の血中ADAMTS13の動態解明、ならびに抗犬ADAMTS13ラットモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、良性群および悪性群における血中ADAMTS13活性は、健常群と比較して有意に高かった。イヌADAMTS13を認識するモノクローナル抗体産生株も樹立できたが、その抗体はイヌADAMTS13以外のタンパクも認識している可能性が示唆された。モノクローナル抗体の作製においては更なる検索が必要ではあるが、イヌの血栓症の病態解明に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify plasma ADAMTS13 activity in dogs with tumor that is one of causes of thrombosis, and to establish an anti-canine ADAMTS13 monoclonal antibody for measuring canine plasma ADAMTS13 antigen. As results, the plasma ADAMTS13 activities in dogs with tumor were significantly higher than those in normal dogs. The established monoclonal antibody reacted with canine ADAMTS13, but also with another protein. Therefore, although some improvements of the monoclonal antibody could be required, these results might contribute to facilitate pathobiology of thrombosis in dog.

研究分野：農学

キーワード：ADAMTS13 犬 血栓

1. 研究開始当初の背景

犬において血栓症は、悪性腫瘍、敗血症、免疫介在性溶血性貧血など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高いことから、臨床上早急に打開すべき重要な疾患である。しかし、病態において未だ不明な点も多く、予後改善に大きく寄与するような早期診断法や効果的な治療法は確立されていないのが現状である。

ADAMTS13 は、止血因子のフォンヴィレブランド因子 (VWF) を分解し過剰な血栓形成を抑制する血中蛋白である。人医学ではその欠乏により血栓性血小板減少性紫斑病などの血栓症を引き起こすことが明らかとなっている。研究代表者はこれまでに犬の ADAMTS13 遺伝子を決定し、それに基づき作出した組換え蛋白を用いて、犬でも人と同じように ADAMTS13 が VWF を分解することを確認した。さらに、人の臨床現場にて使用されている ADAMTS13 活性測定法が犬に応用可能なことも併せて明らかにしてきた。しかしながら、血栓好発疾患に罹患した犬での血中 ADAMTS13 の活性値および抗原量の動態については十分な検討がなされておらず、血栓症の早期診断ならびに効果的治療法を確立する上でそれら情報の取得が欠かせない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、獣医学領域ではまだ不明である血栓好発疾患における血中 ADAMTS13 活性を明らかにすることに加え、その抗原量を測定するために欠かせない抗イヌ ADAMTS13 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの樹立である。

3. 研究の方法

(1) 肝臓腫瘍罹患犬における血中 ADAMTS13 活性の動態について

2013年7月から2014年8月に日本大学動物病院に来院して外科的治療を行った肝細胞腫瘍の犬11頭の犬7頭を用い、正常犬と

して臨床的に健常なビーグル犬を10頭用いた。肝細胞腫瘍の犬は術前、術後1、3、7、14日目の時点で、正常犬は一時点でのみそれぞれ採血を行った。採血サンプルは一部を血小板数測定に用い、残りはクエン酸ナトリウムを添加したチューブに入れ、遠心分離により得られた血漿を用いて ADAMTS13 活性および血液凝固線溶系検査項目であるプロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン濃度 (Fib)、そしてアンチトロンビン III (AT) 活性の測定に供した。ADAMTS13 活性の測定にはヒト ADAMTS13 活性測定 ELISA キット (株式会社カイノス社製) を用いた。

(2) 腫瘍罹患犬における血中 ADAMTS13 活性の検討

2014年6月から2015年3月の間に日本大学動物病院を受診し、病理組織学的検査により腫瘍性疾患と診断された犬60頭 (良性: 12例、悪性: 48例) ならびに対照として健常犬11頭 (ビーグル: 9頭、ボルゾイ: 2頭) から得たクエン酸添加血漿を用いた。

ADAMTS13 活性測定にはヒト ADAMTS13 活性測定 ELISA キット (株式会社カイノス社製) を使用した。さらに、一般止血凝固検査として血小板数、PT、APTT、Fib、AT 活性の測定を行い、血中 ADAMTS13 活性との相関性についても検討した。また、〔1〕血小板数の減少 ($150 \times 10^3/\mu\text{l}$ 未満)〔2〕PT の延長 (8.5 秒以上)〔3〕APTT の延長 (18.0 秒以上)〔4〕Fib の減少 (200 mg/dl 以上)〔5〕AT の低下 (90%未満) の5項目から3項目以上該当したものを播種性血管内凝固症候群 (DIC) と診断した。

(3) 抗イヌ ADAMTS13 モノクローナル抗体の作製

抗イヌ ADAMTS13 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

イヌ ADAMTS13 (ACCESSION NO. AB605619) タンパクドメイン (A.A.223-302) の大腸菌組換タンパク (rCA13) を作製し、Wister/ST ラットを免疫した (1 回/週、3 回)。腸骨リンパ節細胞とマウスミエローマ細胞 (P3X63-Ag8.653) とのハイブリドーマを作製、回収後、rCA13 およびイヌブール血漿を抗原とする ELISA で陽性ハイブリドーマクローン株を選択し、限界希釈法によるクローニングを二度実施した。最も抗体産生能の高いハイブリドーマクローン株 (M4A10G2F7) 由来 mAb のイヌ血漿中 ADAMTS13 認識能を ELISA およびウエスタンブロッティングにて調べた。

M4A10G2F7 から得られたモノクローナル抗体の ADAMTS13 認識能の解析

ELISA 法ではイヌ血漿および rCA13 をそれぞれ固層化し、作製 mAb で感作後、ウサギ HRP 標識抗ラット Ig 抗体 (Dako) を二次抗体として用い、作製 mAb の結合活性を吸光度測定した。ウエスタンブロッティングでは、抗原として HeLa 細胞を用いて作製した完全長のイヌ ADAMTS13 組換えタンパクを SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写し、作製 mAb と感作後、ウサギ HRP 標識抗ラット Ig 抗体 (Dako) を用い、作製 mAb の結合活性を化学発光法で測定した。また、抗原としてイヌブール血漿も供して、同様の方法でウエスタンブロッティングを行った。

4. 研究成果

(1) 肝臓腫瘍罹患犬における血中 ADAMTS13 活性の動態について

術前において、ADAMTS13 活性の中央値は正常群で 68.5%であったのに対し、肝細胞腫瘍群では 125.3%と有意に高い値を示した。同様に、血小板数と Fib も他群に比較して肝細胞腫瘍群で有意に高値を示した。一方、PT、APTT、そして Fib には有意な差は認められなかった。術後経過において、肝細胞腫瘍群では

ADAMTS13 活性は術前に比較して術後 3、7、14 日目には有意に低く、血小板数も術後 7、14 日目で有意に減少した。

(2) 腫瘍罹患犬における血中 ADAMTS13 活性値

血中 ADAMTS13 活性の中央値 (範囲) は健常群において 77.1% (53.3-141.1%) であったのに対し、良性群では 166.0% (68.9-196.0%)、悪性群では 114.2% (34.3-185.0%) であった。そして、良性群ならびに悪性群の血中 ADAMTS13 活性は、健常群と比較して有意に高い値であった ($p < 0.05$) (図 1)。播種性血管内凝固症候群 (DIC) 2 症例において本酵素活性値の低下を認めた。しかしながら、血中 ADAMTS13 活性と血小板数、PT、APTT、Fib、AT との間に相関性は認めなかった。以上、肝臓腫瘍ならびに腫瘍疾患に罹患した犬における血中 ADAMTS13 活性の解析の結果、健常群と比較して有意に高いことが明らかとなった。しかし、ADAMTS13 は VWF を分解し血栓を抑制することから、その活性が高いことは血栓が形成されづらい状態と言え予想に反した結果であった。そのため、今後、ADAMTS13 の基質である VWF 濃度やそのマルチマー構造との関連性についても検討する必要があると考えられる。

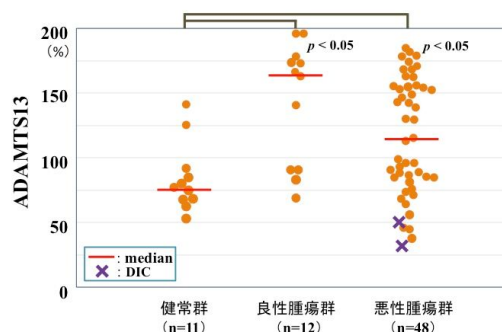


図 1 腫瘍罹患犬における血中 ADAMTS13 活性

(3) 抗イヌ ADAMTS13 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマとその抗体の特性

抗イヌ ADAMTS13 ラット mAb 産生ハイブリド

ーマを 22 株樹立した（第 3 世代）。この内一株（M4A10G2F7）から得られた抗体の特徴を解析した。本抗体のサブクラスは IgG2b であった。イヌブール血漿もしくは rCA13 を抗原とした ELISA では、良好な検量線直線性を認めた（図 2）。

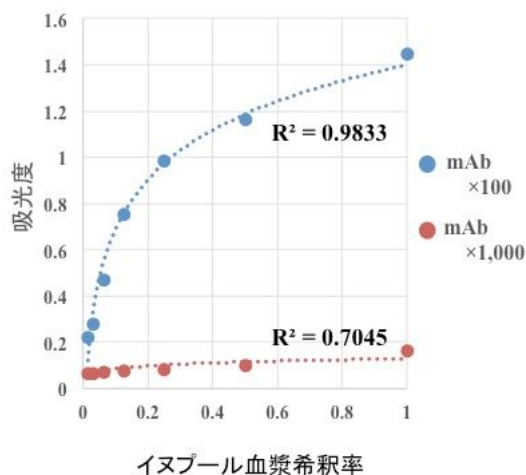


図 2 イヌブール血漿を抗原とした ELISA

ウエスタンブロットにおいて、完全長のイヌ ADAMTS13 組換えタンパクと予測される 180 kD 付近にバンドを認めたが、それに加え約 50 kD 付近にもバンドを認めた。イヌブール血漿を抗原とした場合、約 100 kD 及び 50 kD にバンドを認めた。以上の結果より、樹立したハイブリドーマはモノクローナルになっていない、もしくはモノクローナルであってもその抗体がイヌ ADAMTS13 以外のタンパクも認識している可能性が示唆される。したがって、今後もリクローニングならびに引き続き残りのハイブリドーマ株のスクリーニングを行う必要があると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

兵頭彩音、丸山治彦、吉川あかね、石垣久美子、関 真美子、浅野和之、加納 隼、鎌田 寛、腫瘍罹患犬における血中 ADAMTS13

活性の検討、日本獣医臨床病理学会 2015 年大会、2015 年 5 月 30 日、31 日、日本獣医生命科学大学、東京都武蔵野市

〔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・講師
研究者番号：60434106

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし