

要であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

英文原著

1. Morishita T, Matsumoto M, Honoki K, Yoshida A, Takakura Y, Fujimura Y. Successful Treatment of Primitive Neuroectodermal Tumor-associated Microangiopathy with Multiple Bone Metastases. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37:66-69.
2. Kobayashi T, Wad H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H. Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thomb Res* 2007;119:447-452.
3. Ito S, Okuyama K, Nakamura T, Tetanishi JI, Saito K, Matsumoto M, Fujimura Y, Aihara Y, Yokota S. Intravenous gamma globulin for thrombotic microangiopathy of unknown etiology. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:301-305.
4. Matsuyama T, Uemura M, Ishikawa M, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Morioka C, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Fujimura Y, Fukui H. Increased von Willebrand factor over decreased ADAMTS13 activity may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:27S-35S.
5. Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Soejima K, Nakagaki T, Fujimura Y. Quantitative western blot analysis of plasma ADAMTS13 antigen in patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res*. 2007;120:381-386
6. Yagi H, Ito S, Kato S, Hiura H, Matsumoto M, Fujimura Y. Plasma levels of ADAMTS13 antigen, determined by an enzyme immunoassay using the neutralizing monoclonal antibody, parallel to those of the activity. *Int J Hematol* 2007, 85: 403-407.
7. Bennett CL, Benjamin K, Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Buffie CG, McKoy JM, Tevar AD, Cursio JF, Yarnold PR, Kwaan HC, De Masi D, Sarode R, Raife TJ, Kiss JE, Raisch DW, Davidson C, Sadler JE, Ortel TL, Zheng XL, Kato S, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y. Two mechanistic pathways for thienopyridine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura: A report from the Surveillance, Epidemiology, and Risk Factors for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (SERF-TTP) research group and the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *J Am Coll Cardiol* 2007, 50:1138-1143.
8. Matsumoto M, Kawa K, Uemura M, Kato S, Ishizashi H, Isonishi A, Yagi H, Park YD, Takeshima Y, Kosaka Y, Hara H, Kai S, Kanamaru A, Fukuhara S, Hino M, Sako M, Hiraoka A, Ogawa H, Hara J, Fujimura Y. Prophylactic fresh frozen plasma infusion may prevent the development of hepatic VOD after stem cell transplantation via ADAMTS13-mediated restoration of von Willebrand factor plasma levels. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:251-259.
9. Furukoji E, Tanaka N, Yamashita A, Matsumoto M, Fujimura Y, Yamamoto R, Tamura S, Asada Y. Ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase inhibits ATP- and ADP-induced vasoconstriction.

- Thromb Res** (in press)
10. Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Inherited and *de novo* mutations of *ADAMTS13* in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. **J Thromb Haemost** 2008;6:213-215
 11. Kato K, Kobayashi C, Katayama Y, Moriyama N, Shiono J, Kudo K, Koide K, Aoki K, Fujisawa K, Okada M, Matsumoto M, Fujimura Y, Tsuchida M. A one-month-old boy with acute idiopathic thrombocytopenic purpura complicated with intracranial hemorrhage in association with minor head trauma. **J Ped Hematol Onc** 2007 (in press).
 12. Shida S, Nishio K, Sugimoto M, Mizuno T, Hamada M, Kato S, Matsumoto M, Okuchi K, Fujimura Y, Yoshioka A. Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. **Blood** 2008;111:1295-1298

日本語原著

1. 金子仁臣, 松本雅則, 岡本浩平, 蝶名林和久, 菱沢方勝, 渡邊光正, 藤村吉博, 通堂満. Rituximab と vincristine 併用が奏効した難治性血栓性血小板減少性紫斑病. **臨床血液** 48:144-147, 2007
2. 福迫俊弘, 山下博史, 尾本雅俊, 松田万幸, 篠原健次, 藤村吉博. 塩酸クロピドグレルにより血栓性血小板減少性紫斑病をきたした脳梗塞の 1 例. **臨床神経学** 47: 635-638, 2007

日本語総説

1. 松本雅則, 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)診断におけ

る ADAMTS13 解析. **日本検査血液学会雑誌** 8, 383-391, 2007

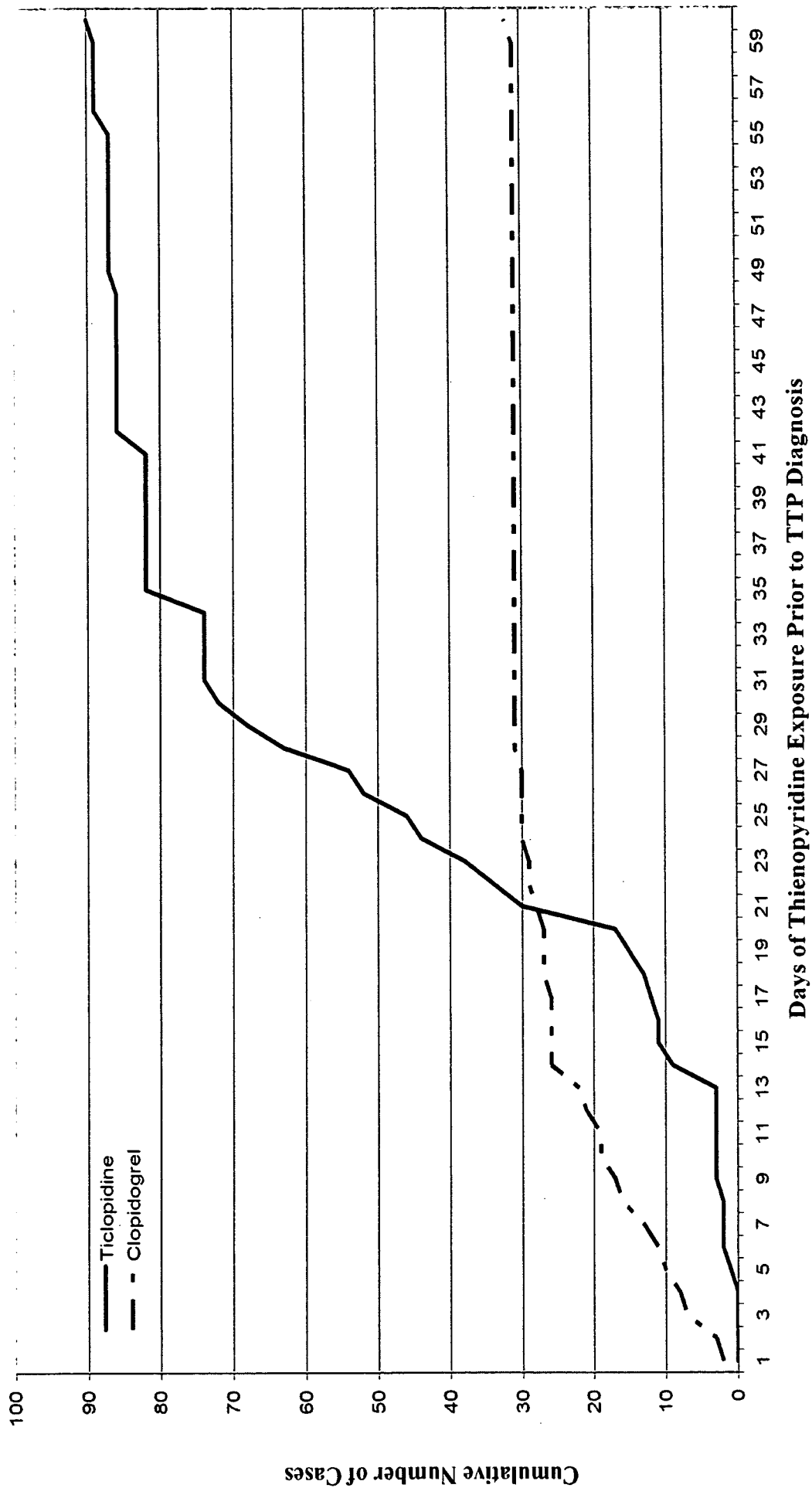
2. 藤村吉博, 松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病の成因と治療. **BIO Clinica** 22:332-337.2007
3. 八木秀男, 松本雅則, 藤村吉博. 血栓症. **Modern Physician** 27:518-521, 2007
4. 八木秀男, 松本雅則, 藤村吉博. 血栓性微小血管障害症による脳神経症状. **日内会誌** 96: 353-362, 2007
5. 松本雅則, 藤村吉博. von Willebrand 病-最近の進歩. **Annual Review 血液** 2008. pp211-220

学会発表

1. Matsumoto M, Fujimura Y. The ADAMTS13 analysis on thrombotic microangiopathies in Japan, 6th World Congress of the International Society for Apheresis/World Apheresis Association 11th Congress, Yokohama (Japan), 2007
2. Hiura H, Isonoshi A, Kato S, Matsumoto M, Fujimura Y. Immuno-purification of ADAMTS13 and its physico-chemical characterization. XXI Congress of the ISTH, Geneva (Switzerland), 2007
3. Koyama N, Makinodan K, Tamaki S, Fukuoka A, Hamada K, Matsumoto M, Fujimura Y, Kimura H. Alteration of von Willebrand factor and ADAMTS13 activity and its clinical significant in patients with obstructive sleep apnea syndrome. XXI Congress of the ISTH, Geneva (Switzerland), 2007
4. Matsuyama T, Matsumoto M, Isonishi A, Uemura M, Inokuma S, Fujimura Y. Analysis of ADAMTS13 in patients with collagen disease-associated TMAs.

- XXI Congress of the ISTH, Geneva (Switzerland), 2007
5. Matsuyama T, Matsumoto M, Isonishi A, Inokuma S, Fujimura Y. Analysis of ADAMTS13 and its IgG-autoantibodies in 170 patients with connective tissue disease-associated thrombotic microangiopathy indicates more than 2 types on its pathogenesis. 49th ASH annual meeting. Atlanta (USA), 2007
 6. Bennett CL, Luu TH, Zakarija A, Kwaan HC, Bandarenko N, Pandey DK, Curio JF, McKoy JM, Buffie C, Winters JL, Ortel TL, Sarode R, Zheng XL, Raife TJ, Matsumoto M, Fujimura Y, Rock GA. Clinical and outcomes findings for thrombotic thrombocytopenic purpura among 467 persons with severely versus not severely deficient ADAMTS-13 levels. 49th ASH annual meeting. Atlanta (USA), 2007
 7. Richey EA, Bennett CL, Kwaan HC, Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Yarnold PR, Raisch DW, Winters JL, Raife TJ, Curio JF, Fisher MJ, Ortel TL, Tallman MS, Matsumoto M, Fujimura Y, Moake JL. Ticlopidine- and Clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): final results from the surveillance epidemiology and risk factor- TTP study group. 49th ASH annual meeting. Atlanta (USA), 2007
 8. Morioka C, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Ishikawa M, Ishizashi H, Fujimoto M, Tsujimoto T, Nishio K, Okuchi K, Fujimura Y, Fukui H. Plasma ADAMTS13 activity markedly decreased in patients with severe acute pancreatitis: Its potential role on the development of multiorgan failure. 49th ASH annual meeting. Atlanta (USA), 2007
 9. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Isonishi A, Matsuyama T, Kato S, Ishizashi H, Shida Y, Kenji N, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuraishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Sugimoto M, Wada H, Murata M, Miyata T, Ikeda Y. Natural history of 33 patients with Upshaw-Schulman syndrome has revealed that all the gravida develop thrombocytopenia, often followed by thrombotic microangiopathy with stillbirth. 49th ASH annual meeting. Atlanta (USA), 2007
 10. 竹山佳織、川本紀子、辻博之、永峰知子、中村恵子、松本雅則、藤村吉博. Upshaw-Schulman 症候群患者への小分け調整 FFP 投与の試み. 第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会, (於: 名古屋国際会議場, 平成 19 年 6 月 2 日)
 11. 松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 診断における ADAMTS13 解析、第 8 回日本検査血液学会学術集会 (シンポジウム) (於: 福井市フェニックスプラザ、平成 19 年 7 月 22 日)
 12. 志田泰明、杉本充彦、水野智寛、濱田匡章、吉岡 章、西尾健治、福島英賢、奥地一夫、加藤誠司、松本雅則、藤村吉博. 全血流動下における ADAMTS13 活性発現メカニズムの解析. 第 69 回日本血液学会総会、第 49 回日本臨床血液学会総会. (於: パシフィコ横浜、平成 19 年 10 月 11 日)
 13. 松本雅則、加藤誠司、石西綾美、松山友美、藤村吉博、植村正人、石川昌利、森岡千恵、福井博. 慢性肝疾患における血漿 ADAMTS-13 活性および抗原の動態解析. 第 69 回日本血液学会総会、第 49 回日

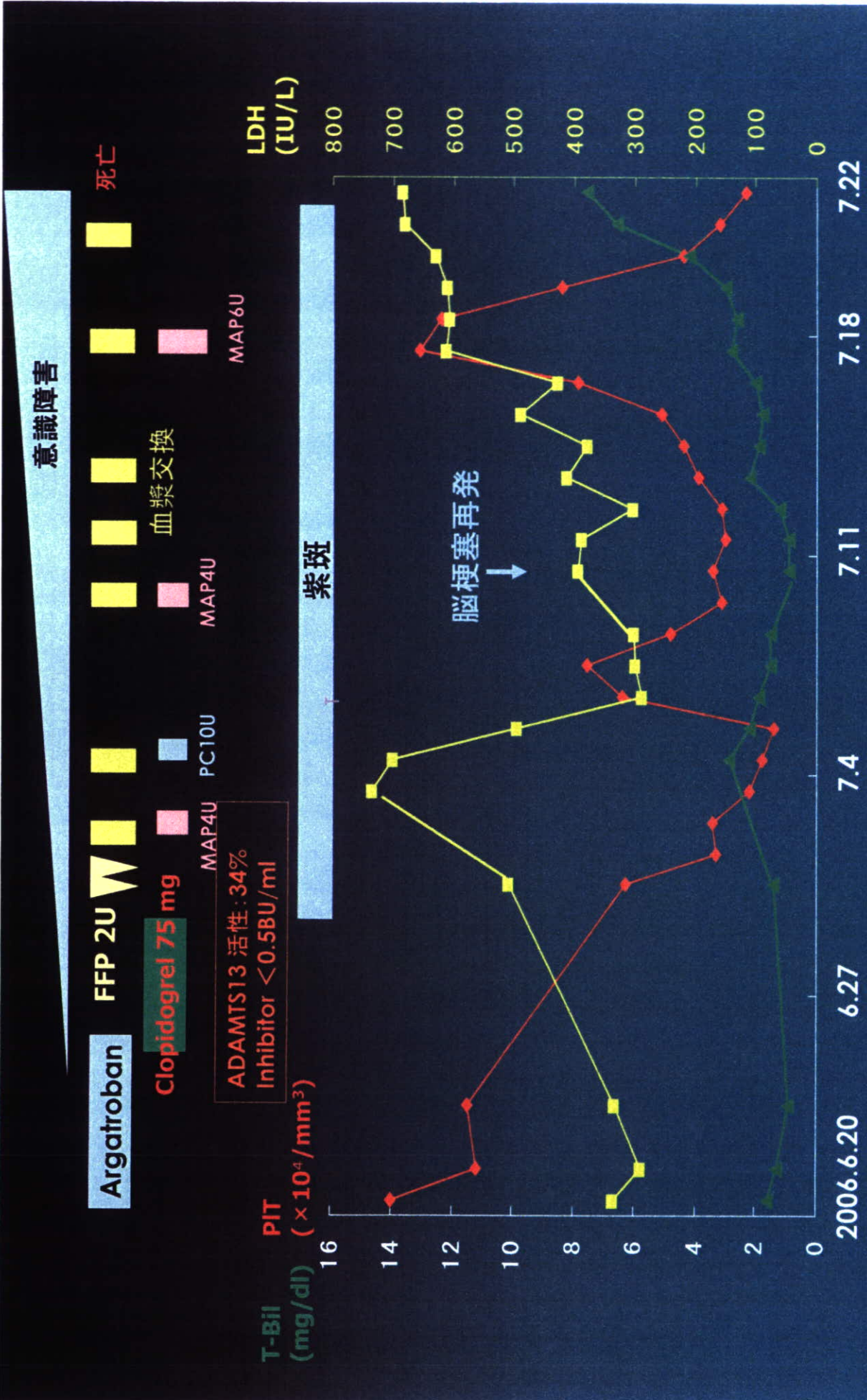
- 本臨床血液学会総会。（於：パシフィコ横浜、平成19年10月11日）
14. 柳生友浩、永田泰之、大谷知穂、玉島貞宏、松本雅則、藤村吉博。紫斑を初発症状とした成人期 Upshaw-Schulman 症候群の一例。第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会。（於：パシフィコ横浜、平成19年10月11日）
 15. 志田泰明、杉本充彦、水野智寛、濱田匡章、吉岡章、西尾健治、奥地一夫、加藤誠司、松本雅則、藤村吉博。血流下での ADAMTS13 による壁血栓成長制御メカニズム—ざり速度との機能連関解析。第30回血栓止血学会学術集会（於：賢島宝生苑・志摩観光ホテル、平成19年11月15日）
 16. 松本雅則、植村正人、加藤誠司、石指宏通、石西綾美、八木秀男、藤村吉博。新鮮凍結血漿（FFP）の予防的投与は造血肝細胞移植後の肝 VOD 発症を予防する。第30回血栓止血学会学術集会（於：賢島宝生苑・志摩観光ホテル、平成19年11月15日）
 17. 八木秀男、山口直子、松本雅則、志田泰明、西尾健治、杉本充彦、椿和央、藤村吉博。妊娠発症型 Upshaw-Schulman 症候群における TTP 発症機序の検討。第30回血栓止血学会学術集会（於：賢島宝生苑・志摩観光ホテル、平成19年11月15日）
 18. 日裏久英、石西綾美、加藤誠司、松本雅則、松井太衛、藤村吉博。ADAMTS13 の血漿からの精製とその物理的及び化学的性質。第30回血栓止血学会学術集会（於：賢島宝生苑・志摩観光ホテル、平成19年11月15日）
 19. 植村正人、森岡千恵、松山友美、松本雅則、加藤誠司、石指宏通、石川昌利、藤本正男、辻本達寛、奥地一夫、福井博、藤村吉博。重症急性膵炎における血漿 von Willebrand 因子特異的切断酵素（ADAMTS13）活性の動態。第30回血栓止血学会学術集会（於：賢島宝生苑・志摩観光ホテル、平成19年11月15日）
 20. 石西綾美、松本雅則、松山友美、児山紀子、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、結石杏奈、加藤誠司、丹羽欣正、藤村吉博。適正な血小板輸血を行うための ADAMTS13 活性と HIT 抗体の測定。第51回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会学術講演会（於：和歌山、平成19年12月1日）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



Days of Thienopyridine Exposure Prior to TTP Diagnosis

図1 チクロピジンとクロピドグレルTTPの発症時期の相違

[Bennett CL et al. J Am Cardiol 2007;50:1138-1143]



(臨床神経、47:635-638,2007)

図2 クロピドグレルTTPの臨床経過

表1 チクロピジンとクロピドグレルTTPの臨床的特徴 (SERF-TTP)

	All Patients N=128	Thieno- pyridine Rx ≤ 14 days N=35	Thieno- pyridine Rx >14 Days N=93	Ticlopidine N=93	Clopidogrel N=35	ADAMTS13 Deficient N=26	ADAMTS13 Non- Deficient N=13
Mean Age-Years (Standard Deviation)	62.4 (13.9)	59.8 (20.5)	63.4 (20.3)	64.2 (12.9)	58.1 (15.3)	67.1 (12.0)	60.3 (20.2)
Male	53.7 %	57.1 %	52.3 %	53.4 %	54.3 %	46.2 %	61.5 %
Thienopyridine Rx ≤ 14 days	27.3 %			9.7 % ¹	74.3 % ¹	15.4 %	38.5 %
ADAMTS13 Deficient	66.7 %	44.4 %	73.3 %	80 % ²	22.2 % ²	96.2 % ⁵	38.5 % ⁵
Platelet Count < 20,000/mm ³	77.3 %	65.7 % ³	81.7 % ³	83.9 % ⁴	60.0 % ⁴	26.9 %	46.2 %
Creatinine > 2.5mg/dl	35.6 %	41.9 %	32.9 %	27.8 % ⁶	55.2 % ⁶		
Abnormal neurologic findings	29.1 %	33.3 %	27.3 %	27.8 %	32.3 %	19.2 %	15.4 %
Received TPE	76.6 %	74.3 %	77.4 %	74.2 %	82.9 %	84.6 %	92.3 %
Survival	74.2 %	77.1 %	73.1 %	75.3 %	71.4 %	84.6 %	61.5 %

*P < 0.05 for 1, 2, 4, 5, and 6; P = 0.07 for 3.

[Bennett CL et al. J Am Cardiol 2007;50:1138-1143]

表 2 血漿交換(TPE)の有無による生存率の違い

	Survival with TPE	Survival without TPE
All Patients (N=128)*	81.6 %	50.0 %
Ticlopidine (N=93) *	85.5 %	45.8 %
Ticlopidine Rx ≤ 14 days (N=9)	100.0 %	100.0 %
Ticlopidine Rx > 14 days (N=84) *	84.1 %	38.1 %
Clopidogrel (N=35)	72.4 %	66.7 %
Clopidogrel Rx ≤ 14 days (N=26)	70.0 %	66.7 %
Clopidogrel Rx > 14 days (N=9)	77.8 %	-
Thienopyridine Rx ≤ 14 days (N=35)	76.9 %	77.8 %
Thienopyridine Rx > 14 days (N=93) *	83.3 %	38.1 %

***P < 0.05**

表3 奈良医大で経験したチクロピジンとクロピドグレルTTP

No	Gender	Age	ADAMTS13 activity (%)		Inhibitor (BU/ml)	Duration of ticlopidine	Platelet (10*9/L)	Hemoglobin (g/dl)	Creatine (mg/ml)	Neurological findings	Outcome
			VWFM	ELISA							
Tc1	M	73	<3	<0.5	17	29	8	7	1.9	+	survival
Tc2	M	41	<3	<0.5	2	22	15	6.4	1.4	-	survival
Tc3	M	68	<3	<0.5	1	30	8	8.2	0.99	-	survival
Tc4	F	85	<3	<0.5	2.3	26	4	8.6	0.85	+	survival
Tc5	F	81	10	15	1.9	65	1	3.1	10.9	-	dead
Tc6	F	78	<3	3.6	1.5	35	9	8.1	1.5	+	survival
Tc7	M	70	<3	<0.5	4.4	21	5	7.3	2.3	-	survival
Tc8	M	61	<3	<0.5	2.3	19	4	6.8	1	+	survival
Tc9	M	68	<3	<0.5	2.4	26	9	7.6	1.5	+	dead
Tc10	F	65	<3	<0.5	2	14	3	8.4	1.8	+	survival
Tc11	F	78	9	13	1.2	42	43	10.3	2.3	-	survival
Tc12	F	66	<3	<0.5	1.6	29	14	7.6	0.92	+	survival
Tc13	F	68	<3	1.7	0.8	30	18	9	0.6	+	survival
Tc14	F	74	<3	<0.5	2.1	26	3	6.3	1	+	survival
Tc15	M	69	<3	1.0	2.1	31	12	8.6	2.1	+	survival
Tc16	M	66	<3	<0.5	25	22	7	7.2	2.92	-	dead
Tc17	M	73	<3	<0.5	1.6	35	12	8	2.3	+	survival
Tc18	F	59	<3	<0.5	9	21	16	?	?	?	survival
Tc19	M	56	-	<0.5	38	19	9	8.3	6.47	+	survival
Tc20	F	84	-	70	<0.5	15	34	9.5	1.6	-	survival
Cl1	F	80	28	33	<0.5	4	14	6.7	0.7	+	Dead*

表4 チクロピジンとクロピドグレル-TTPの比較

	チクロピジン	クロピドグレル
TTP発症までの薬剤投与期間	長い (2週間～1ヶ月)	短い (2週間以内)
ADAMTS13活性	著減	軽度の低下
血小板低下	高度	軽度
腎障害	軽度	高度
血漿交換の有効性	有効	明らかではない
TTP発症の機序	免疫学的	非免疫学的

ADAMTS13 における VWF 結合部位ならびに後天的 TTP 患者 IgG 結合部位の エピトープ解析

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部臨床検査医学・教授
研究協力者 森木 隆典 慶應義塾大学保健管理センター・講師

研究要旨 昨年度我々は、ファージディスプレイ法を用いて ADAMTS13 内のフォンビルブランド因子 (VWF) 結合エピトープ配列を探索した結果、スパーサー領域の C 末端および中央部に 2 ケ所、それぞれアミノ酸 15 個 (エピトープ A)、24 個 (エピトープ B) より構成される VWF 結合エピトープ配列を見出した。本年度においては、これらの配列を有する合成ペプチドを作製し、ADAMTS13 の VWF 切断活性に対する阻害効果および VWF への結合能を評価したところ、エピトープ B はエピトープ A よりも強い ADAMTS13 活性阻害効果および VWF 結合能を示すことが明らかとなった。スパーサー領域は後天的血栓性血小板減少性紫斑病 (以下 TTP) 患者 IgG の結合部位とする報告が多いため、次に我々は同様の方法を用いて、ADAMTS13 における TTP 患者 IgG の結合エピトープ配列を探索することにした。13 人の TTP 患者血漿より精製した IgG サンプルについてエピトープ解析を行ったところ複数の結合エピトープが得られたが、13 人中 6 人にスパーサー領域の配列が見出され、その中の 5 人はスパーサー領域 C 末部の同じアミノ酸配列を IgG 結合エピトープとして有していた。さらに、その共通のアミノ酸配列は、VWF 結合配列エピトープ A を含んでいた。これらの事実より、ADAMTS13 のスパーサー領域は主要な VWF 結合部位であり、さらに後天的 TTP においては、この領域に自己抗体 IgG が結合するために ADAMTS13 と VWF の結合に支障をきたし、VWF マルチマーが分解されにくくなることが示唆された。この結果、血流中に高分子 VWF マルチマーが増加することが、TTP 発症の誘引となっていることが予想される。

A. 研究目的

従来の報告によれば、ADAMTS13 における VWF 結合部位としてシステインリッチおよびスパーサー領域が重要であ

ることが示されており、さらに TTP 患者自己抗体 IgG の主要な結合部位としてスパーサー領域が挙げられている。我々は、ADAMTS13 のスパーサー領域が

VWF 結合部位として主要な役割を果たしており、この領域に自己抗体が結合することが後天的 TTP 発症の重要な引き金になるのではないかという仮説を持った。この仮説を確かめるために、本研究の目的は、大きく分けて2つの要素から構成されている。第1は、ADAMTS13 における VWF 結合エピトープ配列を探索し、その性質を解析することである。第2は、TTP 患者自己抗体 IgG が ADAMTS13 のどの領域に主に結合するのかを明らかにすることである。

第1の目的は昨年度より継続している内容である。ファージディスプレイ法を用いて探索した結果、ADAMTS13 スペーサー領域の C 末端および中央部に2ヶ所の VWF 結合エピトープ配列を見出している。これらのアミノ酸配列を化学的に合成し、VWF との結合力や、ADAMTS13 における VWF 切断活性の阻害効果を検証し、その性質を比較検討する。これらのデータから ADAMTS13 と VWF の結合分子機序の解明を目的とした。

第2の目的は本年度より開始した内容である。後天的 TTP 発症には、ADAMTS13 に結合する自己抗体が出現することが大きく関与していると考えられている。第1の目的で使用したファージディスプレイ法を用いると、TTP 患者自己抗体が結合する ADAMTS13 のアミノ酸配列を解析することが可能に

なる。複数の TTP 患者血液由来の自己抗体について、その ADAMTS13 上の結合部位を明らかにすることにより、疾患発症の機序解明を目的とした。

B. 研究方法

第1の目的である ADAMTS13 スペーサー領域に存在する VWF 結合エピトープ配列の解析については、昨年度明らかになったスペーサー領域の C 末端および中央部の、それぞれアミノ酸15個 (エピトープ A)、24 個 (エピトープ B) のアミノ酸配列を化学的に合成したペプチドを使用した。これらの合成ペプチドにつき、VWF との結合力および ADAMTS13 の VWF 切断活性に対する阻害効果を評価することにした。

VWF との結合力については、表面プラズモン共鳴法に基づくシステム (BIAcore) を使用した。純化した VWF をセンサーチップ上に固定化し、その表面に対し合成ペプチドの希釈系列を流動させることにより結合定数および解離定数を測定した。

ADAMTS13 の VWF 切断活性阻害効果については2種類の方法を使用した。ADAMTS13 の酵素活性を測定する方法として開発された FRET-S-VWF73 を用い、リコンビナント ADAMTS13 の FRET-S-VWF73 切断活性を、合成ペプチドの希釈系列がどの程度阻害するかを検討した。また、もう1つの方法とし

て、VWF マルチマーに 2 価陽イオンおよび尿素を添加して構造変化を誘発し、リコンビナント ADAMTS13 を加えてインキュベートしたものを SDS アガロースゲルにて泳動し、抗 VWF 抗体でウェスタンブロットすることにより VWF マルチマーの切断過程が評価できるが、この系に合成ペプチドの希釈系列を加え、その阻害効果を検討した。

第 2 の目的は、TTP 患者血液由来の自己抗体について、その ADAMTS13 上の結合部位を明らかにすることであるが、方法としては、昨年度作製した ADAMTS13 のペプチド断片を表面に発現するファージライブラリーを引き続き使用しスクリーニングを行った。後天的 TTP 患者 10 人の血漿を三重大学から供与を受け、さらに 3 人の精製された TTP 患者 IgG を奈良県立医科大学から供与された。当該患者サンプルの取り扱いについては、慶應義塾大学医学部倫理委員会に申請し承認を得ている。これらの患者サンプル由来の精製 IgG をマイクロタイタープレート上に固相化し、ADAMTS13 のペプチド断片を表面に発現しているファージライブラリーをスクリーニングした。得られたファージの DNA 塩基配列を解析することにより、TTP 患者 IgG に結合するアミノ酸配列を求めた。

C. 研究結果

ADAMTS13 の VWF 結合配列として見出されたスペーサー領域の 2 ヶ所のアミノ酸配列を、それぞれエピトープ A、エピトープ B とし、これらの配列を有する合成ペプチドを作製した。表面プラズモン共鳴による VWF との結合力測定においては、 K_D 値として、エピトープ A : 4.08×10^{-6} 、エピトープ B : 3.07×10^{-7} がそれぞれ得られた。

FRETS-VWF73 による ADAMTS13 の切断活性に対する阻害効果の検討では、100 μ M の合成ペプチド濃度においてエピトープ A が 40%、エピトープ B が 70%、ADAMTS13 の酵素活性を抑制した。SDS アガロース泳動による ADAMTS13 の VWF マルチマー切断活性に対する阻害効果の検討においても、エピトープ B はエピトープ A よりも強い阻害作用を有していた。これらの結果より、エピトープ B はエピトープ A よりも強い ADAMTS13 活性阻害効果および VWF 結合能を示すことが明らかとなった。

TTP 患者 IgG が結合する ADAMTS13 アミノ酸配列探索について、13 人の TTP 患者血漿より精製した IgG サンプルを用いてファージライブラリーのスクリーニングを行ったところ複数のアミノ酸配列が得られた。なかでも 13 人中 6 人にスペーサー領域の配列が見出され、その中の 5 人はスペーサー領域 C 末部の同じアミノ酸配列を IgG 結合エピトープとして有していた。さらに、その

共通のアミノ酸配列は、VWF 結合配列エピトープ A を含んでいた。

D. 考察

ADAMTS13 における VWF 結合エピトープ配列として昨年度見出されたスペーサー領域の C 末端（エピトープ A）および中央部（エピトープ B）に対応する合成ペプチドを使用した解析により、エピトープ B はエピトープ A よりも強い VWF 結合能および ADAMTS13 活性阻害効果を示した。ファージライブラリーのスクリーニングにより最初に見出されたのはエピトープ A であり、エピトープ B は、スクリーニング系にエピトープ A に対応する合成ペプチドを加えた結果見出されたアミノ酸配列である。また、得られたファージクローンにおいて、エピトープ B の N 末および C 末アミノ酸はすべて共通していたことより、特異性の高い配列であると考えられる。これらの結果を考えると、ADAMTS13 と VWF の結合は、まず第 1 段階として比較的弱い結合力を有するエピトープ A を介して始まり、引き続き VWF の構造変化によりエピトープ B の結合部位が露出し、第 2 段階としてエピトープ B を介してより強固な結合がなされるという機序が想定される。

後天的 TTP における ADAMTS13 自己抗体 IgG の結合部位としてスペーサー領域の重要性が指摘されていたが、今回

の詳細なエピトープ解析により、スペーサー領域の C 末端側の重要性が高いことが予想された。さらに、この部位には VWF 結合配列として明らかにされたエピトープ A が含まれており、後天的 TTP においては、この領域に自己抗体 IgG が結合するために ADAMTS13 と VWF の結合に支障をきたし、VWF マルチマーが分解されにくくなることが、疾患発症機序に大きく関係している可能性が示唆される。

E. 結論

ADAMTS13 の VWF 結合部位として、スペーサー領域の C 末端および中央部を見出し、その性質を解析したところ、後者は前者よりも強い VWF 結合能および ADAMTS13 活性阻害効果を示すことが判明した。後天的 TTP 患者自己抗体 IgG の結合エピトープとして、VWF 結合部位として見出されたスペーサー領域の C 末端が重要である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表：投稿中

学会発表：

1. Takanori Moriki, Ichiro N. Maruyama, Yusuke Yamaguchi, Atsuko

Igari, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata
Identification of ADAMTS13 Epitopes
Required for Binding to von
Willebrand Factor Using Lambda Phage
Surface Display. The American
Society of Hematology, the 49th ASH
Annual Meeting and Exposition,
December 8-11, 2007, in Atlanta,
Georgia. Blood 2007 Nov; 110 (11):
2707a.

2. 森木 隆典、丸山 一郎、池田 康
夫、村田 満 ADAMTS13 分子内におけ
るフォンビルブランド因子結合エピト
ープ配列 第 30 回日本血栓止血学会
学術集会 2007 年 11 月 三重県志摩
市 日本血栓止血学会誌 2007 18 (5):
472.

H. 知的財産権の出願・登録状況
平成 19 年 6 月 8 日特許願提出 (整理番
号 K0070378)

研究成果の刊行に関する一覧
なし

三重大学で過去3年間に経験したTMA症例について—FRC X IPFの意義—

分担研究者名 和田英夫（三重大学大学院医学系研究科 病態解明学講座臨床検査医学分野 准教授）
研究協力者名 森 美貴（三重県赤十字血液センター 技術部長）

研究要旨

Thrombotic microangiopathy (TMA)のスクリーニングとして、幼若血小板(IPF)や破碎赤血球(FRC)の有用性が報告されているが、特異性に問題があった。今回、IPF X FRCを携有することにより、TMA診断の特異性向上を検討した。

対象は、過去3年間に三重大学大学院医学系研究科附属病院を受診したTMA症例40例、非TMA症例353例である。全血の血球分画をXE-2100にて測定後、特種ソフトウエアにより、IPF、FRCとして換算した。

IPF値は、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、骨髄移植(BMT)-TMA、肝移植(LT)-TMA、TMA-微小血管障害性溶血性貧血(MHA)、播種性血管内凝固(DIC)、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、骨髄異型性症候群(MDS)症例で有意に高値であった。FRC値は、TTP、BMT-TMA、LT-TMA、TMA-MHA、DIC、MDS、骨髄増殖性疾患(MPD)、固形癌症例で有意に高値であった。TMA以外の疾患では、MDS、MPDで有意にFRCは高値であった。FRC X IPF値は、TTP、BMT-TMA、LT-TMA、TMA-MHA、MDS、MPDで有意に高値であった。ROC解析における曲線下面積(AUC)は、FRC X IPF、FRC、IPFの順に高値であった。特に、FRC X IPF、FRCのAUCは著しく高値であった。

以上、TMAの診断にはIPFやFRCが有用とされていたが、FRC X IPFを用いると、さらにTMAの診断能力が向上した。

1. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)あるいは溶血性尿毒症症候群(HUS)は、血小板減少に伴う出血傾向、破碎赤血球を伴う溶血性貧血を主徴として、重症化すると動揺性の神経症状、腎障害、高熱などを呈する病態で、近年では **thrombotic microangiopathy**

(TMA)という概念で包括されている。TMAは予後が未だに悪く、血漿交換などを施行しても、生存率は約80%前後であり、早期診断が重要とされている。TMAのスクリーニングとして、我々は幼若血小板(IPF)や破碎赤血球(FRC)の有用性について報告しているが、特異性に問題があった。今回は、

IPF X FRC を持っていることにより、TMA 診断に対する高感度を保ちながら、特異性向上を検討した。

2. 研究方法

対象は、過去3年間に三重大学大学院医学系研究科附属病院を受診した、健常人 132 名ならびに TMA 症例 40 例、非 TMA 症例 353 例である。なお、播種性血管内凝固 (DIC) 134 例、骨髓異形成症候群 (MDS) 14 例、骨髓増殖性疾患 (MPD) 11 例は、TMA を合併することがあり、高頻度に FRC を伴うことから、ROC 解析からは除外した (表 1)。

(倫理面への配慮)

三重大学の倫理委員会の指針に従い、個人情報保護に留意して患者名は匿名化しておこなった。

IPF ならびに FRC の測定は図 1 に示すように、全血の血球分画を XE-2100 にて測定後、ソフトウェア (XE RET master) により、IPF、FRC として換算された。

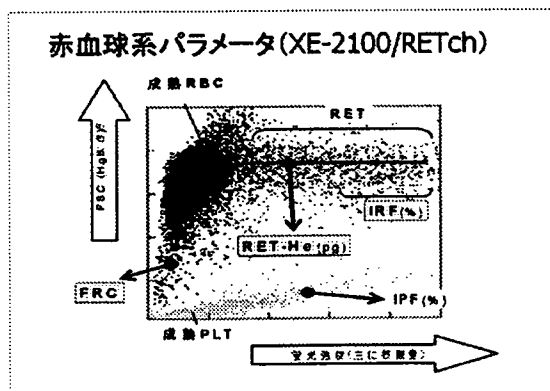


図 1 IPF/FRC の測定 (XE-2100 による)

表 1 対象症例

疾患	例数	TMA
----	----	-----

健常人	132	—
TTP	7	TMA
BMT-TMA	7	TMA
LT-TMA	8	TMA
TMA-MHA	18	TMA
Aplastic anemia	9	—
BMT	6	—
Chemo-H	12	—
Chemo-L	13	—
DIC	134	対象外
ICU 入室患者	170	—
ITP	41	—
MDS	14	対象外
MPD	11	対象外
骨髓低形成	20	—
固形癌	29	—
造血器腫瘍	28	—
肝移植(LT)	25	—

BMT; 骨髓移植、LT; 肝移植、MHA; 微小血管障害性溶血性貧血(MHA)、Chemo; 化学療法、-H; IPF 最高値時、-L; IPF 最低値時、ICU; 集中治療室、ITP; 特発性血小板減少性紫斑病

3. 研究結果

IPF 値は、TTP、BMT-TMA、LT-TMA、TMA-MHA、DIC、ITP、MDS 症例で、健常人に比べて有意に高値であった。TMA 以外の疾患では、DIC、ITP、MDS で有意に ($p < 0.05$) IPF は高値であった。また、一部の MPD 症例でも IPF は高値で合った (図 2)。特に、MDS と MPD では、TMA の合併なしに、IPF の増加が見

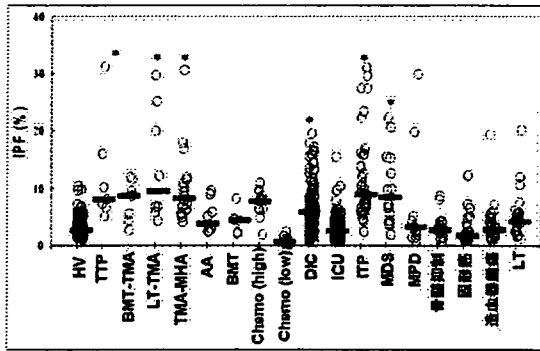


図2 種々の基礎疾患における IPF 値

HV ; 健常人、AA ; 再生不良性貧血

られた。FRC 値は、TTP、BMT-TMA、LT-TMA、TMA-MHA、DIC、ITP、MDS、MPD、固形癌症例で、健常人に比べて有意に ($p < 0.05$) 高値であった。TMA 以外の疾患では、DIC、MDS、MPD、固形癌で有意に ($p < 0.05$) FRC は高値であった。(図2)。DIC と固形癌では、しばしば TMA の合併が見られた (図3)。

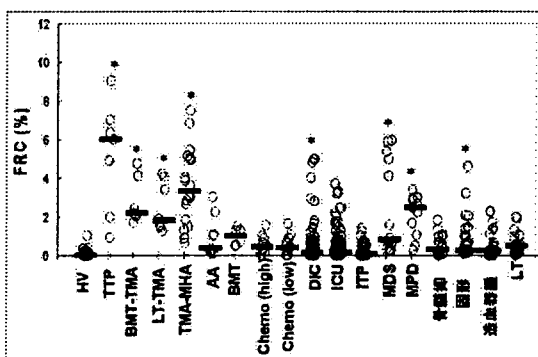


図3 種々の基礎疾患における FRC 値

FRC X IPF 値は、TTP、BMT-TMA、LT-TMA、TMA-MHA、MDS、MPD

で、健常人に比べ有意に ($p < 0.05$) 高値であった。TMA 以外の疾患では、

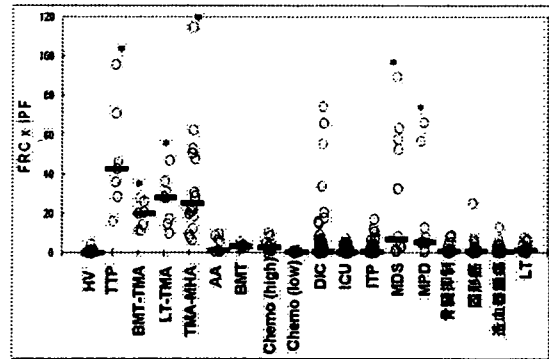


図4 種々の基礎疾患における FRC X IPF 値

MDS、MPD で有意に ($p < 0.05$) FRC は高値であった (図4)。

ROC 解析における曲線下面積 (AUC) は、FRC X IPF (0.996)、FRC (0.959)、IPF (0.889) の順に高値であった。特に、FRC X IPF、FRC の AUC は著しく高値であった (図5)。

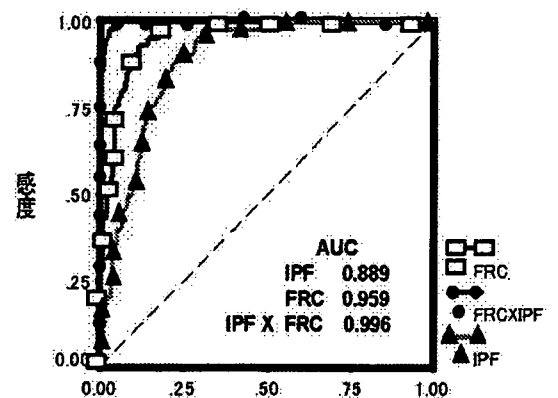


図5 TMA 診断に対する FRC X IPF、FRC、IPF の ROC 解析

4. 考察

近年、生体部分肝移植手術や骨髄移植が盛んに行われるようになり、その合併症である TMA が、TTP や HUS 以上に注目されている。TMA のスクリーニング診断には、IPF ならびに FRC が有用とされているが、充分標準化されていなかった。XE-2100 による IPF の測定は、血小板産生を伴う血小板減少症の診断に、FRC の測定は破碎赤血球の定量化に有用であると考えられている。しかし、IPF ならびに FRC は TMA 診断における特異性がやや低い恐れがあった。

IPF と FRC を乗じると (FRC X IPF)、TTP 診断項目を 2 つ満たすことになり、感度を損なわずに特異度を上げることができ、TMA 診断能力が向上することが期待される。事実 ROC 解析では、FRC X IPF、FRC、IPF の順に AUC は高値であり、特に FRC X IPF では著しい高値を示し、TMA 診断における有用性を示した。

5. 結論

TMA の診断には、IPF や FRC が有用とされていたが、FRC X IPF を用いると、さらに診断能力が向上した。

6. 健康危険情報

特になし

7. 研究発表

1) 論文発表

1) Kobayashi T, Wada H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H: Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura.

Thromb Res. 2007; 119: 447-52

2) Sakakura M, Wada H, Tawara I, Nobori T, Sugiyama T, Sagawa N, Shiku H: Reduced CD4⁺CD25⁺ T Cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Thromb Res, 2007; 120: 187-193

3) Nakatani K, Takao M, Nishioka J, Yasuda K, Noma K, Hayashi A, Wada H, Nobori T: Association of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer with chemosensitivity to gefitinib in isolated cancer cells from Japanese patients. Eur J Cancer Care (Engl). 2007; 16: 263-7

4) Tamaru S, Kitajima K, Nakano T, Eto K, Yazaki A, Kobayashi T, Matsumoto T, Wada H, Katayama N, Nishikawa M: Calyculin A retraction of mature megakaryocytes proplatelets from embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Dec13; [Epub ahead of print]

5) Matsumoto T, Wada H, Tamaru S, Sugimoto Y, Fujieda A, Yamamura K, Kobayashi T, Kaneko T, Yamaguchi M, Nobori T, Katayama N: Central venous catheter-related thrombosis after replacement therapy for intracranial bleeding in a patient with afibrinogenemia. Haemophilia. (in press)

6) Nomura H, Wada H, Mizuno T, Katayama N, Abe Y, Noda M, Nakatani K, Matsumoto T, Ota S, Yamada N, Sudo A, Uchida A, Nobori T: Negative predictive value of D-dimer for diagnosis of venous thromboembolism. Int J Hematol. (in press)

7) Wada H, Hatada T: Pathophysiology and diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation. Crit Care Med, (in press)

8) Matsumoto T, Kaneko T, Seto M, Wada H, Kobayashi T, Nakatani K, Tonomura H, Tono Y, Ohyabu M, Nobori T, Shiku H, Sudo A, Uchida A, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S: The measurement membrane proteinase 3 expression on neutrophils was downregulated after treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. Clin Appl Thromb Hemost. (in press)

9) Kaneko T, Wada H, Onishi K, Abe Y, Ota S, Yamada N, Matsumoto T, Katayama N, Sudou A, Uchida A, Nobori T: Cutoff values of D-dimer and FDP in plasma for the diagnosis of thrombosis. VDP (in press)

2) 学会発表

1) Wada H: Efficacy of DIC treatment in Asian countries. the APSTH-ISTH joint symposium, XXIIth Congress of The International Society of Hematology, July 9, 2007

2) Wada H: Recognising DIC in the coagulopathy of sepsis. 53st SSC Scientific Subcommittees, XXIIth Congress of The International Society of Hematology, July 7, 2007

3) Wada H, Kobayashi T, Nobori T, Matsumoto T, Abe Y: ADAMTS13 related markers in plasma from patients with TTP, XXIIth Congress of The International Society of Hematology, July 10, 2007

4) Matsumoto T, Wada H, Abe Y, Kobayashi T, Nobori T, Yamada N: Elevated D-dimer levels in patients with deep vein thrombosis, XXIIth Congress of The International Society of Hematology, July 10, 2007

5)和田英夫、丸藤哲：診断・病態、DIC 治療ガイドライン、第 2 回日本血栓止血学会

学術標準化委員会シンポジウム 2007、2007
6)和田英夫、伊都野孝、村田満、宮田敏行、松本雅則、藤村吉博：アンケート調査を基にした、後天性 TMA の分類、診断基準案の提示、VWD と TTP の診断と治療のガイドライン作成に向けて、第 2 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 2007、2007

7)和田英夫、DIC 診断・治療の今後の方向性、DIC 治療ガイドラインとその後、第 30 回日本血栓止血学会学術集会、賢島

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>

1) Kobayashi T, Wada H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H: Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Res. 2007; 119: 447-52

2) Sakakura M, Wada H, Tawara I, Nobori T, Sugiyama T, Sagawa N, Shiku H: Reduced CD4⁺CD25⁺ T Cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Thromb Res, 2007; 120: 187-193