

TTP（血栓性血小板減少性紫斑病）サブグループ報告書

グループリーダー：	松本雅則	奈良県立医科大学輸血部	教授
班員：	宮川義隆	埼玉医科大学総合診療内科・血栓止血センター	教授
	小亀浩市	国立循環器病研究センター研究所 分子病態部	部長
研究協力者：	八木秀男	奈良県総合医療センター血液・腫瘍内科	部長
	日笠 聡	兵庫医科大学 血液内科	講師
	上田恭典	倉敷中央病院 血液内科	部長
	森木隆典	慶應義塾大学	准教授
	和田英夫	三重大学医学部 臨床検査医学	准教授
	宮田敏行	国立循環器病研究センター	前部長
	藤村吉博	日本赤十字社近畿ブロック血液センター	所長

## グループ総括

分担研究者：松本雅則

### 研究要旨

我々のグループは、日本国内の TMA (血栓性微小血管症) 症例の集積と病態解析を行い、TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) の実態を明らかにし、予後の改善を図ることを目的としている。我々は、昨年度までに TTP 診療ガイド 2017 を作成し、本年度に和文と英文で発表された。

本年度は、1) TMA レジストリーの継続、2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続、3) ADAMTS13 検査(活性とインヒビター)の保険適用の取得、4) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大、5) 後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の撤廃、6) TTP 診療ガイドラインの改定、を計画として設定した。

このうち TTP 診療ガイド 2017 の中で今後解決すべき課題としている 3) -5) を本年度の重点項目とした。平成 29 年度第 2 回診療報酬調査専門組織・医療技術評価分科会の資料によると、診療報酬改定において対応する優先度が高い技術として 3) と 5) が挙げられており、2018 年度の保険改定で認められることになった。4) に関しては医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議に要望している。1) 2) に関しては、1998 年以降継続しており、1) の TMA 症例数は本年度 54 例増加し、1474 例となった。このうち、ADAMTS13 活性が 10%未満の TTP は 30 例増加し、全部で 637 例となった。また、先天性 TTP は 64 例となり、このうちで ADAMTS13 遺伝子解析を実施した症例は本年度 2 例増えて、61 例となった。57 例(93.4%)で責任遺伝子変異を同定したが、10 例がホモ接合体異常、47 例が複合ヘテロ接合体異常であった。6) に関しては、我々の活動によりガイドラインを改定しなければならない項目が出て来たが、今後どのような頻度で改定するのか、すぐに改定しない場合の追補事項をどのように公表するのか、などを検討する必要がある。

#### A. 研究の目的

##### 目的

日本国内の TMA (血栓性微小血管症) 症例の集積と病態解析を行い、TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) の実態を明らかにし、予後の改善を図る。

2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続

3) ADAMTS13 検査の保険適用の取得

4) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大

5) 後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の変更

6) TTP 診療ガイドラインの改定

#### B. 研究方法

平成 29 年度の計画

(倫理面への配慮)

1) TMA レジストリーの継続

検体採取に際しては、主治医より十分な説

明を行い、同意を得た。また、TMA コホート研究は奈良医大と倫理委員会、遺伝子解析は奈良医大、国立循環器病研究センターのヒトゲノム倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究成果

### 1) TMA レジストリーの継続

奈良県立医科大学輸血部では、1998 年以降 ADAMTS13 の検査を通じて、日本全国の医療機関から TMA 症例の集積を行なってきた。その症例数は 2017 年 12 月末で 1474 例となった。その基礎疾患別の内訳を表 1 に示す。この 1 年間の症例数の増加は 54 例で、そのうち ADAMTS13 活性が 10%未満の TTP 症例の増加は 30 例であった。TTP 全体の症例のまとめを表 2、3 に示す。最も症例数が多いのは、基礎疾患の明らかでない原発性で、TTP 全体の 60.3%であった。先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群:USS) は 64 例同定しているが、我々が ADAMTS13 活性を確認しているのが 63 例(9.9%)であった。それ以外の後天性二次性 TMA の中で、最も症例数が多いのが全身性エリテマトーデス (SLE) などの膠原病 103 例であり、TTP の中で 16.2% を占めた。それに続いて、チクロピジンなどの薬剤 27 例 (4.2%) であった。

### 2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続

先天性 TTP は本年度 3 例新たに同定し、全部で 64 例となった。そのうち ADAMTS13 遺伝子解析を本年度 2 例で行い、1 例は複合ヘテロ接合体異常、1 例がホモ接合体異常であった。これまでに、61 例について ADAMTS13 遺伝子解析を行い、57 例(93.4%)で責任遺伝子変異を同定した。10 例がホモ接合体異常、47 例が複合ヘテロ接合体異常であった。

### 3) ADAMTS13 検査の保険適用の取得

平成 30 年 1 月 15 日に公表された平成 29 年度第 2 回診療報酬調査専門組織・医療技術評価分科会の医療の技術の評価(案)によると、診療報酬改定において対応する優先度が高い技術に、ADAMTS13 活性測定と同一インヒビター力価測定が含まれている。これは、我々が日本血液学会を通じて提案したもので、平成 30 年度 4 月から保険適用となる予定である。

### 4) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大

後天性 TTP に対するリツキサンの保険適用は、2014 年に医師主導治験を実施したが、2017 年 8 月に日本血液学会を通じて、医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議に、保険適用の拡大を要望した。特発性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの保険適用拡大も同様の要望により、2017 年 4 月から適用拡大となったので、1、2 年後に適用拡大となることを期待している。

### 5) 後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の変更

日本国内で後天性 TTP の治療として保険でカバーされる血漿交換の回数は、1 週間に 3 回までで 3 ヶ月を限度とされている。英国のガイドラインでは、血小板数が 15 万/uL を超えて 2 日目まで連日実施することとされており、日本では治療開始直後の血漿交換の回数は少ない。そのため、海外のガイドラインと同様の血漿交換の回数にするため、日本血液学会を通じて要望し、ADAMTS13 検査と同様に診療報酬改定において対応する優先度が高いものとして認定され、平成 30 年 4 月から海外のガイドラ

インと同様の血漿交換の回数が保険で認められる予定となった。

#### 6) TTP 診療ガイドラインの改定

TTP 診療ガイド 2017 を 2017 年 4 月に日本血液学会雑誌「臨床血液」公表し、その英語版を同年 7 月に International Journal of Hematology にも発表した。英語のガイドラインの作成の目的は、日本での TTP 診療における血漿交換などによる治療法の制限について広く海外に知らしめるためであった。その後の我々の活動により ADAMTS13 検査の保険収載、後天性 TTP における血漿交換の回数制限の撤廃などが予定されており、診療ガイドの改定が必要となってきた。ただ、頻回のガイドラインの改定は混乱を招くとの意見もあり、慎重に改定の時期を判断したい。

#### D. 考察

本年度は TTP の診療ガイドラインの発表に続いて、ADAMTS13 検査の保険収載や後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の変更など我々のグループの活動により大きな成果を上げることができた。とりわけ、診断と治療に関するガイドラインの作成は、日本国内での最初のものであり、意義深い。TTP 診断基準としての ADAMTS13 活性 10%未満は、海外のガイドラインとの整合性を重視したが、TTP の古典的 5 徴候を持つにもかかわらず、ADAMTS13 活性が著減しない症例の取り扱いが問題となる。このような症例は TTP 類縁疾患として、TTP と同様の治療ができるように配慮した。このような症例も血漿交換などの TTP と同様の治療が奏功することがあり、何らかの自己免疫疾患である可能性が高い。現在までに報告のある CD36 などに対する自己抗体の存在など

が病因である可能性があるが、今後も病態解析を継続し行きたい。

また、ADAMTS13 検査の保険収載や血漿交換の回数制限の変更など日常診療にも大きく貢献することができた。ただ、このことにより TTP 診療ガイド 2017 において改定すべき項目が出てきた。すぐに改定すべきであるが、頻回のガイドラインの改定は現場の混乱を招くとの意見も聞かれ、慎重に対応したい。追補版などにより部分的に追加することも可能であるが、タイムリーな情報を効果的にどのような方法で現場に届けるのか、今後検討する予定である。

#### E. 結論

本年度は診療ガイドラインの発表、保険診療改定への関与など非常に成果の多い 1 年となった。これによって、TTP の日常診療のレベルが上がり、患者予後の改善につながることを期待している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Matsumoto M, Fujimura Y, Wada H, Kokame K, Miyakawa Y, Ueda Y, Higasa S, Moriki T, Yagi H, Miyata T, Murata M; For TTP group of Blood Coagulation Abnormalities Research Team, Research on Rare and Intractable Disease supported by Health, Labour, and Welfare Sciences Research Grants. Diagnostic and treatment guidelines for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) 2017 in

- Japan. **Int J Hematol** 106:3-15, 2017
2. 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
  3. 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** 15: 538-548, 2017
  4. Yoshii Y, Fujimura Y, Bennett CL, Isonishi A, Kurumatani N, Matsumoto M. Implementation of a rapid assay of ADAMTS13 activity was associated with improved 30-day survival rate in patients with acquired primary thrombotic thrombocytopenic purpura who received platelet transfusions. **Transfusion**. 57:2045-2053, 2017
  5. 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 Gastro-intestinal Angiodysplasia in Heyde's Syndrome After Aortic Valve Replacement. **Intren Med** 56:2431-2433, 2017
  6. Yoshida Y, Matsumoto M, Yagi H, Isonishi A, Sakai K, Hayakawa M, Hori Y, Sado T, Kobayashi H, YFujimura Y. Severe reduction of free-form ADAMTS13, unbound to von Willebrand factor, in plasma of patients with HELLP syndrome. **Blood Advances** 1:1628-1631, 2017
  7. Takaya H, Yoshiji H, Kawaratani H, Sakai K, Matsumoto M, Fujimura Y, Fukui H. Decreased activity of plasma ADAMTS13 are related to enhanced cytokinemia and endotoxemia in patients with acute liver failure. **Biomed Rep** 7:277-285, 2017
  8. Yagi H, Yamaguchi N, Shida Y, Sugimoto M, Tubaki K, Fujimura Y, Matsumoto M. Highly elevated plasma level of von Willebrand factor accelerates the formation of platelet thrombus under high shear stress in plasma with deficient ADAMTS13 activity. **Thromb Res** 159:91-95, 2017
  9. Yamashita M, Matsumoto M, Hayakawa M, Sakai K, Fujimura Y, Ogata N. Intravitreal injection of aflibercept, an anti-VEGF antagonist, down-regulates plasma von Willebrand factor in patients with age-related macular degeneration. **Sci Rep** 24:1491, 2018
  10. Kawano N, Yokota-Ikeda N, Kawano S, Kuriyama T, Yamashita K, Ono N,

- Ueda N, Ochiai H, Ishikawa F, Kikuchi I, Shimoda K, Matsumoto M. Clinical effect of rituximab as early administration for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with connective tissue diseases. **Modern Rheumatology Case Reports** 2:59-67, 2018
11. Takaya H, Kawaratani H, Kubo T, Seki K, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Takeda K, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H. Platelet hyperaggregability is associated with decreased ADAMTS13 activity and enhanced endotoxemia in patients with acute cholangitis. **Hepatology Res** 48:E52-E60, 2018
  12. Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. **Pediatr Neonatol**. In press
  13. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. **Clin Exp Nephrol**. In press
  14. Wada H, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Iba T, Matsumoto M. Differences and similarities between disseminated intravascular coagulation and thrombotic microangiopathy. **Thromb J**. In press
  15. 松本雅則、藤村吉博、和田英夫、小亀浩市、宮川義隆、上田恭典、日笠聡、森木隆典、八木秀男、宮田敏行、村田満：血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）診療ガイド 2017. **臨床血液** 58:271-281, 2017
  16. 船越康智、岡田雅彦、松本雅則、小亀浩市、森内浩幸：先天性血栓性血小板減少性紫斑病の兄弟例. **臨床血液** 58 :933-937, 2017
  17. Takuma Maeda, Katsura Nakagawa, Kuniko Murata, Yoshiaki Kanaumi, Shu Seguchi, Shiori Kawamura, Mayumi Kodama, Takeshi Kawai, Isami Kakutani, Yoshihiko Ohnishi, Koichi Kokame, Hitoshi Okazaki, and Shigeki Miyata: Identifying patients at high risk of heparin-induced thrombocytopenia - associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry. **Thromb. Haemost.** 117 (1), 127-138 (2017)
  18. Nirav Dhanesha, Prakash Doddapattar, Mehul R Chorawala, Manasa K. Nayak, Koichi Kokame, Janice M. Staber, Steven R. Lentz, and Anil K. Chauhan: ADAMTS13 retards progression of diabetic nephropathy by inhibiting intrarenal thrombosis in mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 37 (7), 1332-1338 (2017)
  19. Natalia Torrealba, Mario Navarro-

- Marquez, Valeria Garrido, Zully Pedrozo, Diego Romero, Yuka Eura, Elisa Villalobos, Juan Carlos Roa, Mario Chiong, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor degradation. **Sci. Rep.** 7 (1), 13402 (2017)
20. Mario Navarro-Marquez, Natalia Torrealba, Rodrigo Troncoso, Cesar Vasquez-Trincado, Marcelo Rodriguez, Pablo E Morales, Elisa Villalobos, Yuka Eura, Lorena Garcia, Mario Chiong, Amira Klip, Enrique Jaimovich, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 impacts insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle cells by controlling the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin - Akt axis. **Biochim. Biophys. Acta**, In press.
21. Abe T, Sasaki A, Ueda T, Miyakawa Y, Ochiai H. Complement-mediated thrombotic microangiopathy secondary to sepsis-induced disseminated intravascular coagulation successfully treated with eculizumb: A case report. **Medicine** 96, e6056 (2017)
22. Yamada Y, Abe R, Okano Y, Miyakawa Y. Long-term eculizumab treatment contributes to recovery from end-stage renal disease caused by atypical hemolytic uremic syndrome. **Intern Med** 56, 1085-1088 (2017)
- 学会発表
1. 矢田憲孝、松本雅則、酒井和哉、早川正樹、藤村貴則、藤本隆、小野史郎、吉本清巳、西尾健治. 膠原病の血管炎予測における von Willebrand factor propeptide の有用性. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日
  2. 久保政之、酒井和哉、早川正樹、松本雅則、八木秀男. 本態性血小板症におけるフォンウィルブランド因子マルチマー解析の重要性について. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日
  3. Hisanori Horiuchi, Masanori Matsumoto, Koichi Kokame. A proposal of VWF large multimer index for standardization of the quantitative description of VWF multimers among laboratories. The 63rd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Berlin, July 8th, 2017.
  4. J. T. Tiao, D. Oh, P. Angchaisuksiri, J. Sathar, M. Yap, C. Ruan, Z. Yu, K. Dai, R. Yang, M. Smith, E. Merriman, S. McRae, R. Wong, A. Enjeti, J. Curnow, J. Joseph, A. Davies, G. Chan, C. McLintock, L. Young, P. Maijer, N. Binder, M. Matsumoto, T. S. Leng, S. C. Nair, M. -C. Shen, R. Bird, T. Brighton, G. V. D' Aulerio, G. Gilmore, J. Tay, Q. Hughes, R. I. Baker. Successful International Standardisation of the ADAMTS13 Assays-Results from the APMAT (Asia Pacific Microangiopathic Thrombo -

- cytopenia) Network. XXVI ISTH Congress and 63rd Annual SSC Meeting. Berlin. July 10<sup>th</sup>, 2018.
5. N. Yada, M. Matsumoto, K. Sakai, M. Hayakawa, T. Fujimura, T. Fujimoto, S. Ono, K. Yoshimoto, Y. Urizono, K. Nishino. Von Willebrand Factor Propeptide May Identify the Patient Susceptible for Renal Dysfunction in Collagen Disease. XXVI ISTH Congress and 63rd Annual SSC Meeting. Berlin. July 10<sup>th</sup>, 2018.
  6. 松本雅則. HELLP 症候群の病態解析. 第 38 回日本妊娠高血圧学会(シンポジウム)、熊本、2017 年 9 月 23 日
  7. 松本雅則. 血小板減少症における輸血療法. 第 69 回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会(特別講演)、2017 年 10 月 14 日
  8. 吉井由美、酒井和哉、松浦佳代子、三浦侑子、早川正樹、松本雅則. Risk factors of ADAMTS13 inhibitor boosting in primary acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. 第 79 回日本血液学会、東京、2017 年 10 月 21 日
  9. 酒井和哉、藤村義弘、石西綾美、早川正樹、八木秀男、松本雅則. The retrospective analysis of prognostic factors of Japanese patients with congenital TTP. 第 79 回日本血液学会、東京、2017 年 10 月 21 日
  10. Takahiro Yoshikawa, Takeo Nomi, Kazuya Sakai, Masaki Hayakawa, Daisuke Hokuto, Satoshi Yasuda, Masayuki Sho, Masanori Matsumoto. Ischemia-Reperfusion Injury with Pringle's Maneuver Induces Increasing of Unusually Large Von Willebrand Factor Multimers after Hepatectomy. 59th ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta. December 11<sup>th</sup>, 2017
  11. 小亀浩市: 先天性 TTP の遺伝子解析を通して分かること. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017 年 6 月 8 日-10 日
  12. Hisashi Kato, Y Ito, Hirokazu Kashiwagi, Yoichiro Morikawa, Keigo Akuta, N Nishiura, Shigenori Honda, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, and Yoshiaki Tomiyama: Complete failure of integrin  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 activation in kinetic assay associates with severe bleeding problems in a patient with kindlin-3 deficiency. The 26th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.
  13. 大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二: 活性化プロテイン C (APC) の臨床的用量が実験的脳梗塞の進展を抑制する. 第 40 回日本神経科学大会、千葉、2017 年 7 月 20-23 日
  14. 菅原有佳、加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、内田裕美子、小亀浩市、宮田敏行、秋岡祐子、三浦健一郎、服部元史、南学正臣: 全ゲノム解析により CFHR 領域の新規融合遺伝子を認めた C3 腎症例. 第 54 回日本補体学会学術集会、福島、2017 年 9 月 1-2 日

15. Koichi Kokame: Platelet aggregation balanced by von Willebrand factor (VWF) and ADAMTS13. ACCDiS Workshop, Santiago, Chile, September 25, 2017.
  16. Koichi Kokame and Yuka Eura: Genetic, biochemical, and physiological approach to understanding the function of Herp and Derlin family proteins in ER-associated degradation machinery. XL Annual Meeting of Chilean BMB Society, Puerto Varas, Chile September 26-29, 2017.
  17. Keiko Yamato, Yukako Nakajo, Hitomi Yamamoto-Imoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Hiroharu Kataoka, Jun C. Takahashi, and Hiroji Yanamoto: A clinically relevant dose of activated protein C (APC) suppresses the development of experimental cerebral infarction. Neuroscience 2017, Washington, DC, USA, November 11-15, 2017.
  18. 大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：活性化プロテイン C (APC) の脳梗塞縮小効果とそのメカニズム：マウスを用いた検討。第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会、大阪、2017 年 11 月 3-4 日
  19. 根木玲子、伊田和史、光黒真菜、岡本章、小亀浩市、宮田敏行：稀な部位で静脈血栓症を発症した発端者を契機に遺伝子解析を行った先天性アンチトロンビン欠乏症タイプ I 家系の検討。日本人類遺伝学会 第 62 回大会、神戸、2017 年 11 月 15-18 日
  20. 伊田和史、根木玲子、光黒真菜、岡本章、辻明宏、小亀浩市、宮田敏行：静脈血栓症の再発を認めたプロテイン S 欠乏症患者における PROS1 遺伝子解析。日本人類遺伝学会 第 62 回大会、神戸、2017 年 11 月 15-18 日
  21. 大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：エダラボンとの比較における活性化プロテイン C (APC) の脳保護効果の検討。第 43 回日本脳卒中学会学術集会、福岡、2018 年 3 月 15-18 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表1 TMAのADAMTS13活性別症例数 (n=1474)  
(奈良医大輸血部1998. 7-2017. 12)

	Congenital TMAs (n=158)		Acquired TMAs (n=1316)											Total (n=1474)
	USS (n=64)	aHUS (n=94)	Primary (n=682)			Secondary (n=734)								
			TTP (n=457)	HUS (n=125)	Drug-induced (n=45)			CTD/AD (n=334)	Malignancies (n=86)	H SCT (n=97)	Pregnancy (n=31)	STEC-HUS (n=48)	Others (LC, etc) (n=93)	
			TC(n=25)/CL(n=4)	MMC (n=12)	Others (n=4)									
ADAMTS13:AC (%)	(n=63)	(n=94)	(n=457)	(n=125)	(n=25/n=3)	(n=12)	(n=4)	(n=324)	(n=86)	(n=91)	(n=27)	(n=47)	(n=87)	(n=1473)
<10	63	0	384	0	24	0	3	103	11	5	8	2	34	637
1年間の増加数	3	0	20	0	0	0	0	4	0	1	0	1	1	30
10~<25	0	5	35	15	3	2	0	68	22	29	3	7	15	204
25~<50	0	20	29	62	1	6	0	110	33	46	13	23	25	368
≥50	0	65	9	48	1	4	1	53	20	17	7	16	19	260
全体の年間増加数	3	3	20	0	1	0	0	10	0	6	4	1	6	54

TC: チクロピジン, CL: クロピドグレル  
CTD/AD: Connective tissue diseases and Autoimmune diseases  
H SCT: Hematopoietic stem cell transplantation  
STEC: shiga toxin producing *E.coli*  
LC: liver cirrhosis

表2 TTP (<ADAMTS13活性10%) 症例のまとめ (n=637)  
(奈良医大輸血部1998. 7-2017. 12)

	Congenital TMAs (n=63)	Acquired TMAs (n=574)									Total (n=637)
	USS (n=63)	Primary (n=384)	Secondary (n=190)								
		TTP (n=384)	Drug-induced (n=27)	CTD/AD (n=103)	Malignancies (n=11)	H SCT (n=5)	Pregnancy (n=8)	STEC-HUS (n=2)	Others (LC, etc) (n=34)		
ADAMTS13:AC (%)	(n=63)	(n=384)	(n=27)	(n=103)	(n=11)	(n=5)	(n=8)	(n=2)	(n=34)	(n=637)	
< 0.5	36	322	22	77	5	0	7	0	26	495	
0.5~< 5	25	27	5	15	4	1	1	0	5	83	
5~< 10	2	22	0	11	0	4	0	2	3	44	
マルチマームのみ <3(3~10)	0	12(1)	0	0	1(1)	0	0	0	0	15	
ADAMTS13:INH (BU/ml)	(n=63)	(n=383)	(n=27)	(n=101)	(n=10)	(n=2)	(n=8)	(n=2)	(n=31)	(n=627)	
> 5	0	80	6	16	4	0	1	0	6	113	
2~< 5	0	136	13	32	2	0	3	1	11	198	
0.5~< 2	7	156	7	42	3	0	4	1	13	233	
< 0.5	56	11	1	11	1	2	0	0	1	83	

TC: チクロピジン, CL: クロピドグレル  
CTD/AD: Connective tissue diseases and Autoimmune diseases  
H SCT: Hematopoietic stem cell transplantation  
STEC: shiga toxin producing *E.coli*  
LC: Liver cirrhosis

表3 TTP (<ADAMTS13 10%) の基礎疾患の割合

	分類	症例数	割合(%)
先天性	USS	63	9.9
後天性	原発性	384	60.3
	二次性	190	29.8
	膠原病	103	16.2
	薬剤	27	4.2
	悪性腫瘍	11	1.7
	妊娠	8	1.3
	その他	41	6.4
	肝硬変・肝炎	8	1.3
	計	637	100

## ADAMTS13 による von Willebrand 因子切断生成物の定量的 ELISA の確立

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  
早川正樹 奈良県立医科大学 輸血部 助教

### 研究要旨

ADAMTS13 は、von Willebrand 因子 (VWF) A2 ドメインにある 1605 番目のアミノ酸チロシン (Y1605) と 1606 番目のメチオニン (M1606) 間を特異的に切断する酵素である。我々は、Y1605 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (N10) を作成し、ADAMTS13 活性測定用 ELISA を確立した。今回この N10 を用いて、ADAMTS13 による VWF 切断生成物 (VWF-DP) を定量する ELISA を確立した。N10 をウエルに固相化し、被験血漿を反応させ、VWF の N 末端領域を認識するモノクローナル抗体で検出するサンドイッチ ELISA である。

VWF は ABO 血液型糖鎖を持つ数少ない血漿タンパク質で、O 型の血漿 VWF 抗原量 (VWF:Ag) は他の血液型に比べて約 25%程度低いことが知られている。今回我々は、血液型別の VWF 抗原量の違いを明らかにするため、ABO 血液型別に健常人の VWF-DP を検討した。A 型 87 名、AB 型 45 名、B 型 52 名、O 型 75 名の計 259 名の健常人で検討したところ、O 型の VWF:Ag は中央値 70.9%と他の血液型に比べて有意に低値であった。O 型の VWF-DP は、AB 型や B 型に比べて有意に低値であったが、VWF-DP と VWF:Ag が正の相関を示すため、VWF-DP/VWF:Ag 比を検討した。この比は、O 型では A 型や AB 型に対して有意に高く、同様に B 型でも A 型や AB 型に対して有意に高かった。最終的に O=B>AB=A の順に高値であった。このことから、A 型血液型糖鎖は ADAMTS13 による VWF 切断に阻害的に働くのではないかと考えられた。

今後 VWF-DP を TTP など血栓性微小血管症 (TMA) においても検討する予定である。具体的には、ADAMTS13 活性が著減している TTP において VWF-DP の違いによって重症度が異なるのか、ADAMTS13 が著減しない TMA において VWF-DP を測定することで新たな病態解析を行うことなどを計画している。

#### A. 研究の目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は、von Willebrand 因子 (VWF) 特異的切断酵素である ADAMTS13 活性が著減することで発症する。ADAMTS13 は VWF の A2 ドメイン内の 1605 番目のアミノ酸チロシン (Y) と 1606 番目のメチオニン (M) の間を切断するメタロプロテアーゼである。我々は、

Y1605 を特異的に認識するモノクローナル抗体 N10 を作成し、ADAMTS13 活性測定 ELISA を開発した。この N10 は、ADAMTS13 による切断が行われないと反応しないが、切断後に反応する抗体である。本研究では N10 を用いて、ADAMTS13 による VWF 切断生成物 (VWF-degradation product: VWF-DP) を定量する ELISA を確立した。こ

の VWF-DP を測定することで、VWF の切断状況を明らかにし、TTP を含む微小血管症 (TMA) の病態解析、重症度解析に利用することを考えている。

一方 VWF は、血漿蛋白には非常に珍しいことであるが、ABO 血液型糖鎖を持つことが報告されている。また、O 型の健常人は他の血液型の人に比べて VWF の抗原量が 25% 程度低いことが明らかになっている。この ABO 血液型別の VWF の抗原量の違いに、ADAMTS13 による VWF の切断効率が関与している可能性がある。そこで今回 ABO 血液型別に VWF-DP を検討した。

## B. 研究方法

対象は 259 名の健常人で、年齢は 18 歳から 40 歳で、男性 168 名、女性 91 名であった (Table 1)。

血漿 VWF-DP の測定は、モノクローナル抗体 N10 を ELISA プレートに固相化し、それに血漿を反応させ、VWF の ADAMTS13 切断部位より N 末端に反応するモノクローナル抗体にて検出するサンドイッチ ELISA 法を用いた。VWF 抗原量 (VWF:Ag) は、VWF に対するポリクローナル抗体 2 種類を用いたサンドイッチ ELISA で測定した。結果は、中央値 (範囲) で示した。

(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

Fig 1 に示すように O 型の血漿中の VWF:Ag (中央値 70.9%) は、他の 3 つの血液型に比べて有意に低いことが認められた。

また、AB 型は A 型に比べて有意に高かった。この結果は、現在までに報告されているものと同様の結果であった。

血漿中の VWF-DP に関して、Fig 2A に示すように O 型 (53.2%) が AB 型 (81.2%) や B 型 (83.1%) に比べて有意に低かった。また、A 型 (63.8%) は B 型に比べて有意に低いことが示された。

一方、VWF 抗原と VWF-DP との関連は、全 259 例において有意な正の相関 ( $r=0.737$ ,  $p<0.01$ ) を認めるため、VWF-DP の結果は VWF 抗原量によって大きな影響を受ける可能性がある。そのため我々は、VWF 抗原量に対する VWF-DP 比 (VWF-DP/VWF:Ag) を計算した。その結果を Fig 2B に示すが、O 型 (0.72) が A 型 (0.62) や AB 型に (0.59) 比べて有意に高いことが明らかになった。また、B 型 (0.75) も A 型や AB 型に比べて有意に高いことが示された。VWF-DP/VWF:Ag 比は  $O=B>AB=A$  という順となり、O 型が ADAMTS13 により切断されやすことで VWF 抗原量が低くなることが予想された。

この結果より、A 型、B 型の両者の抗原を持たない O 型 VWF では、ADAMTS13 による切断を受けやすいこと、さらに B 型より A 型糖鎖を持つことにより ADAMTS13 による切断を受けにくくなることが予想された。

## D. 考察

ABO 血液型の前駆物質は H 抗原で非還元末端の糖はフコースであり、O 型では何も付加されるものは無いので、このままである。A 型では、H 抗原に N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が、B 型ではガラクトース (Gal) がそれぞれ付加される。このように ABO 血液型は、糖鎖の違

いによって決定される。O型血液型のVWF抗原量は他の血液型と比較すると25-30%程度低いことが知られている。血液中のVWF抗原の違いは、VWFの生成、分泌、クリアランスによることが予想されるが、ABO血液型はVWFの生成、分泌には影響しないことが報告されている。

VWFの血液中からのクリアランスにおけるABO血液型の関与に関して、血液型糖鎖によって肝細胞やマクロファージを介するクリアランスの違いが報告されている。しかし、現状では結合するレセプターなどは明らかになっておらず、詳細は不明である。他の経路としてADAMTS13によるVWF切断もABO血液型によるクリアランスの違いを説明できる可能性がある。ABO血液型によって、ADAMTS13のVWF切断に対する感受性が異なり、クリアランスが変化することが予想される。実際、VWFがADAMTS13によって切断されるA2ドメイン内には2つのN結合糖鎖が存在し、ABO血液型糖鎖が存在している可能性があり、それによってクリアランスに影響を与えている可能性がある。

血漿中のVWF-DP自体の測定値は、VWF抗原量が少なくなるとDPも比例して低くなることから、我々はVWF-DP/VWF:Ag比を血液型別に比較した。その結果、O型でこの比が高く、A型、AB型で低かった。このことより、VWFにA型の血液型糖鎖が存在することで、ADAMTS13による切断を阻害する可能性が示唆された。

今後、このVWF-DPは、過度のずり応力が発生する病態で、ADAMTS13によってVWFが過剰に切断される後天性 von Willebrand 症候群 (AVWS) などの診断に利用できると考えている。AVWSは、大動脈弁狭窄症による Heyde 症候群が有名であ

るが、僧帽弁閉鎖不全症や閉塞性肥大型心筋症などの疾患に伴うことも報告されている。さらに、経皮的心肺補助(PCPS)や補助人工心臓によってもAVWSが発生することが明らかになっており、ますます対象となる症例が増える可能性が高く、VWF-DP測定の実用性は増すものと思われる。

TMAにおいては、ADAMTS13活性が著減しているTTPにおいても、VWF-DPの違いによって重症度が異なるのか検討予定である。また、ADAMTS13が著減しないTMAにおいて、VWF-DPを測定することでVWF切断が起こりにくい新たな機序を発見し、さらなる病態解析を継続していく予定である。

## E. 結論

ADAMTS13によりVWFが切断された産物(VWF-DP)を測定できるELISA法を確立した。この方法を用いて、ABO血液型によるVWF抗原量の違いを明らかにするため、VWF-DPを測定した。その結果、A抗原が存在することによってVWF-DPの産生が抑制されることを明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

1. Matsumoto M, Fujimura Y, Wada H, Kokame K, Miyakawa Y, Ueda Y, Higasa S, Moriki T, Yagi H, Miyata T, Murata M; For TTP group of Blood Coagulation Abnormalities Research Team, Research on Rare and Intractable Disease supported

- by Health, Labour, and Welfare Sciences Research Grants. Diagnostic and treatment guidelines for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) 2017 in Japan. **Int J Hematol** 106:3-15, 2017
2. 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 micro-angiopathies. **J Thromb Haemost** 15:312-322, 2017
  3. 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** 15: 538-548, 2017
  4. Yoshii Y, Fujimura Y, Bennett CL, Isonishi A, Kurumatani N, Matsumoto M. Implementation of a rapid assay of ADAMTS13 activity was associated with improved 30-day survival rate in patients with acquired primary thrombotic thrombocytopenic purpura who received platelet transfusions. **Transfusion**. 57:2045-2053, 2017
  5. 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 Gastro-intestinal Angiodysplasia in Heyde's Syndrome After Aortic Valve Replacement. **Intren Med** 56:2431-2433, 2017
  6. Yoshida Y, Matsumoto M, Yagi H, Isonishi A, Sakai K, Hayakawa M, Hori Y, Sado T, Kobayashi H, YFujimura Y. Severe reduction of free-form ADAMTS13, unbound to von Willebrand factor, in plasma of patients with HELLP syndrome. **Blood Advances** 1:1628-1631, 2017
  7. Takaya H, Yoshiji H, Kawaratani H, Sakai K, Matsumoto M, Fujimura Y, Fukui H. Decreased activity of plasma ADAMTS13 are related to enhanced cytokinemia and endotoxemia in patients with acute liver failure. **Biomed Rep** 7:277-285, 2017
  8. Yagi H, Yamaguchi N, Shida Y, Sugimoto M, Tubaki K, Fujimura Y, Matsumoto M. Highly elevated plasma level of von Willebrand factor accelerates the formation of platelet thrombus under high shear stress in plasma with deficient ADAMTS13 activity. **Thromb Res** 159:91-95, 2017
  9. Yamashita M, Matsumoto M, Hayakawa M, Sakai K, Fujimura Y, Ogata N. Intravitreal injection of aflibercept, an anti-VEGF antagonist, down-regulates plasma von Willebrand factor in patients

- with age-related macular degeneration. **Sci Rep** 24:1491, 2018
10. Kawano N, Yokota-Ikeda N, Kawano S, Kuriyama T, Yamashita K, Ono N, Ueda N, Ochiai H, Ishikawa F, Kikuchi I, Shimoda K, Matsumoto M. Clinical effect of rituximab as early administration for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with connective tissue diseases. **Modern Rheumatology Case Reports** 2:59-67, 2018
  11. Takaya H, Kawaratani H, Kubo T, Seki K, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Takeda K, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H. Platelet hyper-aggregability is associated with decreased ADAMTS13 activity and enhanced endotoxemia in patients with acute cholangitis. **Hepatology Res** 48:E52-E60, 2018
  12. Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. **Pediatr Neonatol**. In press
  13. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. **Clin Exp Nephrol**. In press
  14. Wada H, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Iba T, Matsumoto M. Differences and similarities between disseminated intravascular coagulation and thrombotic microangiopathy. **Thromb J**. In press
  15. 松本雅則、藤村吉博、和田英夫、小亀浩市、宮川義隆、上田恭典、日笠聡、森木隆典、八木秀男、宮田敏行、村田満：血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 診療ガイド 2017. **臨床血液** 58:271-281, 2017
  16. 船越康智、岡田雅彦、松本雅則、小亀浩市、森内浩幸：先天性血栓性血小板減少性紫斑病の兄弟例. **臨床血液** 58: 933-937, 2017
- 学会発表
1. 矢田憲孝、松本雅則、酒井和哉、早川正樹、藤村貴則、藤 隆、小野史郎、吉本清巳、西尾健治. 膠原病の血管炎予測における von Willebrand factor propeptide の有用性. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日
  2. 久保政之、酒井和哉、早川正樹、松本雅則、八木秀男. 本態性血小板症におけるフォンウィルブランド因子マルチマー解析の重要性について. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日
  3. Hisanori Horiuchi, Masanori Matsumoto, Koichi Kokame: A proposal of VWF large multimer index for standardization of the

- quantitative description of VWF multimers among laboratories. The 63rd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Berlin, July 8th, 2017.
4. J. T. Tiao, D. Oh, P. Angchaisuksiri, J. Sathar, M. Yap, C. Ruan, Z. Yu, K. Dai, R. Yang, M. Smith, E. Merriman, S. McRae, R. Wong, A. Enjeti, J. Curnow, J. Joseph, A. Davies, G. Chan, C. McLintock, L. Young, P. Maijer, N. Binder, M. Matsumoto, T. S. Leng, S. C. Nair, M. -C. Shen, R. Bird, T. Brighton, G. V. D' Aulerio, G. Gilmore, J. Tay, Q. Hughes, R. I. Baker. Successful International Standardisation of the ADAMTS13 Assays—Results from the APMAT (Asia Pacific Microangiopathic Thrombocytopenia) Network. XXVI ISTH Congress and 63rd Annual SSC Meeting. Berlin. July 10<sup>th</sup>, 2018.
  5. N. Yada, M. Matsumoto, K. Sakai, M. Hayakawa, T. Fujimura, T. Fujimoto, S. Ono, K. Yoshimoto, Y. Urizono, K. Nishino. Von Willebrand Factor Propeptide May Identify the Patient Susceptible for Renal Dysfunction in Collagen Disease. XXVI ISTH Congress and 63rd Annual SSC Meeting. Berlin. July 10<sup>th</sup>, 2018.
  6. 松本雅則. HELLP 症候群の病態解析. 第 38 回日本妊娠高血圧学会(シンポジウム)、熊本、2017 年 9 月 23 日
  7. 松本雅則. 血小板減少症における輸血療法. 第 69 回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会(特別講演)、2017 年 10 月 14 日
  8. 吉井由美、酒井和哉、松浦佳代子、三浦侑子、早川正樹、松本雅則. Risk factors of ADAMTS13 inhibitor boosting in primary acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. 第 79 回日本血液学会、東京、2017 年 10 月 21 日
  9. 酒井和哉、藤村吉博、石西綾美、早川正樹、八木秀男、松本雅則. The retrospective analysis of prognostic factors of Japanese patients with congenital TTP. 第 79 回日本血液学会、東京、2017 年 10 月 21 日
  10. Takahiro Yoshikawa, Takeo Nomi, Kazuya Sakai, Masaki Hayakawa, Daisuke Hokuto, Satoshi Yasuda, Masayuki Sho, Masanori Matsumoto. Ischemia-Reperfusion Injury with Pringle's Maneuver Induces Increasing of Unusually Large Von Willebrand Factor Multimers after Hepatectomy. 59th ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta. December 11<sup>th</sup>, 2017
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

Table 1 患者背景

Blood group	A	AB	B	O
number	87	45	52	75
age (median)	23	23	23	23
age (range)	18-33	20-40	18-33	19-35
male/female	56/31	30/15	34/18	48/27

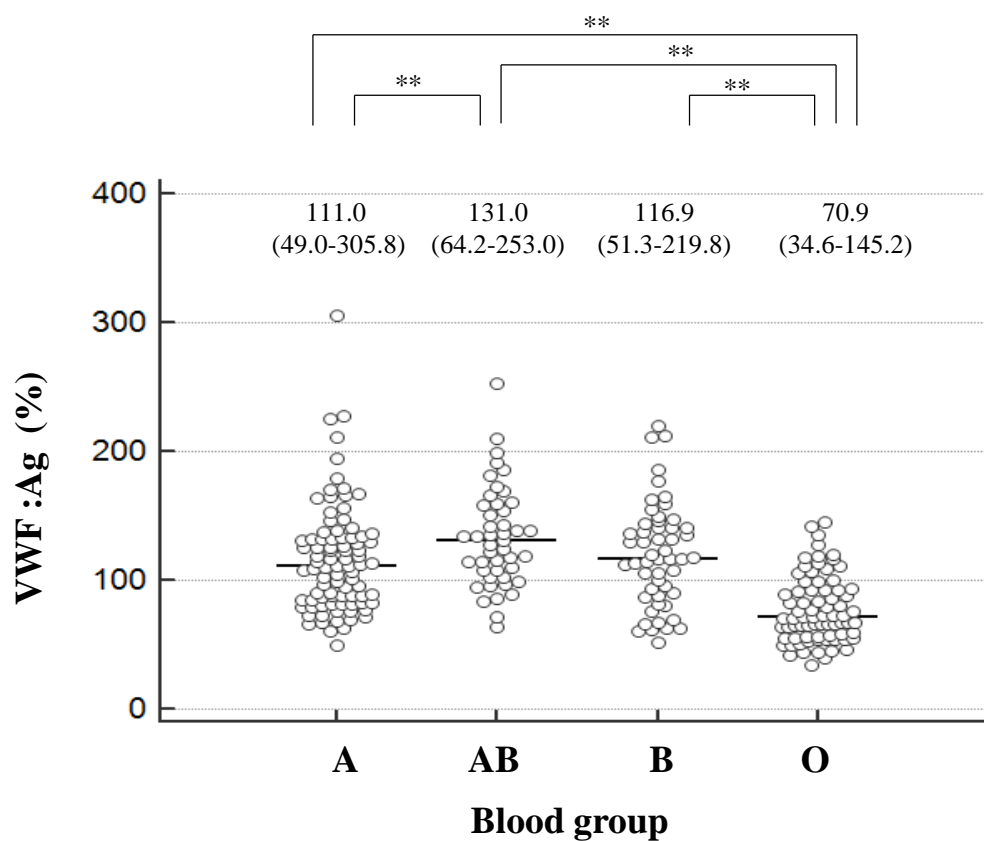
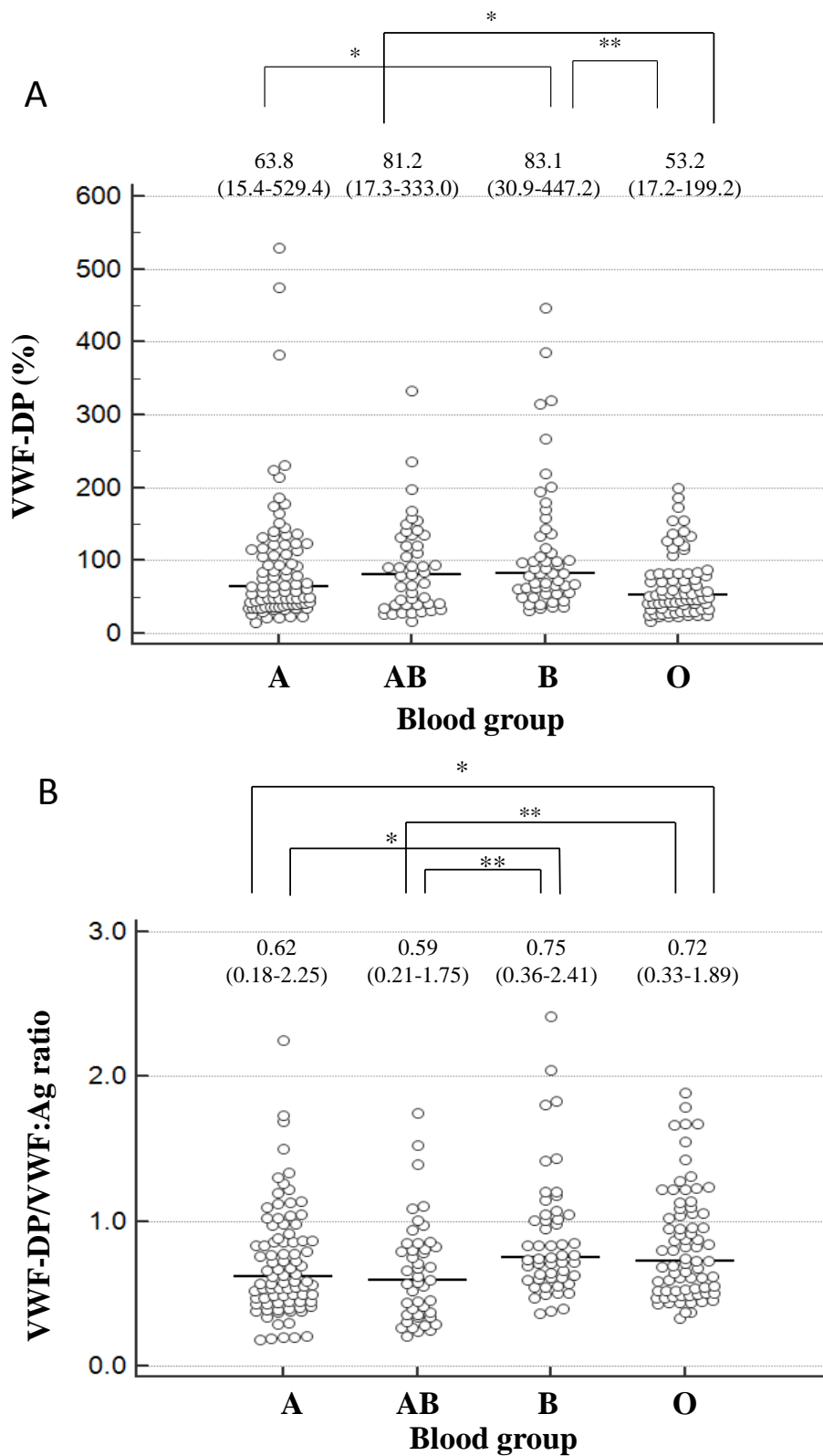


Figure 1 ABO 血液型別の VWF 抗原量

VWF 抗原量は O 型が他の血液型に比べて有意に低かった。  
また AB 型が A 型に比べて有意に高かった。

\*\* p<0.01



**Figure 2** ABO 血液型別の VWF-DP と VWF 抗原との比

A, VWF 切断生成物 (VWF-DP) および B, VWF 抗原量との比を示す。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

## TTP に対する血漿交換と抗体医薬リツキサンの薬事対応

研究分担者：宮川義隆 埼玉医科大学病院 総合診療内科 教授

### 研究要旨

難治性の TTP 患者の救命のため、血漿交換の回数撤廃について薬事対応をした。内保連を通じて、診療報酬調査専門組織医療技術評価分科会に諮り、平成 30 年 4 月より回数制限の撤廃に至った。再発・難治例に有効性が高い抗体医薬リツキサンの TTP に対する適応拡大については、国内で実施した医師主導治験の研究成果をもとに、医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議に要望書を提出した。

#### A. 研究目的

血液難病 TTP の死亡率は 2 割と高い。従来、国内の血漿交換の回数は、週 3 回、最高 3 ヶ月間と健康保険で規定されていた。また、難治例に有効な抗体医薬リツキサンは、TTP に未承認である。難治例の救命のため、欧米の医療環境を参考に、血漿交換の回数撤廃とリツキサンの適応拡大を目的とする。

#### B. 研究方法

血漿交換の回数撤廃については、日本血液学会 診療委員会より、内保連を通じて診療報酬調査専門組織医療技術評価分科会に要望書を提出する。リツキサンの適応拡大は、本研究班が支援を行い、国内で行われた第 II 相医師主導治験の研究成果をもとに、医療上の必要性が高い未承認薬・適応拡大検討会議に要望する。  
(倫理面への配慮)  
なし。

#### C. 研究結果

平成 30 年 4 月より、血漿交換の回数が撤廃された。これにより、欧米並みに救命率の向上と入院期間の短縮が期待され

る。なお、リツキサンの適応拡大については、医療上の必要性が高い未承認薬・適応拡大検討会議にて、医療上の必要性について審議中である。今後、1~2 年かけて公知性が審議され、適応拡大に至ることが期待される。

#### D. 考察

平成 30 年度より血漿交換の回数が撤廃されることが公示された。これにより、難病患者の救命率が向上することが期待される。

#### E. 結論

TTP に対する血漿交換の回数制限が撤廃された。抗体医薬リツキサンの適応拡大については、厚生労働省の専門会議で継続審議中である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Abe T, Sasaki A, Ueda T, Miyakawa Y, Ochiai H. Complement-mediated

- thrombotic microangiopathy syndrome. Intern Med 56, 1085-1088 (2017)
- secondary to sepsis-induced disseminated intravascular coagulation successfully treated with eculizumb: A case report. Medicine 96, e6056 (2017)
2. Yamada Y, Abe R, Okano Y, Miyakawa Y. Long-term eculizumab treatment contributes to recovery from end-stage renal disease caused by atypical hemolytic uremic
- 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

## 先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析

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 部長

### 研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) は、von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減で発症する指定難病である。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 を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成・改訂に寄与することをめざしている。今年度は、先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 家系) を対象として ADAMTS13 遺伝子解析を行った。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、1 名は p. S397F と p. Q892\* の複合ヘテロ接合体であり、もう 1 名は p. C908Y のホモ接合体であった。p. S397F と p. Q892\* は海外も含めて未報告の変異であり、p. C908Y はこれまでに日本の先天性 TTP 患者 9 家系に同定されていた原因変異であった。

### 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 (インヒビター) 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とともに、TTP を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成・改訂に寄与することをめざしている。

ADAMTS13 の酵素活性が 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た。ダイレクト・シーケンシング法で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 2 名 (2 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 genomic Prep 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試薬キットなので、凍結血球 (約 200  $\mu$ L) を解凍しながら約 100  $\mu$ L の生理食塩水で懸濁して約 300  $\mu$ 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 (TGTAACGACGCGCCAGT) 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L を加え、37°C/30 分間、80°C/15 分間反応させた。このうち 1  $\mu$ 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  $\mu$ 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 3730xl (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-2A 家系の患者は女性で、19 歳時に両上肢の点状出血を呈し、近医受診での血液検査で血小板減少と高ビリルビン血症が認められた。当初は特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) と診断されたが、治療効果等から TTP の可能性が疑われた。奈良医大輸血部で血漿検体を解析したところ、ADAMTS13 活性は 0.5% 未満、インヒビター力価は 0.3 BU/mL であった。両親および妹の ADAMTS13 活性は、父 32%、母 53%、妹 46% と低下しており、いずれもインヒビターは陰性 (力価 0.5 BU/mL 未満) であったため、患者は先天性 TTP であると診断された。ダイレクト・シーケンシング法による解析の結果、c. 1190C>T (p. S397F) および c. 2674C>T (p. Q892\*) のヘテロ接合体であった。いずれも国外含めて未報告の変異である。父に c. 2674C>T (p. Q892\*) が、母に c. 1190C>T (p. S397F) が同定されたため、患者はこれらの複合ヘテロ接合体と考えられた。妹には母由来の c. 1190C>T (p. S397F) が同定された。遺伝型と ADAMTS13 活性との関連から、いずれの変異も機能欠失型の原因変異と推定された。

USS-3B 家系の患者は男性で、心窩部痛・嘔吐・軟便・食思不振、無尿状態で入院し、HUS の臨床診断で腎代替療法により改善し退院した。約 6 年後、嘔吐・下痢で近医受診し、血小板減少と腎障害が見られたため総合病院に入院した。当初 HUS 再燃と考えられたが、絶食補液による対症療法で改善し退院した。後日、入院時採血の血漿 ADAMTS13 活性著減 (2.3%)・インヒビター陰性が判明した。その後複数回の測定で、ADAMTS13 活性 1.3~2.0%・インヒビター陰性が確認された。患者の父母弟の ADAMTS13 活性は、それぞれ 34%、17.7%、22.4% で、いずれもインヒビター陰性であった。先天性 TTP の可能性が強く推定されたため、ダイレクト・シーケンシング法による解析を行った結果、患者に c. 2723G>A (p. C908Y) 変異がホモ接合体で同定された。父母とも同変異がヘテロ接合体で同定されたため、患者は本変異のホモ接合体であると確認された。弟にも同変異がヘテロ接合体で同定され、保因者であることが判明した。このミスセンス変異は、日本の先天性 TTP 患者 9 家系に同定されていた原因変異である。

### 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 2 名 (2 家系) に、発症原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子異常を同定した。今回同定されたのは、2 種のミスセンス変異と 1 種のナンセンス変異であった。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

先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 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、両名に両アレル性の異常が同定された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Takuma Maeda, Katsura Nakagawa, Kuniko Murata, Yoshiaki Kanaumi, Shu Seguchi, Shiori Kawamura, Mayumi Kodama, Takeshi Kawai, Isami Kakutani, Yoshihiko Ohnishi, Koichi Kokame, Hitoshi Okazaki, and Shigeki Miyata: Identifying patients at high risk of heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry. *Thromb. Haemost.* 117 (1), 127-138 (2017)

Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Hideo Wada, Koichi Kokame, Yoshitaka Miyakawa, Yasunori Ueda,

Satoshi Higasa, Takanori Moriki, Hideo Yagi, Toshiyuki Miyata, and Mitsuru Murata: Diagnostic and Treatment Guidelines for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) 2017 in Japan. *Int. J. Hematol.* 106 (1), 3-15 (2017)

Nirav Dhanesha, Prakash Doddapattar, Mehul R Chorawala, Manasa K. Nayak, Koichi Kokame, Janice M. Staber, Steven R. Lentz, and Anil K. Chauhan: ADAMTS13 retards progression of diabetic nephropathy by inhibiting intrarenal thrombosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (7), 1332-1338 (2017)

Natalia Torrealba, Mario Navarro-Marquez, Valeria Garrido, Zully Pedrozo, Diego Romero, Yuka Eura, Elisa Villalobos, Juan Carlos Roa, Mario Chiong, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor degradation. *Sci. Rep.* 7 (1), 13402 (2017)

Mario Navarro-Marquez, Natalia Torrealba, Rodrigo Troncoso, Cesar Vasquez-Trincado, Marcelo Rodriguez, Pablo E Morales, Elisa Villalobos, Yuka Eura, Lorena Garcia, Mario Chiong, Amira Klip, Enrique Jaimovich, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 impacts insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle

cells by controlling the  $Ca^{2+}$ -calcineurin-Akt axis. *Biochim. Biophys. Acta*, In press.

Madoka Fujisawa, Hideki Kato, Yoko Yoshida, Tomoko Usui, Munenori Takata, Mika Fujimoto, Hideo Wada, Yumiko Uchida, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata, and Masaomi Nangaku: Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin. Exp. Nephrol.*, In press.

松本雅則、藤村吉博、和田英夫、小亀浩市、宮川義隆、上田恭典、日笠聡、森木隆典、八木秀男、宮田敏行、村田満：血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）診療ガイド 2017. *臨床血液* 58 (4), 271-281 (2017)

船越康智、岡田雅彦、松本雅則、小亀浩市、森内浩幸：先天性血栓性血小板減少性紫斑病の兄弟例. *臨床血液* 58 (8), 933-937 (2017)

## 2. 学会発表

小亀浩市：先天性 TTP の遺伝子解析を通して分かること. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017 年 6 月 8 日-10 日

Hisanori Horiuchi, Masanori Matsumoto, and Koichi Kokame: A proposal of VWF large multimer index for standardization of the quantitative

description of VWF multimers among laboratories. The 63rd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.

Hisashi Kato, Y Ito, Hirokazu Kashiwagi, Yoichiro Morikawa, Keigo Akuta, N Nishiura, Shigenori Honda, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, and Yoshiaki Tomiyama: Complete failure of integrin  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 activation in kinetic assay associates with severe bleeding problems in a patient with kindlin-3 deficiency. The 26th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.

大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：活性化プロテイン C (APC) の臨床的用量が実験的脳梗塞の進展を抑制する. 第 40 回日本神経科学大会、千葉、2017 年 7 月 20-23 日

菅原有佳、加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、内田裕美子、小亀浩市、宮田敏行、秋岡祐子、三浦健一郎、服部元史、南学正臣：全ゲノム解析により CFHR 領域の新規融合遺伝子を認めた C3 腎症例. 第 54 回日本補体学会学術集会、福島、2017 年 9 月 1-2 日

Koichi Kokame: Platelet aggregation balanced by von Willebrand factor (VWF) and ADAMTS13. ACCDiS Workshop,

Santiago, Chile, September 25, 2017.

Koichi Kokame and Yuka Eura: Genetic, biochemical, and physiological approach to understanding the function of Herp and Derlin family proteins in ER-associated degradation machinery. XL Annual Meeting of Chilean BMB Society, Puerto Varas, Chile September 26-29, 2017.

Keiko Yamato, Yukako Nakajo, Hitomi Yamamoto-Imoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Hiroharu Kataoka, Jun C. Takahashi, and Hiroji Yanamoto: A clinically relevant dose of activated protein C (APC) suppresses the development of experimental cerebral infarction. Neuroscience 2017, Washington, DC, USA, November 11-15, 2017.

大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：活性化プロテインC(APC)の脳梗塞縮小効果とそのメカニズム：マウスを用いた検討。第60回日本脳循環代謝学会学術集会、大阪、2017年11月3-4日

根木玲子、伊田和史、光黒真菜、岡本章、小亀浩市、宮田敏行：稀な部位で静脈血栓症を発症した発端者を契機に遺伝子解析を行った先天性アンチトロンビン欠乏症タイプ I 家系の検討。日本人類遺伝学会 第62回大会、神戸、2017年11月15-18日

伊田和史、根木玲子、光黒真菜、岡本章、辻明宏、小亀浩市、宮田敏行：静脈血栓症の再発を認めたプロテイン S 欠乏症患者における PROS1 遺伝子解析。日本人類遺伝学会 第62回大会、神戸、2017年11月15-18日

大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：エダラボンとの比較における活性化プロテインC (APC)の脳保護効果の検討。第43回日本脳卒中学会学術集会、福岡、2018年3月15-18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