

量的、質的解析を行った。

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。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 は現在までに 12 例の遺伝子解析を終了し、10 例の *ADAMTS13* 遺伝子異常を明らかにした。10 例中 2 例がホモ接合体、残りの 8 例が複合ヘテロ接合体であった。異常部位として、ホットスポ

ットは存在せず、様々なドメインに異常を認めた。また、後天性 TTP においても遺伝子解析を進めている。

3. 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 1 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 α 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鉤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。

4. ADAMTS13 以外の TMA 原因検索:本邦 493 例の TMA の検討結果より、ADAMTS13 活性著減による TMA の発症は、1/3 の症例に過ぎず、残りの 2/3 は ADAMTS13 以外の原因が予想される。その病因の一つとして、補体調節因子である factor H が考えられている。我々は factor H に対するポリクローナル抗体および 6 種類のモノクローナル抗体を作成し、現在解析中である。今後、この抗体を用いて、factor H の簡便なスクリーニング法を確立する。

4 考察

当ラボでは、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 USS を 21 家系 26 症例発見し、うち 10 家系については ADAMTS13 遺伝子解析を行い、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、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)。

また、ADAMTS13 活性の著減が TMA の病因と考えられるのは 1/3 にすぎないことより、残り 2/3 の病因を明らかにする必要がある。欧米では、HUS の病因として報告されている factor H

の解析を開始した。今後、同様に補体調節因子であるCD46やADAMTS13が血管内皮細胞と接着する際に関与すると考えられているCD36などの解析を行っていく予定である。

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(インヒビター除去、UL-VWFの除去、ADAMTS13の補充、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。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. 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 polyarthritidis 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- α . **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, Iwadata 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, 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.
15. Fujimura Y. TTP: VWF and ADAMTS-13. **Int J Hematol** (Review). pp77-83, 2003.
16. Fujimura Y. Is Upshaw-Schulman syndrome congenital TTP or HUS? Yes on the both. **J Thromb Haemost** 1: 2457-2458, 2003.
17. 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.
18. 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.
19. Sakurai Y, Shima M, Matsumoto M, Takatsuka H, Nishiya K, Kasuda S, Fujimura Y, Yoshioka A. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffi*, through selective inhibition of factor IX. **Biochem Biophys Acta** 1649: 51-57, 2003.

20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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 Hematol (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. 湊上健吾、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、小寫秀之、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、埴坂八重、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 45th 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 45th 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 45th 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・京王プラザホテル, 2003 年 11 月 28 日)
18. 内田敏弘、和田英夫、岩下実穂、石原宏朗、芝野俊郎、鈴木美佐子、松原由美子、藤村吉博、池田康夫、村田満. 先天性尿毒症症候群 (HUS)

- 症例より見出された新規 *ADAMTS13* 変異. 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 28 日)
19. 畠山金太、丸塚浩助、佐藤勇一郎、山下篤、盛口清香、古小路英二、松本雅則、八木秀男、藤村吉博、浅田祐太郎. 冠動脈硬化巣における CD39/ecto-ATPase 発現の検討. 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 28 日)
 20. 藤村吉博. V VWF 切断酵素 (ADAMTS-13) の動態解析による TTP/HUS 診断法の進歩. 第 31 回内科学の展望 (招待講演) 血液疾患および腎臓疾患の診断と治療の進歩 (於 大阪国際会議場, 2003 年 11 月 9 日)
 21. 藤村吉博. TTP vs ADAMTS-13 異常-見出された血小板減少症の新機構. 第 50 回日本臨床検査医学会総会 (招待講演) 臨床血液専門部会講演会: 後天性止血異常症の現状 (於 広島国際会議場, 2003 年 10 月 30 日)
 22. 藤村吉博、松本雅則、小亀浩市、宮田敏行. Upshaw-Schulman 症候群 7 家系の *ADAMTS13* 遺伝子変異とモデリングによる立体構造解析. 第 45 回日本小児血液学会総会 (招待講演) 於 石川県立音楽堂 2003 年 10 月 17 日)
 23. 藤村吉博. VWF 特異的切断酵素 /ADAMTS-13 による TTP の治療. 第 10 回日本輸血学会秋季シンポジウム (招待講演) (於 弘前文化センター, 2003 年 10 月 4 日)
 24. 藤村吉博. TTP: VWF vs ADAMTS13. 第 65 回日本血液学会総会 / 第 45 回日本臨床血液学会総会 (教育講演) (於 大阪国際会議場 2003 年 8 月 29 日)
 25. 松本雅則、八木秀男、石指宏通、藤村吉博、磯山恵一、山本修平、池田裕一、三森謙一、副島見事. サイクロスポリンが奏功した難治性 TTP 患者の抗 VWF-CP/ADAMTS13 抗体のエピトープ解析. 第 65 回日本血液学会総会 / 第 45 回日本臨床血液学会総会 (於: 大阪国際会議場 2003 年 8 月 29 日)
 26. 森美貴、和田英夫、南信行、珠玖、登勉、松本雅則、八木秀男、石指宏通、藤村吉博. vWF 特異的切断酵素活性が著明低下しない TTP/HUS 例の検討. 第 65 回日本血液学会総会 / 第 45 回日本臨床血液学会総会 (於 大阪国際会議場, 2003 年 8 月 29 日)
 27. 神野正敏、団野大介、中村忍、南野治彦、川原誠、上野聡、松本雅則、藤村吉博. 血漿 vWF-cleaving protease 活性低値で血栓性血小板減少性紫斑病類似の病態を呈した

- intravascular lymphoma. 第 65 回日本血液学会総会/第 45 回日本臨床血液学会総会(於 大阪国際会議場, 2003 年 8 月 29 日)
28. 藤村吉博. TTP、TMA、HUS の検査. 第 4 回日本検査血液学会(教育講演)(於 京都大学総合人間学部キャンパス 2003 年 7 月 6 日)
29. 藤村吉博. TTP/HUS の解釈. 第 4 9 回中部日本系球体腎炎談話会(特別講演)(於 名古屋観光ホテル, 2003 年 6 月 28 日)
30. 藤村吉博. ADAMTS-13 から見た TTP/HUS の解釈. 第 7 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム(特別講演)(於: 奈良県文化会館, 2003 年 6 月 27 日)
31. 藤村吉博. ADAMTS-13 と血小板血栓. 第 6 回山形県血小板と血管研究会(特別講演)(於 山形国際ホテル, 2003 年 5 月 31 日)
32. 藤村吉博. TT/HUS での血漿交換療法の適応と血小板輸血の禁忌: von Willebrand 因子切断酵素(ADAMTS-13)の解析を基にした解釈. 第 27 回奈良県医師会透析部会(教育講演)(於 奈良県文化会館, 2003 年 2 月 2 日)
33. 藤村吉博. TTP と ADAMTS-13 変異. 第 4 回中四国凝固線溶血小板研究会(特別講演)(於 ピュアリテイまきび, 2003 年 2 月 1 日)
34. Moriguchi S, Hatakeyama K, Marutsuka K, Matsumoto M, Yagi H, Sakurai Y, Fujimura Y, Asada Y. Localization and activity of ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 in human tissues. XIX Congress of the ISTH (於 Birmingham UK, 2003 年 7 月 14 日)
35. Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Nakagaki T, Yagi H, Ishizashi H, Miyata T, Fujimura Y. Mutations of ADAMTH13 gene in four Japanese families with Upshaw-Schulman syndrome. XIX Congress of the ISTH (於 Birmingham UK. 2003 年 7 月 14 日)
36. Kokame K, Mstumoto M, Fujimura Y, Miyata T. D1596-R1668 of von Willebrand factor is a minimal region as a specific substrate for ADAMTS-13. XIX Congress of the ISTH. (於 Birmingham UK. 2003 年 7 月 14 日)
37. 松本雅則、八木秀男、石指宏通、前田美和、辻野秀夫、河本順雄、寺田暁美、西田幸世、藤村吉博、萱島道德、野口幸、池田直也、小山文一. 血漿交換療法と血小板輸血についての再考: TTP をモデルとして. 第 51 回日本輸血学会(於 北九州国際会議場, 2003 年 5 月 29 日)

38. 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 (教育講演). 第 31 回内科学の展望-血液疾患および腎疾患の診断と治療の進歩 (於 大阪国際会議場, 2003 年 11 月 9 日).
39. 河敬世、松本雅則、朴永東、小川啓恭、原純一、竹原泰弘、小阪嘉之、原宏、甲斐俊朗、山本益嗣、金丸昭久、福原資郎、日野雅之、平岡諦、藤村吉博. FFP 投与による同種造血幹細胞移植後の VOD 発症予防に関する他施設共同研究. 第 26 回日本造血細胞移植学会 (Workshop) (於 パシフィコ横浜, 2003 年 12 月 19 日)
40. 植村正人、松本雅則、石指宏通、田村信宏、八木秀男、大浦元、藤本正男、今津博雄、桜井伸也、浪崎正、小島秀之、石井禎暢、豊原眞久、山崎正晴、吉治仁志、山尾純一、藤村吉博、福井博. 肝硬変における von Willebrand 因子特異的切断酵素活性と予後に関する検討. 第 35 回日本肝臓学会西部会 (於 ホテルグランビリア岡山, 2003 年 11 月 28 日)
41. 西村滋子、秋山暢、黒澤彩子、中村紳、富山順治、藤田浩、合地研吾、松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博. 妊娠中期に症状が顕性化し、診断された vWF-CP (ADAMTS-13) 活性欠損症: Upshaw-Schulman 症候群が疑われた姉妹例. 第 146 回日本臨床血液学会 (於 シオノギ渋谷ビル, 2003 年 3 月 29 日)
42. Soejima K, Matsumoto M, Banno F, Kokame K, Miyata M, Wada H, Fujimura Y, Nozaki T, Nakagaki T. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) -Structural and functional relationship-. Xth Congress of International Society of Hematology (於 Nagoya, 2004 年 9 月 1 日)
43. Hatakeyama K, Marutsuka K, Yamashita A, Moriguchi A, Imamura T, Shibata Y, Fujimura Y, Asada Y. CD39 expression in human coronary atherosclerotic lesions. Xth Congress of International Society of Hematology (於 Nagoya, 2004 年 9 月 1 日)
44. 藤村吉博. VWF 切断酵素 (ADAMTS13) による血小板血栓の病態解析 (特別講演). 第 17 回東京医科大学「脈管研究会」 (於 東京医科大学講堂, 2004 年 3 月 2 日).
45. 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、小島秀之、桜井伸也、石井禎暢、石川昌利、浪崎正、豊原眞久、山崎正晴、吉治仁志、山尾純一、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 24 回アルコール医学生物学研究会. (於 奈良文化会館 2004 年 3 月 4 日)
46. 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).
47. 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、小嶋秀之、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)
48. 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).
49. 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).
50. 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)
51. 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)
52. 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)
53. 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）
54. 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）
55. 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 ホテルグランピア岡山 2004年10月9日）.
56. 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）
57. 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）
58. 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）
59. 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）
60. 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）
61. 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）
62. 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）
63. 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)

64. 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)

4. 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

8. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)

1. 血栓形成傾向素因の検査方法

出願人:国立循環器病センター総長

発明人:宮田敏行、小亀浩市、松本雅則、藤村吉博、河野雄平

2002年4月12日国内出願

2. フォンビルブランド因子特異的切断酵素に対する抗体の認識領域からなる構成物

出願人:財団法人化学及血清療法研究所

発明人:副島見事、中垣智弘、松本雅則・藤村吉博、内野衿自

2003年3月17日国内出願

3. 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

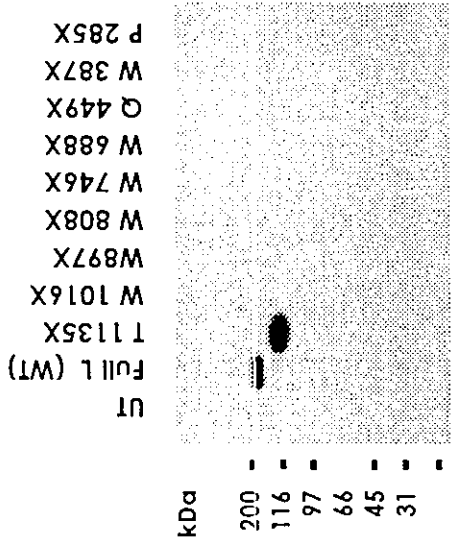
発明人:藤村吉博、松本雅則、森俊雄
2004年10月19日国内出願

表 1. 過去 7 年間に奈良医大輸血部で集積した本邦TTP/HUS患者 493 例：
ADAMTS13とそのインヒビター活性（平成16年10月末）

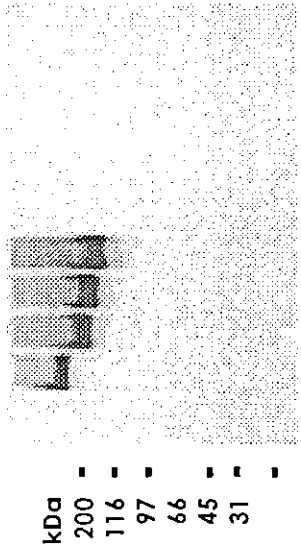
	先天性 TTP/HUS (n=41)	後天性 TTP (n=381)						後天性 HUS (n=71)		
	Upshaw-Schulman 症候群 (n=26)	特発性 (n=166)	膠原病 (n=111)	悪性腫瘍 (n=36)	造血幹細胞移植 (n=26)	妊娠 (n=12)	薬物 (n=12)	その他 (n=18)	特発性 (n=48)	0157 Mitomycin (n=17)
ADAMTS13 活性(%)										
< 3	26	93	18	3	0	5	12	2	0	0
3-<25	0	67	46	12	12	4	0	9	6	2
25-<50	0	6	24	15	8	2	0	2	26	7
≥50	0	0	23	6	6	1	0	5	16	8
インヒビター Bethesda U/ml)										
< 0.5	25	19	33	11	8	2	0	2	35	10
0.5-<2	1	78	30	5	1	4	8	5	0	0
≥2	0	53	3	2	0	1	4	0	0	0
	(n=26*)	(n=150*)	(n=66*)	(n=18*)	(n=9*)	(n=7*)	(n=12*)	(n=7*)	(n=35*)	(n=10*)
	(n=15*)									

* TTP/HUS患者493名中、インヒビター活性の測定が終了しているのは359名である。

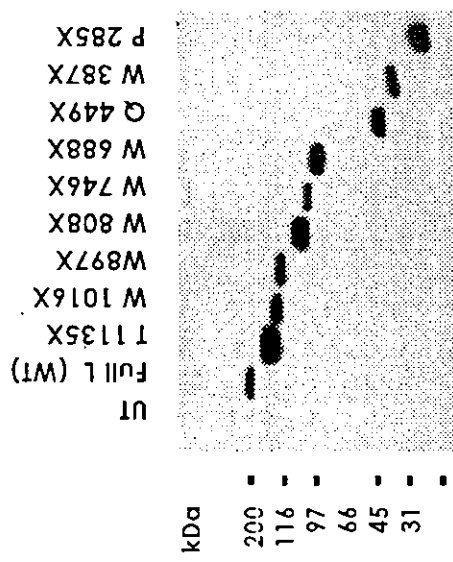
* ADAMTS13活性著減例は全体の約1/3：159/493 (32%)



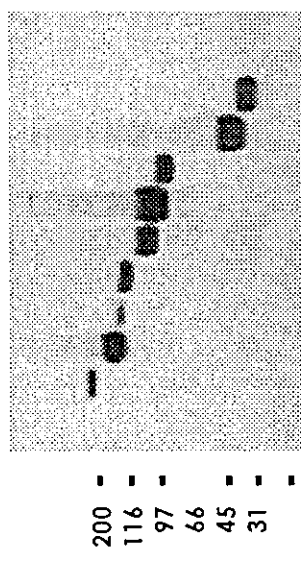
C7



WH2-11-1



anti-Flag



A10

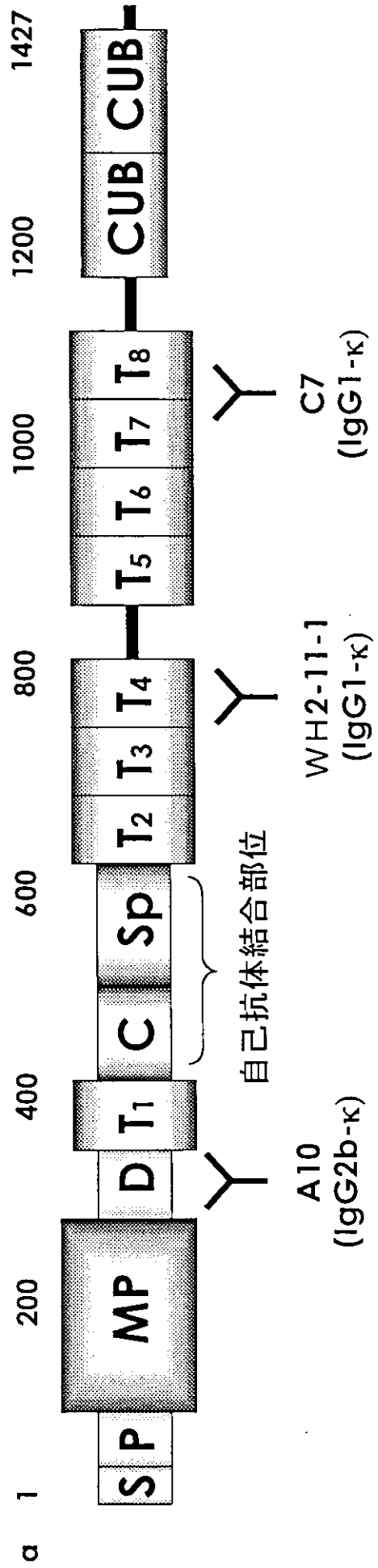


図1. 抗ADAMTS13モノクローナル抗体のエピトープ

総合分担研究報告書

血栓症における ADAMTS13 の関与

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。我々は先天性 (家族性) TTP と考えられる患者のゲノム DNA を用いた遺伝子解析を行った。症例は HUS 症状を頻繁に示す成人男性で、ADAMTS13 活性は 3% 以下であった。また、父親の ADAMTS-13 活性にも著明な低下が認められた。末梢血からゲノム DNA を抽出し、ADAMTS13 遺伝子の全 exon と exon-intron 境界領域について塩基配列を解析した結果、患者サンプルから metalloprotease domain に 2 つの新規変異が見出された。一つは Ala250Val で、他方は exon3 直後イントロン内の guanine から adenine への変異である (intron3 G/A)。発現実験により、A250V 変異は ADAMTS13 酵素活性を著明に低下させること、intron 3 G/A 変異は RNA スプライシング異常を引き起こすことで蛋白産生障害をおこすことが示された。このように本酵素の欠損は HUS/TTP の原因となることは明白であるが、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。そこで 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

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。先天性の TTP 患者における ADAMTS13 遺伝子異常の解析はこの分子の構造-機能相関に重要な知見をもたらすものと考えられる。最近我々は先天性 (家族性) TTP と考えられる患者を経験したのでゲノム DNA を用いた遺伝子解析を行うとともに異常 ADAMTS13 分子の遺伝子発現実験を行った。一方、ADAMTS13 の軽度の低下が多因子疾患である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。そこで

(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

症例検討に関しては、HUS 症状を頻繁に示す成人男性を解析した。平成 12 年痔の手術後より痙攣発作出現したため A 病院を受診、腎不全、貧血、血小板減少から TTP が疑われた。FFP の投与により症状は改善したが平成 13 年 8 月上旬記症状が再燃し、B 病院入院、FFP の投与により再び改善した。以後外来で FFP 4 単位/週の投与を受けていた。入院時：末梢血 RBC $212 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、Hb 6.8g/dl、WBC $3600 / \mu\text{l}$ 、PLT $7.0 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、Reticulocyte $13 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、生化学 LDH 414u/L、T-Bil 2.2mg/dl、BUN 44mg/dl、Creatinine 3.8mg/dl、血漿 ADAMTS13 活性：本人 3%未満、父 46%、母 46%、本人 ADAMTS13 インヒビターは陰性であった。同意を得た上で患者本人およびその母親の末梢血からゲノム DNA を抽出した。ADAMTS13 遺伝子の全 exon と exon-intron 境界領域について塩基配列を解析した。PCR を用いて ADAMTS13 遺伝子の全 29exon と exon-intron 境界領域を増幅し、ABI 3100 sequencer を用いて塩基配列の解

析を行った。発見された変異の頻度の検討はTTP/HUSを有さない集団

(intron3 G/A 772例、A250V66例)について塩基配列を解析した。A250V発現系の構築は、発現ベクター(pcDNA3.1)にADAMTS13およびA250V変異体のcDNAを導入し、HEK293細胞に発現させた。培養上清をWestern blotとADAMTS13活性測定に供した。intron3 G/Aはスプライス異常を来す可能性があるため、mini-gene発現系で産生されるmRNAを検討した。ヒト胎児肝臓cDNAライブラリーから得られたADAMTS13のcDNAをクローニングし、HEK293細胞を用いた発現系で検討した。

ADAMTS13多型と血栓症の関連については、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

患者サンプルからmetalloprotease domainに2つの新規変異が見出された(両変異ともヘテロ接合体)。一方は1アミノ酸変異(Ala250Val)を引き起こし、他方はexon3直後イントロン内のguanineからadenineへの変異で(intron3 G/A)、新たなスプライス部位が形成される結果、RNAスプライシングに影響を及ぼす可能性が考えられた(図1)。

図1

