

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：34606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10127

研究課題名(和文) 後天性凝固異常症における凝固抑制機序の解明と新規治療法の創出

研究課題名(英文) Produce of novel regimens that clarify coagulation inhibitory mechanisms for acquired coagulation disorders

研究代表者

松本 智子 (Matsumoto, Tomoko)

天理医療大学・医療学部・助教

研究者番号：80642678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：凝固線溶波形解析の確立は、凝固異常症の診断のみならず、線溶異常症のタイプ別早期発見が可能と考えられる。また、トランサミンの効果判定が可能であり、今まで分からなかった投薬効果のモニタリングが実現可能になった。さらに、出血あるいは血栓傾向の症状を反映する評価方法として有用と考える。今後APTTに変わるスクリーニング検査としての汎用性の向上を期待できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

凝固異常症を診断できる臨床検査はマーカーの上昇として確立されているが、全凝固線溶機能評価ができ、かつ一般的な検査室で使用できる方法は少ない。我々のテーマは、従来の検査を分かりやすく、汎用性が高い方法で確立した。500秒で測定できると、今後、一般的な測定法として広まっていくと確認している。この方法の確立は凝固異常症の早期発見が可能になり、凝固異常症の早期発見や治療のモニタリングに有用であると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established an assay for assessing clot formation and fibrinolysis simultaneously using clot waveform analysis by the trigger of a mixture of aPTT reagent and an optimized concentration of tissue-type plasminogen activator (0.63 µg/ml) to examine the temporal reactions in a short monitoring time (<500 sec). We concluded that the clot-fibrinolysis waveform analysis technique could sensitively monitor both sides of fibrin clot formation and fibrinolysis, and could provide an easy-to-use assay to help clarify the underlying pathogenesis of bleeding disorders in routine clinical practice.

研究分野：血栓止血領域

キーワード：凝固波形解析 凝固異常症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

後天性凝固異常症(ACD)は特定の凝固因子に対する抑制物質(インヒビター)が出現し、その結果特定の凝固因子活性が著しく低下し、従来は正常な凝固機能を有する患者に突然、重篤な出血あるいは血栓をきたす疾患である。ACDで抗リン脂質抗体は血栓傾向を呈することが多いが、小児では出血症状をきたす場合がある。AHAは膠原病や悪性腫瘍などの基礎疾患を有する場合が約50%、基礎疾患はなく突然発症する場合が50%と難治性の出血性疾患である。AHAは自己抗体が原因であるため、先天性血友病Aインヒビターと治療法は異なる。近年、AHAは認知度を上げ、症例報告は増えつつもまだ一部しか凝固因子抑制メカニズムは解析できていない。また、治療が遅れると生命の危機を招く恐れがあり適切な治療法の確立は急務である。今回、AHAなどの凝固因子インヒビターの抑制メカニズムをさらに解明し、出血あるいは血栓の症状を早期に把握し、迅速で適切な新規治療法の開発にむけてさらに革新的な治療応用を目指す

2. 研究の目的

後天性凝固異常症(ACD)は特定の凝固因子に対する抑制物質(インヒビター)によって突然発症し、出血から血栓性疾患まで臨床症状は多様性を示す。原因は自己抗体のイムノグロブリン(IgG)であることが多い。数年来、第VIII因子(FVIII)に対し抗体を生じる後天性血友病A(AHA)の病態解明について研究するもまだ一部しか解明できていない。AHAの完治を目標とし、我々はAHAにおいてFVIII抑制メカニズムの解明と発症機序についてさらに明らかにする。FVIII変異体を用いた新規治療法の開発を目指す。AHAは近年報告数が増加するが適切な治療の普及は達成されていない。出血に伴う止血治療は高額な製剤の使用が必須であるのが現状である。AHAを発症した患者の治療中のQOL向上と完治を目指した基礎研究を目的とする。

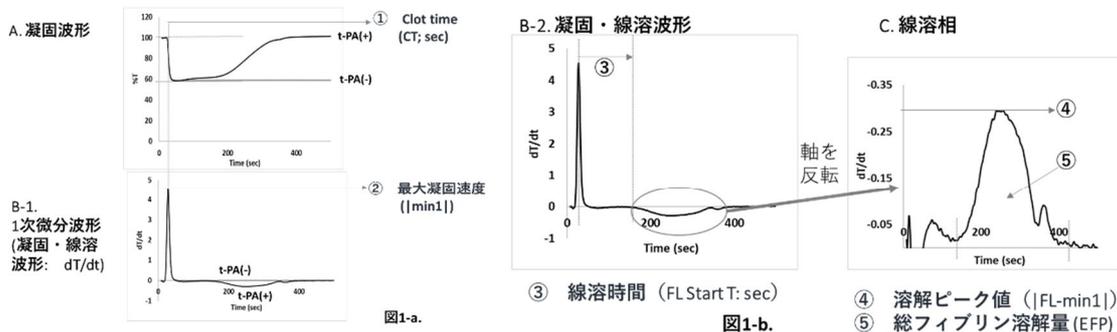
3. 研究の方法

後天性凝固異常症(ACD)の血漿を用いて、凝固および線溶機能評価を実施することで、止血や抗体抑制治療効果に有用なモニタリング法を確立する。重篤な出血あるいは無症状の臨床症状を反映した測定系について検討して評価する。一方、後天性血友病A(AHA)の第VIII因子(FVIII)インヒビター抑制メカニズムの解析を実施し、病態の詳細な解明による適切な治療を目指す。新規治療法の開発のためにインヒビター認識部位の詳細な同定によって認識部位をもたないFVIII変異体を作成する。FVIII変異体の有効性や効果を十分に発揮できる時期について凝固機能の評価し、インヒビターの発症メカニズムおよび抗体産生動態を明らかにする。抑制機序の解明や発症メカニズムを明らかにすることで、AHAの完治を目指す。

一般的に凝固や線溶を評価する臨床検査はTATやFDPやPICのマーカー検査の数値の上昇によって出血あるいは血栓傾向について判断されている。さらに線溶機能抑制や線溶因子の低下については外注検査等で検査依頼をされるため、迅速に判断することは難しかった。そこで、特に凝固線溶機能の評価ができる方法の確立を目指す。

4. 研究成果

凝固のみならず、線溶能と両方の機能評価が可能な測定方法について報告した。凝固・線溶波形解析(Clots-Fibrinolysis Waveform Analysis: CFWA)は、従来のCWAのAPTT試薬を改変することで評価できる(Nogami K. et al. 2019)。血漿サンプル・APTT試薬添加加温後、CaCl₂添加時に一定濃度の組織プラスミノゲンアクチベータ(t-PA)を加えると、500秒以内に凝固波形からフィブリン溶解反応の完了までを評価できる。APTTによるCWAと同様の波形解析の結果を得た後、正常血漿で約100秒後にフィブリンクロットが溶解し、透過光量が低下した凝固波形が元へ戻る(図1-a)。もちろん、凝固波形解析によるCT、|min1|など各種凝固パラメータの評価は可能である。さらに本波形を解析することで、凝固相のみならず、フィブリン溶解相をみることで、線溶機能を反映すると考えられる(図1-a)。1次微分波形を反転し、凝固時間より線溶開始までの時間を線溶開始時間(FLT)、そのフィブリン溶解のピーク値を最大線溶ピーク値(|FL-min1|)、総反応量(EFP)などのパラメータを用いることで定量的に評価できる(図1-b)。



今まで線溶因子低下症例は、スクリーニング検査で判断することは容易でなく、各線溶因子を測定することで評価できた。ユーグロブリン溶解時間は線溶評価に有用だが時間がかかる。CFWA を用いて、2 アンチプラスミン (2-AP) 欠乏血漿では、|FL-min1| が正常に比し高値を示し、プラスミノゲンアクチベーターI (PAI-I) 欠乏血漿では |FL-min1| は正常と差がないが EFP が増大する。以上の結果から両者の鑑別が可能だった (図 2)。本結果より、CFWA を用いることで線溶因子の異常について、検査室で早期診断に有用であると考えられる。

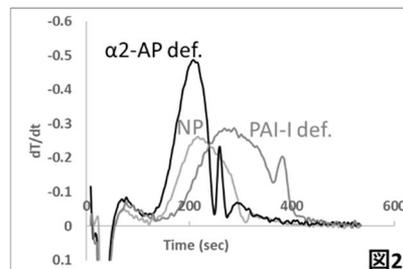


図2.

CFWA は血友病などの先天性出血性疾患のみならず、後天的な凝固異常症にも活用できると期待できる。例えばループスアンチコアグラント陽性例では FLT が正常より延長を認める場合があり、出血のリスクは低いと考えられ今後、解析を進める。また、DIC の診断時では、線溶亢進タイプと抑制タイプについて鑑別が期待できる。今後、DIC の早期診断に有用性が高いと期待できる。今後、DOACS やヘパリンなど抗凝固療法中のモニタリングとしても期待でき、我々も現在検討をすすめている。また、今までトラネキサム酸 (TXA) の効果の有無について判断できる方法はなかった。我々は、TXA が濃度依存性に線溶相を抑制する効果を確認した (図 3)。また第 VIII 因子欠乏血漿における TXA 添加の結果より、血友病 A では、凝固機能が障害されるが、脆弱なフィブリンクロットが TXA によって溶解しにくい状態を呈することを反映できると考えられる (図 3)。この方法は簡便に TXA をモニタリングできることを明らかにした。今まで TXA の治療効果を判断できるモニタリング法はなかったが、本評価方法は有用であることを明らかにした。

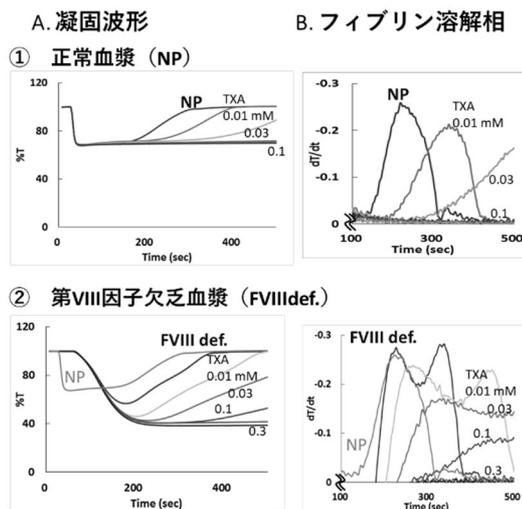


図3.

CFWA は in vitro で t-PA を添加し、フィブリン溶解反応を観察することで、線溶能を間接的に評価している。本来の線溶反応は患者血漿あるいは血管内皮より発現する t-PA によって引き起こされ、Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) や PAI-I を考慮する必要がある。今後、それらの関わりについて検討する必要がある。一方で、自動凝固分析装置を用いて汎用性の高い凝固・線溶機能評価が実施できれば、様々な異常症の早期発見や診断に検査室が今まで以上に貢献できると考える。抗凝固療法の DOACS が線溶活性化に寄与すると報告された。これからは、診断のみならず、止血治療や抗凝固療法中における出血の早期発見にも CFWA は有用だと期待している。今後、CFWA が示す波形に関する凝固および線溶に関与する反応について詳細な解析は重要と考え、現在検討中である。これらの反応曲線の反応途中をセリンプロテアーゼブロックする試薬で凝固・線溶反応を停止させ、各ストップしたポイントでの FDP, D ダイマー、PIC 等を測定することで、各凝固異常症や治療効果判定について、反応曲線の意義を検討する。この検討により、その曲線ポイントの意義を解明すると、各種凝固異常症の病態解明に貢献できると考えられる。さらに、CWA や CFWA について、実用性の高いアッセイとして確立していくためには、使用する試薬や有用性の高いパラメータの標準化についても検討すべき課題である。さらに CWA や CFWA が発展していきけることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Suzuki Y, Kakisaka K, Matsumoto T, Nogami K, Katagiri H, Takahara T, Takikawa Y	4. 巻 24(6)
2. 論文標題 Orthotopic liver transplantation for haemophilia A may not always lead to a phenotypic cure of haemophilia A: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haemophilia	6. 最初と最後の頁 e420-e422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nogami K, Matsumoto T, Yada K, Ogiwara K, Furukawa S, Shida Y, Takeyama M, Shima M.	4. 巻 181(4)
2. 論文標題 Factor (F)VIII/VIIIa enhances global haemostatic function in the co-presence of bypassing agents and FVIII among patients with haemophilia A with inhibitor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Haematol	6. 最初と最後の頁 528-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.15209.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Narazaki T, Haji S, Nakashima Y, Tsukamoto Y, Tsuda M, Takamatsu A, Ohno H, Matsushima T, Matsumoto T, Nogami K, Shima M, Shiratsuchi M, Ogawa Y	4. 巻 108(3)
2. 論文標題 Acquired hemophilia A associated with autoimmune pancreatitis with serum IgG4 elevation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 335-338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-018-2441-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeyama M, Nogami K, Kajimoto T, Ogiwara K, Matsumoto T, Shima M	4. 巻 107(1)
2. 論文標題 First report of real-time monitoring of coagulation function potential and IgG subtype of anti-FVIII autoantibodies in a child with acquired hemophilia A associated with streptococcal infection and amoxicillin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 112-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-017-2273-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nogami K, Soeda T, Matsumoto T, Kawabe Y, Kitazawa T, Shima M	4. 巻 16(7)
2. 論文標題 Routine measurements of factor VIII activity and inhibitor titer in the presence of emicizumab utilizing anti-idiotypic monoclonal antibodies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 1383-1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14135.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nogami K, Matsumoto T, Tabuchi Y, Soeda T, Arai N, Kitazawa T, Shima M	4. 巻 16(6)
2. 論文標題 Modified clot waveform analysis to measure plasma coagulation potential in the presence of the anti-factor IXa/factor X bispecific antibody emicizumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 1078-1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara T, Nogami K, Matsumoto T, Nomura A, Takeshita Y, Ochi S, Shima M	4. 巻 106(1)
2. 論文標題 Potentially life-threatening coagulopathy associated with simultaneous reduction in coagulation and fibrinolytic function in pediatric acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 126-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2213-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoko Matsumoto, Keiji Nogami, Yuka Tabuchi, Koji Yada, Kenichi Ogiwara, Hiroshi Kurono, Nobuo Arai, Midori Shima	4. 巻 23(5)
2. 論文標題 Clot waveform analysis using CS-2000i distinguishes between very low and absent levels of factor VIII activity in patients with severe hemophilia A	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Haemophilia	6. 最初と最後の頁 e427-e435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hae.13266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoko Matsumoto, Keiji Nogami, Midori Shima	4. 巻 105(2)
2. 論文標題 A combined approach using global coagulation assays quickly differentiates coagulation disorders with prolonged aPTT and low levels of FVIII activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 174-183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-016-2108-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本 智子、野上 恵嗣、嶋 緑倫
2. 発表標題 Lupus anticoagulant hypoprothrombinemia syndrome (LAHPS)のフィブリン形成能低下とその脆弱性
3. 学会等名 第40回 日本血栓止血学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 智子、野上 恵嗣、辻本 藍子、笹井 香那、荻原 建一、竹中 亜利沙、新井 信夫、篠原 翔、田淵 有香、嶋 緑倫
2. 発表標題 各種APTT試薬を用いた凝固線溶動態評価による新規凝固因子欠乏血漿の分類
3. 学会等名 第19回 日本検査血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 智子、野上 恵嗣、嶋 緑倫
2. 発表標題 包括的ダイナミック解析による先天性血友病A患者の凝固線溶動態の特性
3. 学会等名 第61回 日本臨床検査医学会近畿支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本 夏菜、下村 大樹、松本 智子、嶋田 昌司、松尾 収二
2. 発表標題 新規APTT凝固波形パラメータによるAPTT延長検体判別の有用性
3. 学会等名 第58回 日臨技近畿支部医学検査学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aiko Tsujimoto, Keiji Nogami, Tomoko Matsumoto, Kenichi Ogiwara, Takehisa Kitazawa, Midori Shima
2. 発表標題 A novel hemostatic monitoring with simultaneous clot-fibrinolysis waveform analysis for hemophilia A
3. 学会等名 第80回 日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Onishi, Keiji Nogami, Tomoko Matsumoto, Takashi Ishihara, Midori Shima
2. 発表標題 A new classification of DIC based on the coagulation/fibrinolysis dynamics
3. 学会等名 第80回 日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 智子、野上 恵嗣、笹井 香那、荻原 建一、竹中亜利沙、嶋 緑倫
2. 発表標題 包括的ダイナミック解析による血友病の凝固線溶動態の特性
3. 学会等名 第39回 日本血栓止血学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本 智子, 野上 恵嗣, 田淵 有香, 添田 哲弘, 新井 信夫, 北沢 剛久, 高岡 秀成, 服部 有宏, 嶋 緑倫
2. 発表標題 凝固波形解析によるFVIII補因子機能代替抗体emicizumabの包括的凝固機能モニタリング法の確立
3. 学会等名 第39回 日本血栓止血学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本 智子, , 野上 恵嗣, 笹井 香那, 荻原 建一, 矢田 弘史, 竹中亜利沙, 嶋 緑倫
2. 発表標題 リン脂質抗体陽性例の凝固波形解析を用いたフィブリン溶解反応における凝固線溶動態の特性
3. 学会等名 第18回 日本検査血液学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉本知史, 松本智子, 野上恵嗣, 嶋緑倫
2. 発表標題 PT・aPTT混合試薬による凝固波形解析を用いた新たな凝固機能評価法の有用性
3. 学会等名 第60回 日本臨床検査医学会近畿支部総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野上 恵嗣, 松本 智子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 686
3. 書名 臨床に直結する血栓止血学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	野上 恵嗣 (Nogami Keiji) (50326328)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	