

血栓性血小板減少性紫斑病の分子病態解析 TMA 患者における血漿 ADAMTS13 抗原解析

分担研究者： 藤村吉博 奈良県立医科大学輸血部 教授

研究要旨

TTP/HUS 患者において、血漿中の ADAMTS13 活性や同インヒビターについては多数の報告があるが、同抗原の報告は全くない。本年度、私は ADAMTS13 抗原の解析のため、3 種類のマウスモノクローナル抗体を作成した。これらの抗体は、現在までに報告されているものとは異なり、血漿 ADAMTS13 抗原を Western blotting(WB)にて直接検出可能であった。これらの抗体を用いると正常血漿中の ADAMTS13 抗原は、非還元下 WB で 190/180kDa のダブルバンドとして検出されるが、180kDa のバンドは還元下 WB では検出されなかった。また、これらの抗体を用いて、先天性および後天性 TTP の多数例における血漿 ADAMTS13 抗原解析を行っている。

1. 研究目的

TTP や HUS などの TMA 患者での ADAMTS13 活性や同インヒビター測定については多くの報告があるが、TMA 患者における ADAMTS13 抗原の解析については、全く報告がない。

私は、recombinant (r) ADAMTS13 を用いて、モノクローナル抗体(mAb)を 3 種類作成した。これらを用いて ADAMTS13 抗原を測定する ELISA 法を確立したが、酵素活性が 3%未満に著減している TTP 症例でも、ADAMTS13 抗原量は必ずしも著減しておらず、抗原量と活性は解離が認められた。そこで、Western blotting (WB) 法を用いて ADAMTS13 抗原

の定性的解析を行った。

2. 研究方法（倫理面への配慮）

1. r ADAMTS13 は HeLa 細胞を用いて発現し、抗 Flag mAb 固相化カラムを用いて、ADAMTS13 抗原を精製した。この抗原をマウスに免疫し、常法に従ってマウス mAb を作成した。

2. mAb の認識部位を決定するため、全長の ADAMTS13(WT)から C 末端のドメインを順に欠損した変異体を 12 種類作成し、HeLa 細胞で発現した。

3. mAb の ADAMTS13 活性阻害は、正常血漿 (NP) に種々の IgG 濃度

のモノクローナル抗体を添加し、37°C 2 時間付置後、AFAMTS13 残存活性を測定した。

4. 患者血漿中の ADAMTS13 抗原解析の WB は、非還元条件は A10 で、還元条件は WH 2-11-1 を使用して行った。

3. 研究結果

1. mAb は、奈良医大で 2 種類 (A10 と C7) 作成し、WH2-11-1 は化学及血清療法研究所 (副島見事博士) より供与を受けた。それぞれの mAb の認識部位は、A10: disintegrin(D) ドメイン、C7: thrombospondin type 1(T) の 7/8 ドメイン、WH2-11-1:T4 ドメインであった。また、サブクラスは、A10: IgG2b- κ 、C7: IgG1- κ 、WH2-11-1: IgG1- κ であった。(図 1 A,B)
2. これらの mAb の ADAMTS13 活性阻害は、A10 は final 50 ug/ml で完全阻害を示し、C7 は final 100 ug/ml でも部分阻害しか示さなかった。WH2-11-1 は全く阻害活性を示さなかった。(図 1C)
3. これらの mAb を用いて、血漿中の ADAMTS13 を WB で検出すると、非還元条件下では、190/180kDa のダブルバンドが検出可能であった。還元条件下では、A10、C7 とは反応せず、WH2-11-1 のみ 200kDa のバンドが検出された。(図 2A)
4. 正常血漿中の 190/180kDa のダブルバンドを Superose 6 カラムで分離した。図 2B に示すように、Fraction No 30 前後に ADAMTS13 抗原が認められた。非還元条件下では、No 29 では 190kDa の 1 本バンドのみであったが、その後 180kDa のバンドが認められるようになり、No36 では 180kDa のバンドのみが認められた。これらの Fraction を還元条件下で WB すると、No 29-33 までは 200kDa のバンドが認められたが、No 36 ではバンドが認められなかった。すなわち、190kDa のバンドは還元すると 200kDa となり、180kDa は還元すると検出できなかった。
5. Upshaw-Schulman 症候群 (USS) は、遺伝子解析を終了している 9 家系 9 症例について患者および家族の WB を行った。非還元条件下では、両親やヘテロ接合体である同胞では、ADAMTS13 は正常血漿よりやや薄くぼやけたバンドであり、患者では極めて薄いバンドは存在した。還元条件下では、両親、同胞の ADAMTS13 は、はっきりとしたバンドとなり、患者においてほとんどバン

ドは認めなくなった。

6. 後天性、特発性 TTP では、ADAMTS13 活性が著減している症例でも、非還元条件下 WB では ADAMTS13 抗原が弱く観察されることが多く、還元条件下ではほぼ消失するものからはっきり観察される症例まで多様であった。

4. 考察

血漿中の ADAMTS13 抗原の解析を行うために、我々は3種類のマウス mAb を作成した。これらの mAb は、現在までに報告されている mAb とは異なり、血漿中の ADAMTS13 を検出することが可能であった。このうち、WH2-11-1 は還元条件下においても、ADAMTS13 抗原と反応した。非還元条件下の WB では、ADAMTS13 抗原は 190/180kDa のダブルバンドとして検出されるために、この2つのバンドを分離し、検討した。190kDa のバンドは還元後には 200kDa バンドとして検出されるが、180kDa のバンドは還元後に認められなかった。このことより、180kDa のバンドは、何らかの proteolytic な修飾を受けているのではないかと予想している。また、少数例ながら、患者血漿の ADAMTS13 抗原を WB で解析した。活性が著減している症例でも

抗原は認められることがあり、今後の検討課題である。

5. 結論

血漿中の ADAMTS13 抗原を WB で検出できる mAb を作成したので、今後患者血漿中の ADAMTS13 抗原の動態について解析が可能となった。

6. 健康危険情報

なし

7. 研究発表 (発表誌名、巻号、頁、発行年等)

論文発表

1. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. Submitted, 2005.
2. Kosugi S, Matsumoto M, Ohtani Y, Take H, Fujimura Y, Kuyama J. Rituximab provided long-term remission in a case with refractory relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* (in press), 2005.
3. Fujisaki K, Matsutani K, Yoshimitsu T, Nakanishi K, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Fujimura Y, Takeda K, Hirakata H, Iida M. Thrombotic

- thrombocytopenic purpura associated with polyarthritis nodosa: demonstration of the inhibitor against von Willebrand factor-cleaving protease. **Clinical Nephrology** (in press), 2005.
4. Fujimura Y. Down-regulation of ADAMTS13 activity by serine proteases. In: Inside Blood. **Blood (Review)** 105: 911-912, 2005.
 5. Sugimoto T, Saigo K, Kanenda Y, Manabe N, Narita H, Wakuya J, Imoto S, Murashima T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nishimura R, Koizumi T, Kumagai S. Von Willebrand factor-cleaving protease activity remains at the intermediate level in thrombotic thrombocytopenic purpura. A CML case treated with interferon-alpha. **Acta Haematologica** (in press), 2005.
 6. Uemura M, Ishikawa M, Matsuyama T, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai S, Toyohara M, Yamazaki M, Yoshiji H, Yamao J, Matsumoto M, Ishizashi H, Fujimura Y, Fukui H. Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. **Alcohol Clin Exp Res** (in press), 2005.
 7. Hatakeyama K, Hao H, Imamura T, Ishikawa T, Shibata Y, Fujimura Y, Eto T, Ogawa H, Asada Y. Decreased CD39 expression in coronary atherosclerotic lesions is implicated in plaque instability and thrombus formation. **Am J Cardiol** 95: 632-635, 2005.
 8. Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y. Adenovirus-mediated transfer of human placental ecto-ATP diphosphohydrolase I to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus formation in vivo. **Circulation** 111: 808-815, 2005.
 9. Yagita M, Uemura M, Yamahara H, Kitano T, Kunitomi A, Konaka Y, Nakamura T, Matsumoto M, Ishizashi H, Fukui H, Fujimura Y. Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. **J Hepatology** 42: 420-421, 2005.
 10. Kawahara M, Kanno M, Matsumoto M, Nanno H, Danno D, Murata K, Nakamura S, Fujimura Y, Ueno S. Diffuse neurodeficits in intravascular lymphomatosis with ADAMTS13 inhibitor. **Neurology** 63: 1731-1733, 2004.

11. Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. **Blood** 104: 2081-2083, 2004.
12. Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Miura M, Hayashi S, Fujii Y, Iwai A, Ito E, Tsuji Y, Takada-Shitaka M, Iwadate M, Umeyama H, Yagi H, Ishizashi H, Banno F, Nakagaki T, Miyata T, Fujimura Y. Molecular characterization of *ADAMTS13* gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. **Blood** 103: 1305-1310, 2004.
13. Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Wada H, Fujimura Y. The Japanese experience with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. **Semin Hematol** 41: 68-74, 2004.
14. Kokame K, Miyata T: Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. **Semin Hematol** 41:34-40, 2004.
15. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. **Blood** 103: 607-612, 2004.
16. 森美貴、和田英夫、珠玖洋、八木秀男、松本雅則、藤村吉博. TMA症例におけるADAMTS13活性と血管内皮細胞マーカーの検討。臨床血液 45 : 378-382, 2004
17. 植村正人、石川昌利、松山友美、田村信宏、藤本正男、今津博雄、小寫秀之、櫻井伸也、石井禎暢、浪崎正、豊原眞久、山崎正晴、吉治仁志、山尾純一、福井博、松本雅則、八木秀男、藤村吉博、石指宏通. アルコール性肝炎におけるvon Willebrand 因子(vWF)特異的切断酵素(ADAMTS13)の動態. アルコールと医学生物学 24. 132-136. 2004

総説

(著書・分担)

1. 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP). 血液疾患診療の EBM. pp201-206, 2004.
2. 松本雅則、藤村吉博. Ecto-ATP diphosphohydrolase. 血小板生物学. pp333-340, 2004.
3. 八木秀男、藤村吉博. von Willebrand 因子. 血小板生物学. pp341-348, 2004.
4. 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病と溶血性尿毒症症候群. 血液の

辞典. pp369-371, 2004.

(総説)

1. 松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病の病因. 内科診療 Q&A 38:158-159, 2004
 2. 松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病の診断と治療. 内科診療 Q&A 38:160-161, 2004
 3. 八木秀男、藤村吉博. TTP の発症機序と病態. 血液腫瘍科 49:128-134, 2004.
 4. 藤村吉博. TTP/HUS 患者への血漿交換療法の適応と血小板輸血の禁忌. 奈良県医師会透析部会誌. 9: 13-22, 2004.
 5. 藤村吉博. TTP と HUS. 医学のあゆみ (別冊) . pp109-112, 2004.
 6. 藤村吉博. VWF 切断酵素 (ADAMTS13) の動態解析による TTP/HUS 診断法の進歩. 日本内科学会雑誌. 93:451-459, 2004.
 7. 加藤誠司、藤村吉博. VWF 切断酵素 (von Willebrand factor-cleaving protease: VWF-CP). 血液と循環. 12:188-192, 2004.
 8. 藤村吉博. TTP/ADAMTS13 の動態解析. Hematological Malignancy Review 30:1-4, 2005.
- ### 学会発表
1. 藤村吉博. TMA での VWF 切断酵素 (ADAMTS13) 解析 (特別講演). 第 2 回千葉造血器腫瘍研究会 (於 千葉京成ホテルミラマーレ、2004 年 5 月 28 日).
 2. 植村正人、松本雅則、石指宏通、田村信宏、八木秀男、松山友美、藤本正男、今津博雄、小寫秀之、櫻井伸也、石井禎暢、石川昌利、藤村吉博、福井博. アルコール肝炎における von Willebrand 因子 (VWF) 特異的切断酵素 (ADAMTS13) の動態. 第 12 回肝病態生理研究会. (於 浦安・ヒルトン東急ベイ 2004 年 6 月 5 日)
 3. 松本雅則、藤村吉博、石指宏通、秋山暢. 血小板減少と貧血を認めた妊婦の 1 例. 第 47 回日本臨床検査医学会近畿支部総会 (プレナリーセッション) (於 奈良県立医科大学大講堂 2004 年 6 月 12 日).
 4. 藤村吉博. ADAMTS13 から見た TTP/HUS (特別講演). 第 5 回腎とバイオロジー研究会 (於: 東京・東海大学校友会館 2004 年 7 月 17 日).
 5. 松本雅則、八木秀男、石指宏通、神野正敏、和田英夫、相原守夫、西浦哲雄、井原彰裕、中村忍、藤村吉博. Intravascular lymphoma 5 症例における ADAMTS13 活性とそのインヒビター. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液

- 学会総会 (ワークショップ) (於 国立京都国際会館 2004年9月17日)
6. 奥田慎也、名取一彦、和泉春香、長瀬大輔、藤本吉紀、菅澤康幸、荒井ちあき、加藤元浩、梅田正法、石指宏通、松本雅則、藤村吉博、倉石安庸. 妊娠時の TTP 発症を契機に Upshaw-Schulman 症候群の診断に至った姉妹例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (於 京都・国立京都国際会館 2004年9月17日)
 7. 長井一浩、大曲勝久、田口潤、宮崎泰司、河野茂、上平憲、藤村吉博、朝長万左男. 慢性に経過する血栓性血小板減少性紫斑病に原発性硬化性胆管炎を合併した 1 症例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (於 国立京都国際会館 2004年9月17日)
 8. 杉尾康浩、長岡克弥、牧野茂義、上田章、松本雅則、藤村吉博. 免疫抑制療法と長期の血漿交換療法にて救命しえた血栓性血小板減少性紫斑病の一例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (於 国立京都国際会館 2004年9月17日)
 9. 藤村吉博. TTP/HUS の病態と治療. 第 34 回日本腎臓学会西部学術大会 (教育講演) (於 岡山コンベンションセンター 2004年10月2日)
 10. 藤村吉博. TTP と VWF (特別講演). 第 8 回岡山血液セミナー (特別講演) (於 ホテルグランビア岡山 2004年10月9日).
 11. 植村正人、松本雅則、石指宏通、松山友美、石川昌利、八木秀男、櫻井伸也、浪崎正、藤本正男、小寫秀之、石井禎暢、藤村吉博、福井博. 急性肝疾患における von Willebrand 因子特異的切断酵素の動態. 第 46 回日本消化器病学会大会. (於 福岡国際会議場 2004年10月21日)
 12. 小亀浩市、宮田敏行、松本雅則、藤村吉博. フォンビルブランド因子切断酵素 ADAMTS13 の活性測定. 第 48 回日本輸血学会近畿支部総会 (シンポジウム) (於 京都大学医学部芝蘭会館, 2004年11月13日)
 13. 小亀浩市、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. 消光性蛍光基質を用いた血漿 ADAMTS13 活性の測定. 第 27 回日本血栓止血学会学術総会. (於 奈良県新公会堂, 2004年11月19日)
 14. 石西綾美、八木秀男、西村仁美、松本雅則、藤村吉博、石指宏通、岩本顕聰、森俊雄、副島見事、中垣智弘. I. 抗 ADAMTS13 マウス

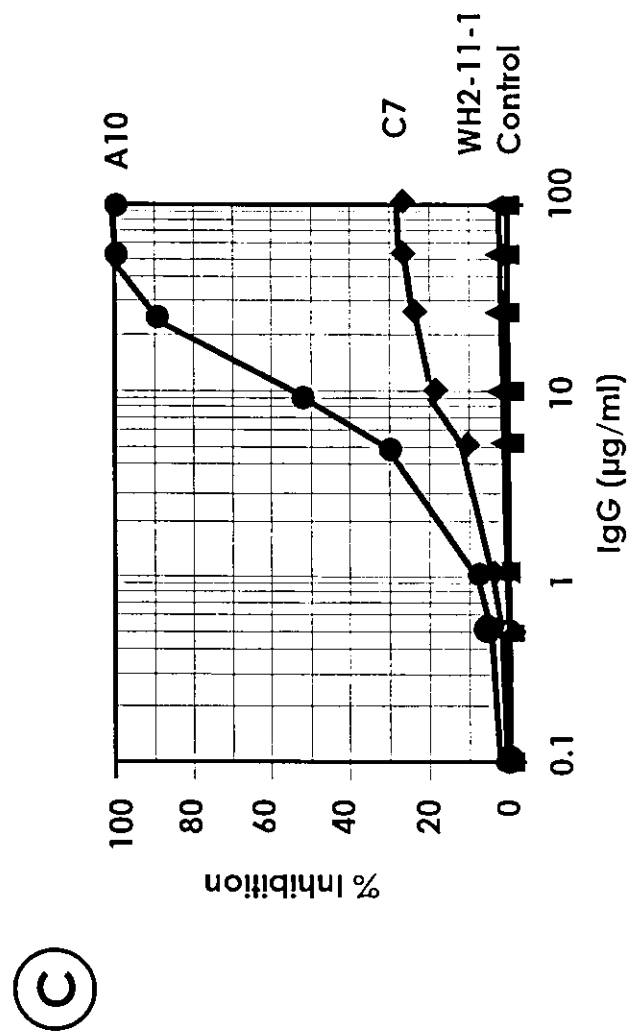
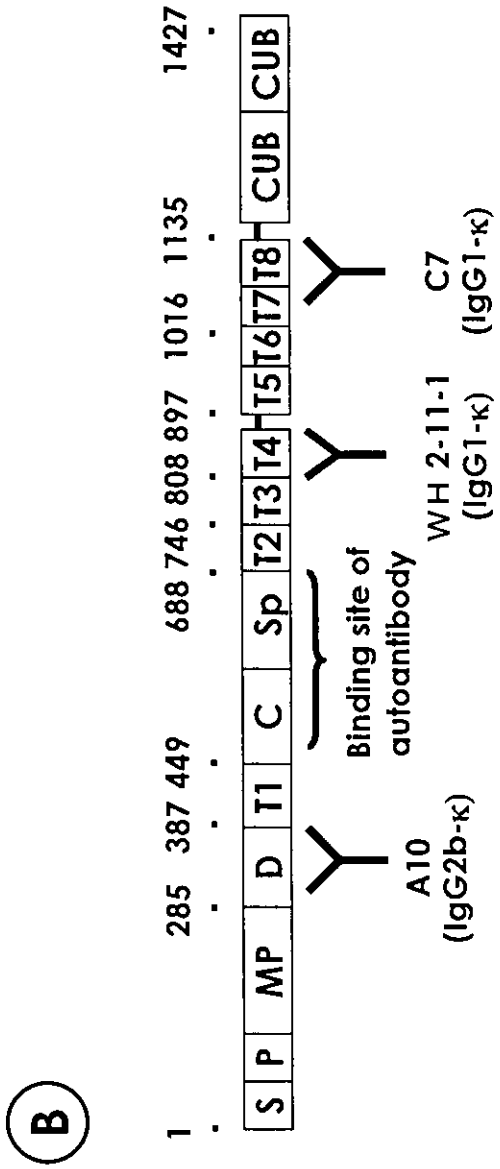
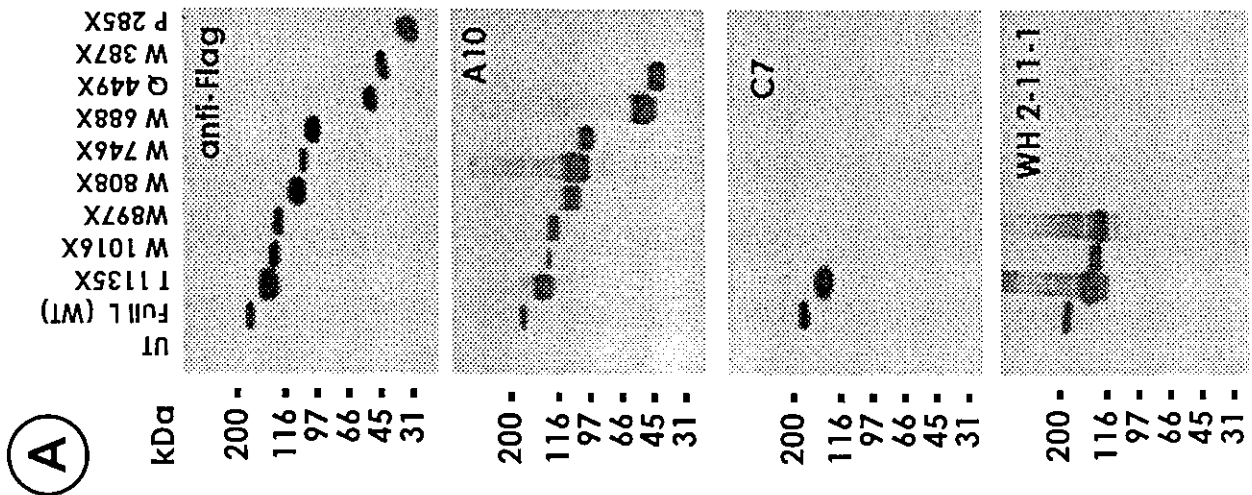
モノクローナル抗体の作成とその性状. 第 27 回日本血栓止血学会学術総会. (於 奈良県新公会堂, 2004 年 11 月 19 日)

15. 松本雅則、八木秀男、石西綾美、西村仁美、藤村吉博、石指宏通、岩本顕聰、森俊雄、副島見事、中垣智弘. II. TTP 患者における血漿 ADAMTS13 抗原解析. 第 27 回日本血栓止血学会学術総会. (於 奈良県新公会堂, 2004 年 11 月 19 日)
16. 古小路英二、松本雅則、山下篤、八木秀男、櫻井嘉彦、丸塚浩助、畠山金太、藤村吉博、浅田祐士郎. 胎盤由来 ecto-ATP Diphosphohydrolase I は傷害動脈壁における血栓形成を抑制する. 第 27 回日本血栓止血学会学術総会. (於 奈良県新公会堂, 2004 年 11 月 19 日)
17. 藤村吉博. 多彩な基礎疾患に合併する TMA の病態解析の進歩 第 27 回日本血栓止血学会学術総会 (ランチョンセミナー). (於: 奈良・奈良県新公会堂、2004 年 11 月 19 日)
18. 藤村吉博. VWF 切断酵素 (ADAMTS13) と血栓症 第 12 回東海肝移植研究会 (特別講演. (於 名古屋・栄ガスビル、2004 年 11 月 19 日)
19. 藤村吉博. ADAMTS13 を中心と

した血栓性微小血管障害症(TMA)の病態解析 第 6 回北陸血管病変研究会 (特別講演). (於 ホテル日航金沢, 2005 年 2 月 24 日)

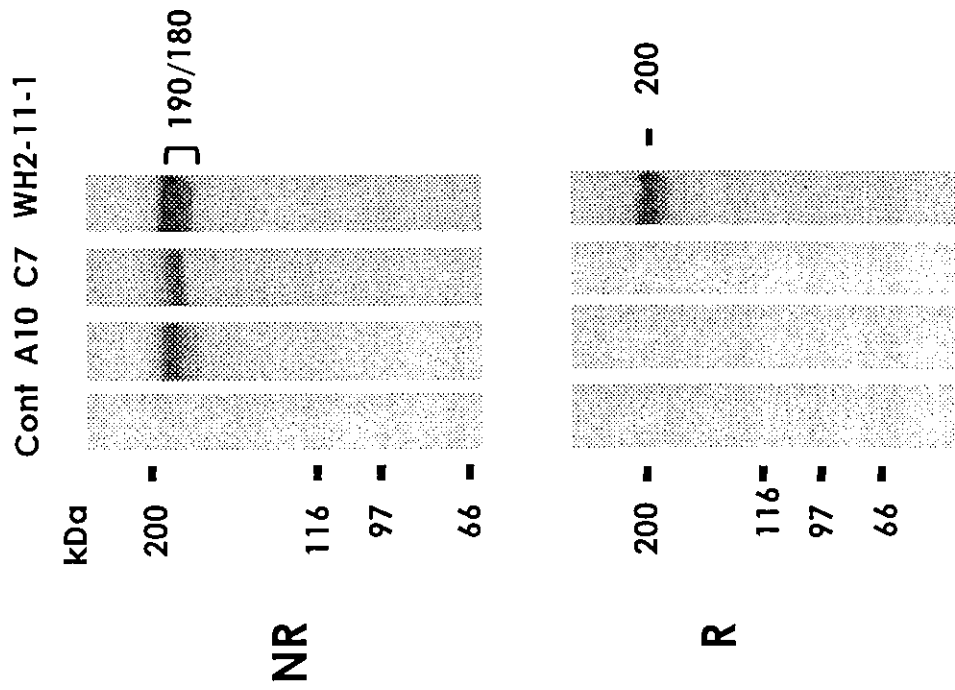
8. 知的財産権の出願・登録 (予定を含む)

1. 抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体
出願人: 株式会社日本臨床医学検査研究所、藤村吉博、松本雅則、森俊雄
発明人: 藤村吉博、松本雅則、森俊雄
2004 年 10 月 19 日国内出願
2. ADAMTS13 活性検定抗体及び活性検定方法
出願人: 株式会社日本臨床医学検査研究所
発明人: 加藤誠司、日裏久英、松本雅則、藤村吉博
2005 年 2 月 14 日国内出願

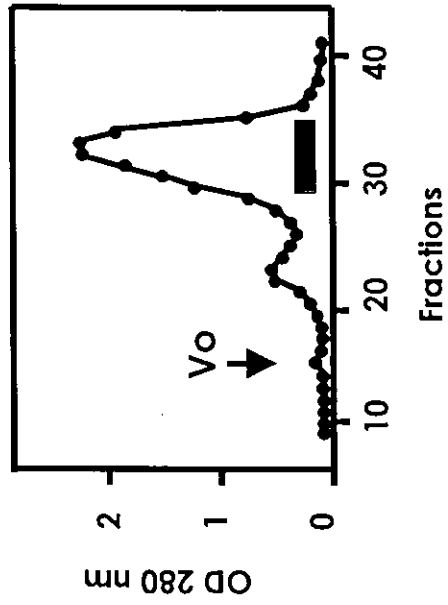


1

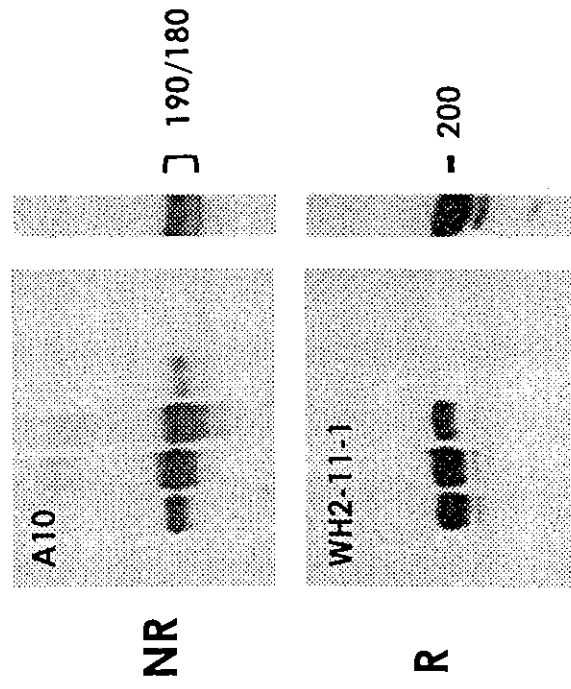
A



B



Fr. 27 29 31 33 36 38 40 NP



分担研究報告書

ADAMTS13 と血栓症

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部内科・講師

研究要旨 HUS/TTP の発症には von Willebrand factor 切断酵素 (VWF-CP : ADAMTS-13) の活性低下が関与することが知られている。しかし本酵素の軽度の低下が多因子疾患である動脈血栓症の原因の一つとなるか否かに関しては不明である。本研究では ADAMTS13 遺伝子多型や ADAMTS13 活性と、その基質である VWF や血栓形成能、動脈硬化との関連を、健常人 (検診受診者) を対象に検討した。その結果、ADAMTS13 遺伝子多型 (P475S) は健常人において血中 ADAMTS13 活性と強く関連することが明らかとなった。しかし ADAMTS13 活性と血中 VWF (抗原量、活性) に有意な相関はなく、また ADAMTS13 遺伝子多型と血中 VWF (抗原量、活性) にも有意な相関はなかった。一方、血中 VWF 値と *in vitro* 血栓形成能の指標のひとつである GTT 閉塞時間の間には弱い負の相関がみられ、また血中 VWF 値と動脈硬化の指標の一つとされる脈派伝導速度の間に正相関が示された。従って ADAMTS13 の正常範囲内での変動は血中 VWF 量と関連しないが、VWF 量は易血栓性と関連する可能性が示された。

A. 研究目的

Von Willebrand factor 切断酵素 (VWF-CP : ADAMTS-13) の著明な活性低下は HUS/TTP の発症に関与することが知られている。一方、本酵素の軽度の低下が血栓症の発症に及ぼす影響については必ずしも明確ではない。軽度の低下は各種後天的要因や疾患のみならず、

先天的な要因、特に ADAMTS13 遺伝子多型によっても起こりうる。VWF と血栓性疾患の関連に関しては、血中 VWF の上昇は心筋梗塞の危険因子あるいは予後不良因子であり、動物実験で VWF に対するモノクローナル抗体が動脈血栓の発症を抑えたとの報告もあるが、VWF 活性を生理的に制御する筈の

ADAMTS13と、体内でのVWF活性や血小板機能との関連はこれまで十分に検討されていなかった。これまでの国立循環器病センターや我々の研究で、頻度の高い一塩基置換が日本人で数種類同定されており、これらの多型が血栓性疾患に及ぼすインパクトを見極める事は日本人における血栓症の原因を探る上で甚だ重要である。

ここでは、(1) ADAMTS13 遺伝子多型 vs ADAMTS13 活性、(2) ADAMTS13 活性 vs 血中 VWF (抗原量、活性)、(3) ADAMTS13 遺伝子多型 vs 血中 VWF (抗原量、活性)、(4) 血中 VWF vs ずり依存性血小板機能、など in vivo における関連について健常人検体を用いて検討した。

B. 研究方法

某企業健診受診者約 300 名を対象とした。クエン酸加全血から白血球 DNA および血漿を分離した。また採血直後の抗凝固剤未添加全血を用いて血栓形成能評価法のひとつである Gorog Thrombosis Test (GTT, Montrose Diagnostics, UK) による閉塞時間を測定した。同時に足関節上腕血圧比 (ABI)、脈波伝播速度の他、フォンビルブランド因子抗原量 (VWF:Ag)、フォンビルブランド因子活性 (VWF:RCo) などを含む血液凝固系の各因子を測定した。ADAMTS13 活性測定は Furlan らの方法に準じ、奈良県立医科大学で行われた。P475S は in vitro 研究で活性を低下さ

せると報告されているため、475 に関して wild type (PP) とヘテロ接合体 (PS) がほぼ同数となるよう対象者を選択し、これに一例のホモ接合体 (SS) を追加して ADAMTS13 活性を測定した。VWF 活性と抗原については全例を対象に測定した。

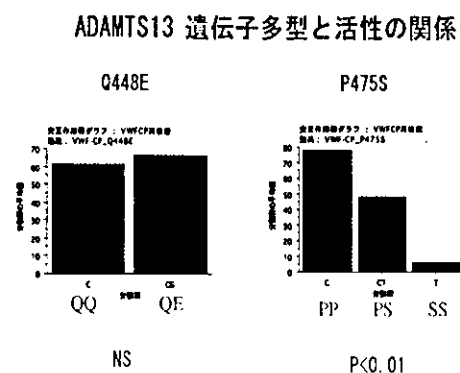
(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム遺伝子解析研究であるため、合同指針の則りまず施設の倫理委員会で承認を受けた。すべての検体提供者から十分な説明の後インフォームドコンセントをえた。検体はすべて匿名化した後、解析された。

C. 研究結果

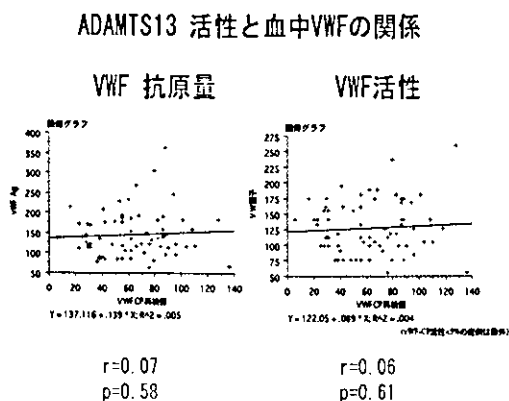
ADAMTS13 遺伝子解析により、既報の遺伝多型 (Q448E, P475S) が同定された。多型出現頻度は既報と同様であった。Q448E 多型は活性に影響を与えなかったが、P475S はアリル数依存的に活性に影響を与えた (図 1)。

図 1



ADAMTS13 活性と血中 VWF (抗原量、活性) の間に有意な相関は見られなかった (図2)。

図2



同様に ADAMTS13 遺伝子多型 (Q448E, P475S) と血中 VWF (抗原量、活性) の間に有意な関連は見られなかった (図3、図4)。

図3

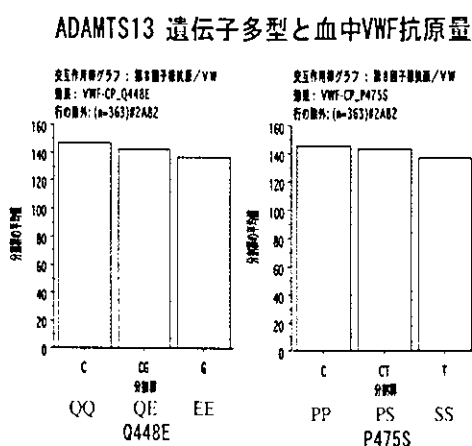
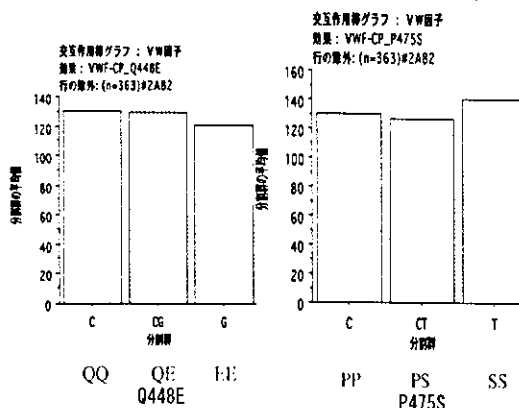


図4

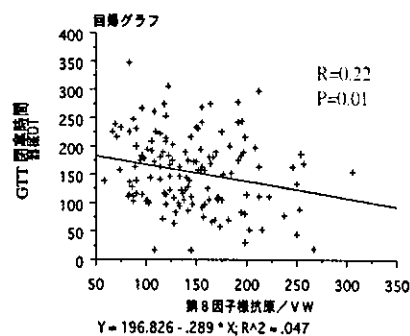
ADAMTS13 遺伝子多型と血中VWF活性



次に血中 VWF 抗原量と GTT 閉塞時間を調べたところ弱い負相関がみられた。すなわち、VWF が高値であるとより早期に血栓による閉塞がおこる傾向が示された (図5)。

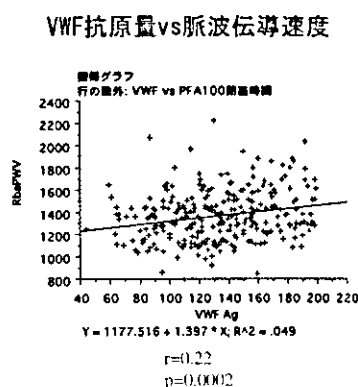
図5

血中VWF抗原量とGTT 閉塞時間



また血中VWF抗原量は脈派伝導速度と正相関を示した(図6)。

図6



D. 考察

今回の検討により、ADAMTS13遺伝子多型(P475S)は健常人において血中ADAMTS13活性の決定要素のひとつであることが明らかとなった。しかしADAMTS13活性と血中VWF(抗原量、活性)に有意な相関はなく、またADAMTS13遺伝子多型と血中VWF(抗原量、活性)にも有意な相関はなかった。従って少なくとも健常人における正常範囲内のADAMTS13活性値の変動は血中VWF活性に影響を与えないことが示された。ADAMTS13活性はTTPの時のように著減した場合にのみ、その病的意義が明瞭になるものと思われる。一方、血中VWF活性は、以前から動脈硬化性疾患や動脈血栓症と関連するとされてきたが、今回の我々の検討した健常人集団においてもこの関連が示された。血中VWF値とin vitro血栓形成能の指標

のひとつであるGTT閉塞時間の間に弱い負の相関がみられ、また血中VWF値と動脈硬化の指標の一つとされる脈派伝導速度の間に正相関が示された。これらの事実はVWFが病的血栓に関わることの傍証である。今後、ADAMTS13の病的な低下と血栓症、ex vivo血栓形成能の関連などにつき検討が必要である。

E. 結論

健常人を対象にADAMTS13遺伝子型、ADAMTS13活性、VWF活性/抗原、in vitro血栓形成能などの関連につき検討した。VWFが易血栓性と関連することを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyaki K, Omae K, Murata M, Tanahashi N, Saito I, Watanabe K: High throughput multiple combination extraction from large scale polymorphism data by Exact Tree Method. *J Hum Genetics* 49: 455-462, 2004

Azuma K, Oguchi S, Matsubara M, Mamizuka T, Murata M, Kikuchi H, Watanabe K, Katsukawa F, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T. Novel resistin polymorphisms: Association

with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res* 36(8): 564-70, 2004

Motohashi Y, Maruyama T, Murata M, Nakano S, Maruyama C, Kyotani S, Tsushima M, Saruta T. Role of genetic factors (CETP gene Taq IB polymorphism and Apo A-1 gene MSP I polymorphism) in serum HDL-C levels in women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14 (1): 6-14, Feb 2004

Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, Murata M, Saruta T. Relation Between Development of Nephropathy and the p22phox C242T and Receptor for Advanced Glycation End Product G1704T Gene Polymorphisms in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 27(2): 303-7, 2004

Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M. Identification of novel mutations in *ADAMTS13* in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 104 (7): 2081-2083, 2004

Ishii K, Oguchi S, Moriki T, Yatabe Y, Takeshita E, Murata M, Ikeda Y, Watanabe K. Genetic analyses and expression studies identified a novel

mutation (W486C) as a molecular basis of congenital coagulation factor XII deficiency. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 15: 1-7, 2004

Murata M, Maruyama T, Suzuki Y, Saruta T, Ikeda Y. Paraoxonase 1 192Gln/Arg polymorphism is associated with the risk of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 21(8): 837-44, 2004

Oguchi S, Ishii K, Moriki T, Takeshita E, Murata M, Ikeda Y, Watanabe K. Factor XII Shizuoka, a novel mutation (Ala392Thr) identified and characterized in a patient with congenital coagulation factor XII deficiency. *Thrombosis Research* 115(3): 191-197, 2005

Hattori H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N. T280M and V249I polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1 and ischemic cerebrovascular disease. *Neuroscience Letters* 374: 132-135, 2005

Matsubara Y, Murata M, Hayashi T, Suzuki K, Okamura Y, Handa M, Ishihara H, Shibano T, Ikeda Y. Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions. *Brit J Haematol* 128:

533-539, 2005

Isshiki I, Favier R, Moriki T, Uchida T, Ishihara H, Van Dreden P, Murata M, Ikeda Y. Genetic analysis of hereditary factor X deficiency in a French patient of Sri Lankan ancestry: *in vitro* expression study identified Gly366Ser substitution as the molecular basis of the dysfunctional factor X. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 16: 9-16, 2005

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2004-128754

発明者：池田康夫, 村田 満, 石原宏明, 内田敏弘

フォンビルブランド因子切断酵素遺伝子解析による血栓性疾患関連の遺伝子変異検出方法 2004年04月23日 出願

平成 16 年度分担研究報告書

TTP 症例の全国アンケート調査

分担研究者名 和田英夫（三重大学医学部臨床検査医学）

研究協力者名 森 美貴（三重県赤十字血液センター）

研究要旨

TTP の病態を調べるため、全国の主要な血液内科・小児科施設にアンケート調査を行った。アンケート調査に回答を得られた先天性 TTP/HUS 18 例、後天性 TTP/HUS 177 例について解析を行った。先天性 TTP/HUS では精神神経症状の頻度が少なく、精神神経症状の出現には ADAMTS-13 以外の因子が関与している可能性が推測された。また、ADAMTS-13 が 10%以下の症例では、殆どが FFP の維持投与が必要であった。後天性 TTP/HUS 177 例の内訳は、特発性 69 例、O-157 関連 60 例、自己免疫性 19 例、移植関連 10 例、薬剤性 9 例、悪性腫瘍に伴うもの 8 例、妊娠に伴うもの 2 例であった。溶血性貧血と血小板減少以外の臨床症状は、腎障害 69%、発熱 67%、DIC 様病態 38%、精神神経症状 35%、呼吸器症状 11%であった。精神神経症状は、特発性と自己免疫性 TTP/HUS に高頻度に認められ、両者はよく似た病態と考えられた。ADAMTS-13 活性の低下は先天性、特発性ならびに自己免疫性 TTP/HUS で高頻度に見られた。特発性ならびに自己免疫性 TTP/HUS の解析結果では、ADAMTS-13 活性が 10-50%のものは寛解率がやや低い傾向にあり、死亡率も高い傾向にあるが、ADAMTS-13 の測定頻度が少なく、確定的な結論は得られなかった。

1. 研究目的

TTP あるいは HUS は、種々の診療科で診られ、種々の原因でよく似た病態を呈することから、公に認められた TTP や HUS の定義や診断基準はなかった。近年、ADAMTS-13 が TTP の発症原因のひとつであることが報告されたが、どの程度 ADAMTS-13 が TTP/HUS の発症に関与するのか、大規模な調査・研究はなされていない。このため、TTP/HUS の病態などについて全国調査を行い、ADAMTS-13 と

TTP/HUS との関係を検討する。最終的には、TTP/HUS の発症原因に基づいた TTP/HUS の定義ならびに診断基準作成を目的とする。

2. 研究方法

2003 年に全国の主要な血液内科・小児科施設に、一次アンケート調査を行った。調査に同意を得られた先天性 TTP /HUS 31 例、後天性 TTP/HUS 344 例に対して、2004 年に二次アンケート調査を行い、TTP/HUS の臨床症状、検査値異常、予後、ADAMTS13

活性ならびにインヒビター値などのアンケート調査を行った。

(倫理面への配慮)

三重大大学の倫理委員会の指針に従い、アンケートに際しては個人情報の保護に留意して、患者名は匿名化しておこなった。

3. 研究結果

各施設から二次調査の回答を得られたものは先天性 TTP/HUS 18 例(58%)、後天性 TTP/HUS 177 例(51.5%)であった。後天性 TTP/HUS 症例の内訳は、特発性 69 例、O-157 関連 60 例、自己免疫性 19 例、移植関連 10 例、薬剤性 9 例、悪性腫瘍に伴うもの 8 例、妊娠に伴うもの 2 例であった。前駆症状は、O-157 関連以外でも、下痢や上気道炎などの前駆症状が 10-15%に見られた。MHA と血小板減少以外の臨床症状は、腎障害 69%、発熱 67%、DIC 様病態 38%、精神神経症状 35%、呼吸器症状 11%であった。精神神経症状は、特発性と自己免疫性に高頻度に認められ、両者はよく似た病態と考えられた(表 1)。

表1 TTP/HUSの臨床症状

%	CNS	腎障害	発熱	呼吸器	FDP>20
USS	11.1	72.2	62.5	5.6	57.1
薬剤性	12.5	77.8	33.3	0	16.7
妊娠	0	100	100	50.0	100
自己免疫性	73.7	68.4	88.8	25.0	33.3
悪性腫瘍	37.5	75.0	75.0	12.5	42.9
移植	10	90.0	70.0	30.0	40.0
特発性	68.1	65.2	67.7	12.2	32.7
O-157	16.7	66.7	51.7	50.0	50.0
全例	35.4	69.2	66.8	10.8	38.3

(USS; 先天性 TTP/HUS)

施行された TTP/HUS に対する治療法

の頻度は、血漿交換(PE)、FFP 輸注、抗血小板剤、ステロイド、抗凝固療法の順であった(表 2)。

表2 TTP/HUSの治療法

%	PE	FFP	ステロイド	免疫抑制	HD	PC	抗凝固	抗血小板
USS	22.2	84.6	42.9	0	12.5	0	12.5	42.9
薬剤性	56.6	75.0	42.9	12.5	42.9	28.6	40.0	62.5
妊娠	100	0	100	0	0	0	0	50.0
自己免疫性	94.4	68.8	100	25.0	15.4	46.2	25.0	58.8
悪性腫瘍	50.0	62.5	75.0	28.5	42.9	57.1	37.5	42.9
移植	40.0	70.0	70	20	12.5	77.8	10	10
特発性	84.8	65.4	69.4	11.6	12.1	31.6	23.8	55.2
O-157	5.0	19.2	1.7	0	6.1	3.2	4.2	1.7
全例	63.5	52.8	44.2	9.2	14.4	27.4	19.5	48.7

予後との関係では、悪性腫瘍と移植に関する TTP/HUS が最も予後が悪かった。妊娠とヴェロトキシンに関する TTP/HUS は予後が良かった。特発性、自己免疫性の TTP/HUS の死亡率は 20-30%台であり、寛解率は 60%台であった(表 3)。

表3 TTP/HUSの死亡率と寛解率

	症例数	死亡例	死亡率	寛解例	寛解率
USS	18	1	5.6%	9	50.0%
薬剤性	9	1	16.7%	8	88.9%
妊娠	2	0	0%	2	100%
自己免疫性	19	6	33.3%	12	63.2%
悪性腫瘍	8	5	62.5%	3	37.5%
移植	10	8	80.0%	2	20.0%
特発性	69	15	21.7%	45	65.2%
O-157	60	1	1.7%	59	98.3%
全例	195	37	19.8%	140	71.8%

先天性 TTP/HUS は 12 家系 18 例で、17 例は家族歴があった。家族歴のない 1 例は、再発性であり、ADAMTS-13 が常時 3%以下かつインヒビター陰性なので、先天性と診断された。先天性 TTP/HUS の死亡例は 1 例のみで、中年になってから腎病変を含む動脈硬化性も加わった臓器障害によるもの

であった。先天性 TTP/HUS では精神神経症状の頻度が少なかった。

ADAMTS-13 に関する検討では、先天性 TTP/HUS の 10 例、自己免疫性の 8 例、特発性の 37 例、移植関連 3 例、薬剤性 1 例、悪性腫瘍関連 1 例に、ADAMTS-13 の低下があった (表 4)。悪性腫瘍ならびに移植関連の TTP/HUS では、著明な ADAMTS-13 の低下はなかった。

表4 TTP/HUSとADAMTS-13活性

ADAMTS-13	<10	10< <50	50<	未測定
USS	7	3	2	6
薬剤性	0	1	2	6
妊娠	0	0	0	2
自己免疫性	6	2	4	7
悪性腫瘍	0	1	1	6
移植	0	3	0	7
特発性	27	10	6	26
O-157	1	0	0	59
全例	41	20	15	119

予後と ADAMTS-13 に関する検討では (表 5)、特発性ならびに自己免疫性 TTP/HUS では、ADAMTS-13 活性が 10% 以下の例に比べ、10-50% の例は寛解率がやや低い傾向にあり、死亡率も高い傾向にあった。

表5 特発性ならびに自己免疫性TTP/HUSの予後とADAMTS-13

ADAMTS13	死亡	寛解	維持療法	判定不能
10>	5 (15.6)	21 (65.6)	2	4
10< <50	4 (30.8%)	7 (53.8%)		2
50<	2 (20%)	7 (70.0%)		1
未測定	10 (30.3%)	20 (60.6%)	1	2
合計	21 (22.7%)	55 (62.5%)	3	9

先天性 TTP/HUS では、ADAMTS-13 が 10% 以下の症例では、殆どが FFP

の維持投与が必要であった。

4. 考察

アンケートの回収率は低かったが、ある程度の解析は行えた。特に、先天性 TTP/HUS では精神神経症状の頻度が少ないので、ADAMTS-13 低下のみでは精神神経症状は起こらず、他の因子が関与することにより、精神神経症状が出現することが示唆された。先天性の解析から、ADAMTS-13 が 10% 以下の症例では、FFP の維持投与が必要なことから、ADAMTS-13 は TTP/HUS の発症を防ぐための必須蛋白と考えられた。また、先天性、特発性ならびに自己免疫性 TTP/HUS の多くは ADAMTS-13 の減少により発症していると考えられた。ADAMTS13 の測定頻度が少なく、確定的な結論は得られなかったが、ADAMTS-13 が中等度減少する症例は、二次的原因から発症している可能性が示唆された。これらの予後を改善するためには、二次的原因を治す必要があると考えられた。今後さらに、ADAMTS-13 の測定を普及させる必要がある。

5. 結論

先天性、特発性ならびに自己免疫性 TTP/HUS の多くは ADAMTS-13 の減少により発症していると考えられた。今後さらに、ADAMTS-13 の測定を普及させる必要がある。

6. 健康危険情報

特になし

7. 研究発表

1. 論文発表

・ Ishikura K, Wada H, Kamikura Y,

Hattori K, Fukuzawa T, Yamada N, Nakamura M, Nobori T, Nakano T: High prevalence of anti-prothrombin antibody in patients with deep vein thrombosis. *Am J Hematol*, 76(4): 338-342, 2004

• Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M: Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 104(7): 2081-2083, 2004

• Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Wada H, Fujimura Y: The Japanese Experience with thrombotic thrombocytopenic purpura – Hemolytic uremic syndrome. *Seminar Hematol*, 41(1): 68-74, 2004

• Kushiya F, Wada H, Ooi K, Sakurai Y, Sakaguchi A, Noda M, Abe Y, Nakasaki T, Tsukada T, Shiku H, Nobori T: Effects of atorvastatin on serum lipids, lipoproteins, and hemostasis. *Am J Hematol*, 78(1):1-6, 2005;

• Kamikura Y, Wada H, Nobori T, Matsumoto T, Shiku H, Ishikura K, Yamada N, Nakano T, Kazahaya Y, Sawai T, Matsuda M: Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*, 115(1): 53-57, 2005

2. 学会発表

• Wada H: Diagnosis of DIC by

hemostatic molecular markers. Symposium 5 Diagnosis and therapeutic approaches of DIC in Asian countries. The Third Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis (2004)

• Wada H: The application of diagnostic algorithm(s) (ISTH and JMHW scoring) to distinct diagnostic subgroups of patients at risk for DIC. Disseminated Intravascular Coagulation (DIC), The 50th Scientific and Standardization Committee Meeting of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. (2004)

• Sakakura M, Wada H, Tawara I, Shiku H: Numbers of CD4+CD25+ T cells in the patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Xth Congress of The International Society of Hematology, Asian-Pacific Division, (2004)

8. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実案新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

<研究成果の刊行に関する一覧>

• Ishikura K, Wada H, Kamikura Y, Hattori K, Fukuzawa T, Yamada N, Nakamura M, Nobori T, Nakano T: High prevalence of anti-prothrombin antibody in patients with deep vein thrombosis. *Am J Hematol*, 76(4): 338-342, 2004

• Kushiya F, Wada H, Ooi K, Sakurai Y, Sakaguchi A, Noda M, Abe Y, Nakasaki T, Tsukada T, Shiku H, Nobori T: Effects