

施する予定である。しかし、ADAMTS13活性著減TTP患者は非常に症例数が少ないため、臨床性能試験をどのように進めるのかPMDAとも相談し、検討する予定である。

D. 考察

ADAMTS13活性とインヒビター測定は、TTPの診断に必要なのみでなく、難治性・再発性TTPに有効であるリツキシマブの使用に関して重要な指標となる。さらに、TTPとの鑑別が必要な非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の診断基準に採用されている。

後天性TTPの急性期の治療法は血漿交換であるが、それに不応例や早期に再発する症例が知られている。難治性・再発性の機序として、血漿交換の実施中にもかかわらず、血漿ADAMTS13インヒビターが急上昇する(ADAMTS13 inhibitor boosting)症例が予想以上に多いことを我々は明らかにした。これらの症例に対して、国内外からCD20に対するモノクローナル抗体リツキシマブが有効であることが報告されている。しかし、日本国内においてリツキシマブはTTPに対して保険適用となっていないため、TTPサブグループが中心となって2014年に医師主導治験を実施した。その際のエントリー基準としてADAMTS13活性著減とインヒビター2 BU/ml以上が使用されている。今後この医師主導治験の結果を用いて、リツキシマブのTTPに対する保険適用拡大が認められる可能性が高いが、その際にはADAMTS13検査が是非とも必要となる。

また、TTPと同様に指定難病110疾患に

選ばれたaHUSは、補体の第二経路の持続的な異常活性化によって発症することが明らかになった。その診断は、血小板減少、溶血性貧血、腎不全という3徴候に加えて、志賀毒素産生HUSとTTPを否定することである。TTPの否定にはADAMTS13活性が著減していないことと診断基準にも記載されており、ここでもADAMTS13検査は重要である。aHUSの治療は最近までは血漿交換などの血漿療法のみであったが、補体C5に対するモノクローナル抗体エクリズマブが日本国内でも使用可能となり、有効であることが示されている。しかし、エクリズマブは非常に高価な薬剤であり、その使用適応は厳しく判断する必要がある。また、補体活性化に関連したaHUSに対してはエクリズマブを早期に投与することで、腎機能の改善が良好になることが報告されている。このように、aHUSを正確に診断し、治療法を選択する上でもADAMTS13活性測定は非常に重要である。

TTPにおいては、ADAMTS13活性著減のみをTTPと診断することが国際的なコンセンサスになっている。さらに、ADAMTS13検査はTTPの予後を予測する重要な指標となることが報告されている。1)治療前にADAMTS13活性が著減している症例は再発が多いこと、2)治療前にインヒビターを検出した症例は再発率が高く、インヒビター力価が高いほど血漿交換への反応が悪く、早期死亡が多いこと、3)臨床的寛解期にADAMTS13活性著減が続く症例は再発が多く、同様にインヒビターが残存する症例も再発が多いことなどが報告されている。

これらの血液疾患以外にも、肝硬変に

においてADAMTS13活性は予後を予測する因子として報告されるなど、ADAMTS13検査は、肝臓疾患領域においても注目されている。これは、ADAMTS13は肝臓の星細胞で主として産生されていることが明らかになっており、肝臓の微小循環の調節に重要な役割を果たしていることが予想されているからである。今後、ADAMTS13検査は微小循環障害によることが予想される血液疾患以外においても重要な検査となることが予想される。

E. 結論

ADAMTS13検査は、TTPの診断のみでなく治療法の選択や、aHUSの診断と治療にも必要な検査であり、早期に保険適用となることが期待されている。今後、ADAMTS13 activity ELISA kitの臨床性能試験を行うとともに、ADAMTS13検査が保険収載されるように活動を続けて行く予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yada N, Fujioka M, Bennett C, Hayakawa M, Matsumoto M, Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, Fujimura Y. The STEC-HUS followed by acute encephalopathy in a young girl was favorably treated on a basis of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin, under plasma exchange. *Clinical Case Reports* (in press) 2015.
2. Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M. A case of autoimmune-type HUS treated with eculizumab, as a first-line therapy. *Pediatrics Int.* in press, 2015.
3. Ogawa Y, Matsumoto M, Sadakata H, Isonishi A, Kato S, Nojima Y, Fujimura Y. A unique case involving a female patient with Upshaw-Schulman syndrome: low titers of antibodies against ADAMTS13 prior to pregnancy disappeared after successful deliver. *Transfusion Med and Hematol.* 42: 59-63, 2015.
4. Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol.* 100 : 437-442, 2014.
5. Sorvillo N, Kaijen PH, Matsumoto M, Fujimura Y, van der Zwaan C, Verbij FC, Pos W, Fijnheer R, Voorberg J, Meijer AB. Identification of N-linked glycosylation and putative O-fucosylation, C-mannosylation sites in plasma derived ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 12: 670-679, 2014.

6. Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2: 240-244, 2014.
7. Takuma Y, Fujimura Y, Emoto Y, Kuriu Y, Iino M, Matoba R. Response to 'Death during pregnancy: Thrombotic thrombocytopenic purpura or septic shock?'. *J Obstet Gynaecol Res* 40: 887, 2014.
8. Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, Hattori M, Kagami S. Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the joint committee of the Japanese society of nephrology and the Japan pediatric society. *Clin Exp Nephrol* 18: 4-9, 2014.
9. Muroi C, Fujioka M, Mishima K, Irie K, Fujimura Y, Nakano T, Fandino J, Keller E, Iwasaki K, Fujiwara M. Effect of ADAMTS13 on cerebrovascular microthrombosis and neuronal injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Thromb Haemost* 12: 505-14, 2014.
10. 藤村吉博、松本雅則、石西綾美、八木秀男、小亀浩市、宮田敏行. 血栓性血小板減少性紫斑病. *臨床血液* 55: 93-104, 2014.

学会発表

1. 石西綾美、松本雅則、藤村吉博. 後天性 TTP の血漿交換療法の影響による ADAMTS13 自己抗体の動態解析. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
2. 長谷川真弓、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、馬場由美、下村志帆、内池敬男、早川正樹、松本雅則、藤村吉博. 奈良医大付属病院における輸血後感染症検査の実施状況. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
3. 八木秀男、早川正樹、山口尚子、山下慶悟、松本雅則、谷口繁樹、杉本充彦、椿和央、藤村吉博. 重症大動脈弁狭窄症患者の弁置換術前後における VWF 依存性血小板血栓形成の計時的変化の検討. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
4. 樋口由佳、小亀浩市、高蓋寿朗、田中亮二郎、小林光、石田文宏、久永修一、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. ダイレクトシーケンシング、定量 PCR、次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
5. 吉田瑤子、範新萍、大山良文、古久保哲朗、岩本顕聰、森俊雄、松本雅

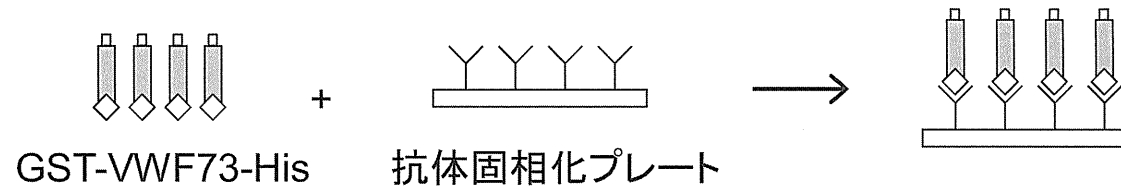
- 則、池島裕子、宮田敏行、藤村吉博. 定量的溶血試験と遺伝子解析を用いた本邦 aHUS 患者の病態解析第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
6. 早川正樹、松本雅則、八木秀男、天野逸人、田中晴之、木村弘、藤村吉博. 造血幹細胞移植後患者における好中球生着と UL-VWFM 出現との関連. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 7. 松本雅則、早川正樹、石西綾美、吉田瑤子、吉井由美、田中賢治、前田琢磨、宮田茂樹、藤村吉博. 維持血液透析患者の血小板減少に対する抗血小板第 4 因子/ヘパリン抗体の関与. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 8. 小亀浩市、樋口由佳、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. デジタル PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 9. 池島裕子、Xinping Fan, 平井秀憲、本田繁則、吉田瑤子、藤村吉博、Johanna A. Kremer Hovinga, Bernhard Lammle, 宮田敏行. 腎障害を示した先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の補体制御因子の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 10. 田井義彬、西尾健治、大野史郎、吉本清巳、赤井靖宏、池島裕子、宮田敏行、吉田瑤子、松本雅則、藤村吉博. インフルエンザ感染時の血小板減少を契機に診断された典型溶血性尿毒症症候群の 1 例. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 11. 早川正樹、松本雅則、吉井由美、八木秀男、藤村吉博. 造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の発症と予防的輸血との関連性. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 12. Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y. Registry of congenital TMA s in Japan. The 8th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis (APSTH). Hanoi/Vietnam. 2014 年 10 月 11 日
 13. 宮川義隆、松本雅則、上田恭典、村田満、阿部貴行、三宅真二、菊池佳代子、岡本真一郎、太田秀一、半田寛、朝倉英策、和田英夫、西尾健治、椿和央、日笠聡、野村昌作、一戸辰夫、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの第 2 相医師主導治験. 第 76 回日本血液学会総会. 大阪国際会議場. 2014 年 10 月 31 日
 14. Hayakawa M, Yagi H, Yamaguchi N, Yamashita K, Hayata Y, Abe T, Taniguchi S, Fujimura Y, Matsumoto M. The changes of von Willebrand factor multimers in patients with aortic stenosis by valve replacement. 第 76 回日本血液学会

- 総会. 大阪国際会議場. 2014年11月1日
15. 下村志帆、前田美和、長谷川真弓、辻内智美、門池真弓、馬場由美、上野華恵、隈志穂里、西田幸世、早川正樹、松本雅則. 奈良医大病院における緊急輸血の現状と問題点. 第58回日本輸血・細胞治療学会 近畿支部総会. 和歌山県立医科大学 講堂. 2014年11月15日
16. Yagi H, Hayakawa M, Yamaguchi N, Yamashita K, Taniguchi S, Matsumoto M, Tsubaki K, Fujimura Y. Decreased platelet thrombus size, due to a heightened proteolysis of VWF by ADAMTS13 is quickly restored after valve replacement in aortic stenosis patients. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology. San Francisco/USA. 2014年12月7日
17. Yoshii Y, Matsumoto M, Kurumatani N, Isonishi A, Uemura M, Hori Y, Hayakawa M, Yagi H, Bennett CL, Fujimura Y. Introduction of a quick assay for ADAMTS13 activity improved a survival of acquired TTP patients who received platelet transfusions. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology. San Francisco/USA. 2014年12月8日
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

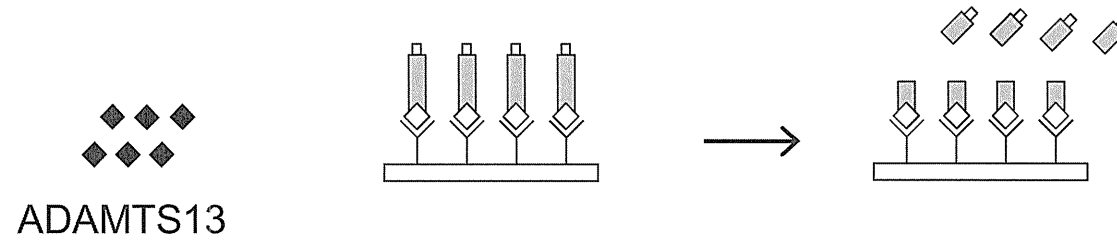
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

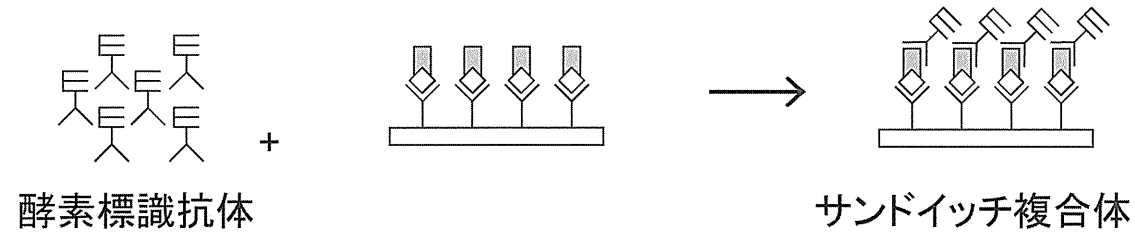
反応原理図①



反応原理図②



反応原理図③



反応原理図④



図 ADAMTS13 activity ELISA kit 測定原理

- ①ADAMTS13で切断される最小基質の73アミノ酸残基からなるVWF73をGSTを介してプレートに固相化する
- ②患者血漿を加えてVWF73の切断反応を行う
- ③ADAMTS13によって切断される断面を認識するモノクローナル抗体を切断部位に結合させる
- ④結合した抗体を発色させる

血液凝固異常症等に関する研究

研究分担者 宮川 義隆 埼玉医科大学教授

研究要旨

平成 26 年に国内で実施された血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの第Ⅱ相医師主導治験の治験実施計画書の作成、研究体制の構築と被験者募集について支援を行った。治験実施期間中に目標の症例数に達し、計画通り無事に治験を終了した。今後、本治験で得られた成果をもとに、診療ガイドラインを作成予定である。

A. 研究目的

平成 26 年 1 月～12 月にかけて、難治性疾患実用化研究事業として血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）に対するリツキシマブの第Ⅱ相医師主導治験が行われた。急性期疾患かつ国内の患者数が約 400 名と少ないことから、本研究班がこれまでの研究成果を生かして、治験実施計画書の作成、研究体制の構築、被験者募集について支援を行う。

B. 研究方法

平成 25 年度に医薬品医療機器総合機構による薬事戦略相談を受けた。審議結果を反映させた治験実施計画書の作成支援、治験実施施設の選定、被験者候補者のリクルートについて支援をした。

C. 研究成果

被験者募集の期間は約 12 ヶ月間と短期間であったが、TTP 疑いの被験者候補者を近くの治験実施施設へ紹介することにより、目標の 6 名に到達することができた。治験実施施設は、過去の疫学研究成果を元に TTP 患者数が多い施設を選び、このうち医師主導治験への参加を希望する医

療機関 11 ヶ所を選定した。最終的に 13 施設が本治験に参加した。

D. 考察

これまでの TTP に関する一連の研究成果をもとに、医師主導治験の治験実施計画書の作成支援、治験実施施設の選定、被験者募集の支援を協力に行うことができた。

E. 結論

本研究の支援により、TTP に対するリツキシマブの医師主導治験が予定期間内に無事に終了することができた。平成 27 年度中に適応拡大を承認申請する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① 宮川義隆

ITP と TTP に対するリツキシマブ
日本内科学会雑誌 103, 1654-1659
(2014)

- ② 宮川義隆
新規診断 ITP に対するリツキシマブ
とデキサメタゾン併用療法とデキサ
メタゾン単剤療法の前向き比較試験、
血液内科 68, 250-253 (2014)
- ③ 宮川義隆
特発性血小板減少性紫斑病
内科 114, 209-213 (2014)
- ④ 宮川義隆
妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド
Thrombosis Medicine 4, 388-394
(2014)

2. 学会発表

- ① 第 76 回 日本血液学会学術集会
2014 年 10 月、大阪)
妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病
診療の参照ガイド
宮川義隆、柏木浩和、高蓋寿朗、藤
村欣吾、倉田義之、小林隆夫、木村
正、安達知子、渡辺尚、今泉益栄、
高橋幸博、松原康策、照井克生、桑
名正隆、金川武司、村田満、富山佳
昭、妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド
作成委員会
- ② 第 76 回 日本血液学会学術集会
(2014 年 10 月、大阪)
血栓性血小板減少性紫斑病に対する
リツキシマブの第 2 相医師主導治験
宮川義隆、松本雅則、上田恭典、村
田満、阿部貴行、三宅真二、菊地佳
代子、岡本真一郎、太田秀一、半田
寛、朝倉英策、和田英夫、西尾健治、
椿和央、日笠聡、野村昌作、一戸辰
夫、藤村吉博
- ③ 第 76 回 日本血液学会学術集会
(2014 年 10 月、大阪)

Investigato-inisiated clinical
trial of rituximab for chronic
primary immune thrombocytopenia
Miyakawa Y, Katsutani S, Yano T,
Nomura S, Nishiwaki K, Tomiyama Y,
Higashihara M, Shirasugi Y,
Nishikawa M, Ozaki K, Abe T,
Kikuchi K, Sato Y, Kanakura Y,
Fujimura K, Ikeda Y, Okamoto S.

【メディア】

- ① 宮川義隆、TBS テレビ報道特集、「難
病女性 決意の出産」、2014 年 12 月
20 日
- ② 宮川義隆、産経新聞、「特発性血小板
減少性紫斑病」、2014 年 4 月 22 日
- ③ 宮川義隆、Medical Tribune、「ITP 患
者の妊娠・出産に 20 年ぶり新指針」、
2014 年 12 月 18 日
- ④ 宮川義隆、読売新聞、医療ルネサ
ンス：シリーズ薬 妊娠と出産「持病
ある女性支える指針」、2014 年 10 月
30 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

肝移植におけるTMAの発症と血小板活性化との関係に関する研究

研究分担者 和田 英夫 三重大学医学系研究科検査医学 准教授
白井 正信 三重大学医学系研究科肝胆膵・移植外科 准教授

研究要旨

血栓性微小血管障害 (TMA) は種々の疾患で見られる予後不良な病態で、肝移植例での報告もある。今回、79例の肝移植例について検討したが、TMAはグラフトロス(死亡)例で認められた。ドナーに比べてレシピエントでは、血小板数と可溶性血小板膜糖蛋白VI (sGPVI)の変動は有意に著しかった。また、レシピエントを生存群(67例)と死亡群(12例)に分けると、死亡例は有意に多くの合併症を併発し、術後14、28日で有意に血小板数が低下した。また、死亡例のsGPVIは術後3日目に有意に高値であった。以上、肝移植後数日で血小板が活性化し、種々の合併症を併発してグラフトロスからTMA、死亡に至ることが推測された。

A. 研究目的

血栓性微小血管障害 (TMA) は、微小血管障害性溶血性貧血、血小板減少、臓器障害を主徴とし、肝移植後にも発症する後不良な病態である。経目的に可溶性血小板膜糖蛋白VI (sGPVI) を測定することにより、肝移植と血小板活性化の関係ならびに、血小板活性化と TMA の発症ならびに予後との関係について検討する。

B. 研究方法

79例の肝移植例について、術後の血小板数、sGPVIの変動を調べ、合併症・生命予後との関係を調べた。sGPVIの測定は、2つのモノクローナルを用いたELISAで行った。術後90日以内に死亡した症例をnon-survivor、90日以上生存した症例をsurvivorとした。

(倫理面への配慮)

本研究は三重大学の倫理審査委員会で研究計画の承認を受けており、研究参加者

からインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

血小板数の変動は、ドナーでは術後第一第三日目に有意に低下し、術後7日目には術前値に復した。一方レシピエントでは術後7日目までは低値が持続し、14日目に増加を示した。このため、術前から術後14日目まで、血小板値はドナーがレシピエントに比べて有意に高値であった(図1)。sGPVI値は、ドナーでは術後1日目で増加するのみであったが、レシピエントは術後持続して増加した。このため、術後3日目にドナーに比べてレシピエント群で有意にsGPVI値が高値であった(図2)。

90日後のnon-survivorは12例、survivorは67例であった。non-survivorは何らかの合併症を併発し、有意に合併症の併発が多かった。血小板数はsurvivor群で術後14日目から有意に増加したが、non-survivor群での増加は少なかった。このため、術後

14日目ならびに28日目において、血小板数はnon-survivor群に比べてsurvivor群で有意に高値であった(図3)。sGPVI値は、survivor群では術後3日目に有意に増加するのみであったが、non-survivor群では術後持続して増加した。このため、術後3日目におけるsGPVI値は、survivor群に比べてnon-survivor群で有意に高値であった(図4)。

D. 考察

以前より、sGPVI値は血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、播種性血管内凝固(DIC)や静脈血栓塞栓症(VTE)などで著しく増加し、血小板活性化マーカーとして注目されていた。今回の検討では、侵襲の少ないドナーでは血小板の減少ならびにsGPVIの増加は軽度であった。すなわち、血小板の活性化はドナーに比べてレシピエントの方が多くと推測される。肝移植のnon-survivorは、有意に合併症が多く、グラフトロスの患者はTMAを合併した。survivor群では血小板数は術後14日で増加するのに比し、non-survivor群では血小板数の増加は殆ど見られなかった。このため、術後14日と28日における血小板数の低下は、生命予後の悪化を示唆した。この生命予後の悪化は、合併症の併発によることが示唆される。合併症の併発を予測するのに、術後14日目の血小板では遅すぎると考えられる。survivor群は術後早期に血小板の活性化がなくなるのに比し、non-survivor群では術後持続してsGPVIが増加した。このため、術後3日目のsGPVIは有意にnon-survivor群で高値であり、肝移植の血小板活性化ならびに合併症併

発の指標として有用であることが示唆された。

E. 結論

sGPVIは血小板活性化マーカーとして有用であり、ドナーに比べて侵襲の強いレシピエントでより増加した。肝移植後数日で血小板が活性化し、種々の合併症を併発してグラフトロスからTMA、死亡に至ることが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukushima N, Itamura H, Wada H, Ikejiri M, Igarashi Y, Masaki H, Sano M, Komiyama Y, Ichinohe T, Kimura S: A Novel Frameshift Mutation in Exon 4 Causing a Deficiency of High-molecular-weight Kininogen in a Patient with Splenic Infarction. Intern Med. 2014; 53: 253-257
- 2) Yamashita Y, Naitoh K, Wada H, Ikejiri M, Mastumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N: Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic microangiopathy. Thromb Res. 2014; 133: 440-444
- 3) Yamashita Y, Wada H, Nomura H, Mizuno T, Saito K, Yamada N, Asanuma K, Usui M, Kamimoto Y, Matsumoto T, Ohishi K, Katayama N: Elevated Fibrin-related Markers in Patients with Malignant Diseases Frequently Associated with Disseminated

- Intravascular Coagulation and Venous Thromboembolism. Intern Med 2014; 53: 413-419
- 4) Shindo A, Wada H, Ishikawa H, Ito A, Asahi M, Ii Y, Ikejiri M, Tomimoto H: Clinical features and underlying causes of cerebral venous thrombosis in Japanese patients. Int J Hematol. 2014; 99: 437-440
 - 5) Nobuoka Y, Wada H, Mizuno S, Kishiwada M, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Kobayashi T, Nobori T, Uemoto S, Isaji S: Prolonged thrombocytopenia after living donor liver transplantation is a strong prognostic predictor irrespective of splenectomy: the significance of ADAMTS13 and graft function. Int J Hematol. 2014; 99:418-28
 - 6) Sasaki T, Matsumoto T, Wada H, Ohishi K, Kanda H, Yamada Y, Arima K, Katayama N, Sugimura Y.: Successful treatment of non-invasive bladder tumour in a haemophilia A patient with high-responding inhibitors: a case report. Haemophilia. 2014; 20: 399-401
 - 7) Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T: Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. Int J Hematol. 2014; 100: 437-442
 - 8) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y:Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. Journal of Intensive Care 2014; 2: 15
 - 9) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Disseminated Intravascular Coagulation: Testing and Diagnosis. Clin Chim Acta. 2014; 436C:130-134
 - 10) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Is early treatment of DIC beneficial in septic patients?, Crit Care, 2014 18:447
 - 11) Wada H, Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasugi K, Gando S, Madoiwa S, Uchiyama T, Mayumi T, Seki Y, Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee: Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the “Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan” . Thromb Res, 2014; 134: 924-925
 - 12) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y:Natural History of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. Semin Thromb Hemost. 2014; 40: 866-873
 - 13) Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Wada H.: Antithrombin and mortality in severe pneumonia patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: an observational nationwide study: comment. J Thromb Haemost. 2015 (in press)
 - 14) Ota S, Wada H, Mastuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Ito M: Anti-Xa activity in VTE patients treated with fondaparinux. Clin Chim Acta, 2015 (in press)
 - 15) Wada H, Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N: Antithrombin

or thrombomodulin administration in severe pneumonia patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation: comment on two papers. J Thromb Haemost. 2015 (in press)

2. 学会発表

- 1) Wada H: Diagnosis and therapy of DIC
The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
- 2) Wada H: New guideline for DIC management
The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
- 3) 和田英夫: aHUS/TTP 患者の検査値異常、共催シンポジウム「補体制御因子と腎疾患」、第 49 回日本小児腎臓学会シンポジウム、秋田、2014
- 4) 和田英夫: 播種性血管内凝固と輸血療法、シンポジウム 2「止血検査からみた最適な輸血療法」、第 21 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、愛媛、2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

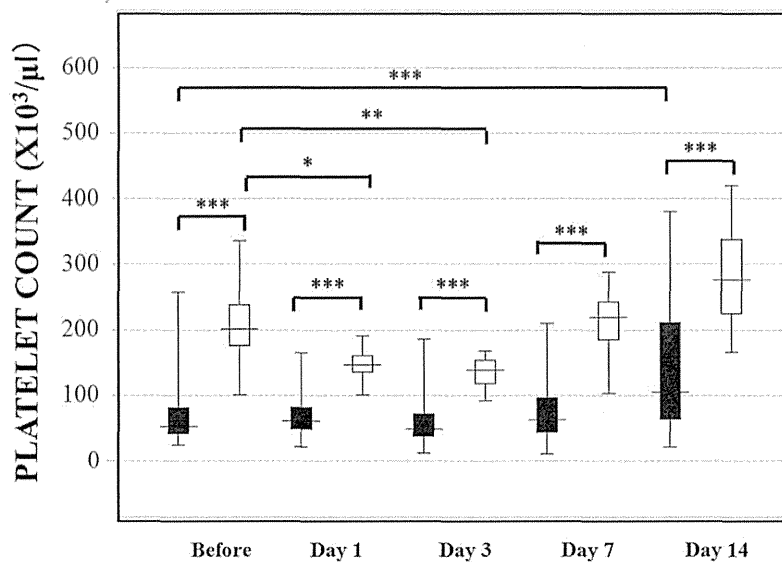


図1 肝移植ドナーとレシピエントの血小板数

Closed bar: recipient, open bar: donor

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

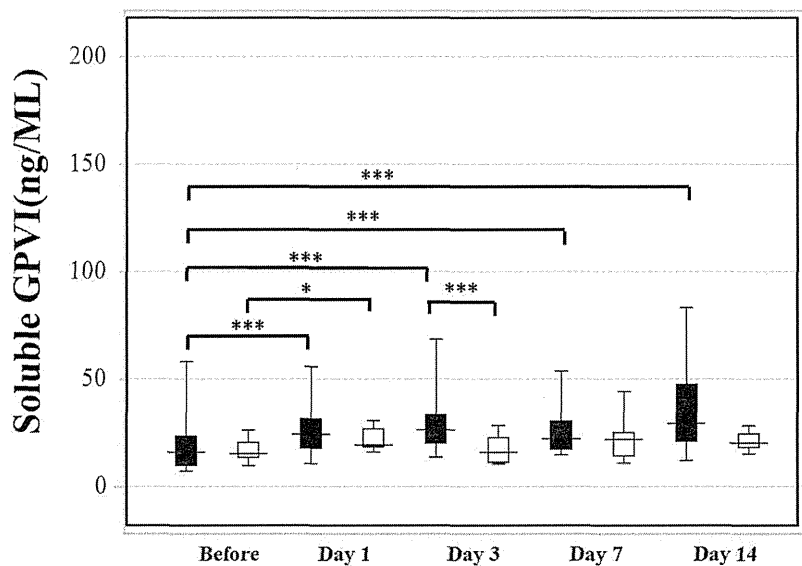


図2 肝移植ドナーとレシピエントの sGPVI 値

Closed bar: recipient, open bar: donor

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

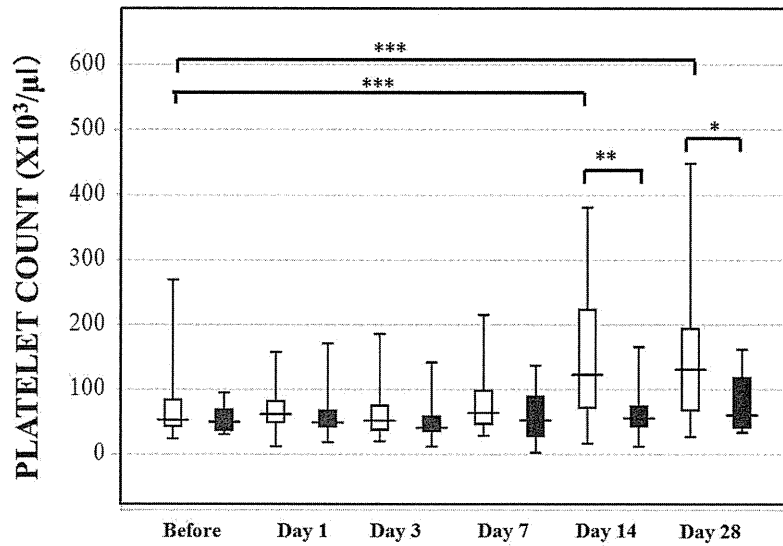


図 3 肝移植の生存群と非生存群における血小板数

Open bar: survivor, closed bar: non-survivor

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

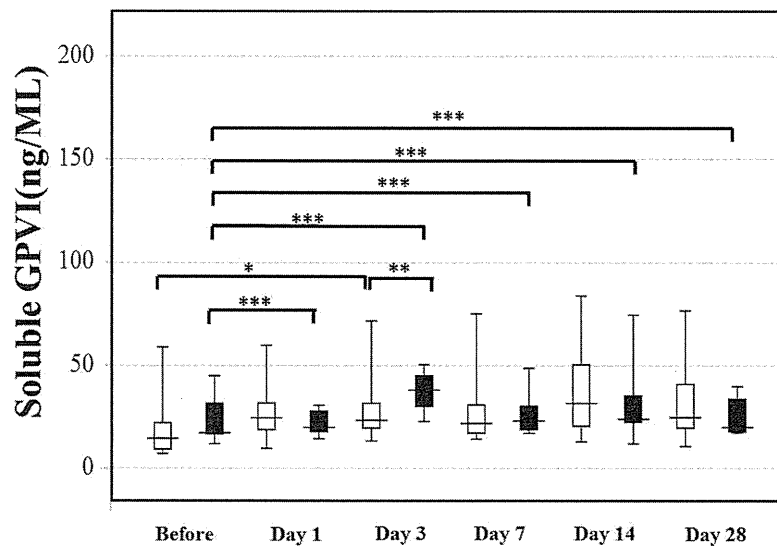


図 4 肝移植の生存群と非生存群における sGPVI 値

Open bar: survivor, closed bar: non-survivor

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析に関する研究

研究分担者 小亀 浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 室長
研究協力者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター分子病態部 部長

研究要旨

von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減は、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の要因となる。ADAMTS13 活性を著減させる原因の一つとして ADAMTS13 遺伝子異常があり、これは先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群) を引き起こす。本研究では、日本における先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、発症メカニズムの解明とともに、TTP 診断ガイドラインや治療ガイドラインの作成に寄与することをめざしている。今年度は、先天性 TTP 患者 3 名 (3 家系) を対象として ADAMTS13 遺伝子の解析を行った。ダイレクトシーケンシング法による塩基配列解析の結果、3 家系の患者はそれぞれ、p. G139Vfs*17 と p. I673F、p. R193W と p. C908Y、p. G139Vfs*17 と p. W686* の複合ヘテロ接合体であった。p. G139Vfs*17 と p. W686* は海外も含めて未報告の変異であった。これらの結果は、臨床データと合わせて考えることで、TTP 関連疾患の診断および治療ガイドラインの作成において有効活用することができる。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の発症は、フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼ ADAMTS13 の活性著減で起こる。ADAMTS13 活性の損失は、先天的な ADAMTS13 遺伝子異常あるいは後天的に生じる抗 ADAMTS13 自己抗体によって起こる。特に ADAMTS13 遺伝子異常によって劣性遺伝形式で発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (Upshaw-Schulman syndrome; USS) と呼ぶ。我々は、先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の分析、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、

ADAMTS13 分子の立体構造解析などに重点をおいて研究を進めてきた。本研究事業では、先天性 TTP 患者の遺伝子解析を継続的に行い、遺伝子異常の特徴や発症メカニズムに関する知見を蓄積することを目的としている。

ADAMTS13 活性が 10% 未満でインヒビターが陰性であれば、先天性 TTP の可能性を考え、遺伝子解析を行う。我々はこれまで、先天性 TTP 疑い患者および家族を対象に ADAMTS13 遺伝子の塩基配列を調べ、先天性 TTP 発症の原因となる遺伝子異常を特定してきた。一般に、遺伝性疾患が疑われる患者の遺伝子の塩基配列は、標的遺伝子の各エクソンを PCR で増幅して塩基配列を解読する方法、すなわちダイレクト・シーケンシング法によって決定

される。我々もまず、ADAMTS13 遺伝子の各エクソンの外側に結合するよう設計した PCR プライマーを用いて、検体 DNA から各エクソンを選択的に増幅させ、その塩基配列を決定する。これまでに我々が行った先天性 TTP 患者解析の場合、約 9 割の症例はこの方法で複合ヘテロ接合性あるいはホモ接合性の原因変異が同定される。ダイレクト・シーケンシング法では原因変異が一つしか、あるいは一つも見つからない場合、ダイレクト・シーケンシング法を効率よく補完する方法として開発したゲノム定量 PCR 法を行っている。この方法で、これまでに 3 患者の ADAMTS13 遺伝子にそれぞれ異なる欠失異常を見出した。

本研究では、新たに見出された先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) の原因変異を明らかにするために、患者および家族の ADAMTS13 遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

患者および家族から得られた血球画分を凍結した状態で受け取り、解析を始めるまで冷凍保管した。DNA 調製には illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GEヘルスケア) を使用した。血液からの調製を前提としたキットなので、凍結血球 (約 200 μ L) を解凍しながら約 100 μ L の生理食塩水で懸濁して約 300 μ L の血液と見なし、マニュアルに従って調製した。

全 29 個のエクソンを PCR で増幅するために、24 ペアのプライマーを用いた。センス方向プライマーの 5' 側に M13F 配列 (TGTAACACGACGGCCAGT) を、アンチセン

ス方向プライマーの 5' 側に M13R 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) を、それぞれ付加しておいた。これは、あとのシーケンシング反応を効率的に行うためである。エクソン 7 以外は一般的な PCR 条件で容易に増幅させることができた。エクソン 8 および 26-27 の増幅では反応液に DMSO 1 μ L を添加した。エクソン 7 は GC 塩基の割合が非常に高いため、GC-RICH PCR System (ロッシュ) を使用した。PCR 終了後、1 μ L を用いてアガロース電気泳動でバンドを確認した。次に、PCR 反応液に残った過剰プライマーの除去と未反応 dNTP の不活化を目的として、ExoSAP-IT (アフィメトリクス) 1 μ L を加え、37°C/30 分間、80°C/15 分間反応させた。このうち 1 μ L を鋳型にして、M13F および M13R プライマーでシーケンス反応を行った。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライド・バイオシステムズ) 試薬の 4 倍希釈液を用いて 5 μ L/反応で行った。反応終了後、CleanSEQ ダイターミネータ精製試薬キット (ベックマン・コールター) で精製し、Genetic Analyzer 3730x1 (アプライド・バイオシステムズ) に供して波形データを得た。

解析ソフトウェア Sequencher (ジーンコード) を用いて波形データを観察し、対象領域 (各エクソンとその前後約 20 塩基) のレファレンス配列と比較した。エクソンに変異が見つかった場合、cDNA 配列 (GenBank: AB069698.2) と照合してアミノ酸配列への影響などを調べた。イントロンに変異が見つかった場合、スプライシングに対する影響等を検討した。なお、エクソンの異常でもスプライシング

に影響をおよぼす可能性もあるので、注意深く検討した。変異が先天性 TTP の原因として既知であれば、それを原因変異として確定した。未報告の変異であれば、アミノ酸レベルでの変異の特徴から機能への影響を類推した。日本人の ADAMTS13 遺伝子に存在する 6 個のミスセンス多型、p. T339R、p. Q448E、p. P475S、p. P618A、p. S903L、p. G1181R は原因変異から除外した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立循環器病研究センターおよび奈良県立医科大学の倫理委員会で研究計画の承認を受けた上で実施した。研究参加者からは書面でのインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

USS-UU 家系の患者は、c. 415-10G>A (p. G139Vfs*17、母由来) と c. 2017A>T (p. I673F、父由来) の複合ヘテロ接合体であった。c. 2017A>T (p. I673F) は先天性 TTP の原因として過去に報告した変異と同一であった。一方、c. 415-10G>A (p. G139Vfs*17) は今回新たに同定された変異で、その配列の特徴からスプライシング異常が予想された。そこで、患者の末梢血球 RNA を解析したところ、予想通りのスプライシング異常により、エクソン 5 に 8 塩基のイントロン配列が含まれる異常 mRNA の存在が確認された。

USS-VV 家系の患者は、c. 577C>T (p. R193W、母由来) と c. 2723G>A (p. C908Y、父由来) の複合ヘテロ接合体であった。いずれも日本の先天性 TTP 患者に比較的によくみられるミスセンス変異であった。

USS-WW 家系の患者は、c. 415-10G>A (p. G139Vfs*17、父由来) と c. 2057G>A (p. W686*、母由来) の複合ヘテロ接合体であった。c. 415-10G>A (p. G139Vfs*17) は上記 USS-UU 家系に同定されたスプライシング異常と同一であった。c. 2057G>A (p. W686*) は国内外とも報告例のない部位のナンセンス変異であった。

D. 考察

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、原因変異を特定することはきわめて重要である。次世代シーケンサーの普及に伴い、遺伝子解析の方法は変化していくと予想されるが、希少疾患で、かつ、先天性 TTP のように責任遺伝子が限定されている場合、依然としてダイレクト・シーケンシング法がコスト面等で優れている。本研究では、種々の工夫により効率化したダイレクト・シーケンシング法を行い、先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) に発症原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子異常を同定した。ミスセンス変異やナンセンス変異、フレームシフトを伴うスプライシング異常など、多様性に富む遺伝子異常が見られた。いずれも、ADAMTS13 の本来の機能、すなわち VWF 切断活性を発揮できなくなる変異であると考えられる。これまでの知見から考えると、いずれもタンパク質が細胞外に分泌されなくなる変異である可能性が高い。

E. 結論

新たに見つかった先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) の ADAMTS13 遺伝子をダイレクト・シーケンシング法で解析した結

果、いずれの患者も ADAMTS13 遺伝子異常の複合ヘテロ接合体であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masanobu Morioka, Masanori Matsumoto, Makoto Saito, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfus.* 12 (S1), s153-s155 (2014)

Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Hata: Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40 (1), 247-249 (2014)

Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, Koichi Kokame, Yaacov Barak, Yoel Sadovsky: NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology* 155 (3), 1099-1106 (2014)

Reiko Neki, Toshiyuki Miyata, Tomio Fujita, Koichi Kokame, Daisuke Fujita, Shigeyuki Isaka, Tomoaki Ikeda, Jun Yoshimatsu: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb. Res.* 133 (5), 914-918 (2014)

Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiro Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata: Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2 (3), 240-244 (2014)

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 宮田敏行: ターゲット領域の異常を見逃さないゲノム定量PCR法の確立. *日本血栓止血学会誌* 25 (5), 615-618 (2014)

小亀浩市: TTP の分子診断. *日本血栓止血学会誌* 25 (6), 689-696 (2014)

小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病. *血液フロンティア* 25 (1), 51-57 (2015)

小亀浩市: ADAMTS13. 新・血栓止血血管学, 印刷中

2. 学会発表

Fumiaki Banno, Yuko Tashima, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Kochi Kokame, Toshiyuki Miyata: Analysis of mice carrying northeast Asian-specific genetic mutations in thrombosis. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014.

小亀浩市: VWF 切断酵素 ADAMTS13 の基礎知識. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 奈良, 2014 年 5 月 15 日-17 日

小亀浩市: TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

小亀浩市, 樋口 (江浦) 由佳, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: デジタルPCRを用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

樋口 (江浦) 由佳, 小亀浩市, 高蓋寿朗, 田中亮二郎, 小林光, 石田文宏, 久永修一, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: ダイレクトシーケンシング, 定量PCR, 次世代シーケンシングを用いたTTP患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

坂野史明, 田寫優子, 小亀浩市, 宮田敏行: 深部静脈血栓症モデルを用いた

日本人の血栓症モデルマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

清水一亘, 柏木浩和, 森川陽一郎, 加藤恒, 田所誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 本田繁則, 金倉譲, 宮田敏行, 富山佳昭: インテグリン α IIb β 3 活性化変異, α IIb (R990W) ノックインマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

滝澤祥恵, 小菅由希子, 淡路比呂代, 田村恵美, 高井綾子, 矢内隆章, 山本玲子, 小亀浩市, 宮田敏行, 井上裕康: HUVEC におけるレスベラトロールによる eNOS、SIRT1、オートファジー関連遺伝子の発現誘導. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 15-18 日

丸山慶子, 秋山正志, 小亀浩市, 森下英理子, 宮田敏行: プロテイン S K196E (PS 徳島) 変異検出 ELISA 法の開発. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014 年 10 月 31-11 月 2 日

Kazunobu Kiyomizu, Hirokazu Kashiwagi, Shinji Kunishima, Fumiaki Banno, Hisashi Kato, Youichiro Morikawa, Seiji Tadokoro, Koichi Kokame, Shigenori Honda, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, Yoshiaki Tomiyama: α IIb (R990W), a constitutive activating mutation of integrin α IIb β 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with

impairment of platelet function. The 56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.

小亀浩市：先天性TTPにおける遺伝子解析. Ion Torrent/Applied Biosystems ユーザーグループミーティング 2014, 東京, 2014年12月16日

小亀浩市：先天性TTP(USS)の分子診断. 第9回日本血栓止血学会SSCシンポジウム, 東京, 2015年2月28日

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