

課題番号 37

## 体外循環に合併する後天性フォンウィルブランド症候群の 実験モデルでの検討と治療法の開発

### [1] 組織

代表者：早川 正樹

(奈良県立医科大学)

対応者：山家 智之

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

松本 雅則 (奈良県立医科大学)

研究費：物件費 30 万円

### [2] 研究経過

フォンビレブランド因子(VWF)は約 250kDa の1つのサブユニットが鎖状に多数結合した止血因子である。この多重 VWF は、通常の状態ではその分子間内結合により球状に折り畳まれた三次構造を有する。超高分子を形成するような VWF 多重体は非常に強い止血機能を有するため、VWF 切断酵素(ADAMTS13)により適切な大きさに切断されることで体内の止血機能は保たれている。PCPS(経皮的補助循環装置)や人工心臓などの体外循環を用いると、血流の流れと血管壁の摩擦によって生じる shear stress(ずり応力)によって三次構造が崩れ、ADAMTS13による VWF 切断が過剰となり、高分子量 VWF が欠損して出血傾向をもたらすと報告されている。後天的素因によってこのような病態を呈する疾患は、総称して後天性フォンビレブランド症候群 (AVWS) と呼ばれている。我々は山家研究室と共同研究によって、1)臨床現場で使用されている PCPS や人工心臓を用いて in vitro における AVWS モデルを完成させる。2)ADAMTS13 機能阻害抗体(A10)によって AVWS の病態の発症を阻害できるかどうかを検討する、ことを目的としている。A10 とは、ADAMTS13 に対するモノクローナル抗体で、ディスインテグリンドメインを認識する活性阻害抗体である。この阻害作用は、静的な状態でも、高ずり応力下でも認められることを我々はすでに確認している。本研究では、山家研で蓄積されたノウハウを駆使して、ヒトの血液を用いて補助循環システムを独自に構築し、VWF が切断されるかを確認する。その後、この切断が回路を動かす「ポンプ」が原因であるのか、回路をつなぐ「導管」が原

因であるのか、それとも「患者側の背景」が原因なのかを多角的に検討する。その一方で A10 を投与することで、VWF の過剰な切断を止めることができるのか、可能であれば有効な濃度を検討する。A10 の効果が過剰となれば、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) という血栓症となる可能性があり、ADAMTS13 活性を阻害する最低の濃度を検討する。また、この循環回路は最低でも1回 200ml の人全血を必要とするため、東北大学倫理委員会承認を既に取得しており、実際の血液を使用して AVWS が起きるかを解析した。

早川が東北大学加齢医学研究所におもむき、10月から1月まで計8例の実験を実施した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

1)補助循環装置を利用した AVWS モデルの確立  
山家研で既存の PCPS 回路を利用した実験モデルを独自に作成した。その回路に健常人より採血したヒト血液を還流し、VWF が切断されることを確認した。その際、回路の側に要因として回転速度、導管側の要因として導管径や、導管のねじれ、患者血液側の要因として、粘張度を変化させて切断の変化を確認した。これによって得られたサンプルについて、奈良医大輸血部で VWF マルチマー解析を行う。

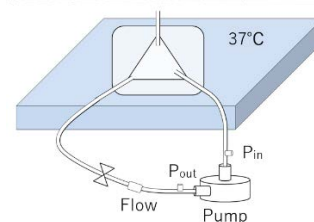
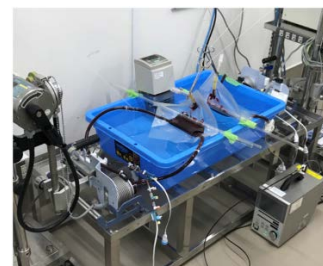


図1. 作製した機械循環による AVWS モデル回路

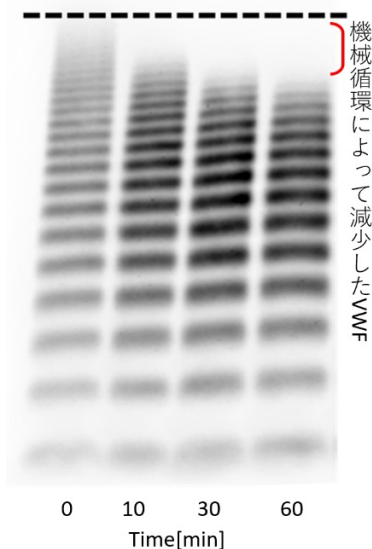


図2. 作成したモデルによって減少したVWF

2) ADAMTS13 モノクローナル抗体A10 での阻害  
A10 は奈良医大輸血部で作成した ADAMTS13 モノクローナル抗体である。IgG 終濃度 100ug/mL で完全阻害することを既に確認済みである。1)でVWF 切断を確認した各条件下で、回路内に A10 IgG を投与してその阻害効果を確認する。A10 IgG の様々な濃度で阻害効果を確認する。3)生体における AVWS の確認山家研で既に確立された人工心臓装着ヤギを使用して AVWS の発生の有無を確認する。その後、A10 を投与して、AVWS の発症を予防できるか確認する。本研究により、ADAMTS13 阻害薬の有効性が確認されれば、我が国では年間 5,000 例程度、急性重症心不全が PCPS を用いて治療されている。PCPS 治療では、急性期に穿刺部出血が必発であり、AVWS がその出血に大きく関与していると考えられつつある。もし、PCPS 装着時に抗 ADAMTS 抗体を投与すれば、合併する出血は大きく改善できると期待される。

### (3-2) 波及効果と発展性など

植込型補助人工心臓医療は近未来に大きく発展する可能性があるが、AVWS が原因と考えられている出血性合併症の制御法は未だ確立できていない。循環する血流量を落とせば必ずり応力は減少するが、流量を落とせば循環状態を維持できないことも多い。そのような症例には、定期的に抗 ADAMTS 抗体を投与して、VWF 高分子多量体を維持すれば出血性合併症は予防できると考えられる。また、我が国には、現在 100 症例程度確認されている 2A 型 VWD 患者のうち ADAMTS13 切断過剰症例の根本的な治療薬として用いることができる可能性がある。また、我々は厚生労働省科学研究費政策研究事業で

種々の循環器疾患において解析(AVeC study)を進めているが、植込型補助人工心臓装着例において非常に高度に高分子 VWF 多量体を欠損し、出血性合併症が頻発していることを確認している (Sakatsume et al,submitted)。VWF 多量体が閾値以下の症例には、その出血性合併症予防のため、定期的に抗 ADAMTS 抗体を投与して、VWF 高分子多量体を維持すれば出血性合併症は予防できると考えられる。このように、ADAMTS13 活性制御薬の開発は喫緊の必要性があり、成功時には我が国の医療を向上させることが出来ると思われる。

### [4] 成果資料

1. Yamashita K, Yagi H, Hayakawa M, Y,Matsumoto M, Taniguchi S. Rapid restoration of thrombus formation and high-molecular-weight vonWillebrand factor multimers in patients with severe aortic stenosis after valve replacement. *J Atheroscler Thromb*. 23:1150-1158, 2016.2.
2. Nishigori N, Matsumoto M, Koyama F, Hayakawa M, Hatakeyayama K, Ko S, Fujimura Y, Nakajima Y. von Willebrand Factor-Rich Platelet Thrombi in the Liver Cause Sinusoidal Obstruction Syndrome following Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *PLoS One*;10:e0143136. doi:10.1371/journal.pone.0143136.2015.3.
3. Hori Y, Hayakawa M, Isonishi A, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y. ADAMTS13 unbound to largervon Willebrand factor multimers in cryosupernatant: Implications for selection of plasma preparations for TTP treatment. *Transfusion* 53:3192-3201, 2013.4. STEC:O111-HUS complicated by acute encephalopathy in a young girl was successfully treated with a set of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin under plasma exchange.
4. Yada N, Fujioka M, Bennett C, Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y. Clinical Case Reports (査読有) 3(4) : 208-212, 2015.5. Acquired idiopathic ADAMTS13 activity deficient thrombotic thrombocytopenic purpura in a population from Japan.
5. Matsumoto M, Bennett CL, Qureshi Z, Isonishi A, Hori Y, Hayakawa M, Yoshida Y, Yagi H, Fujimura Y. *PLoS ONE* e33029, 2012.6.