

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)

とみやまよしあき
富山佳昭*

サマリー

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) は、抗血小板膜糖蛋白 (glycoprotein, GP) II b-III a や抗 GP I b-IX などの抗血小板自己抗体によって脾臓での血小板破壊が亢進し、また、血小板減少をきたす後天性の自己免疫疾患である。最近、ITP において血小板造血も障害されていることが明らかとなってきた。ITP の診断は除外診断が主体であるが、その病態が明らかにされるに従って、網状血小板比率 (%) や血漿トロンボポエチン (thrombopoietin, TPO) 濃度など、病態に即した検査法の有用性が明らかにされつつある。本稿では、ITP の病態とその検査法とともに、新たな治療薬である TPO 受容体作動薬に関して述べる。

用語解説

- **GP II b-III a および GP I b-IX**…血小板/巨核球系に特異的に発現している GP であり、GP II b-III a はフィブリノゲンや von Willebrand 因子の受容体として、GP I b-IX は von Willebrand 因子の受容体として血小板機能の中核を担っている。GP II b-III a の先天性欠損症は血小板無力症、GP I b-IX の先天性欠損症は Bernard-Soulier 症候群として知られている。
- **EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 依存性偽性血小板減少症**…末梢血用のスピッツには抗凝固剤の EDTA-2K[®] が含まれているため、まれに EDTA 依存性の抗体により血小板が凝集することがあり、それが自動血球計算器において白血球分画に認識され、みかけ上血小板減少をきたす現象である。塗抹標本や抗凝固剤なしの採血直後に測定し血小板数が正常であることを確認する。治療は不要である。
- **血小板関連 IgG (platelet-associated IgG, PAIgG)**…PAIgG は血小板関連 IgG (immunoglobulin G) とも呼ばれ、血小板を分離したのち血小板に結合している IgG を測定する検査法である。血小板上には IgG の Fc 受容体が存在しているため、PAIgG は Fc 受容体を介した IgG 結合や非特異的な IgG も測定することになって、正確に抗血小板抗体を測定することはできない。そのため、ITP における PAIgG 測定の診断的意義は小さい。
- **トロンボポエチン (TPO) 受容体作動薬**…TPO とは相同性を有さないが、その受容体 [c-MPL (myeloproliferative leukemia protein)] に作用して受容体を活性化させる薬剤である。TPO と相同性がないため、TPO 受容体作動薬による TPO 中和抗体誘導の副作用は報告されていない。エルトロンプバグ (経口薬: レボレード[®]) およびロミプロスチム (皮下注: ロミプレート[®]) が市販されている。

* 大阪大学医学部附属病院輸血部 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-15

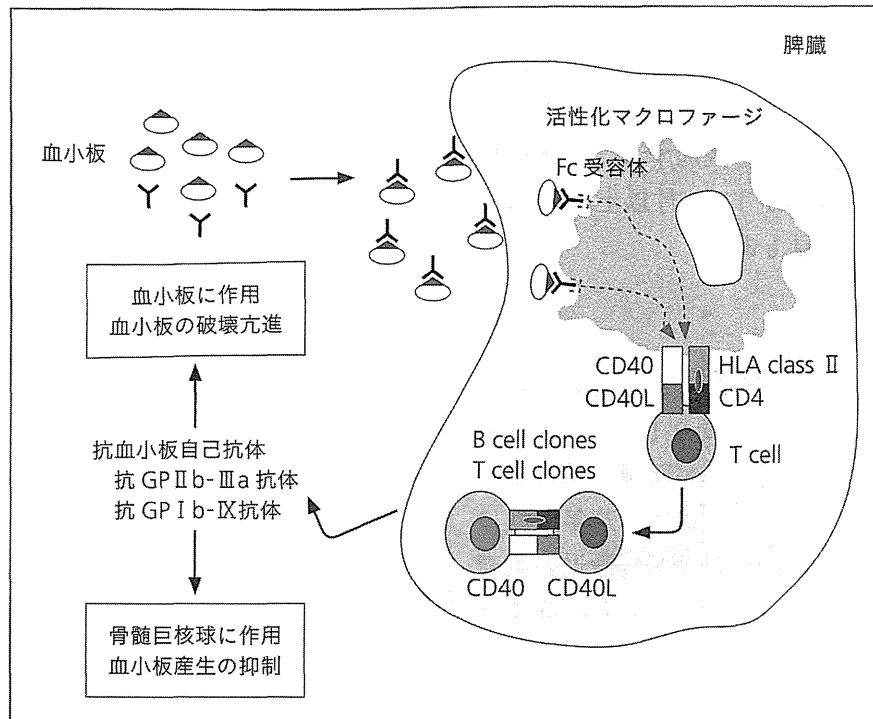


図1 ITPの病態生理

主に脾臓で産生された抗血小板自己抗体(主に IgG)は血小板膜 GPIIb-IIIaあるいは GPIb-IXに結合し、感作血小板は主として脾臓内でマクロファージ上の Fc 受容体を介して捕捉され、破壊される。血小板を取り込んだマクロファージは GPIIb-IIIa あるいは GPIb-IX の抗原ペプチドを HLA 上に表出し、HLA class II-CD4 に加え副刺激経路(ここでは CD40-CD40L を提示)などを介して自己反応性ヘルパー T 細胞を活性化し、さらには B 細胞を活性化し抗体産生を誘導する。一方では、これらの抗体は巨核球の成熟障害などを誘導し、血小板産生を抑制する。(文献3をもとに作成)

ITP の病因と病態

ITP は、厚生労働省の特定疾患治療研究事業対象疾患(特定疾患)に認定されている疾患であり、他の基礎疾患や薬剤などの原因がなく、血小板の破壊が亢進し減少する後天性の自己免疫疾患である^{1,2)}。日本ではいまだ特発性(idiopathic)という名称が一般的であるが³⁾、欧米では本疾患に対して免疫性(immune)あるいは自己免疫性(auto-immune)という表現が用いられ、最近では primary ITP(primary immune thrombocytopenia)との名称が提唱されている。

ITP の病因はいまだ不明であるが、ITP における血小板減少の主たる病態は、血小板の破壊亢進である。ITP では血小板は抗血小板自己抗体(主に IgG)によって感作されており、自己抗体に感作された血小板は早期に脾臓を中心とした網内系においてマクロファージの Fc 受容体を介して捕捉され、破壊され血小板減少をきたす。血小板自

己抗体の主要な標的抗原としては、血小板 GPIIb-IIIa および GPIb-IX が知られている²⁾。これらの標的抗原は抗原提示細胞であるマクロファージによりプロセッシングを受け、その HLA(human histocompatibility leukocyte antigen) 上に表出され、抗体産生を誘導する。このように ITP では、脾臓が主な血小板破壊部位であるとともに、血小板抗体産生部位でもある(図1)³⁾。

最近では、血小板破壊亢進に加え ITP においては巨核球の成熟障害や細胞障害を生じており、血小板産生も抑制されていることが明らかにされている。血小板自己抗体が骨髄巨核球にも結合し、血小板の産生障害を引き起こしていると考えられる(図1)³⁾。

病型

ITP はその発症様式と経過から急性型と慢性型に分類され、6 カ月以内に自然寛解する病型は急性型、それ以後も血小板減少が持続する病型は慢

性型と分類される。急性型は小児に多くみられ、ウイルス感染を主とする先行感染を伴うことが多い。一方、慢性型は成人に多い。しかしながら、発症時に急性型か慢性型かを区別することは極めて困難である。最近では、12カ月以上経過したものを慢性型とする意見もある。

疫学

わが国における有病者数は約2万人で、年間発症率は人口10万人当たり約2.16人と推計される。つまり、年間約3,000人が新規に発症している。慢性ITPは従来20~40歳代の若年女性に発症することが多いとされていたが、最近の調査では60~80歳での発症ピークが認められるようになってきている。高齢者の発症には男女比に差はない。急性ITPは5歳以下の発症が圧倒的である。

臨床症状

症状は皮下出血、歯肉出血、鼻出血、性器出血など皮膚粘膜出血が主症状である。血小板数が1万/ μL 未満となると血尿、消化管出血、吐血、網膜出血を認めることもある。口腔内に高度の粘膜出血を認める場合は、消化管出血や頭蓋内出血をきたす危険があり、早急な対応が必要である。血友病など凝固因子欠損症では関節内出血や筋肉内出血を生じるが、ITPでは通常これら深部出血は認めない。

検査成績

血小板減少以外に特に異常所見を認めないが、出血の持続により貧血を示すことがある。血小板減少の基準は10万/ μL 以下である。白血球数、白血球分類には特に異常を認めない。出血時間は延長し、凝固検査は正常である。骨髄検査において、典型的ITPでは幼若な巨核球が目立つが、巨核球数は正常あるいは増加しており、そのほかに特に異常を認めない。

診断

ITPの診断は、いまだに他の疾患の除外診断が主体であり、薬剤性やC型肝炎など血小板減少をきたす他の疾患を鑑別しなければならない。特

に、血小板数が3万/ μL 以下の症例で無症状の場合や、検査コメントに血小板凝集(+)と記載されている場合は、末梢血用スピッツ内のEDTAによって誘導される「みかけ上」の血小板減少(EDTA依存性偽性血小板減少症)を除外すべきである(治療の必要はない)。

ITPと同様に免疫学的機序で血小板が減少する二次的ITPとして、全身性エリテマトーデスなどの膠原病やリンパ系腫瘍、ウイルス肝炎、HIV(human immunodeficiency virus)感染などが挙げられる。詳しい病歴の聴取や身体所見、時には骨髄穿刺により先天性血小板減少症や薬剤性血小板減少症、さらには血小板産生障害に起因する骨髄異形成症候群や再生不良性貧血(aplastic anemia, AA)などとの鑑別が必要である。

ITPの病態に即した検査法

PAIgGはITPの診断法は2006年に保険収載されたが、PAIgGは血小板に結合した(あるいは付着した)非特異的なIgGも測定するためAAなどの血小板減少時にも高値になることがあり、そのITP診断の特異性は低く27%とも報告されている²⁾。そのため、ITPの診断においてPAIgGの診断的意義は少ない。いい換えると、PAIgGが高値であってもITPとは診断できない。

ITPの病態に即した新たな検査法として、以下のような検査が試みられている。しかしながら、これらの検査の保険適用はなく日常臨床での使用には至っていない。

1. 網状血小板比率(%)

新たに産生された幼若血小板の指標として、網状血小板比率(%)が測定されており、ITPなど血小板破壊亢進時では末血血小板数に占める網状血小板数の比率〔網状血小板比率(%)〕が増加しており、AAではそのような増加は検出されない。

網状血小板比率は、現在大きく分けて2種類の 방법으로測定されている。1つは、フローサイトメトリー(flow cytometry, FCM)を用いた方法(FCM法)であり、以下に述べる本法を用いた測定結果はRP%(percentage of reticulated platelets)と略す。2つ目は、多項目自動血球分析装置XE-2100[®]やXE-5000[®](シスメックス社)を用いて、網状血小板比率をIPF(immature platelet fraction)

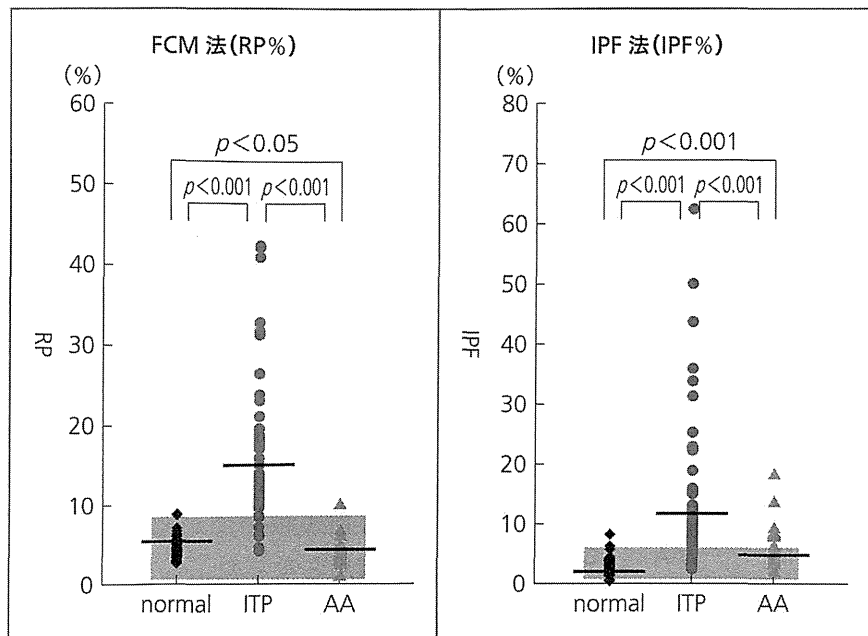


図2 FCM法とIPF法を用いた網状血小板比率の比較

ITP 61例とAA 27例の検体に関して、FCM法とIPF法の両者を用いてITP診断の感度・特異度を比較検討した。■ normal value : mean ± 3SD
(文献4をもとに作成)

として自動測定する方法である(以下、IPF法)。IPF法は簡便であるが、IPFの絶対数が減少している検体の同時再現性が劣っていることが示されている。そこで筆者らは、ITP 61例とAA 27例の検体に関して、FCM法とIPF法の両者を用いてITP診断の感度・特異度を比較検討した。FCM法を用いたRP%では、ITP 61例中50例(82%)が高値を示したのに対し、AA 27例中2例(7%)でのみ高値であった。一方、IPF法での結果はITP 61例中41例(67%)で高値を示したが、AA 27例においても10例(37%)で高値であった。網状血小板比率が増加している検体をITPと診断すると、ITP診断における感度・特異度ともにFCM法が82%、93%と優れていた。一方IPF法では、それぞれ67%と63%であった(図2)⁴⁾。

FCM法はその精度は高いものの、時間と手間がかかりフローサイトメーターなどの高額機器が必要であるなどの欠点を有する。日常診療においては自動分析という簡便さのためIPF法が汎用されているのが現状であるが、その感受性および特異性は60%台でありIPF法の精度は決して高くはなく、AAをITPと誤診する可能性があるため、その結果の解釈にあたっては慎重を期すべき

であると考えられる。

2. 血漿トロンボポエチン(TPO)濃度

TPOはその大部分が肝臓で産生されており、血小板数の変動に関係なくその産生量は一定に保たれている。TPO受容体であるc-MPLは、造血幹細胞にもその発現はみられるが主として血小板/巨核球系に発現しており、c-MPLによるTPO吸着が血漿TPOレベルを制御している。そのため、化学療法などで血小板が減少すると血漿TPO濃度は著明に増加し、血小板輸血にて血小板数が増加すると血漿TPO濃度は低下する。種々の血小板減少病態で血漿TPO濃度を測定すると、AAや化学療法(chemotherapy)後の血小板減少(以下、Chemo)では巨核球も減少し血小板産生が低下しているため、血漿TPO濃度は著増する。一方ITPにおいては、血小板減少にもかかわらず血漿TPO濃度は正常ないしは軽度増加しているのみであった(図3)⁵⁾。ITPでは血小板破壊亢進状態であり、巨核球の分化・成熟障害は認められるものの、その数は低下しておらず、c-MPLとしての減少はわずかであるため、血漿TPO濃度の増加は軽度にとどまると考えられる。また、ITP血小板に結合したTPOが早期に網内系にて血中から除去されることも、ITPにお

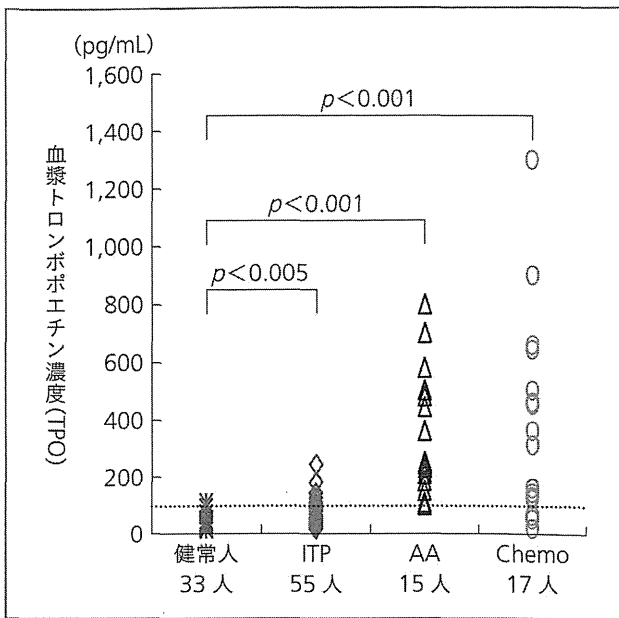


図3 各種血小板減少症における血漿 TPO 値
ITP では血漿 TPO 値は正常から軽度上昇にとどまるが、造血障害に起因する AA や Chemo の血小板減少では血漿 TPO 値は高値を示す。(文献5をもとに作成)

いて血漿 TPO が増加しない一因であると考えられている。

以上のように血漿 TPO 濃度測定は、AA などの血小板産生低下の病態と、ITP などの血小板破壊亢進の病態を区別しうるマーカーとなる可能性がある。

3. GPIIb-IIIa もしくは GPIb-IX に対する自己抗体検出

GPIIb-IIIa もしくは GPIb-IX に対する自己抗体が検出されれば、その診断特異性は 80~90% と高いが、ITP の約 40~60% にしか検出されない点が問題である。

予 後

ITP では、血小板数が 3 万/ μ L 以上では死亡率は正常コントロールと同じであるが、3 万/ μ L 未満だと出血や感染が多くなり死亡率が約 4 倍に増加すると報告されており、3 万/ μ L 以上であれば比較的予後は良好であると考えられている。この成績より、血小板数 3 万/ μ L 以上を維持することが治療目標となっている。

治 療

治療目標は、血小板数を正常化させることなく、危険な出血を予防することである。一般的

には血小板数 3 万/ μ L 以上を維持するように努める。一方、初診時血小板数が 3 万/ μ L 以上あり出血傾向を認めない場合は、無治療での経過観察とする。血小板数を正常に維持するために高用量の副腎皮質ステロイドを長期に使用すべきではない。図 4 に、成人 ITP 治療の参照ガイドの概要を示す⁶⁾。

1. *Helicobacter pylori* 除菌療法

ITP において *H. pylori* 感染陽性の場合、緊急時を除き血小板数に関係なく、*H. pylori* 除菌療法を行う。除菌療法奏効例のうち約 60~70% において血小板増加が認められる。2010 年 6 月に保険適用となった。

2. 副腎皮質ステロイド療法(第一選択治療)

ITP の第一選択薬は副腎皮質ステロイド(プレドニゾロン)である。副腎皮質ステロイドは網内系における血小板の貪食および血小板自己抗体の産生を抑制する。50~75% において血小板が増加するが、多くは副腎皮質ステロイド減量に伴い血小板が減少する。4~6 週間投与後、血小板数の増加がなくても徐々に減量する。

3. 脾臓摘出術(第二選択治療)

ITP において脾臓は主たる自己抗体産生の部位であるとともに、血小板破壊の場である。発症後 6 カ月以上経過し、ステロイドの維持量にて血小板数 3 万/ μ L 以上を維持できない症例、ステロイドの副作用が顕著な症例には積極的に脾摘を行う。寛解率(血小板 5 万以上)は約 60~70% である。

4. 難治 ITP 症例への新規治療法(第三選択治療)

本項で述べる薬剤は、ステロイド療法無効例で、脾摘が無効あるいはなんらかの理由で脾摘困難な症例が対象となる。以下に、最近注目されている治療法を述べる。

1) TPO 受容体作動薬

ITP では血小板造血が障害されていること、また、血漿 TPO 濃度が正常~軽度上昇にとどまることから、治療薬として TPO が期待されていた。しかしながら、リコンビナント TPO 投与により血小板は増加したものの、リコンビナント TPO に対する抗体が産生され、内因性 TPO も抑制されて、血小板減少をきたす有害事象が発生し、その開発が中止となった。この有害事象を克服するため、TPO 受容体作動薬としてエルトロ

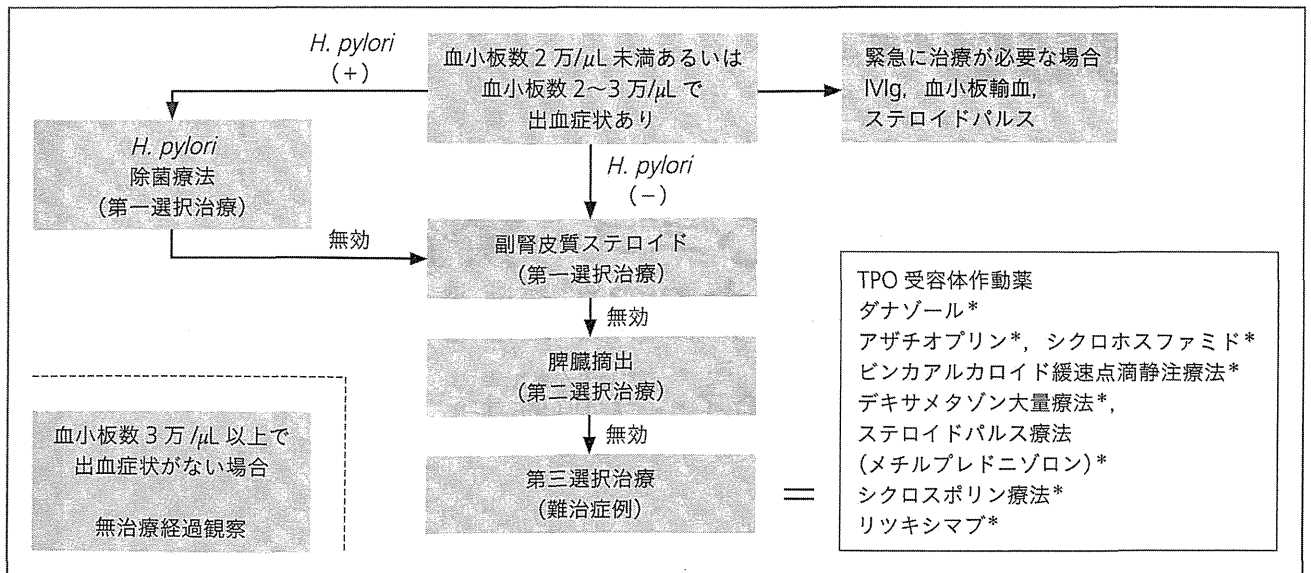


図4 成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版の概要

「血液凝固異常症に関する調査研究」班で作成した成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版の要約を示す。TPO 受容体作動薬は third line 治療に位置する。

*：現時点で保険適用のない薬剤，IVIg：intravenous immunoglobulin(免疫グロブリン大量静注療法)。

(文献6をもとに作成)

ンボパグ(経口薬，レボレード[®])およびロミプロスチム(皮下注，ロミプレート[®])が開発された。両薬剤とも TPO と相同性はないが，TPO 受容体を活性化し，血小板産生を促進し，難治性 ITP に対する有効率も高い。

しかしながら，両薬剤とも血小板造血刺激剤であるため，血栓症や骨髓異常誘導などの可能性に関しての長期的な安全性はまだ確立しておらず，今後，注意深い検討が必要である。

2) 抗 CD20 抗体(リツキシマブ)(保険適用外)

抗 CD20 キメラ抗体であるリツキシマブは B 細胞性リンパ腫に対して開発されたが，自己抗体産生 B 細胞に対しても細胞傷害作用を有することから，現在までに種々の自己免疫疾患に対してその有効性が示されている。日本では保険適用外である。欧米における後方視的解析では，48% に完全寛解(血小板数 15 万/μL 以上)，60% に部分寛解以上(5 万/μL 以上)の効果を誘導しようとされている。しかしながら，肝炎ウイルス再活性化などに留意する必要がある。

おわりに

ITP の病態が明らかにされ，さらに TPO 受容体作動薬の登場によって ITP の診療は大きく変

化している。しかしながら，その診断はいまだに除外診断が主体である。網状血小板比率(%)や血漿 TPO 濃度測定などの ITP の病態特異的な検査法が普及し，日常診療に使用できる日が待たれる。

本稿の一部は厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患研究克服事業)，「血液凝固異常症に関する調査研究」の助成を受けた。

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS : Immune thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 346 : 995-1008, 2002
- 2) 富山佳昭 : 特発性血小板減少性紫斑病. 臨血 49 : 1298-1305, 2008
- 3) 富山佳昭 : トロンボポエチン受容体作動薬による難治性 ITP の治療. 臨血 52 : 627-632, 2011
- 4) 林悟, 西山美保, 末久悦次, 他 : 網状血小板測定法 2 法の比較検討と臨床的有用性の検討—フローサイトメトリー(FCM)法と多項目自動血球分析装置 XE-2100 による自動測定(IPF)法. 臨病理 57 : 1039-1044, 2009
- 5) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, et al : Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. Am J Clin Pathol 115 : 656-664, 2001
- 6) 藤村欣吾, 宮川義隆, 倉田義之, 他 : 成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2012 年版. 臨血 53 : 433-442, 2012

6. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の 分子病態と新規治療法

柏木 浩和*・冨山 佳昭*, **
Kashiwagi Hirokazu Tomiyama Yoshiaki

*大阪大学大学院 医学系研究科 血液・腫瘍内科 講師

**大阪大学医学部附属病院 輸血部 病院教授

Summary

慢性特発性血小板減少性紫斑病 (cITP) は、主に抗血小板自己抗体を介した血小板破壊の亢進と、巨核球分化・成熟障害による血小板産生低下により血小板数が減少する自己免疫疾患である。近年になり、その病態の根幹にある B 細胞および T 細胞の異常、特に制御性 T 細胞の障害が明らかにされてきており、その分子病態の解析が進みつつある。また、新たな治療法として、トロンボポエチン受容体 (TPO-R) 作動薬が使用可能となり、極めて高い有効性を示している。このことから、cITP における血小板減少の病態に、巨核球成熟・血小板産生障害が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

はじめに

特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic thrombocytopenic purpura, Immune thrombocytopenia: ITP) は、主に血小板膜糖蛋白を標的とする自己抗体によりオプソニン化された血小板が、脾臓を中心とする網内系において破壊されることが、その主たる病態であると理解されている。一方で、ITP 患者骨髄における巨核球の形態異常や、血小板カイネティックスタディの結果から、巨核球成熟/血小板産生障害も ITP における血小板減少に関与している可能性が示されていた。近年のトロンボポエチン受容体 (TPO-R) 作動薬の目覚ましい効果は、従来考えられていた以

上に ITP の病態において血小板産生障害が重要な役割を果たしていることを明らかにした。本稿では、このように変わりつつある ITP の分子病態に関する最近の理解を概説するとともに、新たな治療法について紹介する。

1. 慢性 ITP の病態

慢性 ITP (chronic ITP: cITP) の病態に関しての最近の理解は、主に抗血小板自己抗体を介した血小板破壊の亢進とともに、巨核球の障害による血小板産生障害も関与していると考えられている (図 1)。その根幹には、B 細胞および T 細胞を中心とする免疫系細胞の異常がある。

ITP (Idiopathic thrombocytopenic purpura, Immune thrombocytopenia; 特発性血小板減少性紫斑病)
TPO-R (トロンボポエチン受容体) cITP (chronic ITP; 慢性 ITP)

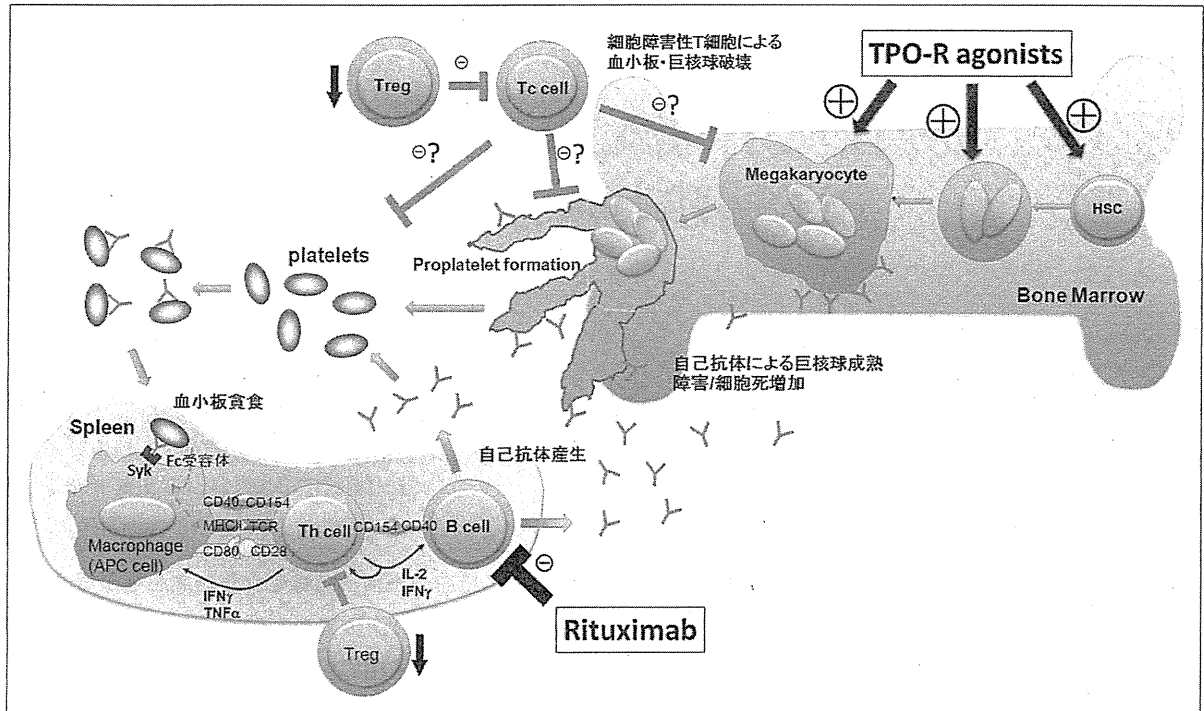


図1 cITPの病態

主に脾臓で産生された抗血小板自己抗体は、血小板破壊を亢進するとともに巨核球も障害する。また、細胞障害性T細胞（Tc cell）による血小板あるいは巨核球の障害も血小板減少に関与している可能性がある。制御性T細胞（Treg）の異常によりこれら免疫異常が継続する。TPO-R 作用薬は巨核球系を刺激することにより血小板産生を促進する。また、Rituximab は自己反応性B細胞を除去することにより自己抗体産生を抑制する。（筆者作成）

1) 抗血小板抗体産生（B細胞の異常）

1950年、セントルイスのBarnes病院の血液内科医HarringtonとHollingsworthは、ITPの原因は血中の何らかの因子による血小板破壊であろうとの仮説のもとに、ITP患者血液をHarrington自身に輸血するという人体実験を行った。輸血後数時間のうちに発熱、悪寒、頭痛、意識障害とともに紫斑が出現し、4日間著明な血小板減少が持続した後、自然に回復した。輸血前後に行われた骨髓検査にて、巨核球に異常はないことが確認され、ITPは血漿中の因子により血小板が破壊される病気であると理解された¹⁾。その後の精力的な研究の結果、この因子は主に血小板の主要な

膜糖蛋白であるGP IIb/III aおよびGP I b/IXを標的とするIgG抗体であることが明らかにされ、特に血小板に直接結合している血小板関連（PA）抗GP IIb/III aあるいはGP I b/IX抗体がその病態に重要であると考えられている。しかし、ITP患者におけるこれら抗体の検出率は、PA抗GP IIb/III a抗体が43～57%、抗GP I b/IX抗体は18～50%程度に留まっている²⁾。抗血小板自己抗体がなぜ産生されるのか、そのメカニズムは依然として不明であるが、Roarkらはファージディスプレイを用いた解析から、ITP患者の抗血小板自己抗体は特定のIg重鎖可変領域を使用していることを示した³⁾。また、筆者らはITP患者

PA（血小板関連）

15名のPA抗GPIIb/IIIa抗体のエピトープに関する詳細な解析を行い、これらがGPIIbのN末端領域の極めて限定された領域を認識すること、また κ/λ -chain解析から、これらの抗体の多くは限定されたクローンから産生されている可能性を示した⁴⁾。これらの結果は、cITP患者においては、自己抗原刺激を受けた特定のB-cell cloneが増殖し、抗体を産生し続けていることを示唆している。HIV, HCV, さらに*H. Pylori*感染例に発症したITPにおいて、血小板と交差反応する抗体の産生が報告されており⁵⁻⁷⁾、何らかの病原体などとの交差反応が自己反応性B細胞クローン増殖の契機となり、後述するT細胞の異常により自己反応性B細胞クローンの排除が行われず、自己抗体産生のサイクルが回り続けることが疾患の慢性化を引き起こしている可能性がある(図1)。

2) T細胞の異常

近年になり、cITP患者におけるT細胞の異常が次々と明らかにされてきた。KuwanaらはITP患者において、通常では分子表面に表出していないGPIIb/IIIaのエピトープ(cryptic epitope)に反応し増殖する自己反応性T細胞の存在を見いだした⁸⁾。また、ITP患者におけるTh1/Th2比の増加、Th17細胞およびIL17レベルの増加、oligo-clonal T細胞の増加、さらに自己血小板に反応する障害性T細胞の存在などのT細胞の異常が報告されてきている⁹⁾。

特に抗血小板自己抗体および自己血小板障害性T細胞の出現は、ITP患者における免疫寛容の破綻を意味しており、他の自己免疫疾患と同様に制御性T細胞(Treg)の異常が注目されている。Tregは末梢血CD4陽性細胞の5~10%を占めており、細胞免疫および液性免疫を抑制することにより自己免疫反応からhostを守る上で重要な役割を果たしている。ITP患者においてもTreg

細胞数の低下やTreg機能の低下が報告されており¹⁰⁾、NishimotoらはTreg欠損マウスにおいて抗血小板抗体の産生による血小板減少が生じること、また、そのマウスにTregを輸注することにより血小板減少を防ぐことが可能であることを示した¹¹⁾。しかし、なぜTregの異常がITPのような臓器特異的自己抗体の産生を促すのかは、現時点では不明である。StasiらはリツキシマブにてB細胞を除去したITP患者において、特にリツキシマブ有効例でTregの数および機能が回復したことを報告しており¹²⁾、Tregの異常発現にはB細胞-T細胞相互作用が関与している可能性がある。

2. 血小板破壊亢進のメカニズム

抗血小板IgG抗体によりオプソニン化された血小板は、主に脾臓のマクロファージに発現した低親和性Fc受容体であるFc γ RIIAおよびFc γ RIII受容体を介して貪食・破壊される¹³⁾。Fc γ RIIAおよびFc γ RIII受容体は、その細胞内領域にITAM (immunoreceptor-activating motif) 領域を有しており、リガンドの結合によりリン酸化されたITAM領域はSykを活性化することにより、マクロファージによる血小板の貪食を促進する¹⁴⁾。網内系による貪食以外に、補体活性化による血小板破壊¹⁵⁾や、細胞障害性T細胞による血小板破壊¹⁶⁾が血小板減少に関与している可能性もある。さらにNardiらは、HIV関連ITP患者より見いだされた抗GPIIIa抗体において、ROS (Reactive oxygen species) 産生の誘導を介した血小板破壊が生じることを報告しており⁵⁾、ITPにおける血小板破壊においても同様の機序が関与している可能性がある。

Treg (制御性T細胞) ITAM (immunoreceptor-activating motif) ROS (Reactive oxygen species)

3. 血小板産生障害のメカニズム

ITP 患者における巨核球系異常・血小板産生障害は、以下のようなデータから示されている。

1) 巨核球形態異常

ITP 患者の骨髄における幼弱巨核球の増加、血小板産生像の消失、核および細胞質の変性変化などの光顕レベルにおける巨核球形態異常は 1940 年代から指摘されていたが、2004 年に Houwerzijl らは ITP 患者骨髄の詳細な電子顕微鏡観察を行い、8 割程度の ITP 患者で細胞質の空胞形成を伴うミトコンドリアの膨化、demarcation membrane の膨張、核内クロマチンの濃縮などのアポトーシス様の形態異常が認められることを報告した (図 2)¹⁷⁾。さらに彼らは、ITP 患者血漿を CD34⁺細胞培養系に加えることにより、このようなアポトーシス様形態異常を誘導できることを示し、ITP 患者血漿中の抗血小板抗体が巨核球のアポトーシスを誘導することを示唆した¹⁷⁾。

2) 巨核球分化・成熟障害

抗血小板抗体の主要なエピトープである GP I b/IX および GP II b/III a は、巨核球系分化の進行とともに発現量を増加させる。2003 年、Chang らは臍帯血由来の CD34⁺細胞を用いた巨核球培養系において、小児 ITP 患者の、特に抗 GP I b/IX 抗体が巨核球系コロニーの産生を抑制することを示した¹⁸⁾。また、McMillan らは同様の手法を用いて、成人 cITP 患者血漿中の抗 GP I b/IX および抗 GP II b/III a 抗体が巨核球コロニー形成を抑制することを示した¹⁹⁾。巨核球に結合した抗体は、骨髄マクロファージを介した貪食、補体活性化などの他に、ROS 産生誘導や PI3 kinase/AKT 経路などを介して巨核球アポトーシスを誘導している可能性がある²⁰⁾。また、自己抗体以外に、血小板と同様に細胞障害性 T 細胞を介した巨核球障害が血小板産生障害に重要な役割を果たしている可能性もある。

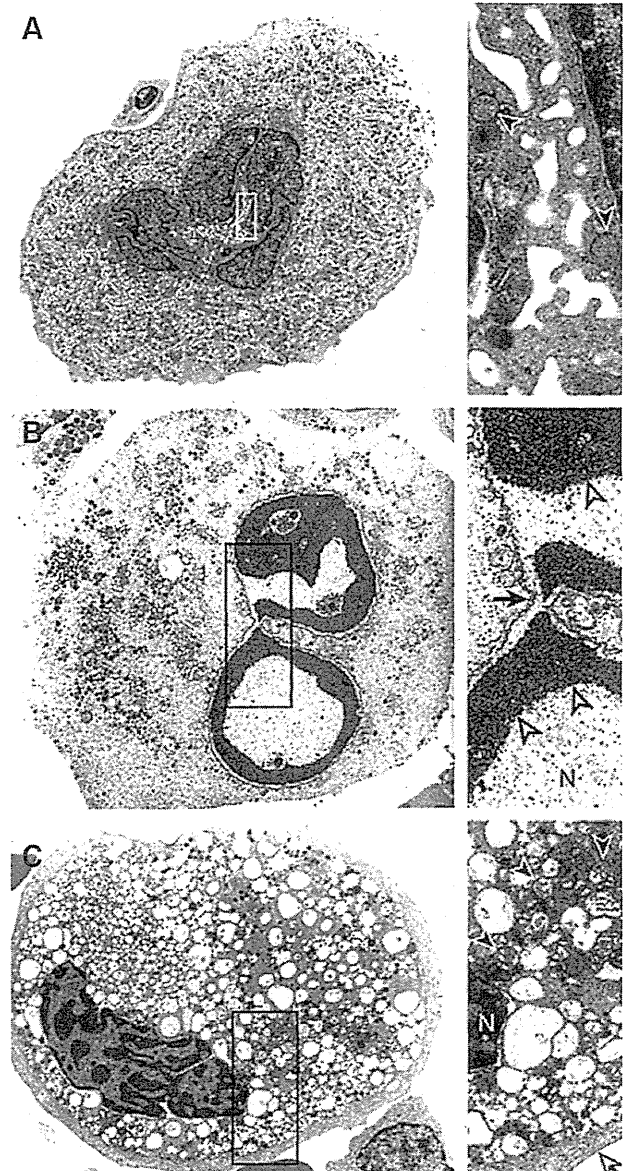


図2 健康人と ITP 患者の巨核球の電顕像

(A) 健康人ドナーの典型的な成熟巨核球。右の高倍率像は正常ミトコンドリア (arrowhead) と正常な demarcation パターンを示す。(B) アポトーシス像を示す ITP 患者の成熟巨核球。高倍率像において核の fragmentation (arrow) とクロマチン凝集 (arrowhead) を示す。(C) パラアポトーシス像を示す ITP 患者の成熟巨核球。ミトコンドリアの膨化 (arrowhead)、小胞体や demarcation membrane の拡張、厚く肥厚した細胞縁 (open arrow) を示す。

(文献 17 より)

3) 血小板カイネティクスと血中 TPO 濃度

主に 1980 年代に行われた $^{111}\text{Indium}$ でラベルした自己血小板を用いた血小板カイネティクススタディの結果は、ITP 患者における血小板回転の多様性を示しており、およそ 2/3 の患者において血小板産生は正常～低下した状態に留まることが示された²¹⁾。同様の結果は、より簡便な網状血小板(幼若血小板)を用いた最近の検討からも明らかにされている。網状血小板はチアゾールオレンジで染色される血小板であり、RNA 含量の豊富な若い血小板であると考えられている。したがって、網状血小板比率 (RP%) は血小板寿命を反映する良いマーカーとなり得る。また、網状血小板絶対数 (RP number) は血小板産生能を反映しているものと考えられる。筆者らは、ITP 患者においては著明に RP %が増加している一方で (Healthy control $7.7 \pm 2.7\%$, cITP 23.8 ± 11.6 , $p < 0.001$), RP number は低下している (Control $17.0 \pm 6.6 \times 10^3/\mu\text{L}$, cITP 8.3 ± 4.6 , $p < 0.05$) ことを示した²²⁾。また、シスメックス社の血球カウンターを用いて測定される IPF (immature platelet fraction) を用いた検討においても、同様に IPF 比率の増加と IPF 絶対数の低下が報告されている²³⁾。これらの結果は、ITP 患者における血小板寿命の短縮とともに、血小板産生障害を反映していると考えられる。

TPO は主に肝臓で一定量産生されており、血中 TPO 濃度は血小板および巨核球に発現した TPO 受容体による TPO 消費により規定されると考えられている。血小板が高値の場合は巨核球に反応する相対的な TPO が低下し、逆に血小板数が低下した場合は血中 TPO が増加することにより巨核球・血小板造血が刺激され、血小板数は一定に保たれる。実際、再生不良性貧血患者や化学療法後の血小板減少例では、血中 TPO 濃度の著

明な上昇を認める。しかし、cITP においては意外なことに、TPO は正常～軽度増加に留まる例が多い²²⁾。このことは、cITP における TPO の相対的な不足を意味していると考えられ、TPO-R 作動薬が有効である理論的根拠の一つとなっている。

4. 新規治療法

本邦の成人 cITP 患者の治療に関しては参照ガイドが作成されており、ピロリ菌陽性例では除菌療法、ピロリ菌陰性あるいは除菌無効例では、血小板数および出血症状に応じて治療を開始することが推奨されている²⁴⁾。第 1 選択は副腎皮質ステロイド (主にプレドニゾン) であるが、寛解 (無治療で 10 万以上を維持) に達する症例は 20% 程度であり、多くはステロイド依存性となる。第 2 選択としては、脾摘が勧められる。脾摘は現時点においても最も治療が期待できる治療法であるが、約 14% の患者においては無効であり、また有効例のうち約 20% は数週から数年後に再燃し、長期的な寛解を維持できる例は約 2/3 に留まる。このようなプレドニゾン、脾摘無効の難治性 cITP 患者に対し各種治療法が試みられてきたが、効果および安全性の点で満足できるものはなかった。しかし、TPO-R 作動薬の登場により、ITP の治療は大きく変わりつつある²⁵⁾。

1) TPO-R 作動薬

cITP 患者においては、巨核球障害による血小板産生低下がその病態の一因と考えられること、また、血中 TPO 濃度は正常～軽度上昇に留まることから、TPO による血小板産生刺激がその治療として有効であることが予想された。実際、第 1 世代の TPO 製剤である PEG-rHuMGDF (recombinant human megakaryocyte growth and development factor) の cITP 患者に対する

RP% (網状血小板比率) RP number (網状血小板絶対数) IPF (immature platelet fraction)
PEG-rHuMGDF (recombinant human megakaryocyte growth and development factor)

有効性がNomuraらにより報告されたが²⁶⁾、本製剤に対する抗体産生とそれによる重篤な遷延性血小板減少が出現したため、本製剤の開発は中止された。その後のより安全な製剤開発の努力の結果、第2世代TPO製剤として2種類のTPO-R作動薬が臨床で使用可能となっている²⁷⁾。

a) エルトロンボパグ(レボレード®)

エルトロンボパグは分子量546ダルトンの非ペプチド化合物であり、TPO依存性細胞株においてSTATなどのリン酸化を誘導する非ペプチド化合物ライブラリーから同定された。TPOと構造上の相同性はない。エルトロンボパグはTPOとは異なりTPO受容体の膜貫通領域に結合し、JAK/STAT系およびRAS/RAF/MAPキナーゼ系を活性化する²⁷⁾。エルトロンボパグは経口製剤であるが、その吸収は食事やミネラルに影響されるため、空腹時に服用する必要がある。また、日本人においては欧米人に比べ、より低用量で同等の効果を発揮する²⁸⁾。

b) ロミプロスチム(ロミプレート®)

ロミプロスチムは、ヒト免疫グロブリンのFc領域にTPO様ペプチドを融合させて作成された“peptibody”である。分子量は約59,000ダルトンであり、皮下注製剤である。TPO様ペプチド単独では不安定であるが、Fc領域と結合させることにより安定化され、週1回のみ投与を可能としている。なお、TPO様ペプチドはTPO受容体にTPOと競合的に結合するが、TPOとのアミノ酸配列上の類似性はない。また、現在まで臨床問題となる抗体産生の報告はない。

c) TPO-R作動薬の臨床成績

TPO-R作動薬は巨核球のみならず造血幹細胞にも作用し、巨核球分化を促進する。血小板数の増加は薬剤投与開始後5~7日から認められ、単回投与の場合、血小板数のピークは約10~14

日後に得られる。

エルトロンボパグに関しては、血小板数3万/ μL 以下のcITP患者を対象とした6カ月間の二重盲検 placebo-control 試験が行われ (RAISE study)、高い有効性 (血小板数が一度でも5万/ μL 以上となった例が約80%) と出血症状の改善が示された²⁹⁾。有効率は脾摘の有無に影響されず、また59%の患者において併用する薬剤(多くはステロイド)を減量することが可能であった。副作用の発生や程度はプラセボ群とほぼ同程度であったが、2%の患者(3/135)で血栓症(肺塞栓症2例、深部静脈血栓症1例)、7%の患者で肝トランスアミラーゼの増加、4%で総ビリルビンの増加を認めた。最近報告されたエルトロンボパグの長期投与試験 (EXTEND study) では、299例の患者において中央値100週間(2~1,267日)のエルトロンボパグ投与が行われた結果、85%(254/299)の患者において血小板数5万/ μL 以上が維持された(図3A)。血栓症イベントは16例(5%)の患者において21回(深部静脈血栓症9例、中枢神経系虚血性疾患5例、心筋梗塞4例、肺塞栓3例)認められた³⁰⁾。

ロミプロスチムにおいても同様に半年間の二重盲検試験において、脾摘前患者の88%、脾摘後患者の79%において有効性を認め³¹⁾、さらに、脾摘前患者における通常治療 (Standard of Care : SOC) との52週間におよぶ長期投与比較試験において、ロミプロスチム群では出血イベントおよび輸血頻度の減少、脾摘の回避、そして著明なQOLの改善を認めた³²⁾。血栓症はロミプロスチム群で4%(6/154)、SOC群で3%(2/75)と有意差を認めず、また、リンパ腫やMDSなどの血液悪性疾患の発症は見られなかった³²⁾。本邦における44例、投与期間中央値100週の長期投与の結果では、96%の患者が有効であり、心房細

SOC (Standard of Care ; 通常治療)

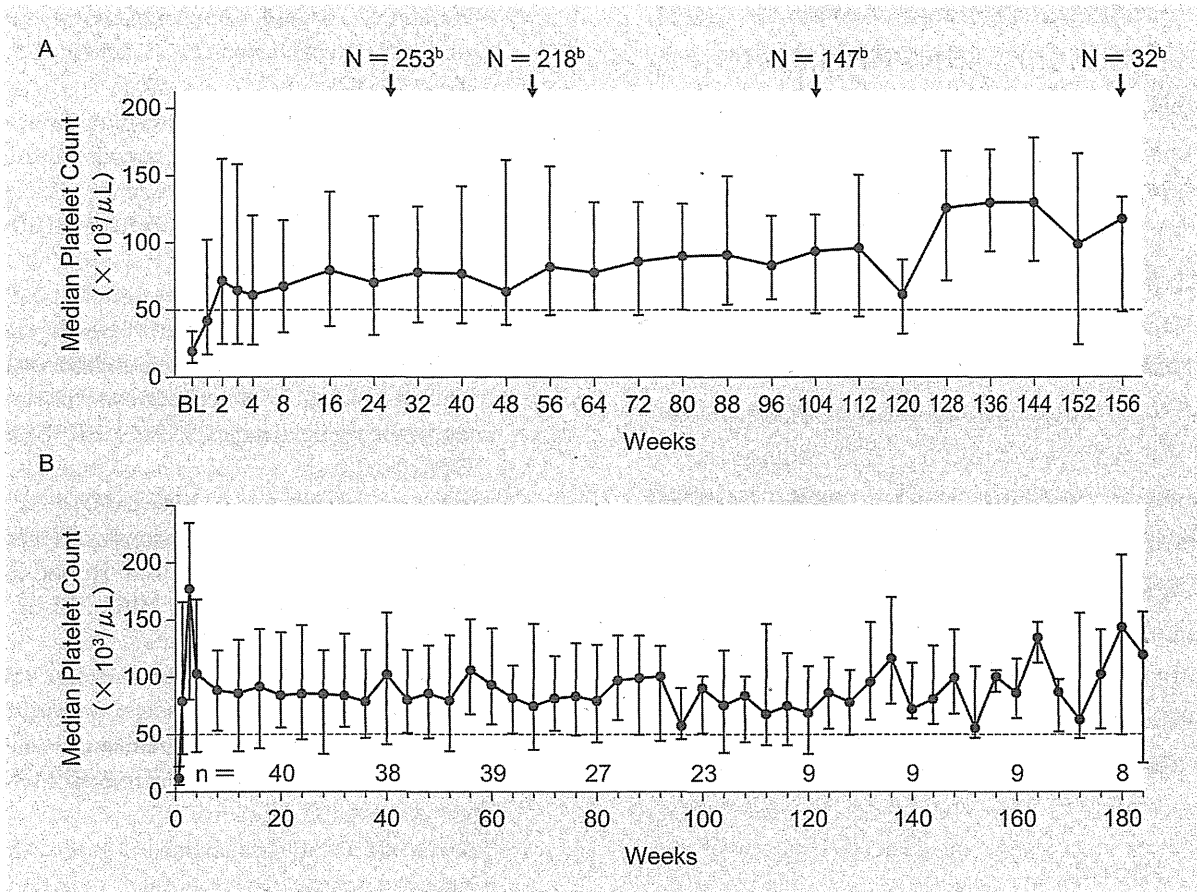


図3 TPO-R作動薬の臨床成績

(A) エルトロンボパグ長期投与の結果。(B) 日本人におけるロミプロスチム長期投与の結果。

(文献 30, 33 より)

動を有する患者で TIA を起こした 1 例以外、血栓症は認めなかった (図 3 B)³³⁾。

以上のように、TPO-R 作動薬はエルトロンボパグ、ロミプレートともに少なくとも数年間の使用においては極めて高い有効率を維持しており、また、血栓症を若干増加させる可能性は否定されていないが、安全性も高い薬剤であるといえる。しかしながら、さらに長期的な有効性および安全性は未だ確立されていないため、両薬剤ともステロイド療法無効例で、脾摘が無効あるいは何らかの理由で困難である患者に対する第 3 選択として使用することが現時点では望ましい。

2) リツキシマブ

リツキシマブは 1990 年代に B 細胞リンパ腫に対する治療薬として広く使われるようになると同時に、主に欧米において自己免疫疾患に対する off-label の投与が行われてきた。特に ITP においては多くの症例報告がなされており、それらの結果をまとめると、 $375 \text{ mg/m}^2 \text{ weekly} \times 4$ の通常投与において、おおむね 1 年で 40%、5 年で 20 ~ 25% の症例が有効と判定される^{34, 35)}。より少ない投与量 ($100 \text{ mg weekly} \times 4$) でも同様の効果が得られる可能性がある³⁶⁾。1 年以上完全寛解を維持できた症例は、その後の再発の際にリツキシ

マブの再投与が有効であることが多いが、部分寛解例はしばしば1年以内に再発し、リツキシマブ再投与は無効であることが多い³⁷⁾。本邦においては保険適用を目指して、医師主導臨床治験が現在進行中である。

リツキシマブのcITP患者に対する効果は、自己反応性B細胞クローンの除去によると考えられており、実際 Patel らは、リツキシマブ投与後長期寛解を維持する症例は、早期に再発した患者に比べて末梢血 CD19 陽性細胞の抑制効果が持続することを示している³⁵⁾。一方で Audia らは、リツキシマブ無効例の末梢血および脾臓ではほぼ完全にB細胞が除去されているにもかかわらず血小板減少が改善していないことを報告し³⁹⁾、また前述したように、リツキシマブ有効例においては Treg 機能の回復を認めていることから¹²⁾、B細胞除去だけでなくT細胞機能の改善がリツキシマブの有効性に重要である可能性がある。

おわりに

我々はITPに対して、主に血小板破壊を抑制する脾摘療法、血小板破壊および巨核球障害の両面を抑制するプレドニンやリツキシマブなどの免疫抑制剤/免疫調節剤、さらに血小板産生を直接的に刺激するTPO-R作動薬という治療法を手に入れることができた。今後はこれらの治療法の最も有効かつ安全な使用方法を確立するとともに、ITPにおける血小板減少メカニズムのさらなる解明を通じて、難治性ITPの完治を目指した新たな治療が開発されることが望まれる。

文 献

1) Schwartz RS: Immune thrombocytopenic purpura-from agony to agonist. *N Engl J Med* **357**: 2299-2301, 2007.

2) Tomiyama Y, Kosugi S: Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol* **81**: 100-105, 2005.

3) Roark JH, Bussel JB, Cines DB, et al: Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood* **100**: 1388-1398, 2002.

4) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, et al: Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* **120**: 1499-1509, 2012.

5) Nardi M, Tomlinson S, Greco MA, et al: Complement-independent, peroxide-induced antibody lysis of platelets in HIV-1-related immune thrombocytopenia. *Cell* **106**: 551-561, 2001.

6) Zhang W, Nardi MA, Borkowsky W, et al: Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GP IIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia. *Blood* **113**: 4086-4093, 2009.

7) Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, et al: Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of H. pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* **124**: 91-96, 2004.

8) Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y: Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* **102**: 1393-1402, 1998.

9) Semple JW, Provan D: The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage. *Curr Opin Hematol* **19**: 357-362, 2012.

10) Yu J, Heck S, Patel V, et al: Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* **112**: 1325-1328, 2008.

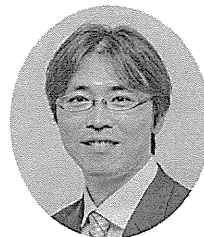
11) Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, et al: Critical role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in preventing murine autoantibody-mediated

- thrombocytopenia. *Exp Hematol* **40** : 279-289, 2012.
- 12) Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, et al : Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood* **112** : 1147-1150, 2008.
 - 13) Stasi R : Pathophysiology and therapeutic options in primary immune thrombocytopenia. *Blood Transfus* **9** : 262-273, 2011.
 - 14) Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, et al : Of mice and men : an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. *Blood* **113** : 3154-3160, 2009.
 - 15) Peerschke EI, Andemariam B, Yin W, et al : Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* **148** : 638-645, 2010.
 - 16) Olsson B, Andersson PO, et al : T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* **9** : 1123-1124, 2003.
 - 17) Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, et al : Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **103** : 500-506, 2004.
 - 18) Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, et al : Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis *in vitro*. *Blood* **102** : 887-895, 2003.
 - 19) McMillan R, Wang L, Tomer A, et al : Suppression of *in vitro* megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* **103** : 1364-1369, 2004.
 - 20) Perdomo J, Yan F, Chong BH : A megakaryocyte with no platelets : Anti-platelet antibodies, apoptosis, and platelet production. *Platelets* 2012 Jun 28. [Epub ahead of print]
 - 21) Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR, et al : Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest* **80** : 33-40, 1987.
 - 22) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, et al : Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycolocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* **115** : 656-664, 2001.
 - 23) Barsam SJ, Psaila B, Forestier M, et al : Platelet production and platelet destruction : assessing mechanisms of treatment effect in immune thrombocytopenia. *Blood* **117** : 5723-5732, 2011.
 - 24) 厚生労働省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 : ITP 治療の参照ガイド作成委員会 : 成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2012 年版. *臨床血液* **53** : 433-442, 2012
 - 25) 富山佳昭 : トロンボポエチン受容体作動薬による難治性 ITP の治療. *臨床血液* **52** : 627-632, 2011.
 - 26) Nomura S, Dan K, Fujimura K, et al : Effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **100** : 728-730, 2002.
 - 27) Kuter DJ : New thrombopoietic growth factors. *Blood* **109** : 4607-4616, 2007.
 - 28) Tomiyama Y, Miyakawa Y, Okamoto S, et al : A lower starting dose of eltrombopag is efficacious in Japanese patients with previously treated chronic immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* **10** : 799-806, 2012.
 - 29) Cheng G, Saleh MN, Marcher C, et al : Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE) : a 6-month, randomised, phase 3 study. *Lancet* **377** : 393-402, 2011.
 - 30) Saleh MN, Bussel JB, Cheng G, et al : Safety and efficacy of eltrombopag for treatment of chronic immune thrombocytopenia (ITP) : results of the long-term, open-label EXTEND study. *Blood* 2012 Nov 20. [Epub ahead of print]

- 31) Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM, et al : Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura : a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* **371** : 395-403, 2008.
- 32) Kuter DJ, Rummel M, Boccia R, et al : Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia. *N Engl J Med* **363** : 1889-1899, 2010.
- 33) Shirasugi Y, Ando K, Miyazaki K, et al : An open-label extension study evaluating the safety and efficacy of romiplostim for up to 3.5 years in thrombocytopenic Japanese patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP) . *Int J Hematol* **95** : 652-659, 2012.
- 34) Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, et al : Systematic review : efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* **146** : 25-33, 2007.
- 35) Patel VL, Mahévas M, Lee SY, et al : Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood* **119** : 5989-5995, 2012.
- 36) Zaja F, Vianelli N, Volpetti S, et al : Low-dose rituximab in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* **85** : 329-334, 2010.
- 37) Hasan A, Michel M, Patel V, et al : Repeated courses of rituximab in chronic ITP : Three different regimens. *Am J Hematol* **84** : 661-665, 2009.
- 38) Audia S, Samson M, Guy J, et al : Immunologic effects of rituximab on the human spleen in immune thrombocytopenia. *Blood* **118** : 4394-4400, 2011.

◆トピックス◆

Primary ITP における抗 α IIb β 3 自己抗体のエピトープ解析：抗 α IIb β 3 抗体は β プロペラドメイン内の高度に限定された領域を認識する



清水一亘

清水一亘^{*1}, 柏木浩和^{*1}, 富山佳昭^{*1,2}

Epitope analysis of anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary ITP :
Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies

Kazunobu KIYOMIZU^{*1}, Hirokazu KASHIWAGI^{*1},
Yoshiaki TOMIYAMA^{*1,2}

2003年3月 大阪市立大学医学部医学科卒業
同 年5月 市立吹田市民病院内科
2006年6月 大阪府立成人病センター血液・化学療法科
2008年6月 大阪大学医学部附属病院血液・腫瘍内科
2009年4月 大阪大学大学院医学系研究科博士課程血液・腫瘍内科学入学
2013年3月 同修了
同 年4月 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学

Key words: ITP, epitope, α IIb β 3

1. はじめに

Primary immune thrombocytopenia (primary ITP; 特発性血小板減少性紫斑病) における血小板減少の主たる病態は網内系での血小板破壊と骨髄における血小板産生の低下にある^{1)・4)}。すなわち抗血小板自己抗体によりオプソニン化された血小板は網内系でFc γ 受容体や補体受容体を介してマクロファージなどの貪食細胞に補足され貪食・破壊される¹⁾。また抗血小板自己抗体は *in vitro* で巨核球の成熟障害や細胞障害を誘導することが報告されており、これにより血小板産生は低下する^{5)・6)}。また抗血小板自己抗体のうち血清抗体は親和性が低く病的意義は乏しいとされており、血小板結合抗体 [platelet-associated (PA) antibody] が病態に重要な役割を果たしていると考えられている⁷⁾。抗血小板抗体の自己抗原とし

ては、血小板膜蛋白である GPIIb/IIIa (α IIb β 3) や GPIb/IX/V などが報告されているが、特に抗 α IIb β 3 抗体は 43~57% と最も高率に検出される^{7)・10)}。我々の研究室では 10 年以上前より、PA-anti- α IIb β 3 抗体の認識部位の同定に取り組んでおり、最近になり新たな知見を得たので紹介する¹¹⁾。

2. PA-anti- α IIb β 3 抗体は α IIb にある β プロペラドメインを認識する

PA-anti- α IIb β 3 抗体の認識部位に関しては、2000 年頃までに本抗体が Ca イオン依存性の立体構造を認識すること、また同じ β 3 インテグリンである α v β 3 とは全く反応しないことから、本抗体が主に α IIb を認識していることが示された^{12)・14)}。 α IIb の N 端には W1-W7 の 7

^{*1} 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 [〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2]
Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine
[2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan]

Tel: 06-6879-3871 Fax: 06-6879-3879 e-mail: kiyomin1220@yahoo.co.jp, kashi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

^{*2} 大阪大学医学部附属病院輸血部 [〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-15]

Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital
[2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan]

Tel: 06-6879-5887 Fax: 06-6879-5889 e-mail: yoshi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

つの繰り返し構造からなる β プロペラ領域が存在する. 2001 年, 我々の研究室では β プロペラドメイン内の 2 塩基挿入によりリガンド結合能を消失した KO mutant を用いて, ITP 患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体の約 1/3 が KO mutant への反応性が著明に低下していることを示した¹⁵⁾. また McMillan らは α_v の β プロペラドメインを α IIb に置換した α IIb- α_v/β 3 変異株を用いることにより, PA-anti- α IIb β 3 抗体の多くが α IIb の β プロペラ領域を認識することを示した¹⁶⁾. これらの結果から, PA-anti- α IIb β 3 抗体のエピトープとして β プロペラドメインの重要性が明らかとなった. しかし, α IIb と α_v あるいはそれ以外のインテグリンの β プロペラドメインのアミノ酸配列は大きく異なるため, それ以上の解析は困難であった.

3. PA-anti- α IIb β 3 抗体は β プロペラドメインの N 末端側半分を認識する

更なるエピトープの解析は, 意外な実験結果から可能となった. 我々は, ITP 患者の PA 抗体の解析過程でヒト血小板とは反応するもののマウス血小板とは反応しない PA 抗体が存在することに気づいた. そこで, PA-anti- α IIb β 3 抗体のマウス α IIb β 3 との反応性を検討したところ, primary ITP 患者 6 例の PA-anti- α IIb β 3 抗体は, 293T 細胞に発現させたヒト α IIb β 3 には結合するにもかかわらず, マウス α IIb β 3 にはほとんど結合しなかった. そこで, ヒト-マウスキメラ α IIb β 3 を作成することにより, PA-anti- α IIb β 3 抗体のエピトープの同定を試みた.

76 例の primary ITP 患者の血小板解離液を検討し, 26 例 (34%) で PA-anti- α IIb β 3 抗体が検出され, その中で十分な検体量の得られた 15 名について解析を進めた. まず, α IIb, β 3 を各々片方ずつマウスに置き換えたキメラ α IIb β 3 との反応性を検討したところ, β 3 をマウスに置き換えたキメラでは反応性が保たれるのに対し, α IIb をマウスに置き換えたキメラでは反応性が大きく低下することが分かった. よって従来の報告通り本抗体は主に α IIb を認識していると考えられた. α IIb の β プロペラドメインは W1 か

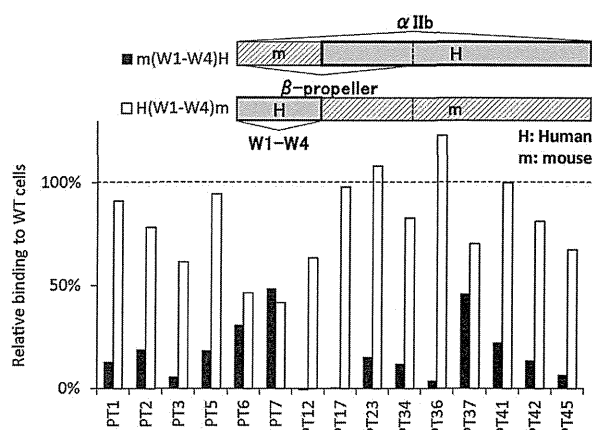


図1 primary ITP 患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体は β プロペラドメインの N-terminal half を認識する

Primary ITP 患者の PA 抗体の α IIb β 3 の変異株発現細胞に対する反応性をフローサイトメトリーで解析し, ヒト α IIb β 3 発現細胞に対する反応性と比較した. α IIb の β プロペラドメインの N-terminal half (W1-W4; Leu1-Trp235) がマウスに置き換えられると反応性が大きく損なわれるのに対し (■), 同部位でヒト配列を残すと反応性が保たれる (□) ことから, PA-anti- α IIb β 3 抗体は β プロペラドメインの N-terminal half を主に認識すると考えられた.

ら W7 より構成されるが, その N-terminal half (W1-W4; Leu1-Trp235) のみをマウスに置換するとヒト α IIb β 3 と比較して大きく反応性が低下するのに対し, 同部位のみヒト配列を残した場合には反応性が保たれたことから, 本抗体は主に β プロペラドメインの N-terminal half を認識していると考えられた (図 1).

4. PA-anti- α IIb β 3 抗体のエピトープの同定とクロナリティ解析

β プロペラドメインの N-terminal half において, 順次ヒト配列をマウス配列に置換する, あるいはマウス配列をヒト配列に置換することにより, PA-anti- α IIb β 3 抗体のエピトープの詳細をさらに解析した. その結果, 3 つの主要な領域 (A 領域, B 領域, C 領域) の同定に成功した (図 2). 15 例中 11 例がこの領域のいずれかを認識していたが, これらの中で特に興味深い 3 例を紹介する.

PT17 および PT23 は図で示す A 領域を認識し, その領域内に存在する Arg32 および Arg139 をそれぞれマウス残基に置換することによりその反応性は著明に低下した (図 3-A). PT17 において

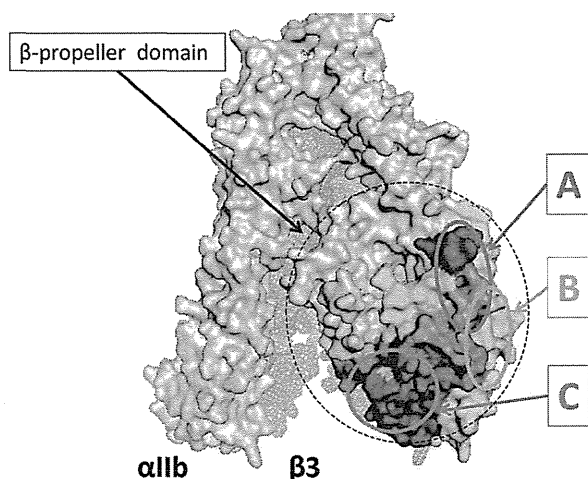


図2 primary ITP 患者における PA-anti- α IIb β 3 抗体の認識領域

Primary ITP 患者の PA 抗体における α IIb β 3 上の自己抗原としての認識領域を示す。図中に黄色で示した領域は α IIb の N 末端に位置している β プロペラドメインの N-terminal half (W1-W4; Leu1-Trp235) を示している。この領域においてヒトマウスキメラ α IIb β 3 に対する患者自己抗体の反応性を詳細に検討することにより、自己抗原としての重要な 3 つの認識領域を同定することができた。 β プロペラドメインの W1-W7 の各ドメインは各々 4 本の β -strand 構造 (1, 2, 3, 4) を持っており、さらに各 β -strand 構造をつなぐ 4 本の small loop 構造 (4-1, 1-2, 2-3, 3-4) が表面に露出する構造をとっている。A 領域は W1: 1-2 loop 及び W2: 3-4 loop から成っており、primary ITP 患者 15 例中 2 例が認識していた。B 領域は W1: 2-3 loop, W2: 3-4 loop, W3: 3-4 loop から成り、5 例が認識しており、さらにそのうち 1 例は W1: 2-3 loop のみを排他的に認識していると考えられた。C 領域は W3: 4-1 loop 及び W4: 4-1 loop から成り、4 例が認識していた。

は Ser29 および Glu136 残基も抗体結合に重要であることが明らかとなった。また PT36 は B 領域を認識しており、この領域内に存在する Gly44 および Pro45 のマウス残基への置換により、著明な反応性の低下を認めた (図 3-B)。さらにこれらの症例においては IgG 軽鎖において明確な κ/λ の偏位が認められ、PA-anti- α IIb β 3 抗体における clonality の存在が示唆された (図 3-C)。エピトープが同定しえた 11 例のうち、1 例を除いて κ/λ の偏位が認められたことから、primary ITP においては特定の B cell clone が活性化されていることが示唆された。

5. おわりに

今回、我々は primary ITP 患者の PA-anti-

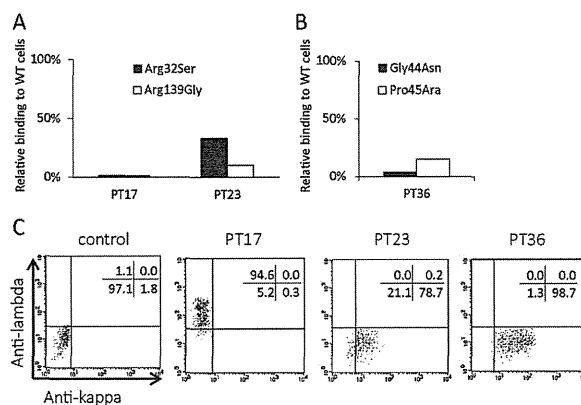


図3 primary ITP 患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体では特定の B cell clone が活性化されていることが示唆される

(A) 図 1 と同様に α IIb β 3 変異株発現細胞に対する PA 抗体の反応性をフローサイトメトリーで解析した。図 2 の A 領域を認識する 2 名の患者 (PT17, 23) の PA 抗体では、同領域の Arg32 及び Arg139 をマウス配列である Ser 及び Gly に置換すると反応性が大きく損なわれることから、これら 2 つのアミノ酸が結合に必須のアミノ酸であることが明らかとなった。(B) (A) と同様にして、図 2 の B 領域を認識する患者のうち 1 名の PA 抗体は (PT36)、同領域の Gly44 及び Pro45 をマウス配列である Asn 及び Ara に置換すると反応性が大きく損なわれることから、これら 2 つのアミノ酸が結合に必須のアミノ酸であることが明らかとなった。(C) 上記 3 名の患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体の IgG 軽鎖は、PT17 では λ 、PT23 及び 36 では κ に偏位していたことから、primary ITP 患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体では特定の B cell clone が活性化されていることが示唆された。

α IIb β 3 抗体の多くが β プロペラドメイン内の高度に限定された領域を認識することを見出し、一部の症例ではあるが、抗体結合に必須となるアミノ酸を同定することができた。ITP の病因については、一部の 2 次性 ITP ではウイルス蛋白と α IIb β 3 の分子構造の相同性が関係している可能性が報告されているが¹⁷⁾、未だ primary ITP 発症のメカニズムは解明されておらず、本研究が primary ITP の病態解明の一助となることが期待される。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS: Immune thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 346: 995-1008, 2002.
- 2) Karpatkin S: Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic pur-

- pura. *Lancet* **349** : 1531-1536, 1997.
- 3) McMillan R : The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* **44** : S3-S11, 2007.
 - 4) Nugent D, McMillan R, Nichol JL, Slichter SJ : Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia : increased platelet destruction and/or decreased platelet production. *Br J Haematol* **146** : 585-596, 2009.
 - 5) Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, Esselink MT, Koornstra JJ, Smit JW, Louwes H, Vellenga E, de Wolf JT : Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **103** : 500-506, 2004.
 - 6) McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J : Suppression of *in vitro* megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* **103** : 1364-1369, 2004.
 - 7) Tomiyama Y, Kosugi S : Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol* **81** : 100-105, 2005.
 - 8) Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH : Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigenspecific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood* **88** : 194-201, 1996.
 - 9) McMillan R, Wang L, Tani P : Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost* **1** : 485-491, 2003.
 - 10) Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG : A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* **104** : 442-447, 1999.
 - 11) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y : Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* **120** : 1499-1509, 2012.
 - 12) Fujisawa K, Tani P, McMillan R : Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. *Blood* **81** : 1284-1289, 1993.
 - 13) McMillan R, Lopez-Dee J, Loftus JC : Autoantibodies to alpha-Ibbeta3 in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura bind primarily to epitopes on alphaIIb. *Blood* **97** : 2171-2172, 2001.
 - 14) Kosugi S, Tomiyama Y, Honda S, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kiyoi T, Kurata Y, Matsuzawa Y : Antialphavbeta3 antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* **85** : 36-41, 2001.
 - 15) Kosugi S, Tomiyama Y, Honda S, Kato H, Kiyoi T, Kashiwagi H, Kurata Y, Matsuzawa Y : Platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura recognizing epitopes close to the ligand-binding site of glycoprotein (GP) IIb. *Blood* **98** : 1819-1827, 2001.
 - 16) McMillan R, Wang L, Lopez-Dee J, Jiu S, Loftus JC : Many α IIb β 3 autoepitopes in chronic immune thrombocytopenic purpura are localized to alphaIIb between amino acids L1 and Q459. *Br J Haematol* **118** : 1132-1136, 2002.
 - 17) Li Z, Nardi MA, Karpatkin S : Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. *Blood* **106** : 572-576, 2005.