

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08304

研究課題名(和文)凝固線溶バランスを基盤とした小児がん血栓症に対する新規テーラーメイド治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of the novel tailored therapy for the thrombosis of pediatric cancer based on the balance between coagulation and fibrinolysis

研究代表者

石原 卓 (Takashi, Ishihara)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00533712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トロンピン・プラスミン生成試験、凝固線溶波形解析といった包括的凝固線溶能の新規解析手法を用いて、小児がんで遭遇する様々な凝固線溶障害の病態解明を行った。小児急性リンパ性白血病のL-アスパラギナーゼ(L-Asp)関連凝固障害症では、L-Aspにより線溶抑制が強い相対的な凝固優位状態になることを解明した。造血幹細胞移植後の肝類洞閉塞症候群においては、発症時に凝固・線溶能がともに低下し、症状の改善とともに凝固・線溶能も回復することを明らかにした。急性骨髄性白血病における線溶亢進型の播種性血管内凝固では、包括的凝固線溶バランスの観点から、線溶能が相対的に優位な亢進を示すことを初めて実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児がん診療における支持療法の中には、真の病態が解明されていないものもあり、あくまでも経験的なエビデンスに基づき構築されてきたものも多い。特に凝固線溶バランスの観点からアプローチした小児がん診療で遭遇する凝固障害に対する病態解明の研究はほとんど行われてきておらず、今回、包括的な凝固能と線溶能を同時に解析できる新規の測定技術を用いることで、様々な病態に応用できることが実証された。これらを応用することによって、今後、さらに症例数を蓄積し、また別の病態においてもエビデンス創出を重ねることにより、病態に応じた安全で費用対効果の高い至適な支持療法の確立につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of the various coagulation and fibrinolysis disorders encountered in pediatric oncology, we conducted research using novel methods for comprehensive analysis of coagulation and fibrinolysis potential, such as the thrombin-plasmin generation assay and clot-fibrinolysis waveform analysis. In L-asparaginase (L-Asp)-associated coagulopathy in pediatric acute lymphocytic leukemia, we elucidated that L-Asp causes a relative procoagulant state with hypofibrinolysis. In hepatic sinusoidal obstruction syndrome (SOS) after hematopoietic stem cell transplantation, we found that both coagulation and fibrinolysis potential were decreased at the onset of SOS, and coagulopathic abnormalities recovered as symptoms improved. In disseminated intravascular coagulation with enhanced fibrinolysis in acute myeloid leukemia, we assessed for the first time the predominant enhancement of relative fibrinolysis potential in terms of comprehensive coagulation-fibrinolysis balance.

研究分野：血液凝固学

キーワード：小児がん 血栓症 播種性血管内凝固 凝固 線溶 トロンピン・プラスミン生成試験 凝固線溶波形解析

## 1. 研究開始当初の背景

小児がんは支持療法の進歩もあり治癒を目指せる時代となったが、一方では適切な支持療法の確立が未解決な合併症もあり、致命的となる例や **QOL** が著しく低下する例もある。その一つが凝固障害症である。病態としては播種性血管内凝固 (**DIC**)、肝類洞閉塞症候群 (**SOS**)、血栓性微小血管障害症 (**TMA**) など多岐にわたり血栓症 **and/or** 出血症状を来し支持療法を誤れば致命的な転帰も取り得る。その他にも、急性リンパ性白血病 (**ALL**) の **key drug** である **L-アスパラギナーゼ (L-Asp)** も血栓症の原因に挙げられるが真の病態が解明されておらず、安全な寛解導入療法の遂行のための大きな課題であった。しかしながら、それまでは包括的な凝固能および線溶能を同時に定量的に解析し、そのバランスの評価を行うことが皆無であった。

## 2. 研究の目的

本研究では小児がんにおける包括的な凝固/線溶動態のバランスを新規のトロンビン・プラスミン生成試験 (**T/P-GA**) で定量的に評価し、**L-Asp** 関連凝固障害症、造血細胞移植 (**HSCT**) 関連凝固障害症 (**SOS** や **TMA**) および悪性腫瘍初発時に遭遇する **DIC** についてそれぞれの病態パターンを解明し、さらには、個々の病態に応じた新たなテーラーメイド治療を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

小児がん患者の血漿中の包括的な凝固/線溶動態について新規の **T/P-GA** を用いて解析し、各パラメータの対正常血漿との比をとり比較検討した。

**T/P-GA** の測定方法を以下に述べる (**Matsumoto T, et al. Thromb. Haemost. 2013**)。-80 で凍結保存していた血漿(試料)は測定直前に 37 で解凍し、患者血漿にヘパリナーゼ (**hepTEM® Lyo, Finggal link**) を 24:1 の割合で添加し試料中に含まれるヘパリンを中和した。トリガー試薬として組織因子 (**TF, 1pM**)、合成リン脂質 (4μM)、組織プラスミノゲンアクチベータ (**200ng/mL**) を血漿へ添加し、最終的に塩化カルシウムを添加させることで生成されるトロンビンとプラスミンから得られた **T/P-GA** 波形からは **Lag time (LT: 生成開始までの時間)**, **Peak height (Peak: 時間あたりの生成最大量)**, **Time to peak (ttPeak: Peak までの時間)**, **EP (総生成量: endogenous potential)** の各パラメータが得られた。

### (1) **L-Asp** 関連凝固障害症:

本研究開始時は、本邦の新規小児 **ALL** は国際的な標準治療である **BFM95** をベースとした日本小児がん研究グループ (**Japan Children's Cancer Group; JCCG**) 血液腫瘍分科会の臨床試験登録例が大多数であった。この寛解導入療法において、**T0;L-Asp** 治療相直前、**T1;L-Asp** 治療相中間、**T2;L-Asp** 治療相終了直後、**T3;寛解導入療法終了直後** で患者血漿を収集し、**T/P-GA** で **Thrombin-EP (T-EP)**、**Plasmin-Peak height (P-Peak)** の対正常血漿比をとり比較検討し、従来の凝固マーカーとの相関を検討した。

### (2) **HSCT** 関連凝固障害症:

血管内皮障害に由来する **SOS**、**TMA** はしばしば消費性凝固障害を来す **DIC** と病態がオーバーラップする。**JCCG** 内で「小児造血幹細胞移植における早期 **DIC** の実態についての観察研究/**DIC-SCT15**」が 2017 年 9 月から既に開始され、奈良県立医科大学小児科は凝固能関連の中央検査施設の役割を担っていたが、症例集積に難渋し 2019 年 8 月 31 日に登録中止に至った。そこで、奈良県立医科大学附属病院小児科での **SOS** 発症例の血漿を用いて包括的凝固/線溶動態を **T/P-GA** で解析し **T-EP**、**P-Peak** の対正常血漿比をとり比較検討した。

### (3) 悪性腫瘍初発時に遭遇する **DIC**:

本研究開始時にはすでに腫瘍に限らず様々な基礎疾患から生じた **DIC** において包括的な凝固/線溶バランスの評価を **T/P-GA** を用いて解明する観察研究を行っていた。その基盤を踏襲し、悪性腫瘍の初発時における **DIC** の血漿を **T/P-GA** で解析し、**T-EP**、**P-Peak**、**LT** の対正常血漿比をとり比較検討した。

## 4. 研究成果

包括的な凝固/線溶能を同時に測定できる新規の **T/P-GA** により、小児がん診療で遭遇する下記の凝固障害症に対して病態解析に有用であることが証明され、今後、より多様な病態への応用の可能性が初めて見出された。今回は個々の病態に応じた新たなテーラーメイド治療を確立するには至らなかったが、病態の理解が深まる様々な知見が得られた点では有意義であった。

### (1) **L-Asp** 関連凝固障害症 (**Ishihara T, et al. Pediatr Blood Cancer. 2020**):

初発時 1~15 歳の小児 **ALL** 患者 72 例 (全例で血栓素因なし、治療中の血栓症の発症もなし) について解析を行った。うち、**BFM95** ベースの治療を行った症例は 55 例であった。**T/P-GA** による **T-EP** 比 / **P-Peak** 比の中央値の推移は、**1.06 / 1.00 (T0)**、**1.04 / 0.64 (T1)**、**1.16 / 0.58 (T2)**、**1.16 / 0.85 (T3)** であり、特に **L-Asp** 治療相にあたる **T1** および **T2** において、**L-Asp** 治療相前の **T0** に比較し **P-Peak** 比が有意に低下した ( $p < 0.01$ )。さらに、**L-Asp** 治療に関連した血栓症のり

スクが高いとされている 10 歳以上の年長児 ALL の群 (Greiner J, et al. *Haematologica*. 2019, Grace RF, et al. *Br J Haematol*. 2011, Rank CU, et al. *Blood*. 2018) においては、今回の解析において 10 歳未満の若年の群よりも、T1 において有意に P-Peak 比が低値であった (T1 における P-Peak 比の中央値 [10.0 歳 / 1.0-9.9 歳]: 0.57 / 0.68 ( $p=0.02$ ))。すなわち、包括的な凝固線溶バランスを解析することによって、BFM95 ベースで治療を受ける 10 歳以上の年長児 ALL 患者においては、L-Asp 治療により著明な低線溶を来し、相対的凝固優位状態となり血栓傾向を惹起する可能性があり、支持療法を考慮する上で「年齢」による層別化の必要性が病因論の観点からも改めて示唆された。なお、BFM95 ではなく小児白血病研究会 (JACLS) ベースの寛解導入療法を行った残りの 17 例においても概ね同様の傾向を確認した (T-EP 比 / P-Peak 比の中央値の推移: 1.06 / 0.87 (T0)、1.04 / 0.71 (T1)、1.02 / 0.69 (T2)、1.20 / 0.92 (T3))。また、従来から新鮮凍結血漿 (FFP) の輸血やアンチトロンビン (AT) 製剤補充といった支持療法が行われてきたが、今回の検討では担当医の判断で支持療法を行っており一定の基準を設けた前方視的な検討ではないが、FFP 輸血あるいは AT 補充の有 / 無しで T/P-GA のパラメータに有意差はなかった。ただし、BFM95 ベースの少数例 (8 例) にダナパロイドナトリウム (Dana) が抗凝固療法として用いられ、T1 において Dana 投与例が有意に T-EP 比が低値であった (T1 における T-EP 比の中央値 [Dana 非投与例 / Dana 投与例]: 1.06 / 0.97 ( $p=0.048$ ))。一方で P-Peak 比には有意差はみられなかった。個々の病態に応じた新たなテーラーメイド治療を確立するためには、今後さらに多数例において、果たして Dana は抗凝固療法として安全で有益であるのか、FFP や AT などの投与の必要性および年齢との関連などにつき検討が必要である。

(2) HSCT 関連凝固障害症 (石原卓, 他: 第 41 回の本造血細胞移植学会学術集会, 2019 年): 研究開始時点ですでに我々は、急性白血病 6 例の HSCT での T/P-GA による解析で TMA1 例と SOS1 例では凝固 / 線溶能ともに低下し消費性凝固障害を来す DIC 類似の病態ではないかと指摘していた (Ishihara T; *Int J. Hematol*. 2017)。さらに、この研究期間中に奈良県立医科大学小児科において、モノソミー 7 を伴う骨髄異形成症候群の 4 歳男児の HSCT 関連 SOS 発症後の包括的な凝固 / 線溶能の経時的な推移について評価した。臍帯血移植後の再発例で、アザシチジン療法後に 2 回目の臍帯血移植を施行した。移植後 Day1 から黄疸 (T-Bil 15.4mg/dL)、有痛性肝腫大、腎機能悪化 (Cre 0.80mg/dL) と体重増加 (10.2kg 11.2kg) を認め SOS と診断し、旧厚生省 DIC 診断基準 6 点 (基礎疾患 1 点、臓器障害 1 点、FDP 181.3  $\mu$ g/mL で 3 点、PT-INR 1.38 で 1 点) で DIC も合併したため遺伝子組み換えトロンボモデュリン製剤を開始し、Day3 から尿量・黄疸が改善した。Day3, Day4, Day6, Day10 で血漿を採取し、T/P-GA で解析を行い、SOS が改善し始めた Day3 では T-EP 比、P-Peak 比ともに低値であったが、その後は両比とも回復したことを確認した (T-EP 比 / P-Peak 比, Day3; 0.38 / 0.23, Day4; 0.70 / 0.40, Day6; 0.92 / 0.65, Day10; 1.27 / 0.97)。また、いずれのポイントでも T-EP 比が P-Peak 比よりも上回っており、相対的に凝固優位状態であったことが示唆された。以上から、T/P-GA により SOS の包括的な凝固 / 線溶動態および凝固 / 線溶能のバランスについて評価でき、トロンビンとプラスミン生成の低下が SOS の凝固 / 線溶動態の特徴である可能性が明らかになりつつあるが、個々の病態に応じた新たなテーラーメイド治療を確立するためには、今後さらに多数例で検討が必要である。特に SOS に関しては、治療薬としてデフィプロチドナトリウム (デファイテリオ®) が 2019 年 6 月に本邦で新たに保険収載されたが、一方で出血の副作用をはじめ凝血的な効果についても不明な点もあり、その凝血的な視点からの治療効果も含めた包括的な解析を進めていくことが必要である。

(3) 悪性腫瘍初発時に遭遇する DIC (Ishihara T, et al. *Pediatr Int*. 2019):

急性骨髄性白血病 (AML, FAB-M5) の 2 歳女児に合併した線溶亢進型 DIC (旧厚生省 DIC 診断基準 8 点) に対して、包括的な凝固線溶動態解析を T/P-GA で行った。初発時のスクリーニングでは PT-INR 1.25, APTT 44.3 秒, Fbg 47mg/dL, FDP 148.4  $\mu$ g/mL, D-dimer 82.7  $\mu$ g/mL, AT 95%, TAT 106.7ng/mL, PIC 14.4  $\mu$ g/mL であり、FFP 補充、遺伝子組み換えトロンボモデュリン製剤投与を試みるも大量鼻出血などで化学療法は中断され、寛解導入不良で初発から 3 か月で原病死した。最終局面でトラネキサム酸の投与を開始したところ、出血症状に関しては緩和された。今回の解析では、患者血漿を用いて、トラネキサム酸投与開始の前後 (投与開始前は初発時や出血時を含む 5 ポイント、開始後は原病死までの 5 ポイント、計 10 ポイント) で比較検討を行った。凝固能は T-EP の対正常血漿比、線溶能は P-Peak の対正常血漿比に加えて P-LT の対正常血漿との逆比も用いて検討した。全経過中 T-EP 比はほぼ 1 前後で (0.83-1.2)、P-Peak 比は 1 以下で推移した (0.21-1.0)。P-LT 逆比はトラネキサム酸投与開始前までは 0.92-2.75 と高値であり (すなわち P-LT の著明な短縮)、投与開始 6 日目以降で 0.071-0.48 と著明に低下した。経過中、凝固能は抑制されず、線溶能は P-Peak 比では評価困難だが、トラネキサム酸投与前後で P-LT は短縮傾向 (DIC による一次線溶の亢進を示唆) から一転して延長し、抗線溶療法としてのトラネキサム酸の治療効果を反映することが示唆された。線溶亢進型 DIC ではトラネキサム酸が出血症状に著効する場合もあるが、例えば急性前骨髄球性白血病における全トランス型レチノイン酸の投与時は重大な血栓症の併発があるため禁忌とされており、諸刃の剣になり得る。個々の病態に応じた新たなテーラーメイド治療を確立するためには、さらに症例を蓄積し、特に抗線溶療法を行う際には重篤な血栓症予防の観点から、凝固線溶バランスの視点で安全でかつ病態に応じた至適な支持療法を行える体制の構築が急がれる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Onishi Tomoko, Nogami Keiji, Ishihara Takashi, Inoue Satoki, Kawaguchi Masahiko, Nishio Kenji, Fukushima Hidetada, Kobayashi Hiroshi, Amano Itsuto, Nishikubo Toshiya, Yamasaki Masaharu, Kasahara Masato, Shima Midori	4. 巻 120
2. 論文標題 A Pathological Clarification of Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulation Based on Comprehensive Coagulation and Fibrinolysis Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1257 ~ 1269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0040-1713890	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 Ohnishi Tomoko, Ishihara Takashi, Nogami Keiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Coagulation and fibrinolysis balance in disseminated intravascular coagulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14684	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 Ishihara Takashi, Nogami Keiji, Ochi Satoshi, Ishida Toshiaki, Kosaka Yoshiyuki, Sawada Akihisa, Inoue Masami, Osone Shinya, Imamura Toshihiko, Hosoi Hajime, Shima Midori	4. 巻 67
2. 論文標題 Disordered hemostasis associated with severely depressed fibrinolysis demonstrated using a simultaneous thrombin and plasmin generation assay during L asparaginase induction therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28016	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 Ishihara Takashi, Nogami Keiji, Onishi Tomoko, Ogiwara Kenichi, Ochi Satoshi, Yamazaki Masaharu, Shima Midori	4. 巻 61
2. 論文標題 Hemostatic function in hyperfibrinolytic disseminated intravascular coagulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 872 ~ 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13919	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石原 卓
2. 発表標題 小児がんと凝固障害
3. 学会等名 第20回日本検査血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西 智子、野上 恵嗣、伊藤 陽子、大前 隆志、石原 卓、嶋 緑倫
2. 発表標題 敗血症性DIC症例における包括的凝固/線溶動態の経時的評価
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 卓、野上 恵嗣、越智 聡史、水町 邦義、大西 智子、嶋 緑倫
2. 発表標題 トロンビン・プラスミン生成の低下がみられた肝類洞閉塞症候群（SOS）の1例
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 石原 卓、野上 恵嗣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 【小児の救急・搬送医療】病態と疾患 血液・腫瘍 播種性血管内凝固(DIC)	

1. 著者名 石原 卓、野上 恵嗣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 8
3. 書名 【新生児・小児の血栓症とDIC】血栓症の凝固機能と診断 小児がん関連の凝固障害症の研究から	

〔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・教授    (24601)	
研究分担者	大西 智子  (Onishi Tomoko)  (60645589)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員    (24601)	
研究分担者	嶋 緑倫  (Shima Midori)  (30162663)	奈良県立医科大学・医学部・副学長    (24601)	

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
---------	---------