

血小板減少マウスの脾細胞培養上清中から正常マウス血小板に結合するIgG抗体が検出された(13例/17例)。このとき血小板非減少マウスの脾細胞培養上清中からは1例も検出されなかった。GPIb欠損マウス血小板を抗原として用いたとき、大部分の培養上清ではIgGの結合能が消失した(10例/12例)(図1)。また、GPIIIa欠損マウス血小板を抗原として用いたとき、10例中1例のみに抗体の結合能の減弱を認めた。そこで、減弱を認めた培養上清中の抗血小板抗体を正常マウス血小板もしくはGPIIIa欠損マウス血小板を用いて吸収させた後に、再び正常マウス血小板と反応させた。その結果、正常マウス血小板では抗血小板抗体を完全に吸収できたのに対し、GPIIIa欠損マウス血小板による吸収では抗血小板抗体の残存を認めた。

### 2. 抗CTLA-4抗体投与によるTregのITP病態発症抑制効果の阻害作用

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞とCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を同時に移植したマウスに対して、抗CTLA-4抗体を投与したところ、19%(3例/16例)で血小板減少の発症を認めた(p<0.05)(表1)。このとき、コントロール抗体を投与した群では血小板減少の発症を1例も認めなかった(0例/20例)。

### 3. Treg移植によるITP病態の治療効果

血小板減少を呈したTreg欠損マウスにTregを移植し、6週間ITP病態を評価したところ、全例で血小板数の改善は認めなかった(0例/3例)。

### D. 考察

血小板減少を発症したTreg欠損マウスから採取した脾細胞の培養上清中に含まれる抗血小板抗体が認識する主要な対応抗原はGPIbであることが確認された。また、低頻度ながらGPIIb/IIIaに対する自己抗体も産生されており、ITP患者と同様に血小板膜蛋白に対するポリクローナルな免疫応答が惹起されて

いると考えられた。また、CTLA-4阻害抗体の投与がTregによるITP発症抑制効果を解除したことから、Tregが血小板に対する自己免疫応答を抑制する分子メカニズムの一つとして、CD28-CD80/86を介する自己反応性T細胞と抗原提示細胞の相互作用の阻害機構が考えられた。しかしながら、ITP病態発症後のTreg移植では治療効果を認めなかったことから、Treg単独ではITP患者に対する治療標的として不十分である可能性が示唆された。

### E. 結論

Treg欠損により誘導した血小板減少では、ITP患者と同様に複数の血小板膜蛋白に対するポリクローナルなIgG自己抗体産生応答が誘導された。TregはCTLA-4を介してITP発症を抑制するが、その効果はITP発症後には乏しかった。

### F. 健康危険情報 該当せず

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) 桑名正隆: ITP-最近の話題; ITP発症のメカニズム. 日本血栓止血学会誌 21(3): 255-261, 2010.

#### 2. 学会発表

1) Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, Kuwana M: A critical role of CD4+CD25+ regulatory T cells in murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. 14th International Congress of Immunology (Kobe). 2010. 8.

2) 桑名正隆: 免疫性血小板減少性紫斑病 (Pathophysiology of immune thrombocytopenic purpura). 第72回日本血液学会学術集会(横浜). 2010. 9.

3) Kuwana M: New aspects of ITP pathogenesis. The 6th Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis (Bali). 2010. 10.

4) Nishimoto T, Satoh T, Ikeda Y, Kuwana M: A critical role of CD4+CD25+ regulatory T cells in prevention of murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. The 52th Annual Meeting of American Society of Hematology (Orlando). 2010. 12.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

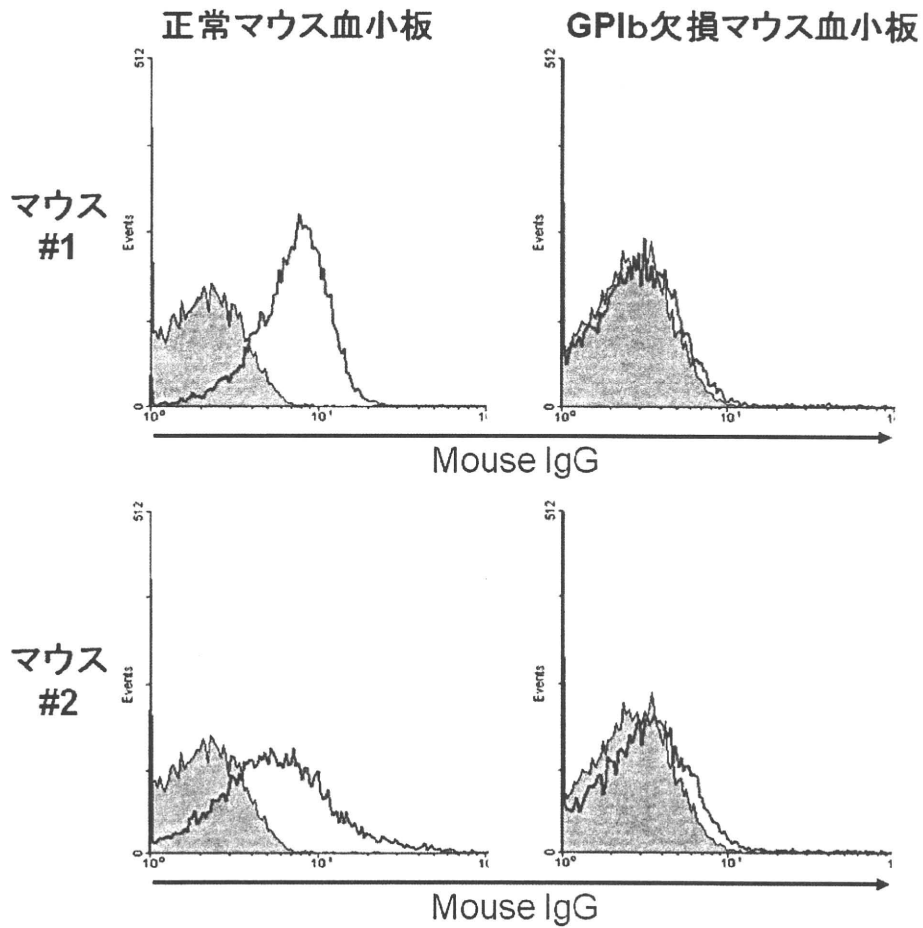


図1 培養上清中に存在する抗血小板抗体の対応抗原  
 正常マウス血小板またはGPIIb欠損マウス血小板を血小板減少マウスから採取した脾細胞の培養上清と反応させた後、血小板に結合したマウス IgG の量をフローサイトメトリーで検出した。

表 1 抗 CTLA-4 抗体投与による Treg の ITP 病態発症抑制作用の阻害効果

| 移植細胞  | 投与した抗体          | 血小板減少     |
|---|-----------------|-----------|
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> 細胞<br>+<br>CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 細胞 | 抗CTLA-4抗体       | 3/16(19%) |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> 細胞<br>+<br>CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 細胞 | isotype control | 0/20(0%)  |

\*

\* P<0.05

# 臨床調査個人票（平成 20 年度）集計による 特発性血小板減少性紫斑病の全国疫学調査

研究分担者：倉田義之 四天王寺大学人文社会学部人間福祉学科 教授

## 研究要旨

我が国における特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症頻度、年齢分布、患者の病状や治療、生活状況を平成 20 年度の臨床調査個人票をもとに解析した。平成 20 年度における新規患者数は 10 万人あたり 2.56 人であった。日本全体では 3,220 人が発症したと推計された。更新患者数は 10 万人あたり 16.11 人で日本全体では 20,285 人の患者がいたと推計された。新規患者の年齢分布では急性型は 5 歳以下の小児に多く、慢性型は 26～30 歳のピークとともに 56～65 歳にも大きなピークを認めた。更新患者においてはさらに顕著で 31～35 歳のピークは小さく 56～60 歳に大きなピークを認めた。高齢発症、患者年齢の高齢化が進んでいると思われた。

### A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病（以下 ITP）は比較的まれな疾患である。わが国における実態を把握することは今後の ITP 患者への治療計画、支援計画などをたてるにあたり非常に重要な資料になると考える。厚生労働省に集められた臨床調査個人票をもとに解析し、患者数の年次ごとの推移、生活・受診状況、治療状況などを解析した。

### B. 研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 20 年度の ITP 患者の臨床調査個人票入力データの提供を受けた。データの提供を受けた時点（平成 22 年 11 月）では一部の都道府県のデータが厚生労働省に届いていなかった。新規申請分でデータが届いていなかった都道府県は北海道、新潟県、東京都、山梨県、静岡県、愛知県、滋賀県、京都府、奈良県、和歌山県、島根県、岡山県、佐賀県、熊本県、宮崎県、鹿児島県の 16 道県であった。更新申請分で届いていなかった都道府県は北海道、岩手県、福島県、茨城県、埼玉県、東京都、新潟県、長野県、愛知県、京都府、大阪府、兵庫県、奈良県、島根県、徳島県、高知県、福岡県、佐賀県、

長崎県、熊本県の 20 都道府県であった。

### C. 研究結果および D 考察

#### 1. ITP 患者発症数

平成 20 年度に発症した患者数を表 1、表 2 に示す。新規患者登録数は男女合わせて 2,025 名であった。2,025 名を調査道府県の人口（79,201 千人）で除し人口 10 万人あたりで計算すると ITP 患者発症頻度は 10 万人あたり 2.56 人であった。また 2,025 名は調査道府県での発症数であるので日本の総人口（125,947 千人）でもって推計するとわが国では平成 20 年度に 3,220 名の患者が発生したと推計された。表 3 に平成 17 年度～平成 20 年度の ITP 新規患者推計発症数の推移を示す。この 4 年間では年間 2,405 名～3,220 名発生していた。この数年間は、約 3,000 人が毎年発症していると思われた。

#### 2. 新規患者年齢分布

新規患者急性型の年齢分布を図 1 に示す。急性型では、5 歳以下に大きなピークがあった。男子では 5 歳以下のピークに加えて 61-85 歳の高齢者にも大きなピークを認めた。一方、女子では 5 歳以下のピークに加えて 21-30 歳、51-85 歳にも幅広い大きなピークを認めた。

新規患者慢性型の年齢分布を図 2 に示す。

女子では21-35歳と56-65歳にピークがあった。高齢者のピークは21-35歳のピークよりも高かった。男子では、56歳以後に徐々に増加し始め、71-75歳にピークを認めた。21歳～65歳では女子が男子の約1.6～6.7倍多かった。一方、66歳以上では男女差を認めなかった。

### 3. ITP 更新患者数

平成20年度に更新申請があった患者数を表4、表5に示す。更新患者数は男女合わせて10,009名であった。10,009名を調査道府県の人口(62,144千人)で除して人口10万人あたりでITP更新症例頻度を計算すると16.11名であった。また10,009名は調査道府県での更新数であるので日本の総人口(125,947千人)でもって推計するとわが国では平成20年度に20,285名の患者が更新申請をしたと推察された。平成17年度～平成20年度の推計更新患者数の推移を表6に示す。更新申請症例数は平成18年度から徐々に増加の傾向にあった。

### 4. 更新患者慢性型の年齢分布

慢性型の更新患者の年齢分布を図3に示す。女子では21歳以後に増加し始め、56-60歳に大きなピークがあった。また女子では31～35歳にも小さなピークを認めた。男子では51-55歳より増加傾向を示し、66-70歳にピークを認めた。女子が男子の約2.6倍多かった。

### 5. 身体障害者手帳、介護認定、日常生活の不自由度

身体障害者認定の有無を表7に示す。身体障害者手帳を交付されている症例は4.7%～7.5%のみで、大多数の症例は身体障害者の認定を受けていなかった。身体障害者の認定がITPによるものか、他の身体的要因によるものかは不明であった。介護認定の有無を表8に示す。要介護、要支援認定者もごく一部の症例のみであった。日常生活不自由度を表9に示す。22%の症例がやや不自由との回答であったがITP症例が非常に高齢化しているため高齢による身体の不自由さを

反映しているのではないかと推測された。

### 6. 生活状況

ITP患者の生活状況を表10に示す。新規・急性型症例では33%の症例が入院状態であった。一方、新規・慢性型では入院症例は13%と少なかった。更新症例では入院症例は殆どなく、多くの症例は就労、就学、家事労働など日常生活が行えていた。

### 7. 受診状況

受診状況を表11に示す。新規・急性型症例では56%の症例が入院していた。新規・慢性型患者においても19%の症例が入院していた。一方、更新・慢性型患者では入院中の症例はごく一部で大半の症例が主に通院であった。

### 8. 出血症状

出血症状を図4～6に示す。新規・急性型では出血症状を示す症例が多く、紫斑が82%の症例において認められた。その他、歯肉出血、鼻出血など、粘膜出血の頻度も高かった。新規・慢性型では紫斑を54%に認め、急性型に比し、出血症状の頻度、粘膜出血の頻度ともに低かった。更新・慢性型では紫斑を38%に認めたが新規申請症例に比べ頻度は低かった。治療の結果、出血症状が軽減しているためと思われた。

### 9. 血小板数

血小板数を図7に示す。新規・急性型症例においては血小板数1万以下の症例が65%と多かった。新規・慢性型においても血小板数1万以下の症例を27%に認めたが、2万～5万を示す症例も認められた。一方、更新患者においては血小板数が5万以下の症例は少なく、53%の症例では5万以上であった。

### 10. 特殊検査

新規症例における骨髓検査、PAIgG、抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率を表12に示す。骨髓検査は急性型、慢性型ともほぼすべての症例で実施されていた。ITPに特異的な検査である

抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率は非常に低かった。これらの特異的検査は一部の施設を除き施行できないためと思われた。早急に検査センターなどで可能となることが必要と考えられる。

#### 11. 治療

新規症例において選択された治療法を図 8、9 に示す。新規・急性型ではプレドニゾン治療が 83%の症例において選択されていた。次いで大量 IgG 療法、ピロリ除菌と続いていた。急性型では出血症状が強いことと小児が多いことからプレドニゾン治療に次いで大量 IgG 療法が選択されていたものと思われた。また新規・慢性型においてもプレドニゾン治療が 59%の症例に選択されていた。次いでピロリ除菌、大量 IgG 療法が実施されていた。ピロリ除菌療法は、平成 20 年度においては保険適応ではないが多くの症例ですでに実施されていた。図 10 が更新症例でこの 1 年間に試みられた治療法、図 11 が全経過で実施された治療法を示している。更新症例においてもこの 1 年間ではプレドニゾン治療が最多で 55%の症例でプレドニゾン治療が行われていた。各種治療法に抵抗性で、プレドニゾンによる維持療法が行われているものと推察された。一方、全経過で見るとプレドニゾン治療が 77%、次いでピロリ除菌療法、大量 IgG 療法、摘脾など各種の治療が行われていた。

#### 12. この 1 年の経過

更新・慢性型症例では、この 1 年間、不変であった症例が 70%、軽快した症例が 20%、徐々に悪化した症例が 6%、などであった。ITP は良性疾患ではあるが治癒する疾患でもないことがうかがわれた。

#### 13. 罹病期間

更新患者（慢性型）における罹病期間を図 12 に示す。罹病期間は 1 年未満の患者から 50 年以上に及ぶ患者まで幅広く

分布していた。ITP が慢性疾患であることを示しているとともに基本的には予後良好な疾患であることを意味しているものと思われた。

#### 14. 合併症

ITP は罹病期間が長期にわたることが多い。その間には多くの合併症を併発することが予想される。特にプレドニゾン治療が長期にわたって行われるのでプレドニゾンによる副作用が懸念される。調査表に記載されている合併症を図 13 に示す。プレドニゾンの影響と考えられる糖尿病の頻度が高い。またプレドニゾンや免疫抑制剤の長期投与が原因ではないかと考えられる脊椎骨折、重症感染症、悪性腫瘍の合併も報告されていた。最も重篤な合併症である脳出血は 43 例報告されていた。その他の合併症として高血圧症、高脂血症、骨粗しょう症などが報告されていた。

#### 15. 難治症例の頻度

難治症例の定義は明確ではないが、今回は、摘脾を含む各種治療を行っても血小板数が低く（血小板数 2 万以下）、出血傾向を示している症例と考え、臨床個人調査票から上記条件にて絞り込み、難治症例数を推計した。更新申請症例で慢性型 8,879 例を対象とした（表 13 参照）。まず血小板数 2 万以下の症例に絞り込むと 1,685 例（19.0%）の症例が対象となった。血小板数 2 万以下の症例を、さらに出血傾向を示している症例に絞り込むと 1,328 例（15.0%）が対象となった。出血傾向を示している症例のうちプレドニゾン治療をされている症例は 1,027 例（11.6%）であった。各種治療に抵抗性であるとの考えに従い、摘脾済み症例に絞り込むと大幅に減少し、271 例（3.1%）が難治例に相当すると考えられた。

#### E. 結論

今回の調査では ITP の発症頻度は 10 万人あたり 2.56 人、更新患者は 10 万人あたり 16.11 人であった。推計発症者数は

平成 19 年度の調査結果よりも少し増加していた。年齢分布は平成 19 年度と同じで高齢者での発症増加が確認できた。更新患者の年齢分布においても高齢者に大きくシフトしていた。今回の成績は平成 19 年度の調査結果とほぼ同じで、ITP 患者の高齢化が確認された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nomura S, Kurata Y, Tomiyama Y, Takubo T, Hasegawa M, Saigo K, Nishikawa M, Higasa S, Maeda Y, Hayashi K. Effects of bisphosphonate administration on the bone mass in immune thrombocytopenic purpura patients under treatment with steroids. Clin Appl Thromb Hemost. 16: 622-627.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



表 1. 新規申請症例数

|         | 全症例   | 男     | 女     |
|---------|-------|-------|-------|
| 症例数     | 2,025 | 787   | 1,238 |
| 10万人あたり | 2.56  | 2.04  | 3.05  |
| 推計症例数   | 3,220 | 1,251 | 1,969 |

表 2. 新規申請症例病型別の症例数

|         | 急性型   | 男    | 女    | 慢性型   | 男    | 女     | 型不明  |
|---------|-------|------|------|-------|------|-------|------|
| 症例数     | 714   | 292  | 422  | 1,195 | 445  | 750   | 116  |
| 10万人あたり | 0.90  | 0.76 | 1.04 | 1.51  | 1.15 | 1.85  | 0.15 |
| 推計症例数   | 1,135 | 464  | 671  | 1,900 | 708  | 1,193 | 184  |

表 3. 新規申請症例数の推移

|       | 平成 17 年度 | 平成 18 年度 | 平成 19 年度 | 平成 20 年度 |
|-------|----------|----------|----------|----------|
| 推定症例数 | 3,107    | 2,405    | 2,776    | 3,220    |

表 4. 更新申請症例数

|         | 全症例    | 男     | 女      |
|---------|--------|-------|--------|
| 症例数     | 10,009 | 2,868 | 7,141  |
| 10万人あたり | 16.11  | 9.50  | 22.36  |
| 推計症例数   | 20,285 | 5,833 | 14,424 |

表 5. 更新申請症例病型別の症例数

|         | 急性型   | 男    | 女     | 慢性型    | 男     | 女      | 型不明  |
|---------|-------|------|-------|--------|-------|--------|------|
| 症例数     | 787   | 282  | 505   | 8,879  | 2,500 | 6,379  | 343  |
| 10万人あたり | 1.27  | 0.93 | 1.58  | 14.29  | 8.28  | 19.97  | 0.55 |
| 推計症例数   | 1,595 | 574  | 1,020 | 17,995 | 5,085 | 12,885 | 695  |

表 6. 更新申請症例数の推移

|       | 平成 17 年度 | 平成 18 年度 | 平成 19 年度 | 平成 20 年度 |
|-------|----------|----------|----------|----------|
| 推定症例数 | 17,708   | 16,873   | 18,994   | 20,285   |

表 7. 身体障害者手帳の有無

|       | あり  | なし    | 記載なし |
|-------|-----|-------|------|
| 新規急性型 | 31  | 633   | 50   |
| 新規慢性型 | 58  | 1,035 | 102  |
| 更新急性型 | 52  | 689   | 46   |
| 更新慢性型 | 529 | 7,790 | 560  |

表 8. 介護認定の有無

|       | 要介護 | 要支援 | なし    | 記載なし |
|-------|-----|-----|-------|------|
| 新規急性型 | 39  | 10  | 604   | 61   |
| 新規慢性型 | 44  | 13  | 1,014 | 124  |
| 更新急性型 | 43  | 29  | 659   | 56   |
| 更新慢性型 | 373 | 174 | 7,706 | 626  |

表 9. 日常生活不自由度

|       | 正常    | やや不自由 | 部分介護 | 全面介護 | 記載なし |
|-------|-------|-------|------|------|------|
| 新規急性型 | 429   | 141   | 66   | 38   | 40   |
| 新規慢性型 | 835   | 196   | 70   | 24   | 70   |
| 更新急性型 | 511   | 160   | 59   | 13   | 44   |
| 更新慢性型 | 6,097 | 1,806 | 425  | 84   | 467  |

表 10. 生活状況

|       | 就労    | 就学  | 家事    | 在宅    | 入院  | 入所 | その他 |
|-------|-------|-----|-------|-------|-----|----|-----|
| 新規急性型 | 129   | 58  | 158   | 66    | 217 | 6  | 33  |
| 新規慢性型 | 382   | 39  | 392   | 132   | 148 | 9  | 18  |
| 更新急性型 | 195   | 53  | 238   | 164   | 30  | 11 | 31  |
| 更新慢性型 | 2,741 | 412 | 3,526 | 1,290 | 132 | 77 | 116 |

表 11. 受診状況

|       | 入院  | 入院・通院 | 通院    | 往診あり | 入通院なし | その他 |
|-------|-----|-------|-------|------|-------|-----|
| 新規急性型 | 380 | 87    | 164   | 2    | 31    | 10  |
| 新規慢性型 | 211 | 97    | 778   | 3    | 16    | 12  |
| 更新急性型 | 30  | 52    | 655   | 4    | 7     | 5   |
| 更新慢性型 | 113 | 241   | 8,058 | 24   | 24    | 67  |

表 1 2 . 特殊検査

|              |     | 骨髓検査  | PAIgG | 抗血小板  | 網血小板  |
|--------------|-----|-------|-------|-------|-------|
| 新規急性型 714 例  | 施行  | 633   | 410   | 22    | 51    |
|              | 未施行 | 81    | 304   | 692   | 663   |
| 新規慢性型 1195 例 | 施行  | 1,048 | 829   | 45    | 69    |
|              | 未施行 | 147   | 366   | 1,150 | 1,126 |

表 1 3 . 難治症例の頻度

|           | 症例数   | %     |
|-----------|-------|-------|
| 更新慢性型症例   | 8,879 | 100.0 |
| 血小板 2 万未満 | 1,685 | 19.0  |
| + 出血症状あり  | 1,328 | 15.0  |
| + プレドニンあり | 1,027 | 11.6  |
| + 摘脾済み症例  | 271   | 3.1   |

图 1. 年龄分布 (新規・急性型)

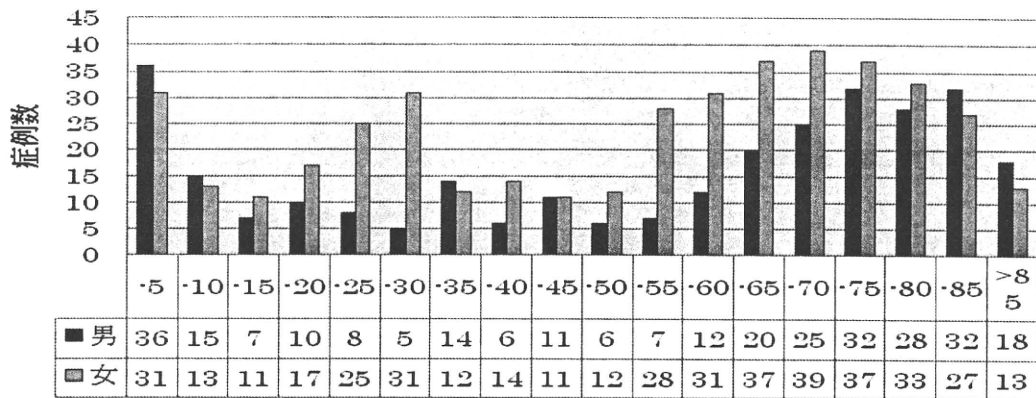


图 2. 年龄分布 (新規・慢性型)

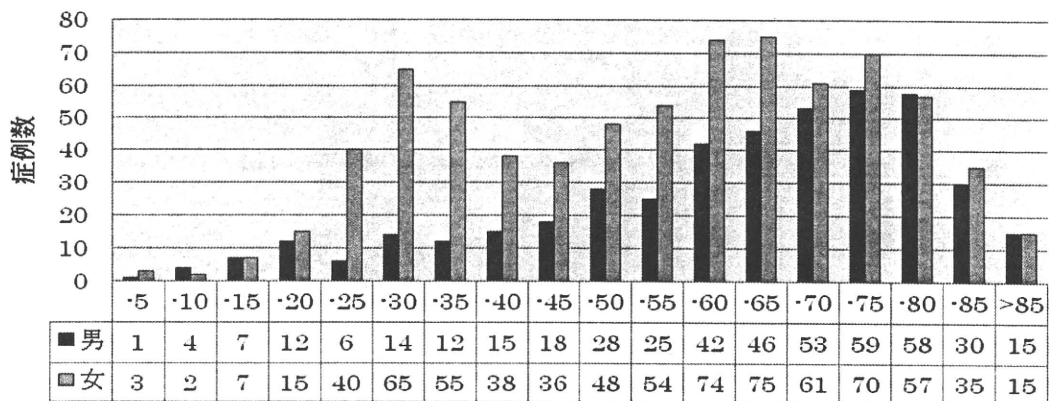


图 3. 年龄分布 (更新・慢性型)

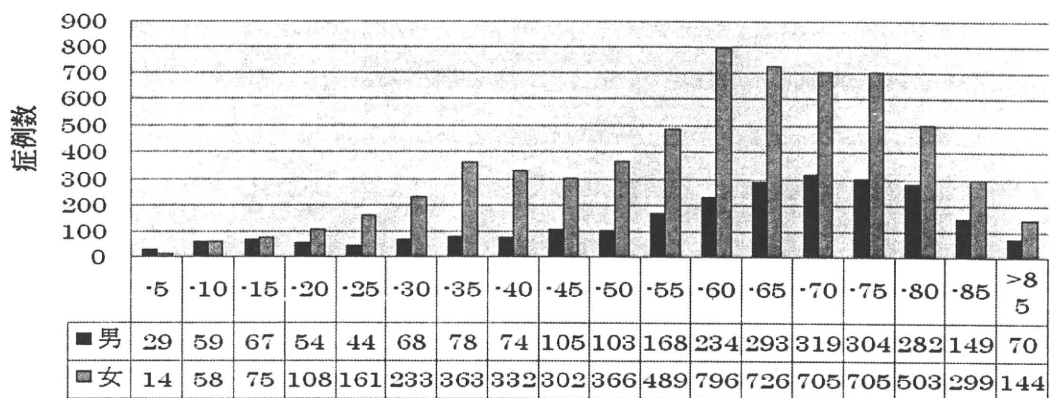


図4. 出血症状（新規・急性型）

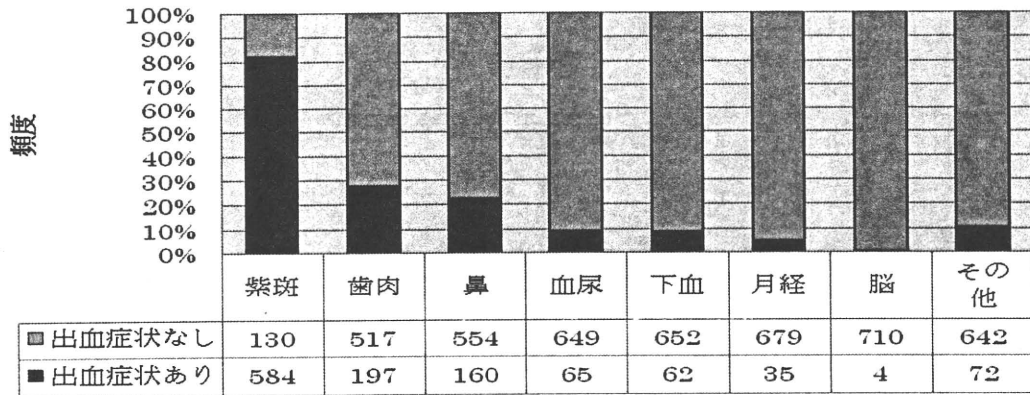


図5. 出血症状（新規・慢性型）

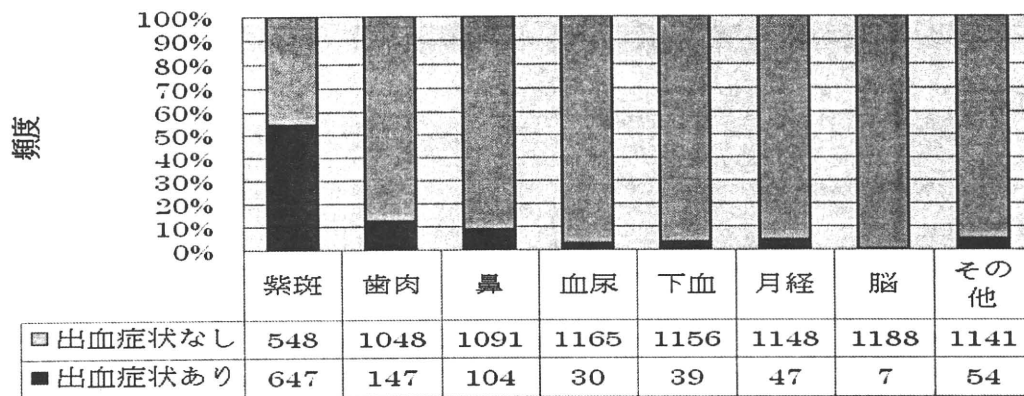


図6. 出血症状（更新・慢性型）

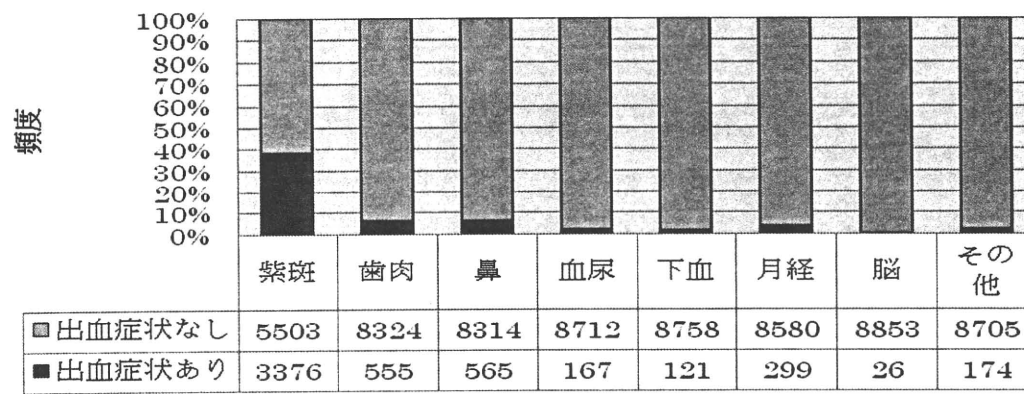


図7. 血小板数

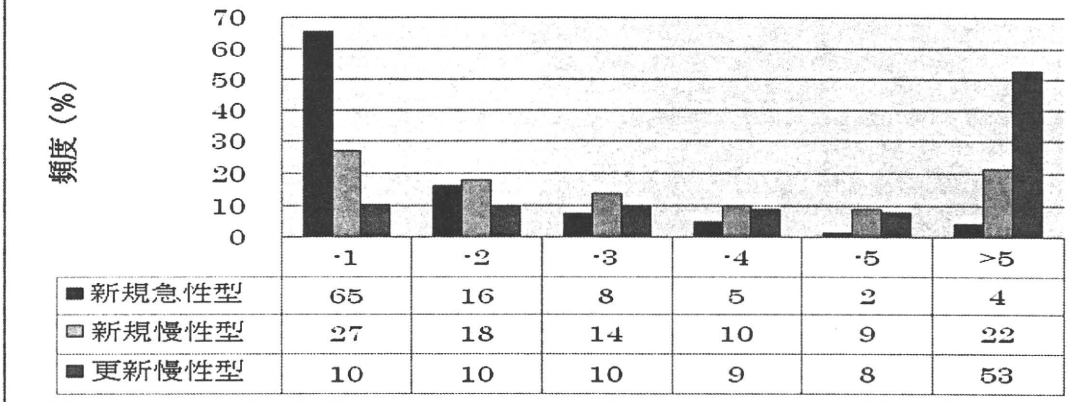


図8. 治療（新規・急性型）

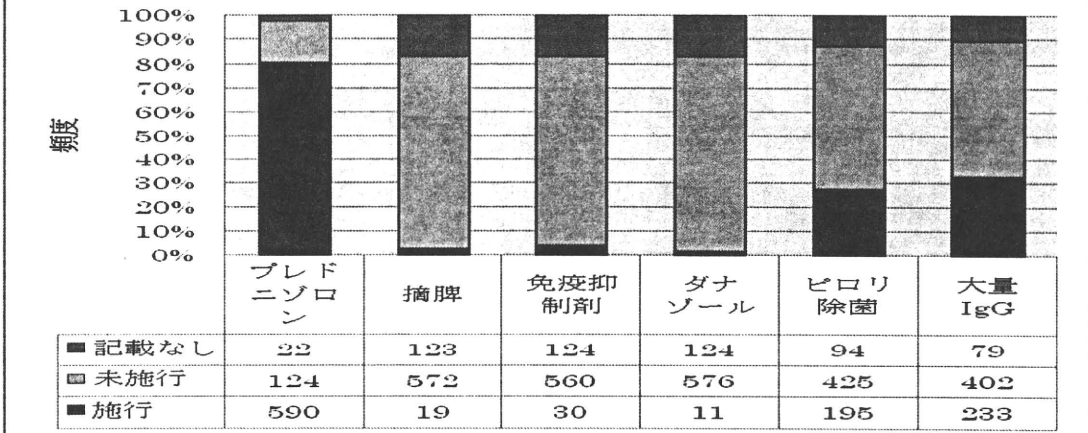


図9. 治療（新規・慢性型）

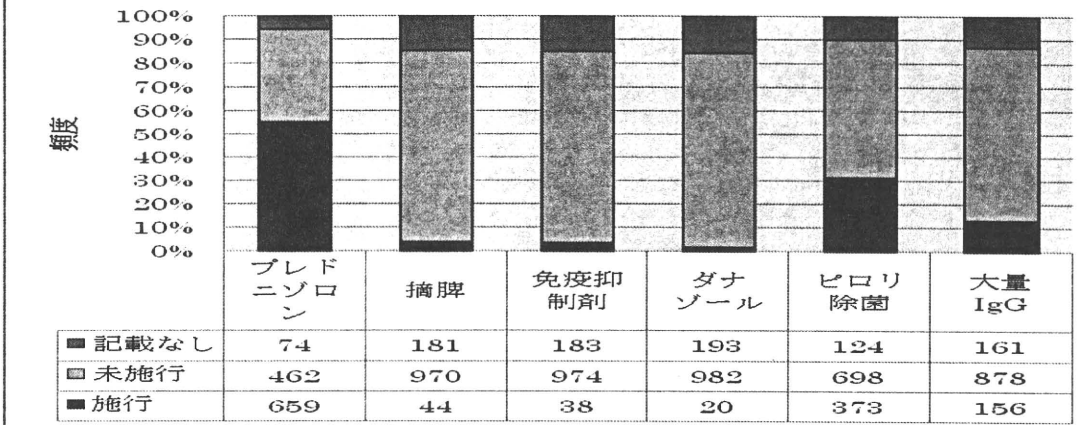


図10. この1年間の治療（更新・慢性型）

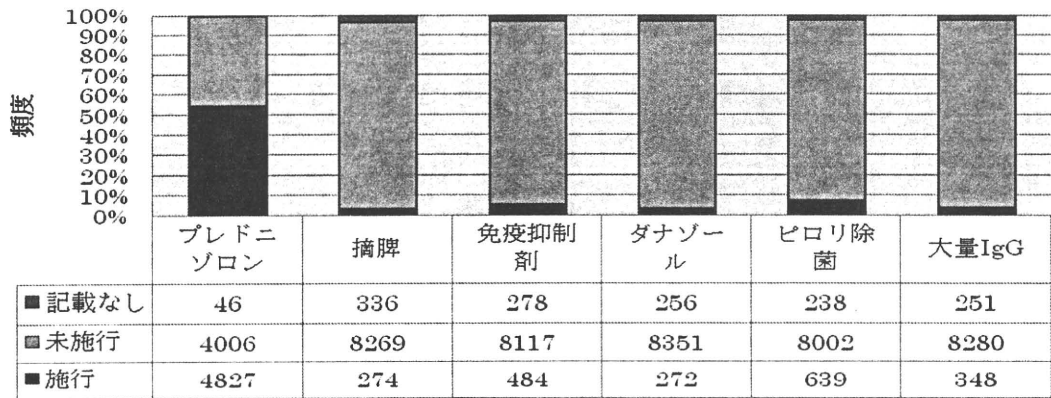


図11. 全経過での治療（更新・慢性型）

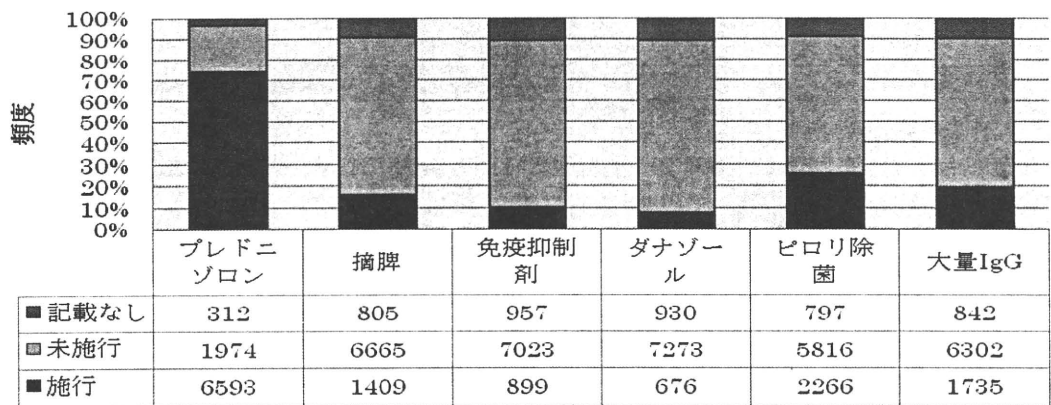


図12. 罹病期間（更新・慢性型）

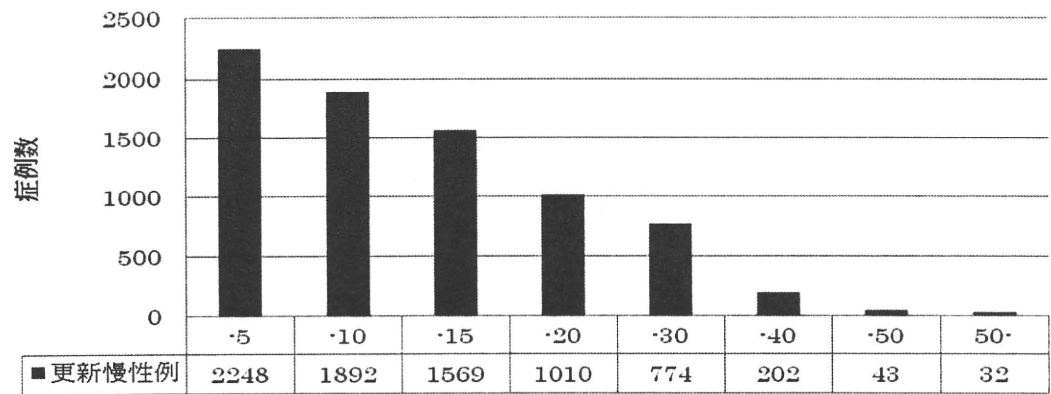
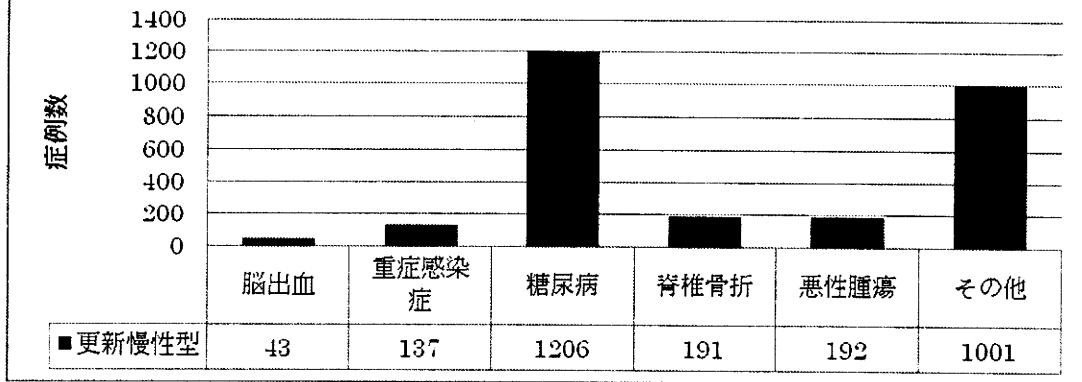


図13. 合併症（更新・慢性型）





# 遺伝性血小板減少症例に見いだされた $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3 変異の血小板機能および血小板産生に及ぼす影響に関する研究

研究分担者：富山佳昭 大阪大学医学部附属病院輸血部

研究協力者：柏木浩和 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科

## 研究要旨

慢性ITPの鑑別診断として、遺伝性血小板減少症が挙げられる。本邦における遺伝性血小板減少症の解析から、血小板膜糖蛋白 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3の細胞内領域GPII**b**(R995W)変異を見いだした。患者血小板はやや大型で、血小板数は $7\sim 10$ 万/ $\mu$ lと軽度に低下していた。 $\alpha$ I**IIb**(R995W)変異により $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3は恒常的に活性化された状態になり、また $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3活性化後に認められる細胞内シグナル、FAKの恒常的な活性化も認められた。更に発現細胞において異常な細胞突起や膜表面の波打ちが認められた。これらの結果から $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3の活性化制御機構およびシグナル異常が血小板数の恒常性維持に関与している可能性が示された。

### A. 研究目的

慢性の血小板減少例の中に、稀に遺伝性(家族性)血小板減少例が存在し、ITPと誤診され無効な治療を受けることがある。また遺伝性血小板減少症の発症メカニズムの解析から血小板産生および制御機構が明らかとされる可能性がある。遺伝性血小板減少症の原因としてはMYH9異常症やBernard-Soulier症候群などが知られているが、原因遺伝子が不明であるものも多い。血小板インテグリン $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3(GPII**b**/IIIa)はフィブリノゲンやフォンウィレブランド因子(VWF)の受容体として血栓止血に必須の分子であり、その先天性異常であるGlanzmann血小板無力症の解析などから $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3の発現や機能に影響する多くの遺伝子異常が報告されている。しかし、これら遺伝子異常を有する患者における血小板数は正常であったことから、 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3の遺伝子異常は血小板産生や血小板数の恒常性維持には関与しないと考えられてきた。しかしながら、我々および國島らは、原因不明の遺伝性血小板減少症の解析から $\alpha$ I**IIb**の細胞内領域に

新たな変異、R995Wの存在を見いだした。本研究では、この $\alpha$ I**IIb**(R995W)変異の血小板機能および産生能に及ぼす影響を明らかにすることを血小板減少のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

患者血小板の $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3発現はflow cytometryおよびWestern blotにて確認した。また $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3の活性化をリガンド類似抗体PAC1を用いて検討した。また患者血小板mRNAよりcDNAを合成し直接シーケンス法にて $\alpha$ I**IIb**および $\beta$ 3 cDNAの翻訳領域の遺伝子異常の有無について検討した。見いだされた遺伝子異常、R995Wを発現ベクターに組み込んだのちCHOおよび293T細胞に発現させ、 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3の活性化、FAK活性化および固相化フィブリノゲン上での接着、進展、形態異常について検討した。尚、本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を得ており、患者からは研究協力に関し、十分な説明の上で書面による同意書を得ている。

## C. 研究結果

1) 本人、妹および母親に血小板減少を認める遺伝性血小板減少例の家族より採血を行い、 $\alpha$ I**Ib** および $\beta$ 3 cDNA の塩基配列を検討した結果、3人とも

$\alpha$ I**Ib**(R995W)変異の heterozygote であることを見いだした。患者血小板数は7~10万/ $\mu$ lであり、やや大型の血小板を認めた。血小板表面の $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 発現は正常例の60-70%程度に低下していた。

2)  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 は通常非活性化状態にあり、そのリガンドであるフィブリノゲンやVWFとは結合できないが、PAC1を用いた検討から $\alpha$ I**Ib**(R995W)  $\beta$ 3 は恒常的に軽度活性化された状態にあることが明らかとなった。

3)  $\alpha$ I**Ib**(R995W)  $\beta$ 3 発現 CHO 細胞はフィブリノゲン上において proplatelet 様の突起形成、細胞膜の異常な波うち (ruffling) などの形態異常を認めた。

4)  $\alpha$ I**Ib**(R995W)  $\beta$ 3 発現細胞において、通常では $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 のリガンド結合後に認められる FAK のリン酸化が、リガンドが結合前から認められた。

## D. 考察

従来、 $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 における変異は血小板数には影響を及ぼさないと考えられてきたが、 $\alpha$ I**Ib**(R995W)変異が本家系を含め本邦の遺伝性血小板減少例の4家系において見いだされたこと(国立名古屋医療センター國島伸治先生)、また細胞内において $\alpha$ I**Ib**(R995)と塩結合を形成し $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 の活性化制御に重要な役割を果たすことが示されている $\beta$ 3(D723)変異においても、海外において遺伝性血小板減少が報告されていることから、 $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 における変異が血小板減少に関与する可能性が示された。そのメカニズムとしては、 $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 が恒常的に活性化していたことから、血小板消費が生体内で亢進

している可能性や、FAK の恒常的なリン酸化や発現細胞における形態異常を認めたことから、本変異により巨核球成熟/分化、血小板産生自体が影響を受ける可能性が示された。

## E. 結論

遺伝性血小板減少例において $\alpha$ I**Ib**(R995W)変異を見いだした。本変異により誘導される $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 は恒常的な活性化と細胞内シグナル活性化が、血小板減少の原因となっている可能性がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Torita S, Suehisa E, Kawasaki T, Toku M, Takeo E, Tomiyama Y, Nishida S, Hidaka Y. Development of a new modified Bethesda method for coagulation inhibitors: the Osaka modified Bethesda method. Blood Coagul Fibrinolysis. 2011 Jan 17. [Epub ahead of print]

2) Tadokoro S, Nakazawa T, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. A potential role for  $\alpha$ -actinin in inside-out  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 signaling. Blood 117(1):250-258, 2011

3) Kashiwagi H, Kiyomizu K, Kamae T, Nakazawa T, Tadokoro S, Takiguchi S, Doki Y, Kanakura Y, Tomiyama Y. Molecular analysis of a patient with type I Glanzmann thrombasthenia and clinical impact of the presence of anti- $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 alloantibodies. Int J Hematol 93(1):106-111, 2011

4) Bhavaraju K, Georgakis A, Jin J,

- Kent Gartner T, Tomiyama Y, Nurden A, Nurden P, Kunapuli SP. Antagonism of P2Y<sub>12</sub> reduces physiological thromboxane levels. Platelets 21:604-609, 2010
- 5) Nomura S, Kurata Y, Tomiyama Y, Takubo T, Hasegawa M, Saigo K, Nishikawa M, Higasa S, Maeda Y, Hayashi K. Effects of bisphosphonate administration on the bone mass in immune thrombocytopenic purpura patients under treatment with steroids. Clin Appl Thromb Hemost 16:622-627, 2010
- 6) Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y. Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/Neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. J Biol Chem 285:24494-24507, 2010
- 7) 富山佳昭. P2Y<sub>12</sub> receptor occupancy. International review of thrombosis 5:34-38, 2010
- 8) 富山佳昭. Atherothrombosis と血小板-動脈硬化病変形成における血小板の関与. 医学のあゆみ 233:447-450, 2010
- 9) 富山佳昭. 抗血小板薬の最近の進歩. 最新医学 65:90-96, 2010
- 10) 富山佳昭. ITP に関する用語の標準化: 国際作業部会からの報告. 日本血栓止血学会誌 21:278-282, 2010
- 11) 富山佳昭. 第 V 章 2. 血液・造血器系の検査. 看護学テキスト NiCE 疾病と検査 検体検査/生理機能検査/画像診断/内視鏡検査/その他 (松田 暉, 荻原俊男, 難波光義, 鈴木久美, 林 直子編), 南江堂, 東京, 2010, pp247-248
- 12) 富山佳昭. データ解説: 急性冠症候群において待機的侵襲処置を受ける患者を対象とした前方視的無作為二重盲検法によるチカグレロールとクロピドグレルの比較試験 (PLATO). International review of thrombosis 5:50-51, 2010
- 13) 富山佳昭. 知っておきたい血管医学用語: P2Y<sub>12</sub>. Vascular Medicine 6:56-60, 2010
- 14) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 小児科診療 73:2193-2196, 2010
- 15) 富山佳昭, 本田繁則. キンドリンとインテグリン活性化. Annual Review 血液 2010 (高久史磨, 小澤敬也, 坂田洋一, 金倉譲, 小島勢二編), 中外医学社, 東京, 2010, pp160-167
- 16) 柏木浩和, 秋山正夫, 富山佳昭. 自己抗体と血小板機能異常. 日本血栓止血学会誌 21:271-277, 2010
- 17) 柏木浩和. 血液型が A 型の患者に B 型の赤血球を輸血してしまった。赤っぽい尿がでていいる。血圧が下がってきた。さてどうしよう? 造血器腫瘍治療 これは困ったぞ、どうしよう? 第 2 版 (押味和夫監修、木崎昌弘、松村到編)、中外医学社、東京、2010、pp296-298
- 18) 柏木浩和. 血小板輸血をしている最中に急にショックになった。さてどうしよう? 造血器腫瘍治療 これは困ったぞ、どうしよう? 第 2 版 (押味和夫監修、木崎昌弘、松村到編)、中外医学社、東

京、2010、pp299-302

19) 柏木浩和. エホバの証人患者、輸血したいが、さてどうしよう? 造血器腫瘍治療 これは困ったぞ、どうしよう? 第2版 (押味和夫監修、木崎昌弘、松村到編)、中外医学社、東京、2010、pp303-306

## 2. 学会発表

1) Kamae T, Kiyomizu K, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. (Poster) Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in thromboxane A2 receptor. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting (2010.12.4-7, Orlando, USA, Broxmeyer HE)

2) Miyazaki K, Shirasugi Y, Ando K, Tomiyama Y, Okamoto S, Kurokawa M, Kirito K, Yonemura Y, Mori S, Usuki K, Iwato K, Hashino S, Wei H, Richard Lizambri R. (Poster) Evaluation of Romiplostim in a randomized placebo-controlled phase 3 study of a Japanese population with chronic immune thrombocytopenia (ITP). The American Society of Hematology 52nd Annual meeting (2010.12.4-7, Orlando, USA, Broxmeyer HE)

3) 柏木浩和, 秋山正夫、中澤剛士、清水一亘、釜江 剛、田所誠司、瀧口修司、土岐祐一郎、金倉謙、富山佳昭. (口演) FACSにて血小板輸血の有用性を検討しえた抗血小板抗体を有する胃癌合併 Glanzmann 血小板無力症の一例. 第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4.22-24, 鹿児島, 丸山征郎)

4) 富山佳昭, 宮川義隆, 岡本真一郎, 勝谷慎也, 木村昭郎, 大越靖, 二宮治

彦, 小杉浩史, 野村昌作, 尾崎勝俊, 池田康夫, 小尾伸之, 桂幸一, 金倉謙. (口演) 治療抵抗性慢性特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者に対するエルトロンボパグの臨床試験成績. 第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4.22-24, 鹿児島, 丸山征郎)

5) 釜江剛, 大塚欣敏, 清水一亘, 中澤剛士, 秋山正夫, 田所誠司, 柏木浩和, 金倉謙, 富山佳昭. (口演) 血小板トロンボキサン受容体異常症患者 (nt.167-8における1塩基挿入ヘテロ接合体) の血小板機能解析. 第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4.22-24, 鹿児島, 丸山征郎)

6) 柏木浩和, 富山佳昭. (シンポジウム) 血小板異常症における血小板抗体の臨床的意義とその対策. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会 (2010.5.28-30, 名古屋, 高松純樹)

7) 押田真知子, 永峰啓丞, 清川知子, 青地寛, 池田珠世, 矢尾真希子, 中原千尋, 富山佳昭. (ワークショップ) 輸血の安全性の確保、適正使用を目的とした輸血オーダリング、輸血管理システムの構築. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会 (2010.5.28-30, 名古屋, 高松純樹)

8) 池田珠世, 押田真知子, 永峰啓丞, 清川知子, 青地寛, 矢尾真希子, 中原千尋, 富山佳昭. (口演) 廃棄血削減への取り組み-過去5年廃棄理由の解析-. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会 (2010.5.28-30, 名古屋, 高松純樹)

9) 西山美保, 林悟, 兜森修, 末久悦次, 柏木浩和, 倉田義之, 富山佳昭. (口演) XE-5000を用いた幼若血小板比率測定に及ぼす抗凝固剤および保存温度の影響-検体安定性の検討-. 第57回日本臨