

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15684

研究課題名(和文)川崎病の病態・合併症におけるVWF-ADAMTS13軸の解明及び新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Pathological elucidation of VWF-ADAMTS13 and cultivation of novel therapy in Kawasaki disease.

研究代表者

辻井 信之(TSUJII, NOBUYUKI)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：00571001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病急性期においてADAMTS13の相対的な低下は血管炎・冠動脈病変の病勢に影響している可能性があることが示された。

また、川崎病急性期治療ガイドラインでの抗血小板薬使用で概ね血小板の活性化は抑制されていたが、血栓強度は強くないが、血栓初期形成能が特に高いことが示唆された。「血栓形成開始が早まること」として表れ、「血栓強度が強くなること」としては表れない可能性があり、血栓初期形成能を抑える薬の方がより望ましい可能性が示唆された。アスピリンは血栓の強度および安定性を主として抑制することを踏まえて、抗血小板薬の有効性、適切な投与量を検討していく必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だに原因は特定されていない川崎病におけるADAMTS13の動態や病勢への影響についての初めての報告であり、川崎病及びその合併症の原因に迫る一助となる研究成果が得られた。

また、血流下の血小板血栓形成を評価することで、現治療ガイドライン下でのアスピリンの有効性を示したことは一つの成果であり、またより理想的な抗血小板薬の性質を解明したことで、新たな抗血小板薬の選択への一助となることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A high VWF:Ag/ADAMTS13:AC ratio in acute-Kawasaki disease (KD) persisted after primary treatment in non-responders, and unbalanced substrate-to-enzyme ratio appeared to associate with vascular endothelial damage. Analysis of existing mode of ADAMTS13 may help to clarify pathogenesis of IVIG resistance in acute-KD.

Acute KD in children was characterized by PTF (platelet thrombus formation under flow conditions)'s early onset and weak stability. Though the current antiplatelet therapy of acute KD in 1week and 1month by aspirin or flurbiprofen effectively suppresses platelet activation, antiplatelet drugs, such as platelet GP IIb/IIIa receptor inhibitor, might be more reasonable for acute KD due to inhibiting the PTF onset.

研究分野：医学

キーワード：川崎病 ADAMTS13 T-TAS

1. 研究開始当初の背景

川崎病の原因は国内外から多くの報告があがるが、未だに原因は特定されておらず、川崎病における ADAMTS13 の動態や病勢への影響についての報告はまだない。また、川崎病急性期の血小板活性化は昔から知られており、アスピリンによる血小板凝集抑制は、長年施行され、急性期治療ガイドラインにも記載されているが、川崎病の血小板血栓の性質・抗血小板薬による凝集抑制効果の有効性に関して十分なエビデンスはない。近年、血流下における血栓形成過程を *in vitro* において解析する簡易な流血下血栓可視装置 (Total Thrombus-formation Analysis System: T-TAS[®]) が開発され³⁾、より生体内に近い反応を解析することが可能であり、臨床の場で利用されつつある^{4,5)}。

2. 研究の目的

(1) 川崎病急性期における ADAMTS13 の動態

川崎病急性期の患者検体を用いて、ADAMTS13 といった未報告の因子の動態を解析することで、川崎病における病勢、合併症に関与するかどうかを統計学的に解明することが一つの目的である。

(2) 川崎病急性期における流血下血小板血栓形成

T-TAS[®]を用い、川崎病急性期における流血下血小板血栓形成を評価し、血小板活性化の性質、抗血小板薬の血小板凝集抑制効果を明らかにすること。その結果、有効で安全な薬物療法の確立と治療の均てん化に寄与することで、川崎病急性期治療の新抗血小板療法ガイドラインを確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 初回 グロブリン投与前、投与約 1 週間後、投与約 4 週間後に採血を行い ADAMTS13 活性 (ADAMTS13:Ac)、VWF 抗原量 (VWF:Ag)、VWF:Ag/ADAMTS13:Ac 比を測定し、各パラメータとの関連を検討した。また、VWF のマルチマー解析、ADAMTS13:Ag の IEF 解析を行い、グロブリン不応例における動態を解析した。

(2) 川崎病患者全血を使用し、流血下血小板血栓形成の評価、また、アスピリン等による治療前後の流血下血小板血栓形成の評価を行う。初回 グロブリン投与前、投与約 1 週間後、投与約 4 週間後に採血を行い、コラーゲンを精密コーティングしたチップ (PL チップ) を使用。ずり応力としては細動脈等の動脈を想定した $1000^{-1}/s$ (PL12)、狭窄等の病的血管を想定した $2000^{-1}/s$ (PL24) を採用した。基準圧 から 5kPa 上昇するまでの時間 T5+ を血栓の初期形成能、10 分までの AUC を血小板血栓強度の指標として使用した。また、各パラメータとの関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 治療前において、ADAMTS13:Ac は低下し、VWF:Ag の上昇とも相乗して、VWF:Ag/ADAMTS13:Ac 比は上昇していた。これらは治療経過とともに改善した (図 1)。ADAMTS13:Ac は治療 1 週間後において、タンパク、アルブミン、ナトリウムと相関、FDP、CRP と逆相関した。VWF:Ag/ADAMTS13:Ac 比は治療前・1 週間後とも白血球数と逆相関し、アルブミン、ナトリウムと相関した。ADAMTS13:Ac、VWF:Ag/ADAMTS13:Ac 比共にアルブミン、ナトリウムといった血管透過性亢進・血管内皮障害を示唆するパラメータと相関していた。

VWF マルチマー解析では グロブリン不応例に有意な特徴は認めなかったが、ADAMTS13:Ag の IEF 解析では反応例に比べて不応例はフリーの ADAMTS13 の減少、結合型の ADAMTS13 の

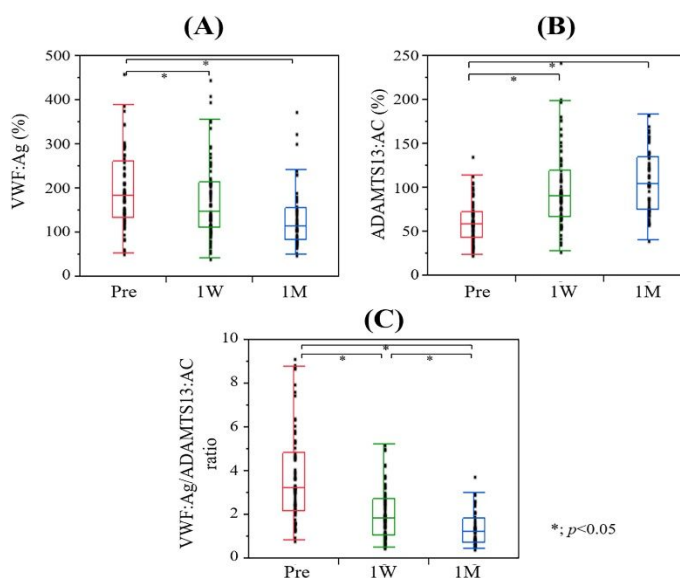


図 1 治療経過における ADAMTS13:Ac、VWF:Ag、VWF:Ag/ADAMTS13:Ac 比

上昇を認めた (図 2)。このことにより、ADAMTS13 の中でも binding したものと free のものを分

けて評価し、ADAMTS13 の形態が川崎病治療の反応性に関わっていることがわかった。

これらのことから ADAMTS13 の相対的な低下は川崎病血管炎・冠動脈病変の病勢に影響している可能性があることが示された。

(2)治療開始前、T5+ は PL12、24 でそれぞれ 3.3(1.8-6.3)分、1.3(0.7-4.9)分で、健常成人と比較し早かった。(p=0.036, p<0.001)。一方、AUC10 はそれぞれ 151.7(66.0-308.9)U、359.4(124.3-481.5)U で、健常成人と比較し PL12 で小さかった(p=0.002)。健常小児と比較すると、T5+ は PL24 で早く、AUC10 は PL12 において小さかった。炎症性疾患小児と比較すると差は認めなかった(図 3)。

川崎病患者の 1 週間後、1 か月後では概ね血小板凝集は抑制され、いずれのパラメータにおいても有意差をもって凝集抑制を認めた(図 4)。治療前のパラメータにおいて T5-、AUC10 に影響していたのは赤血球数と BNP のみで、血小板数含め多くのパラメータでは差がなかった。治療後のパラメータでは、ステロイド使用でわずかに差を認めたが、アスピリン容量やフルルビプロフェンの代替使用でも差は認めなかった。

これらより、ガイドラインでの抗血小板薬使用で概ね血小板の活性化は抑制されていたことがわかったが、川崎病急性期において、血栓強度は強くないが、血栓初期形成能が特に高いことが示唆された。川崎病急性期における血小板活性化は、「血栓形成開始が早まること」として表れ、「血栓強度が強くなること」としては表れない可能性があり、この傾向を考慮すると、GP IIb/3a 阻害薬の様な血栓初期形成能を抑える薬の方がより望ましい可能性が示唆された。コラーゲン上における血栓形成をより直接的に抑制する薬剤と異なり、アスピリンは血栓の強度および安定性を主として抑制することを踏まえて、抗血小板薬の有効性、適切な投与量を検討していく必要があると考えられた。

引用文献

- ① Yamada K et al. Acta Haematol Jpn. 1978; 41:791-802
- ② JCS Joint Working Group. Circ J. 2014, 78(10):2521-62

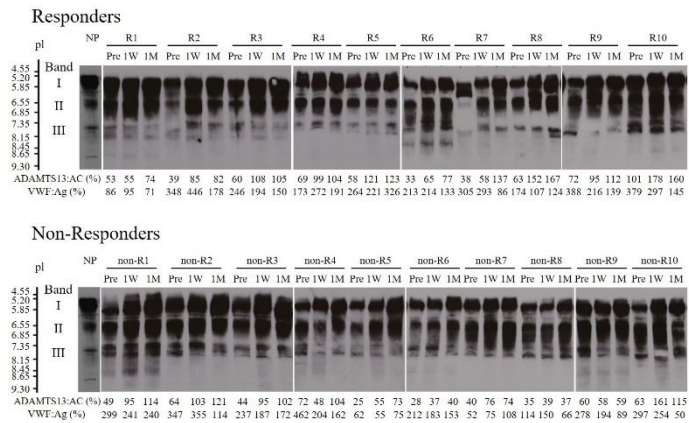


図 2 ADAMTS13:Ag の IEF 解析

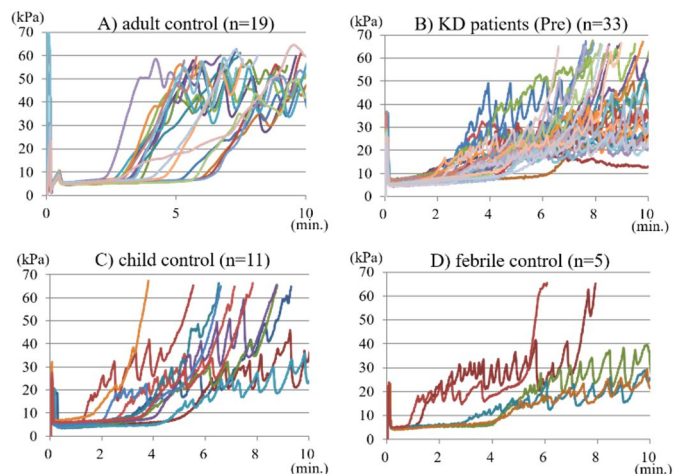


図 3 T-TAS における圧力波形(PL12)

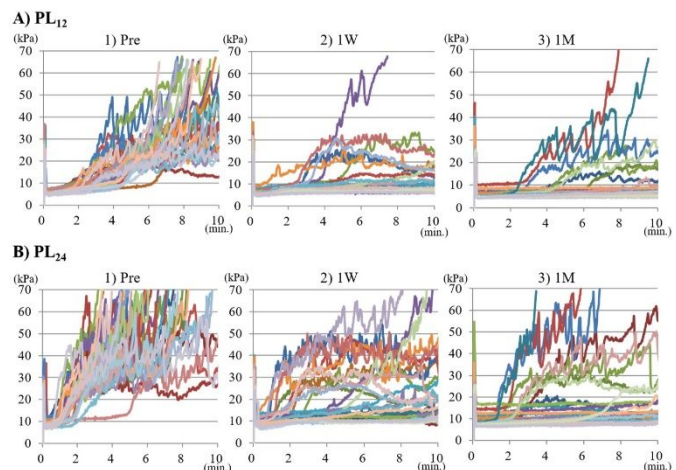


図 4 圧力波形での治療経過

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuji N, Nobuyuki, Nogami Keiji, Yoshizawa Hiroyuki, Sakai Toshiyuki, Fukuda Kazuyoshi, Ishiguro Akira, Shima Midori	4. 巻 226
2. 論文標題 Assessment of Platelet Thrombus Formation under Flow Conditions in Patients with Acute Kawasaki Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pediatrics	6. 最初と最後の頁 266-273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpeds.2020.06.025	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 Tsuji N, Nogami K, Matsumoto M, Yoshizawa H, Takase T, Tanaka I, Sakai T, Fukuda K, Hayakawa M, Sakai K, Isonishi A, Matsuura K, Fujimura Y, Shima M.	4. 巻 179
2. 論文標題 Involvement of the ADAMTS13-VWF axis in acute Kawasaki disease and effects of intravenous immunoglobulin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2019.04.026.	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 Yoshizawa H, Nogami K, Matsumoto T, Tsuji N, Sakai T, Takase T, Tanaka I, Shima M.	4. 巻 174
2. 論文標題 Dynamic evaluation of hemostasis in the acute phase of Kawasaki disease using comprehensive coagulation functional assays.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 76-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2018.12.016.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 辻井信之、野上恵嗣、吉澤弘行、阪井利幸、福田和由、石黒 精、嶋 緑倫
2. 発表標題 流血下血栓可視装置（T-TAS）を用いた 川崎病患者における血小板血栓形成の評価
3. 学会等名 第39回日本川崎病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻井信之、野上恵嗣、吉澤弘行、阪井利幸、 福田和由、石黒 精、嶋 緑倫
2. 発表標題 流血下血栓可視装置 (T-TAS) を用いた川崎病患者における血小板血栓形成の評価
3. 学会等名 第121回 日本小児科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻井信之、野上恵嗣、吉澤弘行、阪井利幸、 福田和由、石黒 精、嶋 緑倫
2. 発表標題 流血下血栓可視装置 (T-TAS) を用いた川崎病患者における血小板血栓形成の評価
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 Nobuyuki Tsujii, Keiji Nogami, Hiroyuki Yoshizawa, Toshiyuki Sakai, Kazuyoshi Fukuda, Akira Ishiguro, Midori Shima
2. 発表標題 Assessment of platelet thrombus formation under flow condition in patients with acute Kawasaki Disease
3. 学会等名 the XXVII Congress of the ISTH and 65th Annual SSC Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------