

Ristocetin 血小板凝集を抑制する 抗 von Willebrand 因子モノクローナル抗体の多様性

奈良県立医科大学小児科学教室

新家 興, 西尾 健治, 中井 寛明, 嶋 緑 倫
高瀬 俊夫, 金田 美喜夫, 吉岡 章, 福井 弘

奈良県立医科大学輸血部

藤 村 吉 博

HETEROGENEITY OF ANTI-VON WILLEBRAND FACTOR (VWF) ANTIBODIES WHICH INHIBIT RISTOCETIN-INDUCED VWF BINDING TO PLATELET GLYCOPROTEIN (GP) Ib

KOU NIINOMI, KENJI NISHIO, HIROAKI NAKAI, MIDORI SHIMA,
TOSHIO TAKASE, MIKIO KANEDA, AKIRA YOSHIOKA and HIROMU FUKUI

Department of Pediatrics, Nara Medical University

YOSHIHIRO FUJIMURA

Department of Blood Transfusion, Nara Medical University

Received November 30, 1989

Summary: The epitopes of four anti-vWF monoclonal antibodies (MoAbs), which inhibit antibiotic ristocetin induced vWF binding to GP Ib, were investigated and compared with each other. MoAb NMC-4 completely inhibited both the vWF bindings to GP Ib expressed by ristocetin and snake venom botrocetin at the final concentrations of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Another MoAb RFF-VIII RAG : 1 also completely inhibited ristocetin-induced vWF binding at the IgG concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, but showed a partial inhibition (75% at the IgG concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on botrocetin-induced binding. Two other MoAbs, RG46 and 52-K8, inhibited ristocetin-induced vWF binding at the inhibition constant by 50% of 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively, but without effect on botrocetin-induced vWF binding.

Using the radiolabelled NMC-4 and its binding to vWF immobilized to plastic tubes, the competitive binding assay was performed. In this assay, cold NMC-4 clearly displaced (^{125}I) NMC-4 binding to solid-phase vWF, and RFF-VIII RAG : 1 partially blocked the binding (60% at the IgG concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), whereas neither RG46 nor 52K-8 blocked this binding. These results indicated that the epitopes of NMC-4 and RFF-VIII RAG : 1 are in close proximity, but those of RG46 and 52K-8 are different, suggesting the epitope heterogeneity of anti-vWF MoAbs which inhibit ristocetin-induced vWF binding.

Index Terms

von Willebrand factor, monoclonal antibody, epitope, ristocetin, botrocetin

結 言

von Willebrand 因子 (vWF) は障害をうけた血管内皮細胞下組織に一旦結合し、vWF のコンフォメーション変化を起こすことにより流血中の血小板と結合し、これを血管壁に結合せしめる“抗錨作用”を有する血漿性止血因子である。この血小板との最初の反応にあずかる部位が血小板膜糖蛋白 (GP) Ib 結合ドメインであるが、これは vWF subunit 上のアミノ酸残基 Val 449-Lys 728 に存在する 52/48 kDa の doublet peptide にあることが Fujimura et al.¹⁾により報告された。著者らは既に教室で作製した抗 vWF モノクローナル抗体の 1 つ NMC-4 が抗生物質 ristocetin 及び蛇毒 botrocetin で惹起される血小板凝集を抑制することから NMC-4 を用いて GP Ib 結合ドメインの解析を行い、NMC-4 が各惹起物質による vWF の GP Ib 結合および protease free neuraminidase で脱シアル酸処理した vWF (AS-vWF) の GP Ib 結合を抑制すること、さらにそのエピトープが 52/48 kDa フラグメントに存在しその高次構造に依存することを示した²⁾。

今回、著者らは NMC-4 と同様に ristocetin 血小板凝集 (RIPA) を抑制する抗 vWF モノクローナル抗体 RFF-VIII RAG: 1 を得たので、各惹起物質による vWF の GP Ib 結合抑制について NMC-4 と比較検討し、さらに 52/48 kDa フラグメントに対するモノクローナル抗体で ristocetin による vWF の GP Ib 結合を抑制する RG-46 および 52 K-8 の 2 抗体を加えて NMC-4 の vWF 結合における交叉反応性を検討した。

試材及び方法

1) vWF の純化：市販第 VIII 因子濃縮製剤 (Armour Pharmaceutical, Kankakee, IL) より免疫吸着体を用い純化した vWF を Dr. Zimmermann (Scripps clinic, USA) より提供された。またすべてのマルチマー型を有する native vWF は有効期限を過ぎた中間型第 VIII 因子濃縮製剤 RCG-5 よりゼラチンアガロースカラム、40% 飽和硫酸沈澱および Sepharose 4 B カラムを用いて精製した。

2) Botrocetin の部分純化：西尾の方法³⁾に準じ、粗製 *bothrops jararaca* venom (Sigma Co.) より純化した。

3) マウスモノクローナル抗体：抗 vWF モノクローナル抗体 NMC-4 は教室の嶋ら⁴⁾が作成した。RFF-VIII RAG: 1 は Dr. Tuddenum (Royal Free Hospital, England) より恵与された。52/48 kDa フラグメントの N 末側及び C 末側を各々認識する 2 種のモノクローナ

ル抗体 RG-46 および 52 K-8 は Dr. Zimmerman (Scripps clinic, USA) より提供を受けた。また vWF subunit の C 末側を認識する抗 vWF モノクローナル抗体 2-2-9 も Dr. Zimmerman より供与された。各モノクローナル抗体について、Steinbuch and Audran の方法⁵⁾に準じて n-caprylic acid を用いて IgG 分画を作成した。

6) Iodination：各々の蛋白は Franker and Speack の方法⁶⁾に準じ Iodogen 法にて ¹²⁵I 標識を行なった。

7) Binding inhibition assay：ホルマリン固定血小板、¹²⁵I-vWF、ristocetin および純化 botrocetin を用いての競合的な binding inhibition assay は、著者らの既報の方法²⁾で行なった。

8) 数種抗 vWF、52/48 kDa フラグメントモノクローナル抗体による ¹²⁵I-NMC-4 の固相化 vWF への結合阻害：RIPA を抑制しない抗 vWF モノクローナル抗体 2-2-9 を終濃度 50 μg/ml とするよう 0.1 M 重炭酸緩衝液 (pH 9.6) にて希釈してシオノギチューブに 500 μl ずつ分注し、4℃で一昼夜コーティングした。ついで 1 ml の 1% bovine serum albumin (BSA) 含 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 3 回洗浄し、洗浄液を十分に除いた後、4% BSA 含 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で終濃度 10 μg/ml に希釈した純化 vWF を 300 μl ずつ分注し再び 4℃で一昼夜放置した。再び洗浄用の緩衝液各 1 ml で 3 回洗浄し、終濃度が各々 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 μg/ml とするよう洗浄用緩衝液で希釈したモノクローナル抗体 (NMC-4, RG-46, 52 K-8, RFF-VIII RAG: 1) を、そして対照として抗ヒトサイログロブリンモノクローナル抗体を希釈列および緩衝液のみを各々 300 μl ずつ分注した。さらに ¹²⁵I で標識した NMC-4 (0.14 μg/ml) を 10 μl ずつ加え 4℃にて一昼夜放置し、洗浄用緩衝液各 1 ml で 3 回洗浄した後 γ-カウンターで測定した。

結 果

1. vWF の GP Ib 結合に対する NMC-4 および RFF-VIII RAG: 1 の効果

抗 vWF モノクローナル抗体 NMC-4 は ristocetin そして蛇毒 botrocetin により発現する ¹²⁵I-vWF の GP Ib への結合を終濃度 10 μg/ml 以下で完全に抑制した。一方、同じく RIPA を抑制する抗体 RFF-VIII RAG: 1 は ristocetin による vWF 結合を同濃度で完全に抑制するも、botrocetin による vWF 結合の抑制は部分的で、100 μg IgG/ml で 75% 阻害にとどまった。また RIPA を抑制する抗 52/48 kDa フラグメントモノクローナル抗

体の RG-46 および 52 K-8 の ristocetin による vWF 結合に対する IC₅₀ は各々約 90 μg/ml, 30 μg/ml であり, botrocetin による vWF 結合は全く抑制しなかった (Fig. 1).

2. 数種抗 vWF フラグメントモノクローナル抗体による ¹²⁵I-NMC-4 の vWF 結合阻害効果

抗 vWF モノクローナル抗体 2-2-9 を用いて間接的に固相化した vWF に対する ¹²⁵I-NMC-4 の結合は非標識 NMC-4 では終濃度 10 μg/ml 以下で完全に抑制されたが, RFF-VIII RAG:1 ではその結合は 100 μg IgG/ml で 60% 阻害され部分的に抑制されるにすぎなかった. また RG 46, 52 K-8 では NMC-4 の vWF への結合は 100 μg IgG/ml においても全く抑制されなかった (Fig. 2).

考 察

vWF の ristocetin 依存性 GP Ib 結合ドメインに関する研究は急速な進歩をとげ, 1986 年教室の Fujimura et al.¹⁾ は純化 vWF のトリプシン分解産物を還元アルキル化処理し, HPLC 分子ふるいカラムそして HPLC クロマトフォーカシングカラムで精製した分子量 52/48 kDa の doublet peptide が ristocetin および蛇毒 botrocetin で発現する vWF の GP Ib 結合そして AS-vWF の GP Ib 結合を完全に抑制し, さらにこの peptide が vWF subunit のアミノ酸残基 449-728 に相当することからこの部分に GP Ib 結合ドメインがあることを示

した. 一方, 教室の嶋ら⁴⁾ が作製した抗 vWF モノクローナル抗体 5 種 (NMC-1~NMC-5) のうち RIPA を抑制した NMC-4 は各惹起物質による vWF 結合および AS-vWF の GP Ib 結合を完全に抑制したため, 著者らは NMC-4 のエピトープが GP Ib 結合ドメインの極めて近傍にあると考え, エピトープ解析を行いそのエピトープが 52/48 kDa フラグメント上にあること, そして高次構造に依存していることを確認した. Dr. Turdendum より供与された抗 vWF モノクローナル抗体 RFF-VIII RAG:1 はこの NMC-4 と同じく RIPA を抑制したため, 両抗体が全く同じエピトープを認識する抗体であるかを検討する目的で, ristocetin および botrocetin による vWF 結合の抑制効果を見たところ, ristocetin 依存性 vWF 結合を完全に抑制するも botrocetin 依存性 vWF 結合は部分的にしか抑制しなかった. 次いで, 惹起物質非存在下での両抗体の交叉反応性をみるため, 固相化した vWF に対する ¹²⁵I-NMC-4 の結合の競合的抑制を非標識 NMC-4, RFF-VIII RAG:1 さらに抗 52/48 kDa フラグメントモノクローナル抗体の RG-46, 52 K-8 について検討した. 非標識 NMC-4 は ¹²⁵I-NMC-4 の vWF への結合を完全に抑制したが, RFF VIII:RAG-1 は部分的に抑制するのみであった. RG-46, 52 K-8 はいずれも ristocetin 依存性 vWF 結合を抑制し, 各々のエピトープは 52/48 kDa フラグメントのアミノ酸残基 449-549, 674-728 に各々存在するがいずれの抗体も ¹²⁵I-NMC-4 の vWF 結合を抑制しなかった.

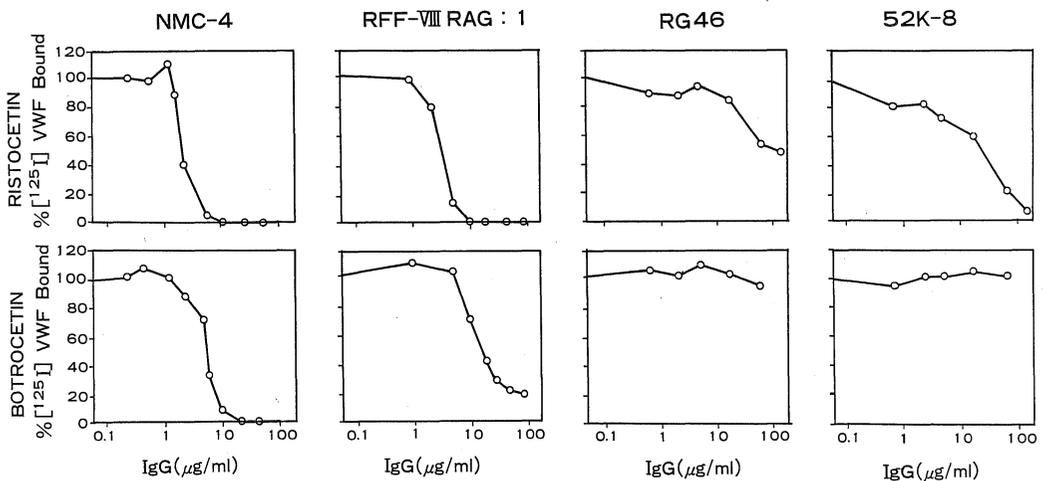


Fig. 1. Inhibitory effect of four anti-vWF monoclonal antibodies (NMC-4, RFF-VIII RAG-1, RG46, and 52K-8; from left to right) on ristocetin- (top) or botrocetin- (bottom) induced (¹²⁵I) vWF binding to platelet GP Ib.

今回使用した4種のモノクローナル抗体のうち RFF-VIII RAG:1 のエピトープは vWF 結合の抑制からみて、NMC-4 と同様に 52/48 kDa フラグメント上にあると考えられ、各々の抗体のエピトープを模式化すると Fig.

3 に示すようになる。同じ ristocetin 依存性 vWF 結合を抑制する抗体でも NMC-4 は、単に 52/48 kDa フラグメント上のアミノ酸配列を認識する抗体である RG-46 および 52 K-2 と交叉反応性を示さず、同じく vWF

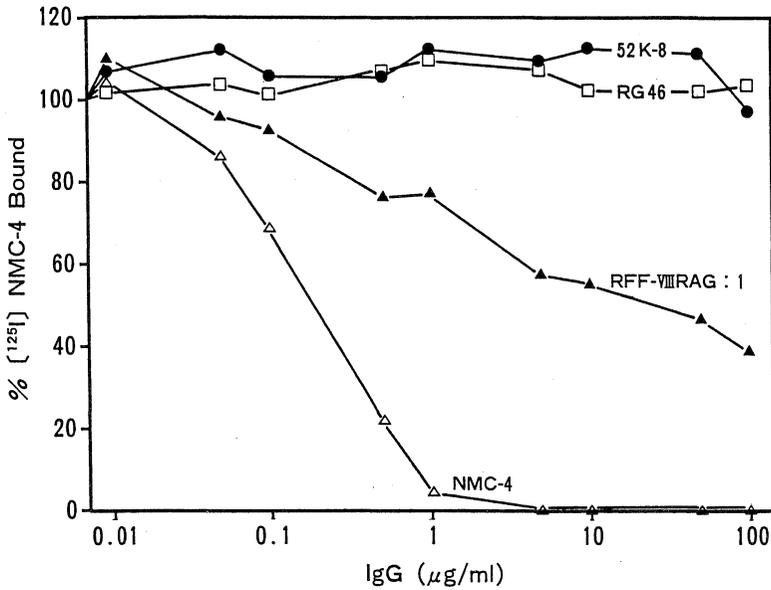


Fig. 2. Binding of ¹²⁵I NMC-4 (IgG) to solid-phase vWF. (¹²⁵I) NMC-4 (0.14 μg IgG/ml) was added to the vWF-coating plastic tubes with or without competing ligands (IgGs) from RG46, 52K-8, and RFF-VIII RAG:1. After incubation, the tubes were washed and the radioactivity bound to the solid-phase vWF was measured as described in the "Materials and Methods".

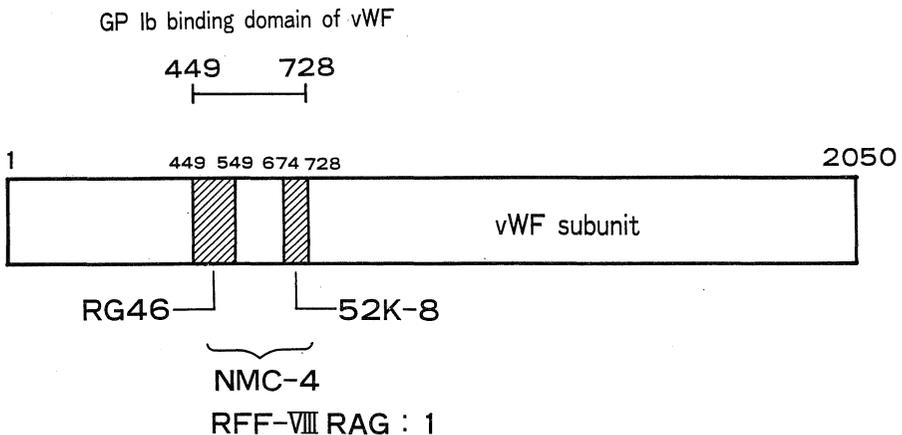


Fig. 3. Epitopes of the four anti-vWF monoclonal antibodies (NMC-4, RFF-VIII RAG:1, RG46, and 52K-8), which inhibited ristocetin-induced platelet agglutination and vWF binding to platelet GP Ib.

に対する抗体である RFF-VIII RAG:1 も部分的な交叉反応性をもつことから, ristocetin 依存性 vWF 結合を抑制するモノクローナル抗体のエピトープには多様性があると考えられる。また ristocetin および botrocetin により発現される vWF の GP Ib 結合抑制に差を認めることから, 各々の惹起物質により発現する vWF の GP Ib 結合部位は立体構造的に極めて近傍にあるも互いに異なると考えられた。

結 語

Ristocetin 血小板凝集を抑制する 4 種の抗 vWF モノクローナル抗体について比較検討した。

1. 抗 vWF モノクローナル抗体 RFF-VIII RAG:1 は ristocetin 依存性 vWF 結合を終濃度 $\sim 10 \mu\text{g IgG/ml}$ で完全に抑制するも, botrocetin 依存性 vWF 結合は $100 \mu\text{g IgG/ml}$ で 75% と部分的にのみ抑制を示した。

2. $^{125}\text{I-NMC-4}$ の固相化 vWF への結合は, 非標識 NMC-4 で完全に抑制されるも, RFF-VIII RAG:1 では部分的にしか抑制されなかった。RIPA を抑制するも botrocetin 依存性血小板凝集に対する阻害の全くない RG-46 および 52 K-8 は $^{125}\text{I-NMC-4}$ の結合を全く抑制しなかった。

以上より, ristocetin 依存性血小板凝集および vWF 結合を抑制する抗 vWF モノクローナル抗体のエピトープには多様性があると考えられる。

本研究は平成元年度文部省科学研究費重点領域研究「血柱性素因」の助成を受けた。

文 献

- 1) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. C., Roberts, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: von Willebrand factor; a reduced and alkylated 52/48kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* **261**: 381-385, 1986.
- 2) 新家 興: 抗 von Willebrand 因子 (vWF) モノクローナル抗体 NMC-4 による血小板膜糖蛋白 (GP) Ib 結合ドメインの解析. 奈医誌. 投稿中
- 3) 西尾健治: 蛇毒 botrocetin で発現される von Willebrand 因子活性に関する研究 I. Botrocetin cofactor 活性測定 of の検討. 奈医誌. **39**: 673-682, 1988.
- 4) 嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 螺良義彦, 吉岡章, 福井 弘: von Willebrand 因子 (vWF) に対するモノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性. 奈医誌. **36**: 662-669, 1985.
- 5) Steinbuch, M. and Audran, R.: The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **134**: 279-284, 1969.
- 6) Fraker, P. J. and Speck, J. C.: Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**: 849-857, 1978.