

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461456

研究課題名(和文)造血幹細胞移植後の致死性疾患である血栓性微小血管障害症の新規診断法と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel methods for diagnosis and management of thrombotic microangiopathy following stem cell transplantation

研究代表者

松本 雅則 (Matsumoto, Masanori)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60316081

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)：造血幹細胞移植(SCT)後の血栓性微小血管症(TMA)の予後を改善するため、von Willebrand 因子(VWF)とADAMTS13を中心に病態解析を行い、早期診断のマーカーを検討した。SCT-TMA症例は、ADAMTS13活性が10%未満に低下している頻度は少なく(4.5%)、0.5%まで著減している症例は認めなかった。血小板血栓形成能が最も強い超高分子量VWFマルチマーがTMA発症前に出現すること、TMA発症時には高分子量VWFが欠損していることなどが判明した。さらに、早期診断のための診断基準として、ハプログロビン、補正血小板増加数などを用いたpre-TMA診断基準を作成した。

研究成果の概要(英文)：For improving the prognosis of thrombotic microangiopathy following hematopoietic stem cell transplantation (SCT-TMA), we analyzed the pathophysiology focusing on von Willebrand factor (VWF) and its cleaving protease ADAMTS13. In the TMA registry in Japan, the incidence of decreased ADAMTS13 activity under 10% of normal control in patients with SCT-TMA (4/89, 4.5%) was low compared with those of acquired primary thrombotic thrombocytopenic purpura (347/420, 82.6%). There was no patient with ADAMTS13 activity under 0.5%. We found the appearance of unusually large VWF multimers, which are the most active form of VWF, just before development of SCT-TMA. Moreover, high molecular weight VWF multimers were lacked during the events of SCT-TMA. We proposed the novel diagnostic criteria for early diagnosis of SCT-TMA including serum haptoglobin, corrected count increment of platelet which can calculate using platelet counts before and after platelet transfusion.

研究分野：血液内科

キーワード：造血幹細胞移植 血栓性微小血管症

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植 (SCT) は急性白血病などの血液悪性疾患の治療法として定着しつつあるが、移植 1 年後の生存率は約 70% と安全な治療法とはいええない状況である。SCT の致命的な合併症として、移植変対宿主病 (GVHD) や、ウイルス、真菌などの感染症、血栓性微小血管症 (TMA) や肝中心静脈閉塞症 (SOS) など血栓症が知られている。この中で GVHD と感染症は、SCT の合併症として注目されており、予防や治療が可能となりつつある。一方、TMA や SOS はその診断自体が困難な上に、有効な治療法が存在しないことから、診断基準の作成や新たな治療法の開発が期待されている。

TMA とは、微小血管に血小板血栓が形成されることによって発症する血栓症で、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) が代表的疾患である。TTP の病因として von Willebrand 因子 (VWF) 切断酵素である ADAMTS13 活性著減が報告されており、後天性 TTP では同酵素に対する自己抗体 (インヒビター) が産生される。VWF は、血小板と血小板を結合させる分子糊であり、分子量が大きいほど活性が高く、血小板血栓を形成しやすいことが証明されている。主として血管内皮細胞から分泌されるが、分泌直後の超高分子量 VWF 重合体 (UL-VWFM) は ADAMTS13 によって切断されることでその分子量が制御されている。TTP 患者では、ADAMTS13 活性が著減するために、UL-VWFM が切断されずに血液中に残存し、高い粘り応力の発生する微小血管に血小板血栓が形成されることで発症する。

一方、SCT-TMA では、特発性後天性 TTP とは異なり、ADAMTS13 活性が著減しないことが報告されている。ADAMTS13 活性が著減しない症例の TMA の発症機序として、血管内皮細胞への障害や刺激により UL-VWFM の放出増加が想定されている。SCT-TMA の場合、移植前処置で使用する大量の抗がん剤や全身放射線照射に加えて、同種移植の際に用いられるサイクロスポリンや タクロリムスなどの免疫抑制剤によって、血管内皮細胞障害が引き起こされ、UL-VWFM が増加することが想定されている。また、SCT-TMA に合併することが多い GVHD やサイトメガロウイルス感染では種々のサイトカインが増加し、血管内皮細胞が刺激され UL-VWFM が放出される可能性も指摘されている。

2. 研究の目的

SCT-TMA は、従来の治療法では致死率が極めて高い予後不良な疾患である。本疾患の予後を改善するためには、新たな治療法の開発とともに、早期に診断して治療を開始するための指標が必要であると言われている。

我々は、同種 SCT 後の SOS 症例では、TTP ほどの著減ではない程度に ADAMTS13 活性が有意に低下していることを報告した。また、SCT 後の SOS が FFP の投与によって予防できることを多施設共同研究で明らかにした。SOS を発症した症例で VWF マルチマー解析を行ったところ、移植後早期に高分子量のマルチマーを欠損していることを明らかにした。一方、FFP を投与した群ではこのような欠損を認めないことより、FFP 投与によって補充された VWF と ADAMTS13 によって VWF の分子量を制御していることが予想された。さらに、SOS 研究に続いて実施した SCT-TMA 症例の解析では、SOS 症例と同様に移植早期に高分子量 VWF マルチマー欠損が認められる症例が複数認められ、その後 UL-VWFM が出現していた。

本研究では、SCT-TMA 症例において VWF マルチマー解析を中心とした VWF と ADAMTS13 の経時的解析を行い、早期に治療を開始するため迅速診断法や診断基準を作成することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 全国の医療機関から解析依頼を受けた TMA 症例の中から SCT-TMA 症例について、ADAMTS13、VWF について検査する。この解析は、ほとんどの症例で治療開始前 1 ポイントである。

2) 学内の症例について、経時的に ADAMTS13、VWF の解析を行う。特に VWF マルチマーを UL-VWFM を検出するに適した方法に改良して実施する。また、血小板輸血の効果を確認する補正血小板増加数 (CCI) を翌朝の血小板数から計算し、TMA / VOD の発症との関連を検討する。

3) 特異的な早期診断方法として、血管内皮細胞障害を反映すると考えられる血液中の血管内皮細胞測定 (CEC) のフローサイトメトリーを用いた測定方法を確立する。

4) 現在 SCT-TMA の診断基準として 2 つの代表的な方法が使用されている。2005 年に発表された北米の Blood and Marrow Transplant Clinical Trial Network (BMT-CTN) によるものと、2007 年に発表された European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) の International Working Group (IWG) によるものがある。これらには一長一短があり、新たに独自に早期診断基準を開発する。

4. 研究成果

1) 奈良医大輸血部では、1998 年から 2015 年 12 月までに全国の医療機関からの依頼により 1323 例の TMA 症例の ADAMTS13 活性測定を実施してきた。そのうち SCT-TMA 症例は 89 例存在であった。TMA 全体で ADAMTS13 活性が 10% 未満への低下症例は 582 例 (42.5%)

基礎疾患のない原発性 TTP420 例中 347 例 (82.6%) に対し、SCT-TMA ではわずか 4 例 (4.5%) であった。その内訳は、5-10% の症例は 3 例、5% 未満の症例は 1 例のみで、0.5% 未満の症例は認めなかった。以上のように SCT-TMA で ADAMTS13 が 10% 未満に低下する頻度は少なく、活性の低下度も高度ではないことが示された。

2) 学内症例の経時的な検体採取により、TMA/VOD を発症していない症例でも SCT 後患者の VWF マルチマーの推移を解析した。多くの症例で好中球生着前後に UL-VWFM が出現した。さらに、TMA/VOD 発症直前に UL-VWFM が出現し、発症時には逆に高分子量 VWF が欠損していることを確認した。また、UL-VWFM が出現している時期には CCI は著しく低下していた。このことから、UL-VWFM が出現している時期の血小板輸血は、血小板血栓の形成に利用される可能性が高いと考えられた。そのため、このような時期に血小板輸血を施行すると無効であるばかりか、血小板血栓の形成を促進し TMA/VOD の発症要因となる可能性が示唆された。

3) 血管内皮細胞障害時に CEC が増加することが報告されているが、少量の血液を用いてフローサイトメトリーで検出する方法を確立できれば、早期診断の指標となる可能性がある。既報の Kraan らの方法を基に CD45 と CD146 で CEC を効率的に検出できる方法を確立し、少数例で検討した。今後、TMA 発症例を含めて多数例で検討する。

4) SCT-TMA を診断するには、溶血所見、血小板減少、臓器障害の TMA の 3 徴候を有効に診断することが重要である。BMT-CTN と EBMT の診断基準を図に示した。BMT-TMA は、TMA の最も重要な所見である血小板減少が入っておらず特異度が低く、進行後に認められる臓器障害が入っているため早期診断には不向きであると思われる。一方、EBMT は破碎赤血球が 4% 超と進行した TMA しか診断できないと思われる。溶血の指標として、ハプログロビンが最も鋭敏であると考えられる。また、SCT 後には血小板数が減少しているため血小板減少の評価は困難な場合が多い。そのため、血小板輸血前後の血小板数を元に簡単に計算できる CCI を活用した。SCT-TMA や VOD 症例において、発症時は CCI が低く、発症前より徐々に CCI が低下する傾向を認めた。このような検討から、SCT-TMA を早期に診断する基準として pre-TMA を提唱した(図)。DIC をまず除外し、クームス試験陰性で、ハプログロビンが著減しており、血小板減少を評価した時点で、診断する。この pre-TMA の時点で、早期に治療介入を行うことで SCT-TMA の予後が改善するか今後検討していく予定である。

移植後TMAの診断基準

		BMT-CTN	IWG (EBMT)	Pre-TMA
溶血所見	破碎赤血球	1視野2個以上	4%超	
	LDH	上昇	急速、遅延性の上昇	
	クームス試験	陰性		陰性
	ハプログロビン		低下	著減
血小板減少	赤血球		Hbの低下、赤血球輸血の増加	
	血小板減少		新規で、遅延性または進行性	進行性
	CCI			低下
臓器障害	腎障害 神経障害	+		
凝固異常				なし

CCI: corrected count increment

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11件)

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** 53:3192-3201, 2013

松本雅則. 移植後 TMA の病態と治療. **臨床血液** 2013; 54:1958-1965.

Morioka M, Matsumoto M, Saito M, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y. The first bout of TTP triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nonparous female with Upshaw-Schulman syndrome. **Blood Transfusion** 12 suppl 1; s153-155, 2014

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.

松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病. **日本内科学会雑誌** 103: 1613-1621, 2014

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 and Hemotherapy** 42;59-63, 2015

Isonishi A, Bennett CL, Plaimauer B, Scheifflinger 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** ;55: 2321-2330, 2015
Kato S, Tanaka M, Isonishi A, Matsumoto M, Samori T, Fujimura Y. A rapid, fully automated and highly sensitive ADAMTS13 gold particle immunoassay using a routine biochemistry analyser. **Br J Haematol** ;171, 655-658, 2015
Nishigori N, Matsumoto M, Koyama F, Hayakawa M, Hatakeyama K, Ko S, Fujimura Y, Nakajima Y. von Willebrand Factor-Rich Platelet Thrombi in the Liver Cause Sinusoidal Obstruction Syndrome following Oxaliplatin-Based Chemotherapy. **PLoS One**;10:e0143136. doi:10.1371/journal.pone.0143136. 2015.
松本雅則. TMAの診断と治療. **臨床血液** ; 56 : 232-239, 2015
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**. In press

[学会発表](計5件)

早川正樹、松本雅則、藤村吉博. 造血幹細胞移植後 TMA/VOD における UL-VWF の解析. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会. 山形, 2013. 6.1.
松本雅則. 移植後 TMA の病態と治療. 第 75 回日本血液学会学術集会(教育講演). 札幌, 2013.10.11,
Hayakawa M, Matsumoto M, Yoshii Y, Yagi H, Kimura H, Fujimura Y. HSCT-associated hepatic VOD is initiated with preceding appearance of unusually large von Willebrand factor multimers in patient plasmas. The 55th Annual Meeting of American Society of Hematology. New Orleans (USA), 2013.12.9
早川正樹、藤村吉博、松本雅則. 「von Willebrand 因子による造血幹細胞移植後 TMA/VOD の病態解析」第 37 回日本造血細胞移植学会総会、神戸、2015.3.6.

松本雅則 教育講演 「TMA の診断と治療」第 77 回日本血液学会学術集会、金沢、2015.10.16.

[図書](計2件)

Fujimura Y, Kokame K, Yagi H, Isonishi A, Matsumoto M, Miyata T. Hereditary Deficiency of ADAMTS13 Activity: Upshaw-Schulman Syndrome. **ADAMTS13 Biology and Disease** (George M. Rodgers), Springer Switzerland, 2015,73-90
松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病. 今日の診断指針 (金澤一郎、永井良三) 医学書院, 東京, 2015, 1164-1165

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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