

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02637

研究課題名(和文)ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)の病態検査学の確立

研究課題名(英文) Establishment of laboratory medicine of heparin-induced thrombocytopenia

研究代表者

矢富 裕 (Yatomi, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60200523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパリン起因性血小板減少症(heparin-induced thrombocytopenia; HIT)は、抗血栓薬(抗凝固薬)として広く臨床において使用されているヘパリンの重大な副作用であるが、その診断手法の向上が望まれている。今回、免疫学的HIT抗体、機能的HIT抗体の診断性能向上、そして、並行してHIT抗体の血小板活性化機構の基礎的検討を行った。

イムノクロマトグラフィ法によるHIT抗体検出キットの開発が進み、近い将来に薬事承認を得るためのデータ取りが可能な段階となる一方、マウスHIT抗体を用いたHITのin vitroモデル系を確立し、機能的HIT抗体検出系の改良に応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘパリン起因性血小板減少症(heparin-induced thrombocytopenia; HIT)は、抗血栓薬(抗凝固薬)として広く臨床において使用されているヘパリンの重大な副作用であるが、早期かつ的確な診断が難しいことが多く、その診断手法の向上が望まれている。我々は、本診断における二本柱である免疫学的HIT抗体、機能的HIT抗体の手法の向上につながる成果をあげることができた。

研究成果の概要(英文)：Anti-platelet factor 4 (PF4)/heparin antibodies-induced platelet activation is important for thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia (HIT), and we established in vitro functional HIT assay system using mouse anti-PF4/heparin monoclonal antibody (HIT-MoAb). We have found that platelet activation via the clustering of Fc γ RIIa involves cytochalasin-sensitive cytoskeletal reorganization and that cytochalasin B (CB) significantly enhanced HIT-MoAb-induced platelet activation, accompanied by platelet aggregation. From a practical viewpoint, CB may be useful for improving the sensitivity of HIT functional assays. We have also developed a facile immunological HIT assay system, which can be applied to IVD in the future.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：ヘパリン起因性血小板減少症 HIT抗体検査

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘパリン起因性血小板減少症 (heparin-induced thrombocytopenia; HIT) は、抗血栓薬 (抗凝固薬) として広く臨床において使用されているヘパリンの重大な副作用である。治療目的で生体に (陰性荷電を有する) ヘパリンが投与されると (陽性荷電を有する) 血小板第 4 因子 (PF4) との複合体が形成され、それに伴い PF4 に構造変化が生じる。この構造変化した複合体が新生抗原となり、体内で HIT 抗体が産生される。この HIT 抗体は PF4/ヘパリン複合体 (抗原) と免疫複合体を形成し、Fc 部分で血小板膜上の FcγIIA 受容体に結合し、そのクロスリンクにより血小板を活性化させる。その結果、血小板凝集・放出反応が惹起され、活性化された血小板からはさらに PF4 が放出され、この免疫反応が増幅される。凝固を促進するマイクロパーティクルも生成・放出され、さらに、血栓形成が促進される。このような免疫機序を介して血小板減少や血栓塞栓症が引き起こされるのが HIT の本体 (図 1) であるが、これが診断されずに放置された場合には、致死にいたる重篤な病態が生じる。最近の啓発活動により、HIT の存在自体は広く認識されてきているが、その診断には苦慮されることが多い。

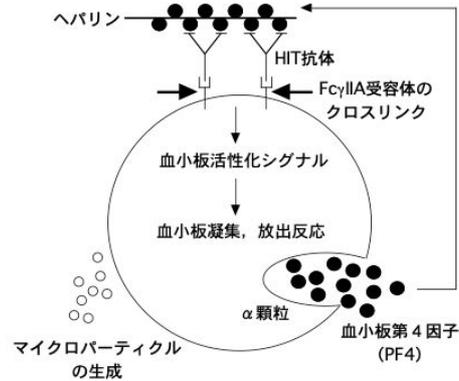


図1. HIT抗体の血小板活性化機構

一般的には血小板減少の経過・様態、さらには他の臨床症状を元に (通常 4Ts スコアを使用) HIT を疑い、まず、免疫学的 HIT 抗体検査を行う。スコアに基づく臨床診断に加え、免疫学的 HIT 抗体高値などの検査結果が揃えば、HIT の診断が下されるが、現実には、簡単に診断が下るケースは多くない。免疫学的 HIT 抗体検査は、最近、化学発光免疫測定法、ラテックス免疫比濁法によるものが保険収載されたが、必要な測定機器の関係で、病院内の検査室で施行されることはなく、ほとんどが外注検査であり、迅速性がない。簡便かつ信頼性の高い免疫学的 HIT 検査が待ち望まれている。

一方、確定診断に最も有用な機能的 HIT 抗体検査の代表である ¹⁴C-セロトニン放出アッセイは、アイソトープを使用することもあり、現在、国内で実施している施設はない。また、その代替となる機能的 HIT 抗体検査も、健常人の全血から調整した血小板を扱い、しかも、特殊な血小板機能検査の施行を必要とすることから、国内において実施できる施設は限られている。

さらには、HIT 抗体による、血小板、さらには単球、血管内皮細胞の活性化機構に関しても不明の部分が多く、その解明が待たれている。

2. 研究の目的

以上の背景、また、私たちの教室のこれまでの研究経験・体制を生かすことにより、HIT の基礎・臨床に関わる種々の問題点を解決できると考え、以下の研究目的を設定した。

[免疫学的 HIT 抗体検査の研究]

- ・簡便な免疫学的 HIT 抗体検査の開発。とくに HIT 検査に相応しい簡便性・機動性を備えたイムノクロマトグラフィ法の開発と臨床応用

[機能的 HIT 抗体検査の研究]

- ・機能的 HIT 抗体検査としての非 RI セロトニン放出アッセイの開発と臨床応用
- ・全血検体を用いた新しい機能的 HIT 抗体検査の開発
- ・より実施しやすい機能的 HIT 検査の開発 (HIT 抗体による血小板活性化機序の解明と密接に関連する)

[HIT 抗体による細胞活性化機序の解明]

- ・CD9 抗体による血小板活性化機構との対比、12-リポキシゲナーゼの関与を軸にした、HIT 抗体による血小板活性化機構の解明

- ・HIT 抗体による単球、血管内皮細胞の活性化機構の解明

[HIT 診断ガイドラインの策定]

- ・新しい HIT 診断フローチャートの提唱も含め、HIT 診療の向上に寄与することを目指す

3. 研究の方法

研究代表者の矢富が研究全般の指揮をとるとともに、血小板の扱い・脂質の解析等では、実地指導を行った。安本篤史 (助教) が中心となり、矢富を指導教員とする大学院生・特任研究員・臨床検査技師が実際の実験を実施する体制をとった。ヒト血小板の調整・血小板凝集能の評価は一般的な方法 (透過光法) で行ったほか、並行して実施している先端的な手法も取り入れた。脂質解析は、LC/MS/MS で網羅的に実施するとともに、特定の生理活性脂質に関しては ELISA 法で実施した。

イムノクロマトグラフィ法キットの開発に関しては、日本凍結乾燥研究所と共同で進めた。ヒト血液を用いた研究計画に関しては、東京大学大学院医学系研究・医学部倫理委員会によ

て承認されている[審査番号: 10324-(3)].
 また,日本血栓止血学会の学術標準化委員会(SSC)HIT 部会の部会長(矢富),部員(安本)として,HIT 診療ガイドラインの策定に関わった.

4. 研究成果

[免疫学的 HIT 抗体検査の研究]

日本凍結乾燥研究所との共同研究で進めてきた,イムノクロマトグラフィ法による HIT 抗体検出キットの性能が向上した.既に保険収載されている HIT 抗体検出試薬との相関も良好であり,近い将来に薬事承認を得るためのデータ取りが可能な段階になっている.

[機能的 HIT 抗体検査の研究]

[HIT 抗体による細胞活性化機序の解明]

機能的 HIT 抗体検査としての非 RI セロトニン放出アッセイの開発,ソノクロット装置を用いた全血検体機能的 HIT 抗体検査の開発に関わる研究を実施したが,実臨床への応用は難しいことが判明し,現在,我が国である程度は普及しているヘパリン惹起血小板凝集能検査の,より実施しやすい機能的 HIT 検査への応用を進めた.これは,HIT 抗体による血小板活性化機序の解明と並行して進めた.

ヒト洗浄血小板をマウスモノクローナル PF4/ヘパリン抗体(マウス HIT 抗体)で刺激することにより,HIT 抗体による血小板活性化機序の解明を進めた(図2).血小板凝集能装置(PR313M)を用いて機能面の評価を行うとともに,LC/MS/MS を用いたエイコサノイドの一斉定量を実施,さらには,TxB2/12-HETE に関しては ELISA でも測定した.マウス HIT 抗体により,特徴的な lag time と濃度依存的な凝集反応を認め,ウエスタンブロットでも HIT 抗体が Fc γ RIIA に作用したときに生じる切断された Fc γ RIIA (40kDa 32kDa) のバンドを得て,HIT の in vitro モデル系を確立した(図3).マウス HIT 抗体による活性化血小板の生理活性脂質解析では,TxB2/12-HETE の血小板凝集反応との相関を確認した.

以前より明らかにしていたサイトカラシン B (CB) による HIT 抗体刺激血小板活性化の増強硬化を詳細に解析した.血小板と低濃度 CB を短時間混和後にマウス HIT 抗体で刺激すると,低濃度でも凝集する血小板ドナーでは lag time の短縮を認め,低濃度マウス HIT 抗体では凝集しない血小板ドナーでは凝集が誘導された.HIT の診断において重要な機能的 HIT 抗体検査の感度を上げる方法として,CB (図4)の有効性・将来性が確認された.

臨床検体 30 症例を用いて,5 名の血小板ドナーに CB 処理の有無で評価したところ,CB 処理なしではドナーにより凝集の有無にばらつきがみられたが,CB 処理ありでは全例で凝集を認めた.さらに,HIT 抗体が陰性の症例では,CB で処理しても血小板凝集は誘導されなかった.機能的 HIT 抗体検査では血小板ドナーの選択は極めて重要であるが,CB を用いることでドナー選択が不要となる可能性が示唆される.この成果を,現在,英文原著論文として投稿中である.

[HIT 診断ガイドラインの策定]

日本血栓止血学会の SSC HIT 部会において,作業を進行させている.
 2019 年 6 月の第 41 回日本血栓止血学会学術集会の HIT 部会において骨格が出来上がる予定である.

[その他]

上記の研究を進める過程で,血小板研究におけるいくつかの重要な成果をあげることができた.高速に多数の細胞を撮影する「OTS (optofluidic time-stretch) 顕微鏡」と機械学習による細胞分類を用いて,ヒト血液における血小板凝集塊の高精度検出に成功した.従来の顕微鏡に比べて非常に高速に血小板凝集塊を無標識検出

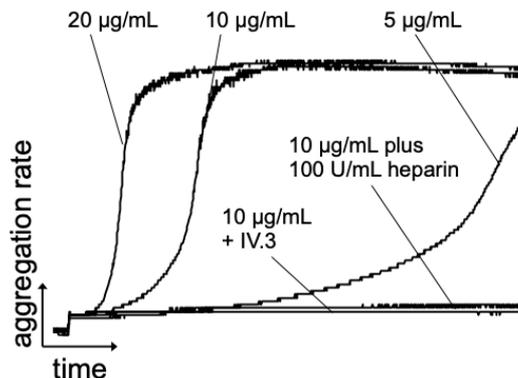


図2. HIT抗体による血小板凝集

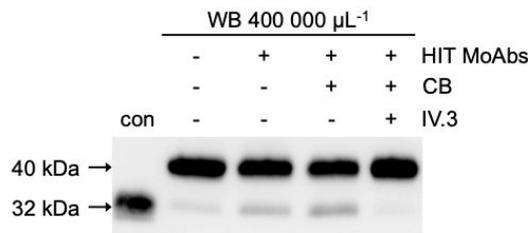


図3. HIT抗体によるFc γ RIIAの切断

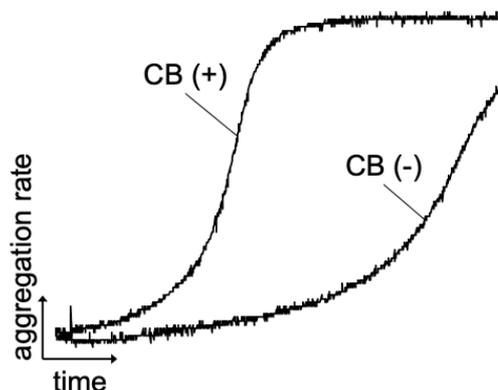


図4. CBによるHIT抗体惹起血小板凝集の増強

できるため、これまでの研究で示されている各種疾患と血小板凝集塊との関連性をより詳しく調べることが可能になった。アテローム血栓症などの新たな診断手法として、今後、臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

(英文)

1. Guo, B., Lei, C., Wu, Y., Kobayashi, H., Ito, T., Yalikul, Y., Lee, S., Isozaki, A., Li, M., Jiang, Y., Yasumoto, A., Di Carlo, D., Tanaka, Y., Yatomi, Y., Ozeki, Y., and Goda, K. Optofluidic time-stretch quantitative phase microscopy. *Methods* 136: 116-125, 2018.
2. Lei, C., Kobayashi, H., Wu, Y., Li, M., Isozaki, A., Yasumoto, A., Mikami, H., Ito, T., Nitta, N., Sugimura, T., Yamada, M., Yatomi, Y., Di Carlo, D., Ozeki, Y., and Goda, K. High-throughput imaging flow cytometry by optofluidic time-stretch microscopy. *Nat Protoc* 13: 1603-1631, 2018.
3. Nakao, T., Yasumoto, A., Tokuoka, S., Kita, Y., Kawahara, T., Daimon, M., and Yatomi, Y. The impact of night-shift work on platelet function in healthy medical staff. *J Occup Health* 60: 324-332, 2018.
4. Nitta, N., Sugimura, T., Isozaki, A., Mikami, H., Hiraki, K., Sakuma, S., Iino, T., Arai, F., Endo, T., Fujiwaki, Y., Fukuzawa, H., Hase, M., Hayakawa, T., Hiramatsu, K., Hoshino, Y., Inaba, M., Ito, T., Karakawa, H., Kasai, Y., Koizumi, K., Lee, S., Lei, C., Li, M., Maeno, T., Matsusaka, S., Murakami, D., Nakagawa, A., Oguchi, Y., Oikawa, M., Ota, T., Shiba, K., Shintaku, H., Shirasaki, Y., Suga, K., Suzuki, Y., Suzuki, N., Tanaka, Y., Tezuka, H., Toyokawa, C., Yalikul, Y., Yamada, M., Yamagishi, M., Yamano, T., Yasumoto, A., Yatomi, Y., Yazawa, M., Di Carlo, D., Hosokawa, Y., Uemura, S., Ozeki, Y., and Goda, K. Intelligent Image-Activated Cell Sorting. *Cell* 175: 266-276 e213, 2018.
5. Jiang, Y., Lei, C., Yasumoto, A., Kobayashi, H., Aisaka, Y., Ito, T., Guo, B., Nitta, N., Kutsuna, N., Ozeki, Y., Nakagawa, A., Yatomi, Y., and Goda, K. Label-free detection of aggregated platelets in blood by machine-learning-aided optofluidic time-stretch microscopy. *Lab Chip* 17: 2426-2434, 2017.
6. Yasumoto, A., Ishiura, R., Narushima, M., and Yatomi, Y. Successful treatment with dabigatran for consumptive coagulopathy associated with extensive vascular malformations. *Blood Coagul Fibrinolysis* 28: 670-674, 2017.
7. Yasumoto, A., Tokuoka, S.M., Kita, Y., Shimizu, T., and Yatomi, Y. Multiplex quantitative analysis of eicosanoid mediators in human plasma and serum: Possible introduction into clinical testing. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1068-1069: 98-104, 2017.

(和文)

8. 安本 篤史, 矢富 裕. ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)の診断. 日本血栓止血学会誌 30 巻 1 号 178-183, 2019
9. 安本 篤史, 矢富 裕. ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)の病態から考える診断と治療. *Thrombosis Medicine* 8 巻 3 号 194-200, 2018
10. 安本 篤史, 矢富 裕. ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)の最新の診断・検査. *臨床検査* 61 巻 2 号 140-145, 2017
11. 安本 篤史, 矢富 裕. ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)診断の最新検査. *医学のあゆみ* 263 巻 13 号 1163-1168, 2017
12. 安本 篤史, 矢富 裕. フローチャートで整理する出血傾向を示す患者の診療の流れ. *Medical Technology* 44 巻 4 号 338-344, 2016

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 安本ほか. HIT の診断を確定させる際に有用な血清学的診断法はどれか? 第 13 回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム. 2019 年 2 月.
2. 安本ほか. トロンボキサン A2 受容体異常症の一例. 第 19 回日本検査血液学会学術集会. 2018 年 7 月.
3. Atsushi Yasumoto et al. Regulation of Fc RIIA-mediated platelet activation by a cytochalasin-sensitive cytoskeletal rearrangement: its clinical application to the detection of functional HIT antibody. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*. 2017 年 7 月.
4. 安本ほか. 非標識リアルタイムイメージング装置を用いた血小板凝集塊の検出法の確立. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会. 2017 年 6 月.
5. 安本ほか. サイトカラシン B 前処理血小板を用いた HIT 診断のための機能的測定法の有用性. 第 11 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム. 2017 年 2 月.
6. 安本ほか. エイコサノイド高感度一斉定量法の血漿・血清臨床検体への応用に向けた基礎検討. 第 63 回日本臨床検査医学会. 2016 年 9 月.

7. 安本ほか．エイコサノイド高感度一斉定量による血小板機能評価の基礎検討．第 38 回日本血栓止血学会学術集会.2016 年 6 月．

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医学部附属病院検査部ホームページ

<http://lab-tky.umin.jp/>

6．研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：安本 篤史

ローマ字氏名：YASUMOTO ATSUSHI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。