

Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cardiomyocytes Contributes to Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction. **Am. J. Pathol.** 164 (2): 449-456, 2004.

A. Shimizu, T. Matsushita, T. Kondo, Y. Inden, T. Kojima, H. Saito, and M. Hirai: Identification of the Amino Acid Residues of the Platelet Glycoprotein Ib (GPIb) Essential for the von Willebrand Factor Binding by Clustered Charged-to-Alanine Scanning Mutagenesis. **J. Biol. Chem.** 279 (16): 16285-16294, 2004.

T. Koike, N. Kimura, K. Miyazaki, T. Yabuta, K. Kumamoto, S. Takenoshita, J. Chen, M. Kobayashi, M. Hosokawa, A. Taniguchi, T. Kojima, N. o Ishida, M. Kawakita, H. Yamamoto, H. Takematsu, A. Suzuki, Y. Kozutsumi and R. Kannagi: Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101 (21), 8132-8137, 2004.

H. Okada, A. Takagi, T. Murate, T. Adachi, K. Yamamoto, T. Matsushita, J. Takamatsu, K. Sugita, M. Sugimoto, A. Yoshioka, T. Yamazaki, H. Saito, and T. Kojima: Identification of protein S gene mutations including four novel mutations in eight unrelated patients with protein S deficiency. **Br. J. Haematol.** 126 (2): 219-225, 2004.

T. Matsushita, H. Hayashi, S. Kunishima, M. Hayashi, M. Ikejiri, K. Takeshita, Y. Yuzawa, T. Adachi, K. Hirashima, M. Sone, K. Yamamoto, A. Takagi, A. Katsumi, K. Kawai, T. Nezu, M. Takahashi, T. Nakashima, T. Naoe, T. Kojima and H. Saito: Targeted disruption of mouse ortholog of the human MYH9 responsible

for macrothrombocytopenia with different organ involvement: Hematological, nephrological, and otological studies of heterozygous KO mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 325: 1613-1171, 2004.

2. 学会発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記載)

山本晃士、下川高賢、竹下享典、松下 正、小嶋哲人、齋藤英彦: 拘束ストレス負荷マウスにおける tissue factor の組織特異的な遺伝子発現 一加齢の影響一. 第 64 回日本血液学会総会 (2002)

Tetsuhito Kojima: *In vivo* functions of a heparan sulfate proteoglycan, ryudocan (syndecan-4). International Symposium on Biological Science of Heparan Sulfate Proteoglycans (2003)

萩原和美、中出祐介、祖父江沙矢加、田川容子、坂野嘉子、小泉恵子、浅野治彦、高木明、小嶋哲人、野澤義則、村手隆: PMA 刺激ヒト白血病細胞株 MEG-01 におけるスフィンゴシンキナーゼ 1 の発現調節機序の解析 第 45 回日本臨床血液学会総会 (2003)

原田直明、岡島研二、内場光浩、小嶋哲人: アンチトロンビンの抗炎症作用は主にカプサイシン感受性知覚神経の活性化を介する 第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

中出祐介、高木明、小嶋哲人、村手隆: ヒト白血病細胞株 MEG-01 を用いたスフィンゴシンキナーゼ 1 の発現調節機序の解析 第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

岡田浩美、河井怜子、山田貴之、高木 明、村手 隆、小嶋哲人、足立達哉、松下 正、山本晃士、高松純樹、齋藤英彦: プロテイン S 欠損症 16 例における PS $\alpha$  遺伝子解析 第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

山田貴之、河井怜子、岡田浩美、高木 明、

村手 隆、伊藤雅文、足立達哉、山本晃士、松下 正、齋藤英彦、小嶋哲人：マウス PAI-1に対する抗体作製とELISA構築 第26回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

河井怜子、岡田浩美、山田貴之、高木 明、村手 隆、伊藤雅文、足立達哉、山本晃士、松下 正、齋藤英彦、小嶋哲人：血液凝固第XI因子欠損症4症例の遺伝子解析 第26回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

T. Yamada, A. Takagi, H. Okada, M. Motoyama, H. Horio, K. Yamamoto, M. Ito, T. Matsushita, T. Murate, H. Saito, T. Kojima: ELISA for mouse PAI-1 using a specific antibody produced by the naked DNA method. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division. (2004)

H. Okada, A. Takagi, T. Murate, T. Adachi, K. Yamamoto, T. Matsushita, J. Takamatsu, T. Yamazaki, H. Saito, T. Kojima: Four novel mutations in eight unrelated Japanese subjects with protein S deficiency. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division. (2004)

T. Kojima, S. Kunishima, T. Matsushita, K. Yokoi, T. Yoshihara, T. Yamazaki, M. Hamaguchi, H. Saito: Somatic mosaicism in a family with MYH9 disorders. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division. (2004)

K. Hagiwara, S. Sobue, Y. Banno, K. Tamiya-Koizumi, T. Kojima, H. Asano, C. Sugisaki, Y. Nozawa, T. Murate: Determination of the promoter region responsible for the PMA induced sphingisine kinase 1 gene expression during megakaryocytic differentiation of a human leukemia cell line, MEGO-1. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific

Division. (2004)

足立達哉、松下 正、林 睦春、村田 誠、横澤敏也、勝見 章、山本晃士、小嶋哲人、齋藤英彦、直江知樹：同種末梢血幹細胞移植後にSDAMTS13に対するインヒビターが出現した1症例 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004)

林 睦春、松下 正、伊藤雅文、岩崎卓識、山田貴之、足立達哉、国島伸治、山崎鶴夫、近藤隆久、勝見 章、山本晃士、小嶋哲人、MACKMAN NIGEL、齋藤英彦、室原豊明、直江知樹：ATIII欠損・組織因子(TF)低発現マウスの病態解析 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004)

松下 正、清水敦哉、近藤隆久、因田恭也、足立達哉、国島伸治、山崎鶴夫、勝見 章、山本晃士、神谷香一郎、小嶋哲人、平井真理、齋藤英彦、室原豊明、直江知樹：複合体結晶構造モデルを用いたvon Willebrand因子-血小板GPIbの相互作用様式の解析 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004)

山影 望、池尻 誠、奥村 薫、京谷麻由、堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、高木 明、村手 隆、足立達哉、松下 正、山本晃士、高松純樹、国島伸治、山崎鶴夫、濱口元洋、齋藤英彦、小嶋哲人：先天性血液凝固第V因子欠損症の一家系解析 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (2004)

山田貴之、池尻 誠、山影 望、京谷麻由、奥村 薫、堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、高木 明、村手 隆、小嶋哲人：マウスATに対する抗体作製とELISA構築 第27回日本血栓止血学会学術集会(2004)

京谷麻由、池尻 誠、山影 望、奥村 薫、堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、山田貴之、高木 明、村手 隆、杉村 基、小林隆夫、金山尚裕、足立達哉、山本晃士、松下 正、高松純樹、齋藤英彦、小嶋哲人：妊娠中に深部静脈血栓症を発症した安置トロンビン

欠損症3例の遺伝子解析 第27回日本血栓止血学会学術集会(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 |

## 日本の現状と肺血栓塞栓症の予防戦略

分担研究者：川崎 富夫 大阪大学医学部

### 研究要旨

日本においては血栓症の頻度や発生機序が欧米と異なるため、EBMに基づいた実用的な日本のガイドライン作成が急務となっている。基礎的検討の後に大阪大学医学部附属病院では独自の血栓症予防ガイドラインを作成した。下肢周囲径測定の有用性、カプロシン皮下注射の安全性を確認後、2003年12月からこのガイドラインを運用し2004年6月までのデータを検討した。この期間の深部静脈血栓症/肺塞栓症患者は36名で、入院中に発症した患者が25例、入院時点で血栓症が発見された患者数は11例であった。11例中5例(全体の14%)は既往歴が無いとされていたが、詳細な既往歴聴取にて血栓症を示唆する特徴的な症状を確認できた。血栓症予防対策として血栓症の詳細な既往歴聴取や触診視診など基本的な診察法の教育が重要である。現在本ガイドラインをより簡易で実用的なものとするための検討を進めている。

### A. 研究目的

日本における実効的な肺動脈塞栓症の予防法を確立させるためには、深部静脈血栓症予防法の最適化のための基礎データを蓄積し解析することが重要である。大阪大学附属病院ではより実効性の高い独自の肺動脈塞栓症および深部静脈血栓症予防ガイドラインを作成することを目的として検討を行った。

### B. 研究方法

下肢周囲径によるスクリーニングの信頼性を明らかにする目的で、2002年7月から2003年6月まで大阪大学産婦人科の協力のもとに卵巣癌および子宮癌症例46例について検討した。術前日及び術後第一歩行前にAir Plethysmography及び大腿と下腿の周囲径を測定して異常を認めた症例に血管エコーを行い深部静脈血栓症の有無を診断

した。また有志医師6名において、カプロシン2500単位皮下注射の安全性をaPTTの変動の面から検討した。

また、2003年12月から大阪大学医学部附属病院において本ガイドラインを運用し、2004年6月までのデータを検討した。複写式の帳票を患者入院時にカルテに添付し、入院中のリスク評価や実施した予防法を記入後、退院時に帳票を保険請求用、入院カルテ用、データ用として回収した。

患者入院時に血栓症のリスク評価を行い、リスクが中または高の患者には、下肢周囲径を測定し、左右差があれば超音波診断による血栓症の精査を行った。また、長期臥床あるいはベッド上安静後にもう一度下肢周囲径を測定して左右差あるいは術前後での周囲径の異常があった場合も血栓症の精査を行った。

### C. 研究結果

下肢周囲径の信頼性について、骨盤内リンパ節郭清を伴う産婦人科悪性腫瘍手術患者46症列中 Air Plethysmography 検査結果が異常で血管エコーを行った症例は25例であり、6例に深部静脈血栓症を認めた。深部静脈血栓症の発症が無かった群では、術前に比べて術後に大腿周囲径が  $0.92 \pm 0.81 \text{cm}$  (mean $\pm$ sd) 減少していた。一方、深部静脈血栓症が発症した群では、術前に比べて術後では中枢型で1.5 cm以上大腿周囲径が増加していた。

また、カプロシン2500単位を皮下注射して7時間まで検討した結果、aPTT

は注射後2-4時間で前値より有意に延長していたが、変動は全て正常範囲内であった。

現在大学病院における運用結果の解析中であるため、検討結果の一部を示す。この期間の深部静脈血栓症/肺塞栓症患者は36名で、内科系11例、外科系25例であった。うち肺塞栓症は12例で重症8例、軽症4例であった。血栓症患者36例のうち、入院中に発症した患者が25例で全て入院中発症後に診断された症例である。入院時点（入院直後で手術前または長期臥床前におけるスクリーニング時）で血栓症が発見された患者数は11例であった。このうち6例は既往歴が明らかであったが、他の5例（全体の14%）は既往歴が明らかで無かった。この5例は、もしスクリーニングが行われなければ深部静脈血栓症に気づかれないうまま治療に入って血栓症を発症していた可能性が高く、その際には院内発症として扱われていた可能性が高かった。これらの症例について改めて詳細に既往を聴取したところ、血栓症を示唆する症状の存在を確認できた。

### D. 考察

卵巣癌および子宮癌における骨盤内リンパ節郭清を施行する患者では、術前から深部静脈血栓症が存在する症例が半数であったことから、術後と同様に術前にも深部静脈血栓症に十分注意が必要である。

下肢周囲径の測定は費用が全くかから

ず、容易に施行可能な検査であるが、その信頼性と検出力が不明であった。今回の結果では、下肢周囲径の測定による深部静脈血栓症の検出力は24%であり、費用が全くかからない点から、実用的な方法と考えられた。下肢周囲径測定において、術前左右差の測定に関してはすでに報告している。今回の術前後の比較で1.5cm以上の周囲径増加をもって深部静脈血栓症を疑うとするカットオフ設定により、周術期における深部静脈血栓症のスクリーニング法が完成したと考えられる。

また、カプロシン2500単位、12時間毎皮下注射を行った場合、aPTTはカプロシン投与後2-4時間で明らかに延長していたが変動は正常範囲内に留まったことから、この投与量では出血傾向を伴いにくいと考えられ、外科手術の際の静脈血栓症の予防手段として使用可能と考えられる。

日本ではやっとなら深部静脈血栓症の正確な診断が可能となりつつある段階であり、いまだ深部静脈血栓症の診断がつかない症例も多い。大阪大学での運用結果では、入院中に発症したとされる深部静脈血栓症および肺塞栓症患者の中には、これら診断のついていない血栓症既往患者が無視しえない程度入院時から含まれていることを示している。これら血栓症の既往を有する症例は明らかに血栓症発症の危険度が高いので、血栓症の既往を詳細に聴取して予防対策を行うことにより血栓症および肺塞栓症の再発を未然に

防ぐことができる。このように、血栓症の既往歴の聴取や触診視診など基本的な診察法の教育を徹底することが日本における血栓症の予防戦略上重要であると考えられる。なお、現在さらに解析を続行中である。

## E. 参考文献

1. 渋谷 卓、川崎富夫 深部静脈血栓症の治療戦略 外科治療 85(5), 581-582, 2001

2. 渋谷 卓、川崎富夫 深部静脈血栓の診断における CT 画像と血液凝固検査を用いたスクリーニング法 静脈学 13(1), 39-43, 2002

### 3. 腹部大血管損傷

Today's Therapy 2004 今日の治療指針 山口 徹、北原光夫編 医学書院 東京 49-50, 2004

### 4. 渋谷 卓、川崎富夫

深部静脈血栓症、肺血栓塞栓症のリスク

深部部静脈血栓症予防ハンドブック

医歯薬出版 東京 34-39, 2004

### 5. 畑 泰司、池田正孝、上田美奈子、川崎富夫、鈴木 玲、竹政伊知郎、山本浩文、大植雅之、関本貢嗣、門田守人

深部静脈血栓症の病因と病態

外科治療 91(3):259-264, 2004

### 6. 佐藤 徹、中村真潮、川崎富夫、柳本 繁

急性肺血栓塞栓症のガイドラインをめぐって-座談会-

MEDICO 35(11), 18, 23-39, 2004

## 血栓性微少血管障害症(TMA)サブグループ研究報告

### 分担研究者

○藤村吉博	奈良県立医科大学輸血部	教授
宮田敏行	国立循環器病センター研究所	部長
村田 満	慶應大学医学部内科	講師
和田英夫	三重大学医学部臨床検査医学科	助教授

### 研究協力者：

東邦大学医学部衛生学 杉野 稔・伊津野 孝

### 要旨

TTP グループでは、全国から TTP/HUS 症例を集積して、ADAMTS13 活性および同インヒビターの測定を行い、平成 16 年末で 493 例となった。このうち、先天性および後天性 TTP の活性著減例において ADAMTS13 遺伝子の解析を行ってきた。一方で、全国の医療機関にアンケート調査を行い TTP/HUS の実態調査を行った。以上の結果から TTP/HUS の病型分類と診断基準の作成を目指している。また、FRETs-VWF73 および新規の ELISA 法を使った ADAMTS13 活性測定法の開発に成功し、ベットサイドでの TTP/HUS の診断が可能になることが期待される。また、上記の 493 例中 ADAMTS13 活性が著減しない症例が約 2/3 あり、factor H などの ADAMTS13 以外の原因も含めた TMA の系統的診断法の確立を目指している。

### 1. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は血小板減少、動揺性精神神経症状などの所謂 Moschowitz の 5 徴候からなる全身性重篤疾患で、血漿交換療法が導入される以前の死亡率は 90% を超える予後不良疾患であった。TTP は腎症状優位とされる溶血性尿毒症症候群 (HUS) と臨床的にはしばしば鑑別が困難であるが、共に細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、血栓

による臓器障害を 3 主徴とする血栓性微小血管障害症 (TMA) のカテゴリーに分類されている。近年、von Willebrand 因子切断酵素 (VWF-CP、別名 ADAMTS13) の発見とその活性測定が可能となった事より、TTP では同活性が著減し HUS では略正常との報告がなされるようになった。しかし、このアッセイは技術的に大変困難であるという事情から、本邦では測定可能な施設が極めて制限されており、TTP 患



者の頻度、診断、治療、予後等の実態は殆ど不明である。

奈良医大輸血部では 1998 年にこのアッセイを確立し、全国の医療機関から同活性測定の依頼を受け付け、まず臨床診断にて TMA と判定され、且つ ADAMTS13 活性が解析された数は平成 16 年末で 493 例になる。このような背景のもと、本研究サブグループは、1) 前記 493 例の解析による TMA の病型分類と TTP の診断基準の作成、2) ADAMTS13 抗原／遺伝子解析、3) アンケート調査による TTP の発症頻度と治療法の確立、4) 同酵素活性の簡便・迅速測定法の確立と評価、5) ADAMTS13 以外の原因も含めた TMA の系統的診断法の確立、の 5 項目を研究目的に掲げている。

## 2. 研究方法（倫理面への配慮）

1. ADAMTS13 活性と同インヒビターの測定：精製 VWF を基質に用い、SDS アガロースゲル電気泳動で解析する VWF マルチマー法。

2. ADAMTS13 遺伝子解析：奈良医大輸血部 HP (<http://www.naramed-u.ac.jp/~trans/>) を介して全国の医療機関から同活性測定依頼を受け、臨床症状から TMA と診断された 493 例について、ADAMTS13 活性著減（正常の<3%）と同インヒビター陰性（<0.5 Bethesda

U/ml）所見から先天性 TTP（Upshaw-Schulman 症候群：USS）が疑われた症例については各依頼と解析施設の双方で倫理委員会承認を得た後、ADAMTS13 遺伝子解析を行った（国立循環器病センター研究所の宮田班員が担当）。一方、ADAMTS13 活性著減で同インヒビター陽性の後天性 TTP で、患者の同意が得られたものについても前記と同じ手続きを経て遺伝子解析を行った（慶応大学の村田班員が担当）。（図 1 のフローチャート参照）

3. ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の確立：ADAMTS13 による VWF-A2 ドメインの切断部位（サブユニットのアミノ酸残基 Tyr842-Met843）を含む人工基質を作成し、これを利用したアッセイ法について検討した。

4. ADAMTS13 抗原の解析：Hela 細胞で発現した recombinant (r)ADAMTS13 を抗原とし、常法にてマウスモノクローナル抗体を作成し、これを用いた western blot 並びに酵素免疫測定法 (ELISA) による ADAMTS13 抗原の量的、質的解析を行った。

5. アンケート調査：平成 14 年度に実施した一次調査は日本血液学会研修施設 515 施設の小児科および血液内科の 994 カ所にアンケートを郵送した（添付資料）。回答が得られたのは 429 カ所（43%）で、そのうち 2 次調査に協力可能施設

は 392 施設であった。この結果を受けて本年度 2 次調査を行った。

(添付資料参照、三重大学の和田班員が担当)

### 3. 研究結果

1. ADAMTS13 活性と同インヒビターの測定:表 1 に結果を示す。先天性 TMA と考えられる症例は計 41 例であった。うち 26 例 (21 家系) は同活性著減の USS で、残り 15 例は原因不祥であった。USS の 10 家系については ADAMTS13 遺伝子解析を終了し、その異常部位を同定した (後述)。後天性 TMA は 452 例で、この診断並びに TTP と HUS のふるい分けは紹介医からの臨床経過と基本検査所見をベースに行った。うち TTP は 381 例 (特発性 166 例、膠原病 111 例、悪性腫瘍 36 例、造血幹細胞移植 26 例、妊娠 12 例、薬物 12 例、その他 18 例)、また HUS は 71 例 (特発性 48 例、O157 感染 17 例、マイトマイシン 6 例) であった。TTP の中で、特発性の 93 例 (56%) では ADAMTS13 インヒビターが陽性で、同活性著減が確認された。膠原病では 18 例 (16%) が同活性著減、また造血幹細胞移植では同活性著減例はなかった (0%)。一方、HUS では ADAMTS13 活性著減例は認められなかった。

2. ADAMTS13 遺伝子解析:USS 10 家系 (Family A~J) 11 症例についての家系図と遺伝子解析の結果を図 2 と 3 に示す。ADAMTS13 遺伝子は染色体 9q34 にあるが、両方のアレルに異なった変異部位を持つ「複合型ヘテロ接合体」は 8 家系 9 症例に見られ、患者の両親はいずれも非血縁結婚であった。一方、両方のアレルの変異が同一である「ホモ接合体」は 2 家系 (Family B と C) 2 症例に見られ、Family C の患者の両親は血縁結婚 (いとこ) であった。Family B 患者 (札幌在住) もホモ接合体変異であったが、両親は非血縁結婚であった。しかし、その後の詳細な家系ルーツ調査によって、この御両親の各々の曾祖父母は 19 世紀末に東北地方のある同村から札幌に移住された方である事が判明し、元々は近縁であった事が考えられる症例である。更に、Family A 家系の解析から日本人の 9.6% にヘテロ接合体が存在する事が確認された P475S という潜在的な血栓症リスクファクターの多型が発見された。後天性 TTP での遺伝子解析は現在進行中であるが、先天性 TTP に比べて遥かに少ない。

3. ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の確立: 国立循環器病センター研究所の宮田班員とその共同研究者である小亀らは ADAMTS13 による切断部位

Tyr842-Met843 を含む VWF-A2 ドメインの両端を各々 GST と His タグで挟み込んだ大腸菌発現蛋白を数種作成し、切断に必須である VWF サブユニットの最小アミノ酸残基数は 73 で、またその残基番号は 833-905 である事を示した。この基質 (GST-VWF73-His と命名) を用いた ELISA による活性測定系は米国の研究者が先行する形になったが、基質が両端標識されているため、検量線は切断されない残量を測定する逆勾配となり、その感度は必ずしも満足できるものではない。最近、小亀らは VWF73 に蛍光基と消光基を組み込んだ合成ペプチド (FRETS-VWF73 と命名) を作成し、同酵素切断にて発する蛍光を直接測定するという画期的な方法を構築した。このアッセイの有用性、特に従来法との精度比較は対価面も含めて現在世界的規模で検討が行われつつある。

一方、より最近藤村らの研究グループは Tyr842-Met843 結合が切断される事によって生ずる N 末端側の -Tyr842 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (N10 抗体と命名) を 24 種類作成する事に成功した (図 4)。この N10 抗体は正常 VWF とは ELISA や western blot では殆ど反応しないことから、マイクロプレート上に前記 GST-VWF73-His 基質を固相化し、正常血漿 (希釈) 添加によるペプチド切

断反応を行い、生じた N 末端側の -Tyr842 ペプチドを N10 標識抗体で検出する測定系を構築した。本測定系の検出感度は 0.5% で、また inhibition assay でも TTP 患者の IgG で濃度依存性阻害が確認された事から、今後、迅速、高精度、安価な ADAMTS13 活性測定系のルーチン検査化が可能になるものと考えられる。

5. ADAMTS13 抗原の解析: rADAMTS13 にて作成したモノクローナル抗体は 2 種 (A10 と C7) で、それぞれのエピトープは図 5 に示すように、A10 が disintegrin-like ドメイン、C7 が thrombospondin-1 (T) ドメインの 7 と 8 番目 (T7/T8) であった。さらに A10 は正常血漿中の ADAMTS13 活性の完全中和抗体であり、C7 は非中和抗体であった。(WH2-11-1 は化学血清療法研究所で作成され、そのエピトープは T4 にある。) A10 は血漿中の ADAMTS13 抗原を western blot で直接検出する事ができ、USS や後天性 TTP 患者検体についての解析が現在進行中である。一方、A10 を用いた肝組織の免疫染色、mRNA の in situ hybridization、そして A10 (IgG) と  $\alpha$ SMA モノクローナル抗体 (IgG) をそれぞれ蛍光標識した二重免疫染色にて、ADAMTS13 の肝臓での産生主細胞は類洞壁細胞で、しかも非実質細胞である星状細胞 (旧 伊東細

胞)である事を同定した(論文投稿中)。星状細胞は肝繊維化の鈎をにぎる重要な細胞であり、古来、慢性肝疾患とTTP様症状の関連については多くの議論がなされたが決定的な証拠は提示されていない。今回の発見は両病態の関連を直接結び付ける重要な発見と考えられる。

6. アンケート調査:一次調査では、USS 14 症例、後天性TTP 167 例、先天性HUS 17 例、後天性HUS 223 例の回答があった。これをもとに本年度二次調査を実施し、各施設から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。

#### 4. 考察

TTP研究グループ代表である藤村は1998年に本邦で最初にこの酵素活性測定法を確立し(Int J Hematol 2001, Br J Hematol 2001)、以後今日迄全国の医療施設から依頼されたTMA患者についてADAMTS13解析を行った。この結果、同活性著減例はTMA全体の1/3、中等度低下例が1/3、そして軽度低下ないし正常例が残り1/3である事を示した(途中経過をSem Hematol 2004で報告)。著減例の中から先天性TTP(別名USS)を21家系26症例発見し、うち10家系については宮田班員を

中心にADAMTS13遺伝子解析を行い、また後天性TTPについても村田班員を中心に同遺伝子解析を実施し、これらの結果は既報(PNAS 2003, Blood 2004, Blood 2004)もしくは論文投稿中である。また後天性TTPの中で原因不詳(特発性)のものはその56%にADAMTS13自己抗体が検出される事から自己免疫疾患のカテゴリーに入るが、基礎疾患に併発するものは極めて多彩であり、これらの中で初期、多発性硬化症が疑われた血管内リンパ腫に合併したTTP症例と、C型肝硬変経過中に定型的TTPを発症した症例について、いずれもADAMTS13インヒビターの存在を証明し、これら患者に見られる血小板減少の原因を明らかにした(Neurology 2004, J Hepatology 2005)。また後天性TTPのIgG型インヒビターのエピトープは共通してADAMTS13のCys-rich/Spacerドメインにある事を同定(Blood 2003)し、今後本所見の診断への利用が示された。

一方で、宮田班員らはADAMTS13で切断されるVWFサブユニットの73アミノ酸残基(VWF73)を同定し、これは現在ADAMTS13の最小VWF基質単位と考えられている(Blood 2004)。さらにこのVWF73を蛍光標識した合成ペプチドを作成し、短時間でADAMTS13活性を測定しうるFRET-S-VWF73アッセイを構築した(Br J Haematol 印刷中)。

現在さらに藤村らにより大腸菌発現 VWF73 を基質に用いた、安価、迅速、正確なアッセイが構築されつつあり、ADAMTS13 活性測定が各医療施設で行われ、同所で定型的 TTP の迅速診断が行われる日も近いと考えている。また藤村らは ADAMTS13 に対するマウスモノクローナル抗体を作成し、その性状解析後、ELISA と western blot 法により TTP 患者の ADAMTS13 抗原解析を行っている。さらにこの特異抗体が作成された事により、肝臓での同酵素の産生細胞が星状細胞 (旧 伊東細胞) である事を同定した (論文投稿中)。和田班員は後天性 TTP の中で、ADAMTS13 活性著減、かつ同インヒビター陽性例では血漿交換療法が卓効する事を自験例で示し、その治療理論を構築した (Transfusion 2002)。この論文は臨床的にも高い評価を得ている。さらに和田は TMA の頻度や治療の標準化を目指して、全国の医療施設に対する大規模アンケート調査を行い、データを集積中である。

## 5. 結論

ADAMTS13 に対する IgG 型インヒビターが発生し、活性が著減する後天性・特発性 TTP に対して血漿交換療法が奏功する事の EBM (1 インヒビター除去、2 UL-VWFM の除去、3 ADAMTS13 の補充、4 止血に必要な正常 VWF の

補充) を確立した。

しかしながら、TMA 全体の 1/3 はこの酵素活性の著減で説明される定型的 TTP であるが、残り 2/3 の TMA の原因追求が今後の課題である事が示された。さらに、全国の血液疾患診療科を標榜する医療機関に TMA の診断、治療、予後についてアンケート調査を実施し、現在その結果を集計中であるが、本研究サブグループでは、今後、ADAMTS13 以外の TMA 病因として注目されつつある補体調節因子 (factor H、CD46) や血管内皮細胞膜結合糖蛋白質 (CD36、CD39) 等を含めた多角的な解析を行い TMA の系統的診断法の確立を目指す。

## 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. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FFRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. **Br J Haematol** (in press), 2005.
3. 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.
4. 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 polyarthritidis nodosa: demonstration of the inhibitor against von Willebrand factor-cleaving protease. **Clinical Nephrology** (in press), 2005.
5. Fujimura Y. Down-regulation of ADAMTS13 activity by serine proteases. In: *Inside Blood*. **Blood** (Review) 105: 911-912, 2005.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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: 1-6, 2005.
12. 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: 53-57, 2005.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

16. 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.
17. Kokame K, Miyata T: Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. **Semin Hematol** 41:34-40, 2004.
18. 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.
19. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y. Detection of von Willebrand factor -cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. **Biochem Biophys Res Commun** 313(1): 212-6, 2004.
20. 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
21. Fujimura Y. TTP: VWF and ADAMTS-13. **Int J Hematol** (Review). pp77-83, 2003.
22. Fujimura Y. Is Upshaw-Schulman syndrome congenital TTP or HUS? Yes on the both. **J Thromb Haemost** 1: 2457-2458, 2003.
23. Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C, Miyata T, Fujimura Y, Nakagaki T. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. **Blood** 102: 3232-3237, 2003.
24. Nakazawa Y, Hashikura Y, Ogino S, Urata K, Ikegami T, Terada M, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kawasaki S. Significance of measuring von Willebrand factor-cleaving protease activity in thrombotic microangiopathy after living donor liver transplantation. **Liver Transplant** 9: 1328-1333, 2003.
25. Sakurai Y, Shima M, Matsumoto M, Takatsuka H, Nishiya K, Kasuda S, Fujimura Y, Yoshioka A. Anticoagulant activity of M-LA0,



- L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffi*, through selective inhibition of factor IX. **Biochem Biophys Acta** 1649: 51-57, 2003.
26. Wang J, Kimura T, Asada R, Harada S, Yokota S, Kawamoto Y, Fujimura Y, Tsuji T, Ikehara S, Sonoda Y. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34-negative cells assured by intra-bone injection. **Blood** 101:2924-2931, 2003.
27. Sugimoto M, Matsui H, Mizuno T, Tsuji S, Miyata S, Matsumoto M, Matsuda M, Fujimura Y, Yoshioka A. Mural thrombus generation in type 2A and 2B von Willebrand disease under high shear conditions. **Blood** 101: 915-920, 2002.
28. Yasuzawa-Amano S, Inoue M, Yoshida Y, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Yoshioka A. Intensive plasma IgG removal therapy for severe thrombotic thrombocytopenic purpura. **Int J Hematol** 76: 474-476, 2002.
29. Ashida A, Nakamura H, Yoden A, Tamai H, Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y. Successful treatment of a young infant who developed high-titer inhibitors against VWF-cleaving protease (ADAMTS-13): Important discrimination from Upshaw-Schulman syndrome. **Am J Hematol** 71: 318-322, 2002.
30. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y. Mutations and common polymorphisms in *ADAMTS13* gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 11902-11907, 2002.
31. Matsuda J, Sanaka T, Gohchi K, Matsui K, Uchida S, Matsumoto M, Fujimura Y. Occurrence of thrombotic thrombocytopenic purpura in a systemic lupus erythematosus patient with antiphospholipid antibodies in association with a decreased activity of von Willebrand factor-cleaving protease. **Lupus** 11: 463-464, 2002.
32. Matsui T, Hamako J, Matsushita T, Nakayama T, Fujimura Y, Titani K. Binding site on human von Willebrand factor of bitiscetin, a snake venom-derived platelet aggregation inducer.

- Biochemistry USA** 41: 7939-7946, 2002.
33. Park Y-D, Yoshioka A, Kawa K, Ishizashi H, Yagi H, Yamamoto Y, Matsumoto M, Fujimura Y. Impaired activity of plasma von Willebrand factor-cleaving protease may predict the occurrence of hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 29: 789-794, 2002.
34. Mori Y, Wada H, Gabazza EC, Minami N, Nobori T, Shiku H, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y. Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease activity. **Transfusion** 42: 572-580, 2002.
35. Hayashi T, Yagi H, Suzuki H, Nonaka Y, Nomura T, Sakurai Y, Shibata M, Matsumoto M, Yamamoto Y, Fujimura Y. Low-dosage intravenous immunoglobulin in the management of a patient with acquired von Willebrand syndrome associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. **Pathophys Haemost Thromb** 32: 33-39, 2002.
36. Orimo S, Ozawa E, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y. Simple plasma exchange reduced autoantibody to von Willebrand factor-cleaving protease in a Japanese man with ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. **J Intern Med** 251: 280-281, 2002.
37. Fujimura Y, Matsumoto M, Yoshioka A, Matsui T, Titani K. von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. In: Progress in Hematology. **Int J Hamatol (Review)** 75: 25-34, 2002.

#### 学会発表

1. Yagi H, Matsumoto M, Ishizashi H, Soejima K, Nakagaki T, Kokame K, Kimura H, and Fujimura Y. Recombinant ADAMTS13 rapidly and preferentially cleaves unusually-large von Willebrand factor multimers in the plasmas with Upshaw-Schulman syndrome under high shear stress. 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology (於 Philadelphia, 2002年12月9日)
2. 萱島道德、野口幸、松本雅則、八木

- 秀男、石指宏通、藤村吉博、池田直也、小山文一、吉田淳、森下亨 血小板減少と著しい全身症状の悪化を呈した2症例に対して実施した血漿交換療法の劇的効果. 第46回日本輸血学会近畿支部総会(於 郡山、2002年11月30日)
3. 藤村吉博. SCT合併症としてのTMAとVOD:ADAMTS13との関係. 第25回日本造血細胞移植学会総会 ランチョンセミナー(於 大阪、2002年10月25日)
  4. 小亀浩市、松本雅則、副島見事、八木秀男、石指宏通、船戸正久、玉井晋、今野武津子、神出計、河野雄平、藤村吉博、宮田敏行. von Willebrand 因子切断酵素をコードするヒトADAMTS13遺伝子の変異と多型 第75回 日本生化学会大会(於 京都、2002年10月15日)
  5. 高橋幸博、川口千晴、塙坂八重、松本雅則、藤村吉博、吉岡章. 著明なvWF-CPase活性の低下が見られ、生後早期に急死した左心低形成症候群の1例. 第64回 日本血液学会総会、第44回 日本臨床血液学会総会(合同)(於 横浜、2002年9月14日)
  6. 長谷川大一郎、松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博、Upshaw-Schulman症候群の同胞例の解析. 第64回 日本血液学会総会、第44回 日本臨床血液学会総会(合同)(於 横浜、2002年9月14日)
  7. 石丸裕康、中村陽子、東光久、八田和大、郡義明、林孝昌、松本雅則、八木秀男、石指宏通、藤村吉博、バイアグラ服用後 VWF-cleaving protease に対するインヒビターが出現し、TTP様の症状が見られた1例. 第64回 日本血液学会総会、第44回 日本臨床血液学会総会(合同)(於 横浜、2002年9月14日)
  8. 瀧上健吾、田口潤、陣内逸郎、朝長万左男、早田央、松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博. 定型的精神神経症状を欠いた血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の3例. 第64回 日本血液学会総会、第44回 日本臨床血液学会総会(合同)(於 横浜、2002年9月14日)
  9. 松本雅則、八木秀男、石指宏通、森美貴、和田英夫、松井太衛、千谷晃一、木村弘、藤村吉博. 日本人における後天性TTP117例の解析. 第64回 日本血液学会総会、第44回 日本臨床血液学会総会(合同)(於 横浜、2002年9月13日)
  10. 小亀浩市、松本雅則、副島見事、八木秀男、石指宏通、船戸正久、玉井晋、今野武津子、神出計、河野雄平、宮田敏行、藤村吉博. 先天性TTP患者家系に見出されたVWF切断酵

- 素遺伝子の変異と日本人における多型. 第 64 回 日本血液学会総会、第 44 回 日本臨床血液学会総会 (合同) (於 横浜、2002 年 9 月 12 日)
11. 石井禎暢、植村正人、藤本正男、小嶋秀之、吉川正英、安辰一、櫻井伸也、松村吉庸、奥田浩史、高谷章、福井博、田中一郎、嶋緑倫、吉岡章、藤村吉博. 血友病に合併した C 型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の効果とその長期予後、第 3 回日本肝臓病学会 (於 大阪、2002 年 6 月 14 日)
  12. 高橋幸博、川口千晴、塙坂八重、濱田匡章、藤村吉博、吉岡章. Neonatal thrombotic diathesis from VWF-CPase and unusually large VWF multimers. 第 105 回日本小児科学会学術集会 (於 名古屋、2002 年 4 月 19 日)
  13. Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Wada H, Fujimura Y. The Japanese experience of TTP/HUS: Analysis of 290 patients The 45<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology (於 San Diego, 2003 年 12 月 8 日)
  14. Murata M, Uchida T, Suzuki M, Matsubara Y, Tanahashi N, Ogawa S, Saito I, Watanabe K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y. Screening of single nucleotide polymorphisms in the ADAMTS 13 (von Willebrand factor-cleaving protease) gene and studies on their association with stroke and coronary artery disease. The 45<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology (於 San Diego, 2003 年 12 月 8 日)
  15. Uchida T, Wada H, Iwasita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with recurrent hemolytic-uremic syndrome. The 45<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology (於 San Diego, 2003 年 12 月 8 日)
  16. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Specific small substrate to develop a new assay system of ADAMTS-13 activity. Forum: TTP/HUS and VWF-CP. 第 26 回日本血栓止血学会学術総会 (於 東京・京王プラザホテル, 2003 年 11 月 27 日)
  17. 松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博、植村正人、田村信宏、今津博雄、福井博. 慢性肝疾患における ADAMTS-13 活性とそのインヒビター活性の動態. 第 26 回日本血栓止血学会学術総会. (於 東京・京王