

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A )

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 98695

( P2002 - 98695A )

(43)公開日 平成14年4月5日 (2002.4.5)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* ( 参考 )
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	D
			N
A 6 1 P 9/00		A 6 1 P 9/00	
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L ( 全 6 数 )			

(21)出願番号 特願2000 - 287886(P2000 - 287886)

(22)出願日 平成12年9月22日(2000.9.22)

(71)出願人 000003034

東亜合成株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72)発明者 松尾 克彦

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会  
社つくば研究所内

(72)発明者 丸山 征郎

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘6丁目45 - 10

(72)発明者 井口 晶裕

北海道北見市美芳町5丁目1 - 20第二ナシオ  
マンション208号

(72)発明者 小林 邦彦

北海道札幌市厚別区厚別南5 - 15 - 10

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の検査方法および治療薬

(57)【要約】

【課題】本発明の課題は、造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の予測、確定診断および予後の経過観察に用いることができる検査方法、ならびに造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の治療薬を提供することである。

【解決手段】ヒト血清中の血管内皮細胞増殖因子 / 血管透過性因子 ( VEGF / VPF ) 濃度を測定することを特徴とする造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の検査方法および血管内皮細胞増殖因子 / 血管透過性因子 ( VEGF / VPF ) に対する抗体を含む製剤からなる造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症治療薬。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒト血清中の血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)濃度を測定することを特徴とする造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の検査方法。

【請求項2】血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)濃度を測定する方法が標識免疫測定法であることを特徴とする請求項1記載の造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の検査方法。

【請求項3】血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)濃度を測定する方法が、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)と特異的に反応する化合物を用いて行うことを特徴とする請求項1または請求項2に記載の造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の検査方法。

【請求項4】血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)と特異的に反応する化合物が、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)に結合する抗体または受容体である請求項3記載の造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の検査方法。

【請求項5】血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)に対する抗体を含む製剤からなる造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症治療薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、造血幹細胞移植(以下、SCTという)後の肝中心静脈閉塞症(以下、VODという)の検査方法およびSCT後のVOD治療薬に関するものであり、医療、製薬技術に属するものである。

## 【0002】

【従来の技術】SCTは白血病や再生不良性貧血などの造血器疾患、先天性免疫不全症や先天性代謝異常症などの先天性疾患、そして近年は固形腫瘍の大量化学療法や放射線療法の最大の副作用である骨髄抑制の救援療法としてその適応は広がってきている。SCTは、まず病的なhostの骨髄細胞を大量の抗癌剤や全身放射線照射などにより徹底的に攻撃した後に(移植前処置という)、donor(提供者)から健康な造血細胞を輸注することで行われる。また造血細胞を提供するdonorの種類によって自家移植(自分自身の骨髄あるいは末梢血幹細胞を予め凍結保存していたものを使用する)、同種移植(他人の造血細胞を用いる)に大別される。同種移植はさらにそのソースにより、血縁者および非血縁者の2種類に大別される。さらにそれぞれは骨髄細胞そのもの場合、末梢血幹細胞の場合、臍帯血の場合に区別される。

【0003】SCTにおいて、前処置、造血細胞輸注の後には、輸注した造血細胞が拒絶されることなく生着して健康な造血を回復し、しかも特に悪性疾患の場合は原疾患の再発がないことが目標である。造血細胞輸注後約1ヶ月以内は合併症の出現が集中する時期であり、原疾患

の再発を云々する前に移植自体が成功するかどうかは、この移植後早期の合併症をいかに乗り切ることが重要である。この移植後早期のSCTの3大合併症は、感染、急性GVHD(移植片対宿主病、同種移植の場合)、および肝中心静脈閉塞症(veno-occlusive disease、VOD)である。なお、その他の合併症としては、口腔や消化管の粘膜障害、出血、貧血、TMA(thrombotic microangiopathy)および腎障害などの臓器障害がある。移植後1ヶ月以降は、感染はもちろんのこと、慢性GVHDや白質脳症などの神経学的合併症、そして再発が予後およびQOL(quality of life)を規定する重要な因子となってくる。

【0004】VODは移植後30日以内(ほとんどが血球回復期(移植後7日~14日)に集中)の移植後早期に、臨床的に(1)原因不明の体重増加(>2%)あるいは腹水、(2)右季肋部痛あるいは肝腫大、(3)黄疸(TB 2mg/dl)の3主徴のうち2つ以上を認め、他の疾患が除外されることが臨床的診断基準として認められている。病理学的には肝中心静脈の閉塞と中心静脈域の肝細胞の壊死および鬱血を特徴とする。上記の臨床的3徴は肝中心静脈の閉塞に伴う鬱血症状と門脈圧亢進、それによる肝細胞障害を診断基準としている。移植後にVODを起こす危険因子として、前処置中からの感染症、ウイルス性肝炎、移植前の長い化学療法歴、肝障害例、ブスルファンを中心とした前処置、前処置中の肝障害、同種移植(特に非血縁者やHLA不一致donorからの移植)などが知られている。VODの臨床経過と一致して変動する凝固線溶マーカーとして、protein C(低下)、procollagen typeIII(上昇)、factorVII(低下)、トロンボモジュリン(上昇)、vWF(上昇)、AT-III(低下)、PAI-1(上昇)などが知られている。SCT後は臨床的にVODはなくてもこれら凝固異常は必ず生じており、SCT後は血管内皮細胞障害による凝固異常が生じ易い状態にあると言える。また、サイトカインとしてはTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカインが知られている。臨床的に粘膜障害が強い症例に多く、必ず発熱が先行し、CRPも強陽性になることから、感染が引き金になっているものと考えられている。

【0005】これらの危険因子や内皮細胞障害のマーカーが動くことから、VODは血管内皮細胞障害をベースとして発生する血栓性疾患と考えられてきた。しかしながら、移植前はこれらのマーカーが正常であることは珍しいことではなく、移植前にVODの発症を予測することは現在までできていない。発症予防としてヘパリンの持続投与やプロスタグランジンE1の投与、ウルソの投与、トレンタールの内服、AT-IIIの定期的補充などが行われてきているが、満足いく結果には程遠いのが現状である。近年活性化protein C製剤の治験も始まっている。治療としては利尿剤、AT-IIIやFFPの投与などの対症療法に加えてtissue plasminogen activator(t

PA)による線溶療法が奏効したとの報告がある。しかしながら、tPA治療は血小板数の低下している移植後早期ということもあって、頭蓋内出血などの重篤な副作用の報告も多く、しかも危険な副作用の割には奏効率が低く(30%程度といわれる)、tPA治療に踏み切れないのが現状である。

【0006】重症度はmild、moderate、severeに別けられているが、mildなもの多くは自然に回復するが、severeタイプでは90%以上の致死率である。VODを発症した段階で重症度がどこまで進むかについても予知が困難であり、severeになると治療抵抗性となるため、tPA治療しか有効な治療法がないにもかかわらず、tPA治療の副作用を考慮すると、その適応およびタイミングについてはマーカーなどによる基準がないため、手遅れとなることも少なくない。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、SCT後のVODの発症の予測、確定診断および予後の経過観察に用いることができる検査方法、ならびにSCT後のVODの治療薬を提供することである。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)濃度を測定することにより、前記課題が解決できるのではないかと鋭意検討した結果、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明はヒト血清中の血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)濃度を測定することを特徴とする造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の検査方法であり、さらに血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)に対する抗体を含む製剤からなる造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症治療薬である。

#### 【0009】

【発明の実施の形態】血管新生すなわち毛細血管内皮細胞の増殖、移動および組織への浸潤と言う現象は胎児の生長、創傷治癒、癌細胞の増殖などの生理的または病理的現象において重要な役割を果たしていることが知られている[Folkman、J.Cancer Res.46:467(1986)]。血管新生を誘導する因子としては、直接的に血管内皮細胞に作用する物質として塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor、bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子(acidic fibroblast growth factor、aFGF)、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor、VEGF/VPF)、血小板由来内皮細胞増殖因子(platelet-derived endothelial cell growth factor、PD-ECGF)などが知られ、また、間接的に血管内皮細胞に作用する物質として、transforming growth factor-(TGF-)、transforming growth factor-(TGF-)、angiogenin、tumor necrosis factor-(TNF-)などが知られている[Falkman、J.&S

hing、Y.、J.Biol.Chem.、267:10931(1992)]。

【0010】上記血管新生を誘導する因子の中でも、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF、以下単にVEGFという)に関しては、マウス、ラット、モルモット、ウシ及びヒトの正常又は腫瘍細胞株で分泌されており、また、組織別では脳、下垂体、腎臓、卵巣に存在することが明らかにされている[Ferrara、N.、et al. Endocrine Reviews 13:18(1992)]。また、VEGFは乳癌の血管新生と転移[Weider、N. et al. N.Engl.J.Med.324:1(1991)]や腎細胞癌の血管新生[医学のあゆみ、168:231(1994)]、あるいは網膜疾患における血管新生[Adams、A.P. et al.、Biochem.Biophys.Res.Comm.、193:631(1993)]に関与していることが報告されている。

【0011】ヒトVEGF遺伝子についてはそのcDNAがすでに単離されて塩基配列が決定され、アミノ酸配列も推定されている。この遺伝子からアミノ酸残基数の異なる4種類の蛋白(アミノ酸残基数が121個、165個、189個、206個の4種類)が作られ、それらの中で121個のアミノ酸残基数のもの(VEGF121)と165個のアミノ酸残基数のもの(VEGF165)が成熟蛋白であると言われている[Ferrara N.、et al.、Endocrine Reviews 13:18(1992)]。なお、VEGF121はVEGF165のカルボキシル末端の44個のアミノ酸が欠損したものであるが、VEGF121とVEGF165の間に、血管内皮細胞に対する作用の違いがあるかどうかは明らかにされてはいない。

【0012】本発明は、SCT後のヒト血清中のVEGF濃度を測定することを特徴とするものであり、SCT患者におけるVOD合併患者のVEGF濃度が健康人およびSCT患者であるが非VOD合併者と比較して有意に高値であるという関係に基づく、ヒト血清中のVEGF濃度を測定することによるSCT後のVODの検査方法である。ヒト血清中のVEGF濃度の測定方法としては特に制限はないが、標識免疫測定法による方法が好ましい。また、VEGFと特異的に反応する化合物を用いて行なうことも好ましく、例えば、このような化合物としてはVEGFに結合する抗体または受容体などが挙げられる。VEGFに対する抗体としては、モノクローナル抗体の他、ポリクローナル抗体、また、ヒト化など特殊抗体を用いることも可能であり、これらの抗体は適宜標識として用いられる。標識としては、例えば、赤血球、ラテックス、放射線同意元素、酵素、発光物質、蛍光物質、金属分子、金属ゲル、バクテリオファージなどを用いることが可能である。一方、抗体に代えて、VEGFに対する公知の受容体を用いることも可能である(Shibuya.M. et al.、Oncogene 5:519(1990)、Jaime.C. e

t al, Science, 255:989(1992)参照)。

【0013】また、本発明におけるSCT後のVOD治療薬の形態は、VEGFに対する抗体を含むものであれば特に限定はされず、経口または非経口で投与される。非経口投与として注射液等を用いる場合は、安定剤、緩衝剤、保存剤、等張化剤等の添加剤を含有することが好ましく、一方、経口投与の場合に用いる錠剤、カプセル剤等には、通常それらの製剤において一般的に使用されている結合剤、包含剤、賦形剤、滑沢剤等を含有していることが好ましい。以下、実施例により具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0014】

【実施例】(1)抗VEGFポリクローナル抗体の作製  
単離したヒトVEGF cDNA をグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白(GST-VEGF)として大腸菌で産生させ、得られた蛋白を抗原として、常法に従ってウサギ抗VEGFポリクローナル抗体を作製した。抗体価の上昇したウサギの血清を分離し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによりウサギ抗VEGFポリクローナル抗体のIgG画分を得た。

【0015】(2)抗VEGFポリクローナル抗体の酵素標識

IgG画分の一部をペプシンで消化してF(ab')<sub>2</sub>を調製後、ヒンジ法によりペルオキシダーゼ(西洋わさび)と結合させ、ペルオキシダーゼ標識したウサギ抗VEGFポリクローナル抗体を得た。

【0016】(3)血清中VEGF濃度の測定方法

血清中VEGF濃度を以下に示すように、酵素免疫測定法により測定した。抗VEGFポリクローナル抗体(5 μg/ml)を100 μl/wellずつ96穴プレートにまき、4で一晚放置した後、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、PBSで4回洗浄した。1%BSA、0.1M塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム、0.1M炭酸ナトリウム緩衝液pH6.5でブロッキング(37で4時間)した後、1%BSA、0.4%ゲラチン、1mM塩化マグネシウム、20mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウム、0.1M塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7.0(検体希釈液)で3希釈した血清あるいは同検体希釈液に溶解した標準VEGFを入れ室温で1時間放置した。0.1%BSA、PBSで6回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗VEGFポリクローナル抗体を100 μl/wellずつ入れ室温で1時間反応させた。再度、0.1%BSA、PBSで8回洗浄後、0.125%(w/v)オルトフェニレンジアミン、0.015%過酸化水素、0.2Mトリス(ヒドロキシメチル(アミノメタン)-クエン酸緩衝液(pH5.2))を100 μl/wellずつ入れ、室温で30分間反応させた。2N硫酸を100 μl/wellずつ入れ、反応を停止

\*させた後、650nmの吸光度に対する490nmの吸光度をプレートリーダー(M-Vmax, Molecular Devices社製)で測定した。

【0017】(4)SCT患者におけるVOD合併患者とVOD非合併患者の血清中VEGF濃度を、上記の方法で測定した健常人20例、SCT患者におけるVOD合併患者6例とVOD非合併患者40例の血清中VEGF濃度を図1に示した。それぞれの症例における平均値および標準偏差は、健常人で、それぞれ、52.6 pg/ml、14.8 pg/ml、VOD合併患者では、それぞれ、772.1 pg/ml、1213.9 pg/ml、VOD非合併患者では、それぞれ、12.7 pg/ml、42.6 pg/mlであり、VOD合併患者における血清中VEGF濃度は、健常人およびVOD非合併患者に比べ有意(p<0.001)に高値を示した。

【0018】(5)SCT後のVOD合併患者6例の血清中VEGF測定結果

上記の方法で測定したSCTにおけるVOD患者6例の臨床経過と血清中VEGF濃度の推移を図2~7に示す。SCT患者6例の全てにおいて、SCT後のVEGF濃度が有意に高値となった。また、SCT後においてはVODの臨床経過(腹水貯留; ascites、黄疸; jaundice)と一致してVEGF濃度が高値となった。

【0019】以上の結果から、SCTにおいて、以下の結果が示された。

(1)血清中のVEGF濃度は移植前のVODの発症予測に使用できる。

(2)血清中のVEGFは移植後のVODの診断および治療の臨床的マーカーとなる。

(1)抗体などによりVEGFの量を抑制することにより移植後のVOD治療薬となる。

【0020】

【発明の効果】本発明によれば、ヒト血清中のVEGF濃度を測定することにより、造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症を予測することが可能であり、本発明は臨床診断や治療法を決定するための検査方法として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】健常人および造血幹細胞移植後の患者の血清中VEGF濃度を示す。

【図2】造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症患者の臨床経過と血清中VEGF濃度の推移を示す。

【図3】造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症患者の臨床経過と血清中VEGF濃度の推移を示す。

【図4】造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症患者の臨床経過と血清中VEGF濃度の推移を示す。

【図5】造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症患者の臨床経過と血清中VEGF濃度の推移を示す。

【図6】造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症患者の臨

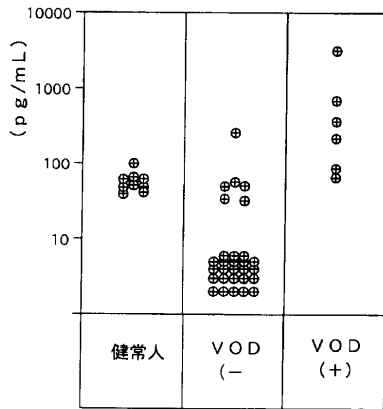
床経過と血清中VEGF濃度の推移を示す。

\*床経過と血清中VEGF濃度の推移を示す。

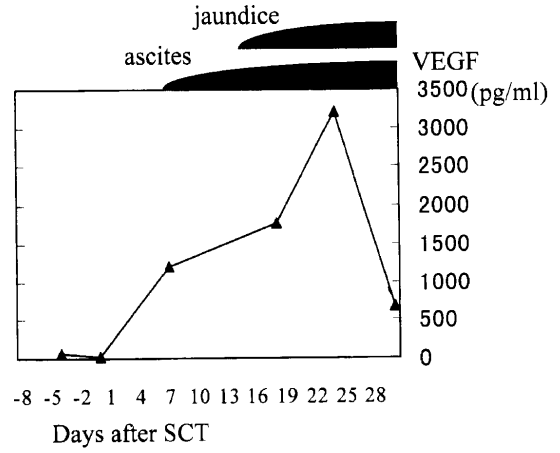
【図7】造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症患者の臨\*

【図1】

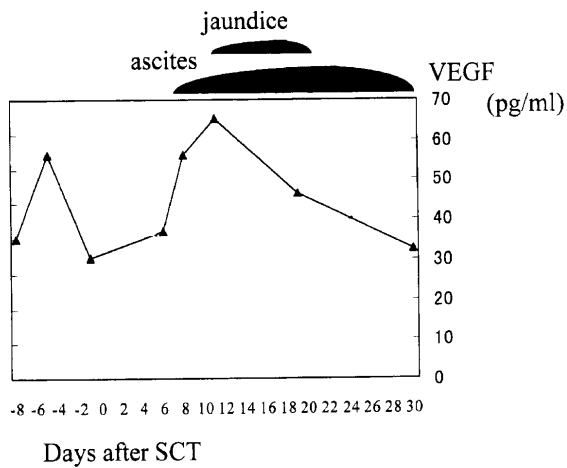
図1. 健常人および造血幹細胞移植後患者の血清中VEGF値



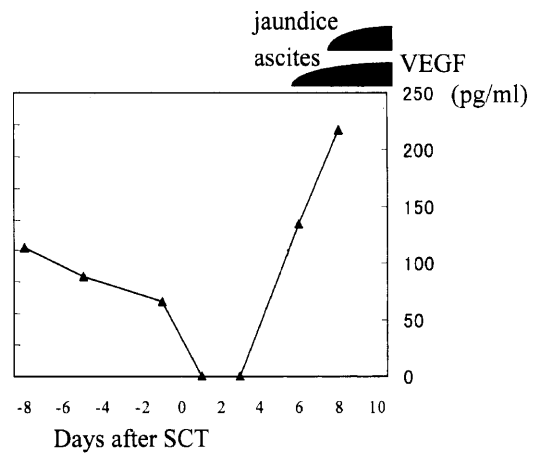
【図2】



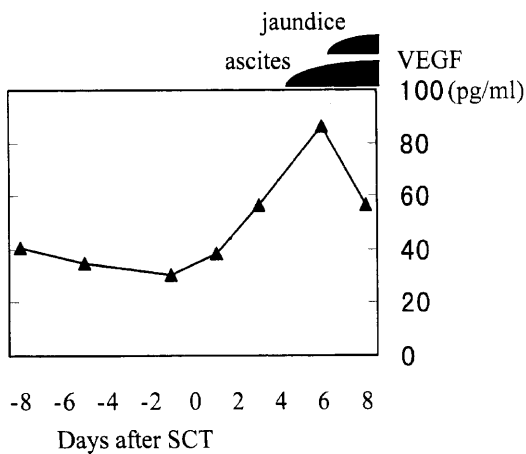
【図3】



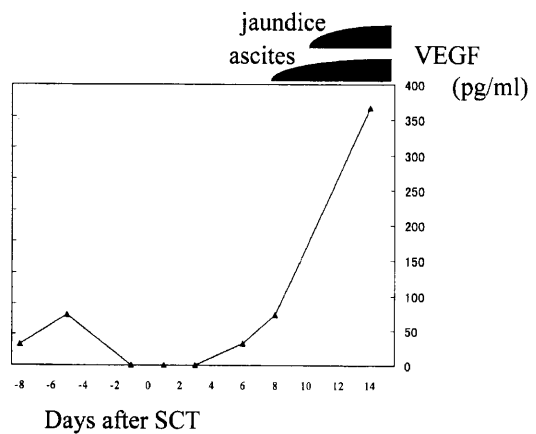
【図4】



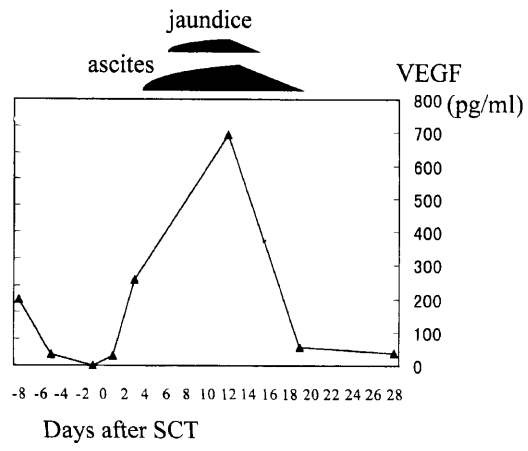
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4C085 AA13 BB11 CC21 DD22 DD32  
EE01

专利名称(译)	造血干细胞移植后肝脏中心静脉闭塞症的方法和治疗药物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002098695A</a>	公开(公告)日	2002-04-05
申请号	JP2000287886	申请日	2000-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社		
申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社		
[标]发明人	松尾克彦 丸山征郎 井口晶裕 小林邦彦		
发明人	松尾 克彦 丸山 征郎 井口 晶裕 小林 邦彦		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P9/00 G01N33/566		
FI分类号	G01N33/53.D A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/00 G01N33/566		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD22 4C085/DD32 4C085/EE01		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种检查方法，该方法可用于估计和决定患者肝脏中央静脉的闭塞，并观察造血干细胞植入后患者的恢复进展，以及提供用于造血干细胞植入后中央静脉闭塞的药物。解决方案：在检查方法中，测量人血清中含有的血管内皮细胞生长因子/血管通透性增加因子(VEGF / VPF) 的浓度。该药物由含有VEGF / VPF抗体的药物组成。

【图3】

