

モデルマウスを用いた ITP の根治的治療法の開発

○桑名正隆 西本哲也 慶應義塾大学リウマチ内科

これまでに、BALB/c ノードマウスに同系マウス由来 CD4⁺CD25⁻細胞を移入することで作製した Treg 欠損マウスの約 35%が ITP 病態を自然発症することを報告した。また、Treg 欠損マウスにおいて産生される抗血小板自己抗体の主な対応抗原は GPIb であった。本年度は、確立した ITP モデルマウスを用いて以下の 2 課題について検討する。

1. GPIb 反応性 CD4⁺T 細胞の解析

大腸菌を用いて GPIb リコンビナント蛋白を作製し、それらを抗原とした T 細胞の増殖反応により GPIb 反応性 CD4⁺T 細胞を検出する。さらに、抗原刺激の反復と限界希釈により、GPIb 反応性 CD4⁺T 細胞株を樹立し、以下の項目を検討する。

- ①産生サイトカインの測定
- ②抗原エピトープと T 細胞受容体の決定
- ③抗血小板自己抗体の産生誘導能の解析
- ④T-B 細胞協調作用に関与するサイトカイン (IL-6 など) と膜蛋白 (CD40-CD154、BAFF-BAFFR など) の探索

2. TPO と抗 CD154 抗体の同時投与による血小板反応性 T 細胞の免疫寛容の誘導

T 細胞活性化には T 細胞受容体による抗原認識と同時に CD40-CD154 を介した副刺激が必要であり、副刺激遮断により T 細胞はアナジー（無反応状態）またはアポトーシスに陥る。ITP 患者を対象としたヒト化抗 CD154 抗体の治験において、単回投与による血小板増加と GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞の反応性低下が確認されたが、その抑制効果は一過性であった。副刺激遮断による自己反応性 T 細胞の抑制効果は T 細胞の抗原認識時に最も発揮されるため、効果増強を目的として以下の治療プロトコルを試みる。

ITP マウスに TPO 300ng または PBS のみを 7 日間連日静脈内投与し、TPO 投与開始 7 日後から抗 CD154 抗体もしくは対照 IgG250mg を隔日で 4 回静脈内投与し、その後 28 日間以上観察する。i) TPO+抗 CD154 抗体、ii) TPO+対照 IgG、iii) PBS+抗 CD154 抗体、iv) PBS+対照 IgG の 4 群に分類し、血小板数、網血小板比率、血小板関連抗血小板抗体とともに上記 GPIb 反応性 CD4⁺T 細胞の解析を経時的に行う。

MEMO

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

血液凝固異常症に関する調査研究班

第 2 回班会議

日時：平成 25 年 1 月 25 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階中会議室

プログラム・抄録集

研究代表者 村田 満

血液凝固異常症に関する調査研究班 第2回班会議プログラム

日時：平成25年1月25日（金）午前10時～午後5時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 新棟11階中会議室

（サブグループ研究計画：25分 各個人研究計画：10分 討論含む）

10：00～ 研究代表者 挨拶 村田 満

厚生労働省健康局疾病対策課 課長補佐 中尾 武史 様

国立保健医療科学院 研究事業推進官 武村 真治 様

10：15～ TMA研究班 研究計画 藤村 吉博

サブグループリーダー：藤村 吉博 奈良県立医科大学

班員： 和田 英夫 三重大学医学部

小亀 浩市 国立循環器病研究センター

研究協力者：

森木 隆典 慶應義塾大学医学部／日笠 聡 兵庫医科大学血液内科

松本 雅則 奈良県立医科大学／上田 恭典 倉敷中央病院

10：40～ 特発性血栓症研究班 研究計画 小嶋 哲人

サブグループリーダー：小嶋 哲人 名古屋大学医学部

班員： 坂田 洋一 自治医科大学

川崎 富夫 大阪大学医学部

宮田 敏行 国立循環器病研究センター

横山 健次 慶應義塾大学医学部

小林 隆夫 県西部浜松医療センター

榛沢 和彦 新潟大学教育研究院

研究協力者：

中村 真潮 三重大学大学院／山田 典一 三重大学大学院

平井 久也 浜松医療センター／太田 覚史 三重大学医学部附属病院

11：05～ I T P研究班 研究計画 富山 佳昭

サブグループリーダー：富山 佳昭 大阪大学医学部

班員： 藤村 欣吾 安田女子大学

桑名 正隆 慶應義塾大学医学部

倉田 義之 四天王寺大学

研究協力者：

降旗 謙一 株式会社エスアールエル／野村 昌作 関西医科大学 第一内科

宮川 義隆 慶應義塾大学医学部／柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科

高蓋 寿朗 西神戸医療センター

11：30～12：30 昼休み

12 : 30～13 : 30

TMA班研究報告：司会 藤村 吉博

藤村吉博・松本雅則 「血栓性血小板減少性紫斑病の診断ガイドライン（案）」

宮川義隆 「TTP の ADAMTS13 体外診断薬とリツキシマブの臨床開発」

和田英夫 「三重大学で経験した aHUS について」

小亀浩市 「定量 PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子解析」

森木隆典・猪狩敦子 「後天性 TTP における抗 ADAMTS13 自己抗体の定量的測定」

13 : 30～14 : 50

特発性血栓症班研究報告：司会 小嶋 哲人

小嶋哲人 「血栓性素因の調査研究：先天性アンチトロンビン欠損症・SERPINC1 遺伝子解析」

坂田洋一・窓岩清治 「特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法施行患者に
おける PT-INR 自己測定の安全性と有効性に関する臨床研究」

川崎富夫 「(1) 凝固因子インヒビター測定法における血漿 pH の安定化法とその応用
(2) 日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略(ガイドライン問題の法的解決)」

宮田敏行 「不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究」

横山健次 「自家移植 (ASCT) を施行した、比較的若年の日本人多発性骨髄腫 (MM)
患者における血栓症発症の解析」

小林隆夫 「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」

太田覚史 「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究」

榛沢和彦 「震災被災者における DVT の研究：中越地震 8 年後の DVT 検診及び
イタリア北部地震(エミリア地震)における VTE の調査」

14 : 50～15 : 10 休憩

15 : 10～16 : 20

ITP 班研究報告：司会 富山 佳昭

藤村欣吾・高蓋寿朗 「鉄観音茶の中止後に血小板数が増加した難治性 ITP の 1 症例」

倉田義之 「臨床個人調査票 (平成 22 年度) 集計による特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の
全国疫学調査および平成 13～22 年度の 10 年間における個別症例解析の試み」

宮川義隆 「妊娠合併 ITP の診療ガイドライン (仮称) の作成」

富山佳昭・柏木浩和・清水一亘 「ITP 患者の PA anti- α IIb β 3 抗体の多くは α IIb の
 β -プロペラ領域内の極めて限定された部位に結合する」

桑名正隆・西本哲也 「ITP マウスモデルにおける GPIb 反応性 CD4+T 細胞の検出」

松原由美子 「脂肪前駆細胞からのトロンボポエチン分泌と巨核球分化・血小板産生」

終了

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

血液凝固異常症に関する調査研究班 研究代表者：村田 満

事務局：慶應義塾大学医学部臨床検査医学 富田ゆかり 村田教授室 TEL : 03-5363-3838

サブグループ研究

TMA サブグループ

研究分担者	藤村 吉博	奈良県立医科大学
	和田 英夫	三重大学
	小亀 浩市	国立循環器病研究センター
研究協力者	森木 隆典	慶応義塾大学
	日笠 聡	兵庫医科大学
	上田 恭典	倉敷中央病院
	宮田 敏行	国立循環器病研究センター
	宮川 義隆	慶応義塾大学
	松本 雅則	奈良県立医科大学

総括目標：TTP (TMA) の病態解析と治療法の開発を基礎と臨床の両面から行う。

平成24年度は以下の個別の活動を行った。

TMAグループとして、1) TMA症例の集積、2) リツキシマブのTTPへの保険適応拡大、3) ADAMTS13体外診断薬の開発、4) TTPの診断基準の作成を重点的に行った。

藤村吉博 (松本雅則)

- 1) 奈良医大輸血部 TMA データベースの個別解析 (継続)
- 2) TTP の血漿交換療法に使用する最適血漿製剤の選択
- 3) TTP の診断ガイドラインの作成

和田英夫

三重県内における TMA 症例の調査・研究の継続 (三重大学の aHUS を中心に)

小亀浩市 (宮田敏行)

Upshaw-Schulman症候群患者の遺伝子解析 (未解決症例の重点的解析)

森木隆典

後天性 TTP における抗 ADAMTS13 自己抗体の定量的測定

日笠聡

新規TMA患者の集積

上田恭典

リツキシマブのTTPへの保険適応拡大と症例集積

宮川義隆

リツキシマブのTTPへの保険適応拡大とADAMTS13体外診断薬の開発

MEMO

特発性血栓症サブグループ研究報告

研究分担者

小嶋哲人 名古屋大学医学系研究科
宮田敏行 国立循環器病研究センター
坂田洋一 自治医科大学
川崎富夫 大阪大学大学院医学系研究科
横山健次 慶應義塾大学医学部
小林隆夫 浜松医療センター
榛沢和彦 新潟大学大学院

研究協力者

中村真潮 三重大学大学院医学系研究科
山田典一 三重大学大学院医学系研究科
太田覚史 三重大学大学院医学系研究科
平井久也 浜松医療センター
窓岩清治 自治医科大学

目的

難治性疾患である先天性血栓性素因に伴う特発性血栓症／静脈血栓塞栓症の日本人での発症原因・メカニズムの解明、その予知・予防対策の確立は、我が国の医療行政上においても重要な課題である。本研究班の全国横断的調査研究は日本人での静脈血栓塞栓症発症のエビデンスを明らかにする貴重なデータであり、これまでに人種間の血栓性素因の違い、とくにプロテイン S K196E 変異が日本人特有な血栓性素因であることを明らかにして来た。日本人での特発性血栓症／静脈血栓塞栓症のエビデンスの収集とともに、その原因・メカニズムを解明し、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防対策の確立を本研究の目的とする。

方法・結果

特発性血栓症／静脈血栓塞栓症サブグループでの研究は、全国の医療施設を対象にしたアンケート調査研究と血栓症患者を対象とした研究などから構成され、今年度はそれぞれ以下の研究を行ったので報告する。

- ・ 特発性血栓症／静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法施行患者におけるPT-INR自己測定的安全性と有効性に関する臨床研究。
- ・ 不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究。
- ・ 血栓性素因の調査研究：先天性アンチトロンビン欠損症・*SERPINC1*解析研究。
- ・ 凝固因子インヒビター測定における血漿pHの安定化法に関する研究。
- ・ 自家移植（ASCT）を施行した、比較的若年の日本人多発性骨髄腫（MM）患者における血栓症発症の解析研究。
- ・ 入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究。
- ・ 震災被災者におけるDVTの研究：中越地震8年後のDVT検診及びイタリア北部地震（エミリア地震）におけるVTEの調査。
- ・ 肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究。

MEMO

ITP サブグループ

班員：	富山佳昭	大阪大学医学部附属病院 輸血部
	藤村欣吾	安田女子大学 薬学部
	倉田義之	四天王寺大学 人間福祉学科
	桑名正隆	慶應義塾大学医学部 リウマチ内科
研究協力者：	降旗謙一	SRL
	松原由美子	慶應義塾大学医学部 臨床検査医学
	宮川義隆	慶應義塾大学医学部 血液内科
	高蓋寿朗	西神戸医療センター 免疫血液内科
	柏木浩和	大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科
	野村昌作	関西医科大学 第一内科
特別協力者：	杉田 稔	東邦大学医学部 衛生学
	島田直樹	昭和大学医学部 衛生学

ITP 診療に関して従来の班研究を継続、発展すべく、1) 疫学研究、2) 診断および治療の標準化、特に診療の参照ガイドの作成および改訂、3) 病態解析、を柱として ITP の解析を行なう。

1) 疫学研究の継続、発展

ITP に関しての、臨床調査個人票の改訂作業は終了。特に骨髓穿刺の取り扱いに関しては見直しを行なった。骨髓穿刺を必要とする基準を設定した。今回の検討では、新たに個別症例の臨床経過の解析を行った。さらには、小児 ITP のデータの精度向上をめざす。

2) 妊娠合併 ITP 治療の参照ガイド作成

成人慢性 ITP の診療に関して海外のガイドを参照しつつ、H. Pylori 除菌療法、TPO 受容体作動薬を含めわが国のデータを加味し ITP 治療の参照ガイド 2012 年度を公開した。摘脾の合併症に関してはさらに検討する必要あり。またリツキシマブの治療上の位置づけに関しても検討する（医師主導型治験）。

本年度より新たに妊娠合併 ITP 治療の参照ガイドの作成を開始。現在、小児科、産婦人科、麻酔科のエキスパートも参画した治療の参照ガイド作成委員会を立ち上げたところである。

ITP の診断基準案に関してその基盤となる検査法の一般化、標準化が必要であるため、標準化にむけて検討する。

3) 病態解析

ITP における主要な抗体である抗 GPIIb-IIIa 抗体のエピトープ解析（ヒト）、マウスモデルを用いた GPIb 反応性 CD4⁺T 細胞の解析、脂肪前駆細胞からの巨核球分化誘導機構の解析を発展させる。

MEMO

個別研究

血栓性血小板減少性紫斑病の診断ガイドライン（案）

奈良県立医科大学 輸血部 松本雅則、藤村吉博

疾患の定義

血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)は、細血管障害性溶血性貧血(microangiopathic hemolytic anemia:MAHA)、血小板減少、腎障害、発熱、動揺性精神神経症状の古典的 5 徴候を特徴とする疾患で、全身の微小血管に血小板血栓が形成されることで発症する。すべての症例で 5 徴候が揃わないことから、最近では他に原因のない MAHA と血小板減少の存在で本疾患を疑うことが重要と考えられている。

診断基準

確定例:

以下の場合には TTP と診断する。

1. ADAMTS13 活性が 5%未満に著減していること
抗 ADAMTS13 自己抗体が陰性であれば Upshaw-Schulman 症候群(USS)、同抗体が陽性であれば後天性 TTP と診断する(補足 1)
2. ADAMTS13 活性に関わらず、下記の特徴的な 5 徴候を認めること (補足 2)

疑い例:

他に原因のない下記 5 徴候の①②を認めた場合、TTP を疑う。この場合、下記の除外すべき疾患を参考にすること。

5 徴候の目安

① 細血管障害性溶血性貧血(microangiopathic hemolytic anemia: MAHA)

ヘモグロビンが 12g/dl 未満 (8-10g/dl の症例が多い) で溶血所見が明らかなこと
かつ直接クームス試験陰性。

溶血所見とは、破碎赤血球の出現、間接ビリルビン、LDH、網状赤血球、ハプトグロビンの著減など

② 血小板減少

血小板数が 10 万/ul 未満。1-3 万/ul の症例が多い。

③ 腎機能障害

尿潜血や尿蛋白陽性のみの軽度のものから血清クレアチニンが上昇する症例もあり。ただし、血液透析を必要とする程度の急性腎不全の場合は溶血性尿毒症症候群 (HUS) が疑われる。

④ 発熱

37℃以上の微熱から 39℃台の高熱まで認める

⑤ 動揺性精神神経症状

頭痛など軽度のものから、せん妄、錯乱などの精神障害、人格の変化、意識レベルの低下、四肢麻痺や痙攣などの神経障害などを認める。

除外すべき疾患

① 血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: DIC)

TTP 症例では、PT, APTT は正常で、フィブリノゲン、アンチトロンビンは低下しないことが多い。DIC の血栓は、フィブリン/フィブリノゲン主体の凝固血栓である。

② 溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome:HUS)

腸管出血性大腸菌 (O157 など) 感染症による典型 HUS は、便培養検査・志賀毒素直接検出法 (EIA) などの大腸菌の関与を確認する方法や抗 LPS-IgM 抗体などで診断する。

非典型 HUS は非典型 HUS の診断基準を参照すること。

③ HELLP

妊娠高血圧腎症や子癇で、溶血 (hemolysis)、肝酵素の上昇 (elevated liver-enzymes)、血小板減少 (low platelets) を認める多臓器障害。診断は、Shibai ら (ShibaiBM. Am J Obstet Gynecol 1993;169:1000) の診断基準によって行われるが、TTP と区別できない。

妊娠高血圧症候群を合併している症例はHELLPと診断し、それ以外をTTP疑い例とする。

④ Evans 症候群

Evans 症候群では直接クームス陽性である。ただし、クームス陰性 Evans 症候群と診断されることがあるが、このような症例の中から ADAMTS13 活性著減 TTP が発見されている。

補足

1. 抗 ADAMTS13 自己抗体が 1 Bethesda 単位/ml 以上は明らかな陽性と判断できる。しかし、陰性の判定は必ずしも容易ではなく、USS の診断は両親の ADAMTS13 活性測定などを参考に行うが、確定診断には *ADAMTS13* 遺伝子解析が必要である。
USS 患者の両親は、ヘテロ接合体異常であることから ADAMTS13 活性は 30-50%を示す場合が多い。
2. 後天性 TTP には、基礎疾患が存在せず発症する特発性と、薬物投与関連、造血幹細胞や臓器移植関連、膠原病や悪性疾患に伴う症例、妊娠に伴う症例などの続発性が存在する。
特発性の約 7 割の症例で ADAMTS13 活性が著減し、続発性では抗血小板薬チクロピジン関連や膠原病の一部を除いて ADAMTS13 活性が著減しないという特徴がある。
3. TTP のその他の症状として、腸管の虚血による腹痛や心臓の虚血による胸痛を認めることがある。

TTP の ADAMTS13 体外診断薬とリツキシマブの臨床開発

宮川義隆、松本雅則、上田恭典、藤村吉博

1. ADAMTS13 体外診断薬の開発

- (ア) 医薬品医療機器総合機構（以下、機構）との薬事戦略相談 事前前面談を①平成 24 年 6 月 19 日、②10 月 5 日、③12 月 10 日に行った。
- (イ) 本研究班が開発しカイノス社が国内で販売している ADAMTS13 活性測定試薬（ELISA 法）を体外診断用医薬品として開発予定
- (ウ) 今後、開発権を保有するカイノス社が機構との対面助言を行い、治験を計画する予定。開発に必要な臨床検体（約 50 検体）は、奈良医大が新たに集める予定。測定試薬はカイノスが提供する。測定施設をカイノス、三菱化学メディエンス、奈良医大、治験施設のいずれにするかは、今後の検討課題

2. リツキシマブの適応拡大

- (ア) 厚生労働省 治験推進研究事業（平成 24 年度）に、医師主導治験の研究計画を申請した。日本血液学会、日本血栓止血学会、日本輸血・細胞治療学会から日本医師会治験促進センター宛に推薦を受けた。平成 24 年 11 月 日本医師会 治験推進評価委員会で審査を受けた。研究計画の内容は高く評価されたが、同事業においてリツキシマブの医師主導治験が既に 2 件（小児ネフローゼ、慢性 ITP）採択されていることから残念ながら不採択となった。
- (イ) 厚生労働省 難治性疾患克服研究事業（平成 25 年度）において、医師主導治験の追加公募があれば申請予定
- (ウ) 第三回 未承認薬・適応外薬検討会議の開催時期は現時点で未定であるが、関連領域学会から申請できるように、班会議から推薦依頼状を作成予定

MEMO

三重大学で経験した aHUS について

三重大学 検査医学/血栓・止血異常症診療センター 和田英夫

[はじめに]

近年、ADAMTS13 に関連する TMA 以外に、aHUS が注目されるようになってきた。今回は、三重大学で経験した 9 家系の aHUS について紹介する。

[対象]

三重大学関連病院において診療を受けた aHUS 症例 9 例である。aHUS の定義は、以下の 3 つの項目をすべて満たすものとした。1) 家族性であるか再発性であること、2) ADAMTS13 値が 20%以上である。3) 劇症型でない。

[結果]

9 家系、11 例が基準を満たした。このうち、4 家系で遺伝子解析がなされた。aHUS は殆ど幼小児期に発症するが、一部成人で発症する例や、遺伝子異常を有しても発症しない症例が存在した。家族歴のない症例も多く存在した。予後はよく、死亡例は見られなかった。感冒やインフルエンザなどの誘因を有するものがあった。貧血、血小板減少は必発であるが、精神神経症状を有さない症例も多かった。ADAMTS13 の著減はみられなかった。

[まとめ]

今後さらに aHUS 症例を集積し、遺伝子解析などで確定診断をする必要があると考えられた。

MEMO

定量 PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子解析

国立循環器病研究センター・分子病態部
小亀浩市・樋口(江浦)由佳・宮田敏行

ADAMTS13 は、血小板の凝集過程で重要な役割を果たす von Willebrand 因子を特異的に切断する血漿プロテアーゼである。遺伝子異常や自己抗体の出現などによる ADAMTS13 活性の損失は、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の要因となる。本研究事業の 3 年間では、以下の 4 項目を主な研究内容としている。(1) Upshaw-Schulman 症候群 (USS) 患者の遺伝子解析、(2) ADAMTS13 の立体構造未決定部分および変異体の構造決定、(3) ADAMTS13 遺伝子変異のタンパク質化学的・生物学的影響の解析、(4) ADAMTS13 活性阻害剤および促進剤の探索。今回、定量 PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子解析に関して報告する。

日本の USS 患者に関する臨床情報は奈良県立医科大学・輸血部に集積されている。そのほとんどの患者家系に対して、我々との共同研究として ADAMTS13 遺伝子解析が実施されてきた。方法は最も一般的なダイレクト・シーケンス法である。41 家系の解析の結果、38 家系の患者 44 名にホモあるいは複合ヘテロの非同義変異 (ミスセンス、ナンセンス、フレームシフト、スプライシング異常) が同定された。しかしながら、残る 3 家系のうち 2 家系の患者には 1 アレルしか変異が発見されず、1 家系の患者には変異が全く発見されなかった。

ダイレクト・シーケンス法では比較的大きな欠失等を見逃す可能性がある。これを補完するために Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法がしばしば行われるが、ADAMTS13 用の試薬はまだ市販されていない。そこで、条件検討が容易な定量 PCR を利用して、ゲノム DNA における ADAMTS13 各エクソンの相対的コピー数を比較分析した。その結果、2 家系でそれぞれ別のエクソン 1 個が少なくとも部分的に大きく欠失していることが示唆された。いずれの患者もミスセンスの原因変異 1 個をヘテロで保有していることから、USS 発症原因はミスセンス変異とエクソン欠失による複合ヘテロであると推定される。現在、検証実験を進めているところである。