

HELLP症候群の病態解析

研究分担者	松本 雅則	奈良県立医科大学 輸血部	教授
研究協力者	藤村 吉博	日本赤十字社 近畿ブロック血液センター	所長
	八木 秀男	近畿大学奈良病院 血液内科	准教授
	吉田 遥子	奈良県立医科大学	輸血部

研究要旨

血栓性微小血管症(TMA)には、ADAMTS13活性著減する血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)や補体因子に異常のある非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の他に、多くの病因不明の疾患が存在する。その中に妊娠に関連し発症するHELLP (hemolysis, elevated liver function tests, low platelets)症候群があるが、その病態はほとんど解明されていない。今回我々は、HELLP症候群においてADAMTS13抗原を等電点電気泳動(IEF)解析で定性的に検討し、その病態を解析した。

我々は、ポリアクリルアミドとアガロースの混合からなる粗孔IEFを完成し、これを用いて血漿中のADAMTS13抗原が、Band I, II, IIIの3種類に分離できることを報告している。Band IはVWFに結合していない(非結合型)ADAMTS13、Band IIIは高分子VWFに結合している(VWF結合型)ADAMTS13であった。しかし、Band IIはVWFを欠くtype 3 von Willebrand病血漿にも見られる事から、その存在様式を同定できなかった。一方、正常血漿のクリオ沈殿分画にてBand I+IIは上清に、またBand IIIは高分子VWFと結合しているため、沈殿として容易に分離回収できた。これらを用いて、VWF依存性高ずり応力惹起血小板凝集に対する阻害能を検討したところ、精製ADAMTS13とBand I+II(クリオ上清)は同凝集を用量依存性に阻害した。一方、Band III(クリオ沈殿)は同凝集の初期は阻害せず、後期を阻害する事が示された。

本研究では、正常妊婦でも妊娠経過と共にBand Iが軽度減少する傾向は見られたが、Band I, II, IIIの存在は全妊娠期間を通じて明瞭であった。対照的にHELLP症候群では全8例でBand Iの著明な欠落が観察された。今後の検討が必要であるが、HELLP症候群ではADAMTS13蛋白の質的異常が易血小板血栓形成の病態形成に大きく関与している事が示唆された。今後の本研究班におけるTMA分野の新たな病態解明の標的と考えている。

A. 研究の目的

TMAの代表的2疾患として血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)と溶血性尿毒症症候群(HUS)が有名であるが、これら以外にもTMAには多くの疾患が存在する。その中でも自己免疫疾患、悪性腫瘍、造血幹細胞移植、妊娠などに伴い発症する二次性

TMAは、ほとんど病態が明らかになっていない。妊娠関連TMAの中で、妊娠高血圧症候群の最重症型と考えられているHELLP症候群は頻度も高く、HUSやTTPとの迅速な鑑別を要する重篤疾患である。HELLP症候群の病態解析において、止血因子のvon Willebrand因子(VWF)は1980年代から注

目されており、産褥期のVWFの血中濃度は正常妊娠女性に比べてHELLP患者では極めて高いこと(300-400%)が知られている。このため、VWF特異的切断酵素であるADAMTS13が注目されたが、現在までの報告では産褥期の血漿ADAMTS13活性は正常とHELLP症候群ともに低下(共に50%程度)し、その値には差がないことが報告されている。そこで、本研究ではHELLP症候群患者においてADAMTS13抗原について、等電点電気泳動解析(IEF)を用いて定性的に解析した。

B. 研究方法

我々は2013年にポリアクリルアミドとアガロースの混合からなる粗孔ゲルIEFを完成し、これを用いて血漿中のADAMTS13抗原が、Band I, II, IIIの3種類に分離できる事を示した(Hori et al. Transfusion 53:3192-3201, 2013)。Band IはVWFに結合していない(非結合型)ADAMTS13、Band IIIは高分子VWFMに結合している(VWF結合型)ADAMTS13であった。しかし、Band IIはVWFを欠くtype 3 von Willebrand病血漿にも見られる事から、その存在様式を明らかにすることができなかった。

本研究では、128人の正常妊婦と8人のHELLP症候群患者について、IEFに加えて、VWF抗原量、ADAMTS13活性を解析した。8例のHELLP症例の年齢は24から40歳であり、発症時期は妊娠28週から39週であった。妊娠9週から16週が妊娠初期、17-28週が妊娠中期、29-40週が妊娠後期とし、産後期は出産後7日目までと定義した。

(倫理面への配慮)

本研究は、奈良医大の倫理委員会の許可を受けて実施した。また、検体採取に際しては、主治医より被験者に十分な説明を行い、文書による同意を得た。

C. 研究成果

正常妊婦におけるVWF抗原量は、妊娠初期119.5%、妊娠後期227%と約2倍に上昇したが、産後期には179.5%と急激に低下した。一方、ADAMTS13活性は妊娠初期の84.3%から妊娠後期66.8%まで徐々に低下し、産後期には52.1%とさらに低下した。血小板数は有意な変化を認めなかった。

産後期におけるHELLP症候群患者のVWF抗原量は352%と健常妊婦の約2倍であった。一方、ADAMTS13活性は61%と正常妊婦と有意な差は認めなかった。

IEFによるADAMTS13抗原の検討では、健常人のBand I, II, IIIの濃度分布は、52.9%、37.9%、9.1%であった。図1に代表例を示すが正常妊婦でも妊娠経過と共にBand Iが軽度減少する傾向は見られたが、Band I, II, IIIの存在は全妊娠期間を通じて明瞭であった。対照的にHELLP症候群では全8例でBand Iの著明な欠落が観察された。Band IIとIIIはやや上昇していたが、有意な変化は認めなかった。産後期におけるBand Iの濃度は正常妊娠と比較して有意に低下していた(14.4 vs 38.9%)。妊娠後期に8例のHELLP症候群のうち5例が著明に減少していたが、分娩後8日目には2例がほぼ正常に回復していた。

D. 考察

正常血漿のクリオ沈殿分画にてBand I+IIは上清に、またBand IIIは高分子VWFMと結合しているため、沈殿として容

易に分離回収できる。これらを用いて、VWF依存性高ずり応力惹起血小板凝集に対する阻害能を検討したところ、精製ADAMTS13とBand I+II（クリオ上清）は同凝集を用量依存性に阻害した。一方、Band III（クリオ沈殿）は同凝集の初期は阻害せず、凝集が開始された直後ではなく、時間が経過した段階の凝集を阻害する事を我々は報告した。

今回の検討でもHELLP症候群患者では、正常妊婦と比べて明らかなVWF抗原の上昇を認めた。しかし、ADAMTS13活性は2群で明らかな差を認めなかったが、IEFによる定性的な解析により、ADAMTS13の質的な異常が明らかとなった。HELLP症候群では、VWFの異常な上昇を認めるにも関わらず、ADAMTS13のBand Iが欠損している。このことにより、高ずり応力下でVWF切断にすぐに働くADAMTS13が存在していないためVWFが切断されずに、血栓形成が開始している可能性が示唆された。

HELLP症候群は、帝王切開などの分娩により急速に軽快することが多い。今回の検討でも、Band Iの欠損は多くの症例で分娩後8日目までに回復しており、Band Iの欠損が病態と深く関与していることが示唆された。

今後、HELLP症候群多数例での解析に加え、胎盤におけるVWF産生などを検討し、なぜHELLP症候群でVWF抗原量が上昇するのか検討する予定である。

E. 結論

HELLP症候群ではADAMTS13蛋白の質的異常が易血小板血栓形成の病態形成に大きく関与している事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yamashita K, Yagi H, Hayakawa M, Abe T, Hayata Y, Yamaguchi N, Sugimoto M, Fujimura Y, Matsumoto M, Taniguchi S. Rapid restoration of thrombus formation and high-molecular-weight von Willebrand factor multimers in patients with severe aortic stenosis after valve replacement. *J Atheroscler Thromb.* 23:1150-1158, 2016
2. Fujino Y, Inoue Y, Onodera M, Kikuchi S, Sato M, Kojika M, Sato H, Suzuki K, Matsumoto M. Acute pancreatitis-induced thrombotic thrombocytopenic purpura with recurrent acute pancreatitis. *Clin J Gastroenterol.* 9:104-108, 2016
3. Fujiwara S, Mochinaga H, Nakata H, Ohshima K, Matsumoto M, Uchiba M, Mikami Y, Hata H, Okuno Y, Mitsuya H, Nosaka K. Successful treatment of TAFRO syndrome, a variant type of multicentric Castleman disease with thrombotic microangiopathy, with anti-IL-6 receptor antibody and steroids. *Int J Hematol.* 103:718-723, 2016
4. Miyata T, Uchida Y, Yoshida Y, Kato H, Matsumoto M, Kokame K, Fujimura Y, Nangaku M. No association between dysplasminogenemia with

- p.Ala620Thr mutation and atypical hemolytic uremic syndrome. **Int J Hematol.** 104:223-227, 2016
5. Miyakawa Y, Imada K, Ichinohe T, Nishio K, Abe T, Murata M, Ueda Y, Fujimura Y, Matsumoto M, Okamoto S. Efficacy and safety of rituximab in Japanese patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura refractory to conventional therapy. **Int J Hematol.** 104:228-235, 2016
 6. Ichikawa S, Sasaki K, Takahashi T, Hayakawa M, Matsumoto M, Harigae H. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with *Klebsiella* pneumonia in the background of alcoholic liver cirrhosis. **Case Reports in Internal Medicine** 3:30-35,2016
 7. Tsujii N, Nogami K, Yoshizawa H, Hayakawa M, Isonishi A, Matsumoto M, Shima M. Influenza-associated thrombotic microangiopathy with unbalanced von Willebrand factor and a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 levels in a heterozygous protein S-deficient boy. **Pediatr Int** 58:926-929, 2016
 8. Tsujii N, Shiraishi I, MD, Kokame K, Shima M, MD, Fujimura Y, MD, Takahashi Y, Matsumoto M. Severe hemolysis and pulmonary hypertension in a neonate with Upshaw-Schulman syndrome. **Pediatrics**, 138: e20161565, 2016
 9. Scully M, Cataland S, Coppo P, de la Rubia J, Friedman KD, Kremer Hovinga J, Lämmle B, Matsumoto M, Pavenski K, Sadler E, Sarode R, Wu H, on behalf of the international working group for Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. **J Thromb Haemost** 15:312-322, 2017
 10. Akutagawa T, Shindo T, Yamanouchi K, Hayakawa M, Ureshino H, Tsuruoka N, Sakata Y, Shimoda R, Noguchi R, Furukawa K, Morita S, Iwakiri R, Kimura S, Matsumoto M, Fujimoto K. Persistent Gastrointestinal Angiodysplasia in Heyde 's Syndrome After Aortic Valve Replacement. **Intren Med.** In press.
 11. Matsui T, Hori A, Hamako J, Matsushita F, Ozeki Y, Sakurai Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y. Mutant botrocetin-2 inhibits von Willebrand factor-induced platelet agglutination. **J Thromb Haemost.** In press.

学会発表

1. 松本雅則. TMA における血漿療法と病因に基づいた新規治療法の選択. **第64回日本輸血・細胞治療学会総会** 国立京都国際会館、2016年4月28日

(シンポジウム)

2. 杉邑俊樹、長谷川真弓、隅志穂里、下村志帆、馬場由美、辻内智美、前田美和、早川正樹、松本雅則. 当院で過去5年半に血液型判定困難で精査となった65症例の検討.**第64回日本輸血・細胞治療学会総会**. 国立京都国際会館. 2016年4月28日
3. 高橋幸博、長谷川真弓、松本雅則. 自施設作成混合血の組成およびその機能解析と緊急時の新生児の交換輸血.**第64回日本輸血・細胞治療学会総会**. 国立京都国際会館. 2016年4月28日
4. 松本雅則. 病因に基づいたTMAの診断と治療法の選択. **第38回日本血栓止血学会学術集会**. 奈良春日野国際フォーラム. 2016年6月17日(教育講演)
5. 吉井由美、早川正樹、石西綾美、堀勇二、藤村吉博、松本雅則. 後天性原発性血栓性血小板減少性紫斑病の再発危険因子の検討**第38回日本血栓止血学会学術集会**. 奈良春日野国際フォーラム. 2016年6月18日
6. 小亀浩市、内田裕美子、宮田敏行、松本雅則、藤村吉博、吉田瑤子、加藤秀樹、南学正臣. デジタルPCRを用いたaHUS関連遺伝子異常の検出**第38回日本血栓止血学会学術集会**. 奈良春日野国際フォーラム. 2016年6月18日
7. 早川正樹、松本雅則、山下慶吾、阿部毅寿、谷口繁樹. 大動脈弁置換術で小腸血管異常まで改善したHeyde症候群のマルチマー解析.**第38回日本血栓止血学会学術集会**. 奈良春日野国際フォーラム. 2016年6月18日
8. 松本雅則、錦織直人、小山文一、早川正樹、畠山金太、高濟峯、藤村吉博、中島祥介. 大腸がん化学療法後の肝類洞障害は von Willebrand 因子による血小板血栓形成により発症する.**第38回日本血栓止血学会学術集会**. 奈良春日野国際フォーラム. 2016年6月18日
9. 飯野宏允、柳澤邦雄、小川孔幸、清水啓明、三井健揮、石崎卓馬、半田寛、石西綾美、早川正樹、松本雅則、野島美久. Inhibitor boosting にリツキシマブが著効した血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)症例.**第38回日本血栓止血学会学術集会**. 奈良春日野国際フォーラム. 2016年6月18日
10. 内藤千晶、小川孔幸、柳澤邦雄、石崎卓馬、三原正大、半田寛、石西綾美、早川正樹、松本雅則、野島美久. 低力価 ADAMTS13 インヒビター残存状態で均衡を保っている血栓性血小板減少性紫斑病の1例.**第38回日本血栓止血学会学術集会**. 奈良春日野国際フォーラム. 2016年6月18日.
11. Matsumoto M. Analysis of Thrombotic Microangiopathy with Severe ADAMTS13 Deficiency in Japanese Registry. **The 9th Congress of the Asia-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis**. Taipei International Convention Center. 2016年10月8日
12. Tsujii N, Matsumoto M, Kokame K, Takahashi Y, Fujimura Y. Pulmonary hypertension complicated by severe hemolysis in neonate with congenital TTP. **第78回日本血液学会学術集会**. パシ

- フィコ横浜.2016年10月15日
13. Hayakawa M, Kato S, Fujimura Y, Matsumoto M. Quantitative evaluation of degradation products in von Willebrand factor A2 domain by ADAMTS13. **第78回日本血液学会学術集会**. パシフィコ横浜.2016年10月15日
 14. Matsui T, Horii A, Hamako J, Matsushita F, Matsumoto M, Hayakawa M, Fujimura Y. The point-mutated botrocetin-2 inhibits VWF-induced platelet agglutination. **第78回日本血液学会学術集会**. パシフィコ横浜.2016年10月13日
 15. 早川正樹、酒井和哉、長谷川真弓、前田美和、辻内智美、馬場由美、下村志帆、隅志穂里、上野華恵、松下彰利、杉邑俊樹、梅木弥生、松本雅則. 大動脈弁狭窄症の根治術により難治性消化管出血が改善した症例. **第60回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会**. 大阪国際交流センター.2016年11月26日
 16. Yoshida Y, Isonishi A, Sado T, Hayakawa M, Yagi H, Kobayashi H, Fujimura Y, Matsumoto M. Severe Reduction of Free ADAMTS13, Unbound to Von Willebrand Factor, in Plasma Milieu Is a Unique Feature of HELLP Syndrome. **The 58th Annual meeting of American Society of Hematology**. San Diego Convention Center. 2016年12月3日
 17. Hayakawa M, Kato S, Matsui T, Sakai K, Yoshii Y, Yagi H, Fujimura Y, Matsumoto M. Quantitative ELISA Using N10 Antibody, Targeting on VWF-Y1605 Residue, Indicates That N-Linked Blood Group Type A Carbohydrate on VWF Molecule Functions Against ADAMTS13 Cleavage. **The 58th Annual meeting of American Society of Hematology**. San Diego Convention Center.2016年12月5日
 18. 堀内久徳、松本雅則、小亀浩市、The Avec Study Group. 標準化したVWFマルチマー解析によって評価した循環器疾患随伴AVWSの重症度と出血性合併症の関係. **第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム**. 野村コンファレンスプラザ日本橋.2017年1月21日
 19. 松本雅則、厚生労働科研「血液凝固異常症等に関する研究班」TTPサブグループ. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)診療ガイドの作成状況. **第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム**. 野村コンファレンスプラザ日本橋.2017年1月21日
 20. 松本雅則. さらなる適正使用に向けた、血液製剤の使用と輸血療法の実施に関する研究. **平成28年度輸血関連研究班 第2回合同班会議**. 国立衛生研究所.2017年2月11日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

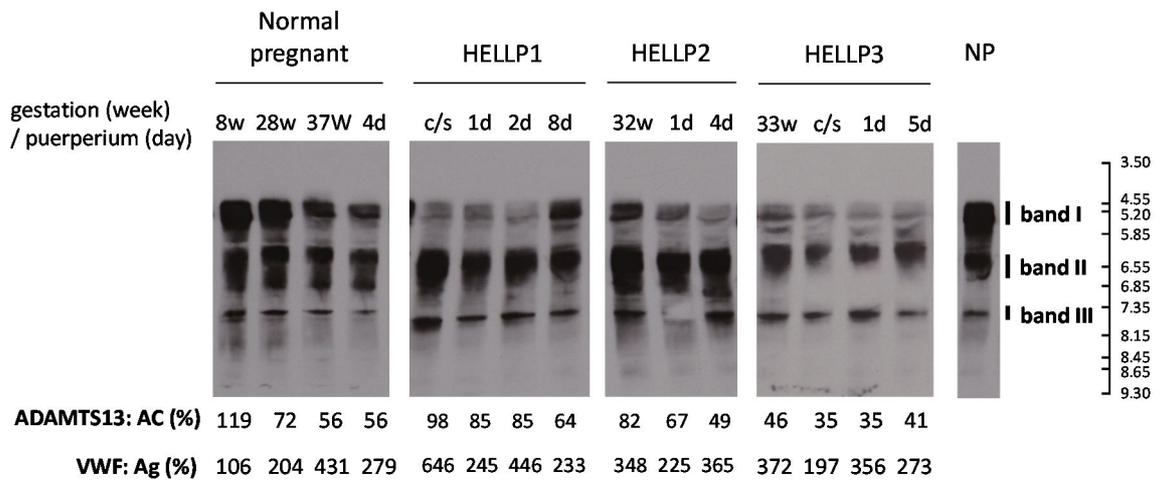


図1 代表例におけるIEFによるADAMTS13抗原解析

c/s: cesarean section