

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591425

研究課題名(和文) 妊娠期に特異な後天性・血栓性微小血管障害症の分子病態とその制御機構解析

研究課題名(英文) Analysis of the pathology and regulation system in pregnancy-associated thrombotic microangiopathy (TMA)

研究代表者

藤村 吉博 (Fujimura, Yoshihiro)

奈良県立医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：80118033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：正常妊婦ならびに妊娠高血圧症候群、HELLP症候群について、von Willebrand因子(VWF)、VWF特異的切断酵素ADAMTS13、胎盤由来E-NTPDaseの解析を行い、妊娠期における血栓性微小血管症(TMA)の病態解析と治療法の個別化を行うことを目的とした。妊娠期に見られる重篤な疾患であるHELLP症候群発症例では、等電点電気泳動によるADAMTS13解析の結果、“VWF非結合型ADAMTS13”の著明な欠損を認め、血小板凝集における早期凝集の阻害が減弱している可能性が示唆された。本研究は、HELLP症候群におけるADAMTS13の血小板凝集阻害機能低下を示唆する初の報告である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to reveal the pathology of pregnancy-associated thrombotic microangiopathy (TMA). We analyzed von Willebrand factor (VWF), VWF-cleaving specific cleavage protease ADAMTS13 and placenta-derived E-NTPDase by using the plasma samples of normal pregnant women and the patients with pregnancy-induced hypertension (PIH) or HELLP syndrome. We identified that the patients with HELLP syndrome had the severe deletion of "VWF unbound forms of ADAMTS13 (free ADAMTS13)" in isoelectric focusing. We previously showed that cryosupernatant, which abundantly contains "free ADAMTS13", inhibited initial phase of platelet aggregation. Thus, we suggested that the development of HELLP syndrome might be associated with the decreased function of inhibiting initial phase of platelet aggregation by "free ADAMTS13".

研究分野：血栓止血学

キーワード：妊娠関連TMA HELLP症候群 ADAMTS13 VWF 胎盤由来E-NTPDase

## 1. 研究開始当初の背景

### 学術的研究背景

止血因子である von Willebrand 因子 (VWF) は、その約 80% が血管内皮細胞で産生される。産生直後の VWF は高度の多重体構造を持つ超高分子量 VWF マルチマー (UL-VWF) として存在し、過剰な血小板凝集を引き起こし、細小動脈における血栓形成を促す。この UL-VWF を適度に切断し、「止血に適切であるが、病的血栓を生じない」ように、その分子サイズを調節しているのが ADAMTS13 である。また、血管内皮細胞から UL-VWF の放出を促す因子としてアドレナリンや DDAVP、サイトカインや低酸素刺激などが報告されているが、妊娠期には胎盤由来のマイクロパーティクルが UL-VWF 放出の促進因子である可能性も示唆されていた。

一方で申請者らは、以前に胎盤絨毛冊子縁から分離される微粒子 (brush border membrane vesicles, BBMV) が、高張り応力下において強力な血小板凝集阻害作用を有することを同定した。そこで、この BBMV より ADP 分解酵素 (Ecto-NTPDase) の精製・cDNA 構造の決定 (Int Haematol, 1998、FEBS Letters, 1999) を行うとともに、この胎盤由来 E-NTPDase が強い抗血栓作用を示すことを報告した (Circulation, 2005、Arterioscl Thromb Vasc Bio, 2009)。さらに、この E-NTPDase に対する 2 種類の特異的マウスモノクローナル抗体 (mAb) : MK33, YH34 の作成に成功した。しかしながら、この胎盤 E-NTPDase が、実際に妊娠期の血液中で、どのような挙動を示すのかという点については未解決のままであった。

従来、妊娠期は凝固能亢進、線溶能低下、運動量低下に伴う循環不全等の理由により、非妊娠期に比べて血栓症のリスクが高いことが知られている。しかしながら妊婦の多くは出血や血栓の合併症無く経過することから、妊娠期には特有の血栓制御機構が存在することが想定され、これには胎盤由来 E-NTPDase が関与する可能性が示唆された。

### 疫学的研究背景

血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy, TMA) は、微小血管症性溶血性貧血、血小板減少、微小血管に血小板血栓が生じることによる臓器機能障害 (特に腎や脳) の 3 主徴を示す疾患の病理学的診断名である。TMA に含まれる代表的な疾患が溶血性尿毒症症候群 (HUS) と血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) であり、TTP は前述した ADAMTS13 酵素の活性低下により発症する。

一方、妊娠高血圧症候群 (pregnancy-induced hypertension, PIH) は妊婦の約 1 割に見られる高頻度合併症で、これは妊娠高血圧腎症 (preeclampsia) や子癇 (eclampsia) 等の 4 病型から成る。この中で、溶血、肝遊離酵素上昇、そして血小板減少を伴う最重症

型が HELLP 症候群 (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet) である。HELLP 症候群は病理学的に「広義の TMA」に分類されるが、「TMA」の観点からの病態解析は十分に行われていない。よって、HELLP 症候群を含む妊娠期 TMA 病態について、TTP や HUS との異同の観点から解析を行うことは、個々の TMA 病態に対する適切な治療選択上からも非常に重要であると考えた。

これらの学術的・疫学的研究背景により、申請者らは VWF, ADAMTS13, 胎盤 E-NTPDase の 3 標識に焦点をあて、妊娠期における血栓制御機構の解明を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究は、HELLP 症候群を含む妊娠期に特有な後天性 TMA に焦点をあて、その成因と制御の作用因子と考えられる、VWF (特に活性型 VWF)、VWF 特異的切断酵素 ADAMTS13、VWF 依存性の高張り応力惹起血小板凝集を強力に阻害する胎盤由来 E-NTPDase (ADP 分解酵素) の 3 標識について解析し、妊娠期 TMA の病態と治療法の個別化を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 解析対象

奈良県立医科大学の産婦人科に通院した妊婦を対象に、正常妊婦、PIH、HELLP 症候群について連続検体の集積を行った。検体は、一般的な医療機関で使用する凝固用採血管 (2ml, 1:9=クエン酸:全血) で採取し、得られた血漿 (約 1ml) を用いて、以下に示す方法で解析を実施した。

### 2) VWF ならびに ADAMTS13 の解析

#### a) VWF 抗原量測定

VWF のポリクローナル抗体 (pAb) (Dako) を 96well プレート上に固相化し、ブロッキング後、適宜希釈した患者検体を添加して 4 で一晚反応させた。洗浄後、HRP-conjugated VWF pAb (Dako) を添加して反応させた後に、発色試薬を添加して患者血漿中の VWF 抗原量を測定した。

#### b) ADAMTS13 解析

ADAMTS13 の活性測定は、申請者らの研究室で樹立した chromogenic-act ELISA 法を用いて測定を行った (Kato, et al., 2006)。ADAMTS13 の等電点電気泳動 (IEF) 解析は、pH 3-10 の勾配を付けたアガロース・アクリルアミド混合ゲルを用い、集積した妊婦血漿を 6μL 添加して、泳動を行った。泳動後、ニトロセルロース膜に転写してスキムミルクでブロッキング後、当研究室で作成したヒト ADAMTS13 に対するマウスモノクローナル抗体 (mAb) である WH2-11-1 と 4 で一晚反応

させた。洗浄後、HRP-conjugated anti-mouse IgG と室温で 1 時間反応させ、バンドの検出を行った。

### 3) E-NTPDase 解析

#### a) E-NTPDase の精製とこれに対する新規モノクローナル抗体の作成

申請者が以前作成した E-NTPDase に対するマウス mAb (MK33) 20mg を CNBr activated Sepharose-4B に結合させ、抗体カップリングカラムを作成した。このカップリングカラムに、ヒト胎盤から作成した BBMV を添加して精製を行った。得られた溶出液は濃縮、透析を行った後に、DEAE カラムに添加して、さらなる精製を行った。得られた分画を濃縮し、50%グリセロール添加後にマイナス 80 で保存した。この胎盤由来 E-NTPDase (10 $\mu$ g) を BALB/c マウスに週 1 回、計 4 回免疫し、これに対する新規 mAb の作成を行った。

#### b) E-NTPDase の活性測定

E-NTPDase 活性測定には、E-NTPDase とその基質である ATP あるいは ADP を反応させ、精製したリンの生成量を、マラカイトグリーン法を用いて測定した。まず 96well プレート上に MK33 を固相化し、ブロッキング後に、適宜希釈した患者検体を添加して 4 で一晩反応させた。洗浄後、基質である ATP あるいは ADP を添加し、37 で 30min 反応させた後に、マラカイト発色液を添加し、630 nm の吸光度を測定した。

#### c) E-NTPDase の抗原測定

96well プレート上に MK33 を固相化し、ブロッキング後に、適宜希釈した患者検体を添加し、4 で一晩反応させた。洗浄後、HRP 標識を行った YH34 mAb を添加し、反応させた後に、発色試薬を添加して E-NTPDase の抗原量を測定した。

### 4) 活性型 VWF に対するモノクローナル抗体の作成

精製 VWF は、それ単独では血小板凝集能を示さないが、シアリダーゼ酵素処理により得られる脱シアリ化 VWF (asialo-VWF) は、単独で血小板凝集能を生じる。これは、脱シアリ化により分子表面に血小板の GP1b 結合ドメインが恒常的に露出されることに起因すると考えられている。申請者は、この「活性型 VWF」を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成することで、活性型 VWF のみを効率的に検出できる解析系の構築を目指した。

まず、血漿より精製した VWF にシアリダーゼを添加し、asialo-VWF を作成した。作成した asialo-VWF (50  $\mu$ g) をマウスに週 1 回、計 4 回免疫し、抗体の作成を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) 患者集積

2013 年未までに正常妊婦 129 例、PIH 24 例、HELLP 症候群 10 例の連続検体の集積を成し得た。また、奈良医大輸血部の TMA コホート研究を通じて、2013 年未までに同定した後天性・妊娠関連 TMA 症例は 22 例であった。

#### 2) VWF, ADAMTS13 解析結果

正常妊婦、PIH、HELLP 症候群の 3 群について、解析を実施した。結果、正常妊婦では妊娠週数の経過と共に ADAMTS13 活性は漸減し (図 1)、VWF 抗原量は増加する傾向が見られた (図 2)。ADAMTS13 活性については 3 群間で顕著な差は見られなかった (図 1)、HELLP 症候群症例では他に比べ VWF 抗原量の増加が著しかった (図 2)。これより、正常妊婦では妊娠経過に伴い血栓傾向にあることを認められたが、血小板数に大きな変化は無かった。

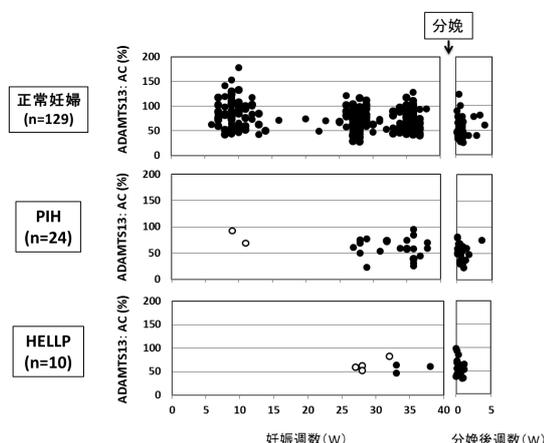


図 1: 正常妊婦および PIH, HELLP 症候群における ADAMTS13 活性の動向

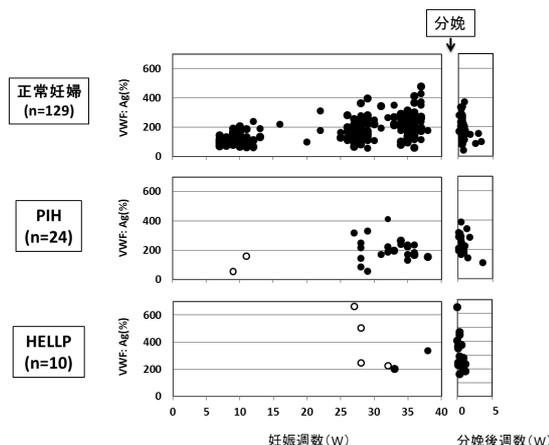
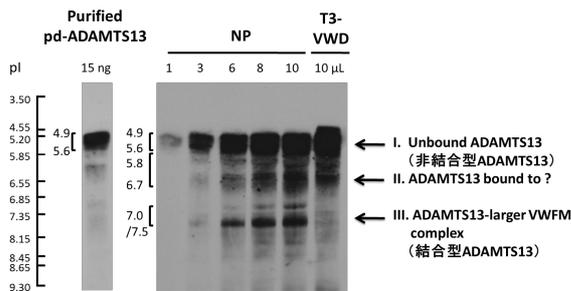


図 2: 正常妊婦および PIH, HELLP 症候群における VWF 抗原量の動向

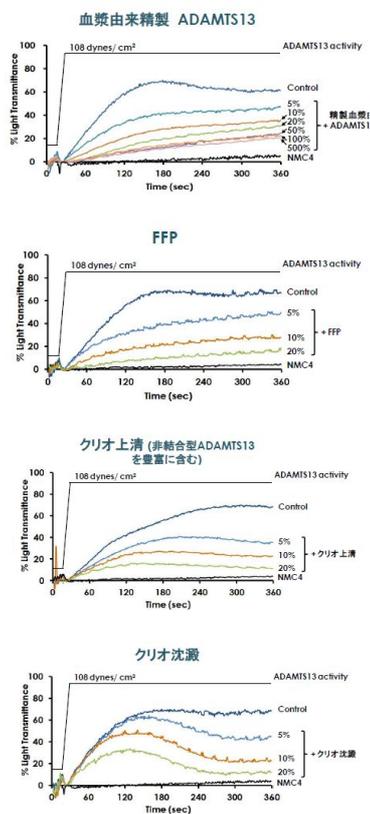
一方、ADAMTS13 の IEF 解析について、申請者は以前、ADAMTS13 は IEF により主に 3 つの異なる電荷をもつ部位 (バンド : pI 4.9-5.6、バンド : pI 5.8-6.7、バンド : pI 7.0-7.5) に分離され、バンド は VWF 非

結合型の、バンドはVWF結合型のADAMTS13であることを確認している(図3)。また非結合型ADAMTS13は高ずり応力惹起凝集を初期より阻害するが、結合型ADAMTS13は凝集を後期に阻害するという知見も得ている(Hori et al, 2013)(図4)。



Hori et al. Transfusion 2013

図3: IEFによる血漿中のADAMTS13解析  
T3-VWD: von Willebrand病タイプ3患者の血漿

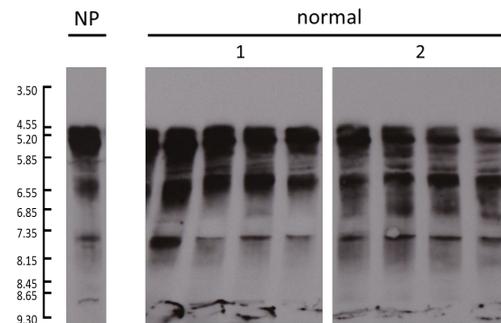


Hori et al. Transfusion 2013

図4: 各種ADAMTS13製剤の高ずり応力惹起血小板凝集の抑制効果  
VWF非結合型ADAMTS13を豊富に含むクリオ上清は、高ずり応力惹起凝集を初期より阻害する。

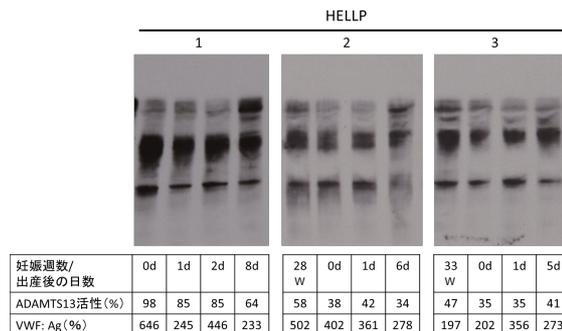
妊婦検体の IEF 解析では、正常妊婦では妊

娠週数の経過に伴い、非結合型ADAMTS13の緩やかな減少を認めた(図5)。さらにHELLP症候群では、「非結合型ADAMTS13」の著明な欠損と「結合型ADAMTS13」の増加を認め、これは病態の回復とともに徐々に正常化した(図6)。これより、HELLP症候群では血小板凝集における早期凝集の阻害が减弱している可能性が示唆された。またPIHにおいても一部の重症症例で軽度の“非結合型ADAMTS13”の欠損を認めた。



妊娠週数/ 出産後の日数	12 W	28 W	36 W	3d	12 W	28 W	36 W	4d
ADAMTS13活性(%)	118	81	61	72	73	49	44	46
VWF: Ag (%)	108	149	227	238	241	262	230	244

図5: 正常妊婦におけるADAMTS13のIEF解析の結果



妊娠週数/ 出産後の日数	0d	1d	2d	8d	28 W	0d	1d	6d	33 W	0d	1d	5d
ADAMTS13活性(%)	98	85	85	64	58	38	42	34	47	35	35	41
VWF: Ag (%)	646	245	446	233	502	402	361	278	197	202	356	273

図6: HELLP症候群におけるADAMTS13のIEF解析の結果

#### 4) E-NTPDase 解析

E-NTPDaseに対する11種類のmAbの作成に成功した。ウェスタンブロットによる解析では、図7に示すように10種の抗体がE-NTPDaseに対して反応し、その反応性は大きく3種類に分けられた(E-NTPDaseをシングルバンドで検出。E-NTPDaseとその分解物と考えられる低分子を検出。E-NTPDase以外に高分子領域と低分子領域に複数のバンドを検出。)。なお、ウェスタンブロットで反応を示さなかった1種類の抗体(T26)については、ドットブロット法ではE-NTPDaseと反応することを確認した。

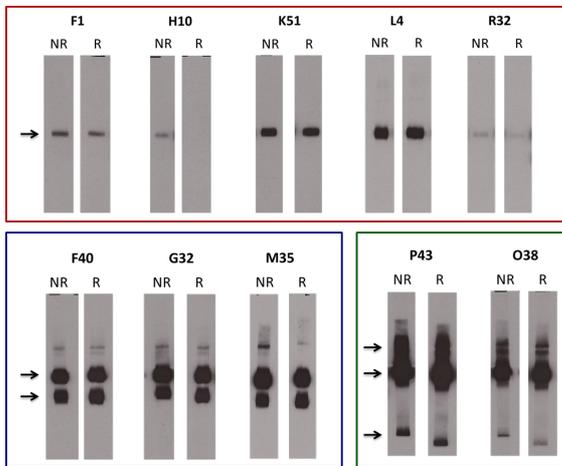


図7: E-NTPDase に対する 10 種 mAb のウェスタンブロット法による解析

各々の mAb が E-NTPDase 活性に与える影響を解析したところ、興味深いことに mAb-T26 に E-NTPDase 活性を助長するような働きが認められた。

正常妊婦ならびに HELLP 症例における E-NTPDase 活性や抗原測定には、以前に申請者らが作成した MK33 を用いて実施したが、本手法では血漿中に存在する微量な E-NTPDase 活性を同定することが困難であり、正常妊婦ならびに HELLP 症例の間で有意な差を見出すことができなかった。よって、今後はフローサイトメトリー等を用いた同酵素の測定系を検討する必要があると考えた。

また、asialo-VWF に対するモノクローナル抗体の作成については、数種の mAb を得ることに作成したが、asialo-VWF のみを特異的に認識する抗体の同定には至っていないため、今後の検討課題であると考えます。

従来、妊娠期における VWF や ADAMTS13 の動態解析は、その抗原量や活性測定が中心であり、HELLP 症候群のような妊娠期 TMA 病態発症との有意な関連性は見いだされていなかった。本研究は ADAMTS13 解析に「IEF」という申請者独自の手法を用いたことで、HELLP 症候群における ADAMTS13 の血小板凝集阻害機能の低下を示唆した初の報告である。今後はこの非結合型 ADAMTS13 の欠損が同酵素の活性にもたらす影響や病態の発症と、どのように関連するかをより詳細に調べることで、妊娠関連 TMA の病態解析について更なる展開が期待出来るものと考えている。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 36 件)

(欧文: 査読あり)

1. Isonishi A, Bennett CL, Plaimauer B, Scheiflinger F, Matsumoto M, Fujimura Y. Poor-responder to plasma exchange

therapy in acquired TTP is associated with ADAMTS13 inhibitor boosting: Visualization of an ADAMTS13-inhibitor complex, and its proteolytic clearance from plasma. *Transfusion* (in press) 2015

2. Kato S, Tanaka M, Isonishi A, Matsumoto M, Samori T, Fujimura Y. A rapid, fully automatic and highly sensitive ADAMTS13 gold particle immunoassay using a routine biochemistry analyser. *Brit J Haematol* (in press) 2015  
doi: 10.1111/bjh.13425.

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. *Transfus Med Hemother*. 42, pp.59-63, 2015  
doi: 10.1159/000370225.

4. 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, pp.887, 2014  
doi: 10.1111/jog.12220.

5. Miyata T, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y. ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japanese subjects. *Hämostaseologie*. 33, pp.131-137, 2013

6. Hori Y, Hayakawa M, Isonishi A, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y. ADAMTS13 unbound to larger von Willebrand factor multimers in cryosupernatant: Implications for selection of plasma preparations for TTP treatment. *Transfusion*. 53, pp.3192-3202.  
doi: 10.1111/trf.12182.

7. Tanaka H, Tenkumo C, Mori N, Kokame K, Fujimura Y, Hata T. Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*. 40, pp.247-249, 2013

「他、29 件」

(和文: 査読なし)

8. 藤村吉博, 石西綾美. TTP の病態. *日本腎臓学会誌*. 56, pp. 1043-1051, 2014
9. 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, pp.93-104, 2014
10. 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病. 臨床血液. 53, pp.185-195, 2012
  11. 藤村吉博, 八木秀男, 石西綾美, 山口直子, 早川正樹, 松本雅則, 佐道俊幸. 血栓性微小血管障害症(TMA)と妊娠 - その診断と治療 -. 日本産婦人科・新生児血液学雑誌. 20, pp.83-92, 2011
  12. 石西綾美, 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病と妊娠-その診断と治療. 産婦人科治療. 103, pp.319-324, 2011
- 「他 9 件」

〔学会発表〕(計 67 件)  
(国際学会：招待講演)

1. Fujimura Y. Registry of congenital thrombotic microangiopathy in Japan. The 3rd ASEAN Federation of Hematology Congress. Plenary lecture (Bangkok, Oct 23, 2014) Yoshi Y, 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)
- 「他、6 件」

(国際学会：査読あり)

2. Yoshii Y, Matsumoto M, Fujimura Y, et al. 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)
3. Yoshii Y, Matsumoto M, Fujimura Y, et al. A long-term phenotype analysis of 51 patients with Upshaw -Schulman Syndrome in Japan, with special references to pregnancy and renal failure that requires hemodialysis. The 55th Annual Meeting of American Society of Hematology( New Orleans/USA, 2013)
4. Successful management for pregnancy in 3 patients with Upshaw-Schulman syndrome. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis( Amsterdam/Netherland, 2013)
5. Fujimura Y, et al. CD39 in atherosclerotic lesion contributes to the vascular pleiotropic effects of stain. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Kyoto/Japan, 2011)
6. Isonishi A, Matsumoto M, Fujimura Y, et al. Isoelectric focusing analysis

with a large-pore agarose-acrylamide composite gel identified two forms of ADAMTS13, unbound and bound to von Willebrand factor, in plasma milieu. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Kyoto/Japan, 2011)

「他、20 件」

(国内学会：査読なし)

7. 藤村吉博. 周産期 TMA (血栓性血小板減少性紫斑病)の診断と治療. 平成 23 年度富山県産科婦人科学会 第 4 回例会特別講演 (富山, 2011)
8. 藤村吉博. 多彩な精神神経状態と血小板血栓による微小循環障害-インフルエンザと妊娠合併症についての知見-. 第 49 回日本小児神経学会近畿地方会 特別講演 (奈良, 2011)

「他、33 件」

〔図書〕(計 11 件)

1. Fujimura Y, Kokame K, Yagi H, Isonishi A, Matsumoto M, Miyata T. Chapter 5. Hereditary deficiency of ADAMTS13 activity - Upshaw-Schulman syndrome. ADAMTS13 book. 2015 (in press)

「他、10 件」

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)  
特になし  
取得状況 (計 0 件)  
特になし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤村 吉博 (FUJIMURA, Yoshihiro)  
奈良県立医科大学・輸血部・名誉教授  
研究者番号：80118033

(2)研究分担者

松本 雅則 (MATSUMOTO, Masanori)  
奈良県立医科大学・輸血部・教授  
研究者番号：60316081

佐道 俊幸 (SADO, Toshiyuki)  
奈良県立科大学・産婦人科・講師  
研究者番号：50275335

早川 正樹 (HAYAKAWA, Masaki)  
奈良県立医科大学・輸血部・医員  
研究者番号：30516729

(3)連携研究者

なし。