

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 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：25461605

研究課題名(和文) 後天性凝固異常症における凝固機能評価と抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Demonstration of global coagulation assays and the suppression mechanism about acquired coagulation disorders

研究代表者

松本 智子 (Matsumoto, Tomoko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80642678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：後天性凝固異常症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、当該因子の活性が著しく低下し、突然出血を発症する疾患である。原因はほとんどが自己抗体によるIgGである。しかし抑制メカニズムは明らかでない。後天性第V因子インヒビターにおいて出血症状の有無で有群はProcoagulantの低下、無群は活性化プロテインC抵抗性の存在を解明した。また、病態を把握する凝固機能評価法は必要不可欠である。新規診断法ではThrombin/Plasminによる凝固線溶能評価、迅速なVWF測定を確立した。さらにAPTTが延長する後天性凝固異常症群をAPTT凝固波形解析で迅速に鑑別する測定法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Acquired coagulation factor inhibitors occur rarely, but may develop spontaneously haemorrhage symptoms as autoantibodies in previously normal individuals. However, the suppression mechanism is not clear. In the existence group, the decrease, no group of procoagulant activities elucidated activation protein C-resistant presence in the presence or absence of haemorrhage symptoms in acquired factor V inhibitor. Also, the coagulation function rating system to grasp clinical condition is essential. We established coagulation and fibrinolysis ability evaluation by Thrombin/Plasmin, quickly VWF measurement by the new diagnostic methods. A approach using clot waveform analysis provided useful means of differentiating coagulation defects in inhibitor patients with a prolonged aPTT.

研究分野：血栓止血

キーワード：後天性凝固異常症 凝固因子 インヒビター

### 1. 研究開始当初の背景

後天性凝固異常症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、その結果特定の因子活性が著しく低下し、従来凝固機能は正常な患者に突然出血を発症する疾患であり、しばしば重篤な出血症状をきたす。膠原病、悪性腫瘍や分娩などの基礎疾患を有する場合は約 50%で残りの 50%は基礎疾患をもたない突然発症する難治性の出血性疾患である。後天性凝固因子インヒビターの発生は第 VIII 因子に対するものが約 80-90%で、次いで第 V 因子や VWF をターゲットとする。近年、疾患の認知度とともにインヒビター症例報告が多くなっているが未だ後天性凝固異常症に対する迅速な診断および治療が行き届いてはいえない。また、全国の院内検査室においてもインヒビター力価の測定は自施設で行っている施設は少なく、出血を起こしていても診断に時間を有することもある。今回、各種インヒビターの抑制メカニズムを解明し、高感度で特異性の高い検査を新たに検討し、適切な治療計画を実施するための研究を確立したい。

### 2. 研究の目的

後天性凝固異常症の原因は自己抗体産生による IgG が本態であることが多い。しかし抑制メカニズムについては未だ明らかでない。今回、後天性血友病 A (AHA) 後天性第 V 因子インヒビター (AFVi) と後天性 VWD (AVWD) の各種疾患の臨床病態の把握や止血効果を確認するための凝固機能の評価の確立は、必要不可欠である。そして、インヒビター抑制メカニズムの解明は重要である。患者にとって効果の高い止血治療および低副作用で抗体産生を抑制するための治療が重要で、本研究が応用できることを目標とする。

### 3. 研究の方法

後天性凝固因子患者の血漿を用いた凝固抑制レベルについて凝固波形解析 (CWA)・トロンビン生成能測定 (TGT)・凝固線溶能測定 (T/P-GT) などの凝固機能評価法を用いて包括的に凝固および凝固線溶動態を評価する。AFVi では患者血漿より純化 IgG を精製し、この IgG による FVIII および FV の抑制メカニズムについて検討する。特に FV は procoagulant/anticoagulant 機能の両者に作用機序を発揮する凝固因子である。この因子に対するインヒビターの解析を実施し、FV に対する相互作用や IgG の抑制メカニズムについて検証する。なぜ、出血症状の有無による異なる臨床症状を示すのかを解明する。その他の後天性凝固異常症についても凝固線溶動態を把握する診断法の確立と、後天性凝固抑制メカニズムについて明らかにし、有効な治療選択域を広範囲にする。

### 4. 研究成果

#### 1. AFVi の抑制メカニズムの解明

AFVi の抑制メカニズムの解析として、出血症状:有群と無群で比較し、有群では PT の凝固波形解析 (CWA) で有意に低下する。(図 1.)

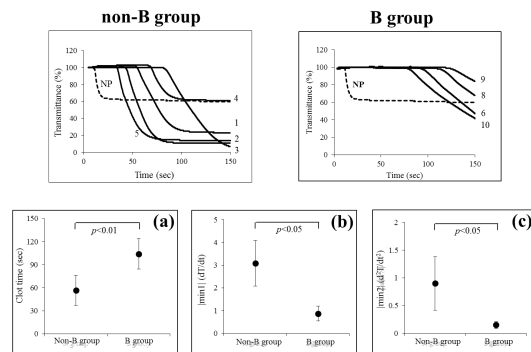


図1. AFVi の出血症状(B group)と症状無(Non-B group)のCWAとパラメータ

抗体認識部位は FV:L 鎖、無群は FV:H 鎖を抗体認識部位として同定した。出血症状の有無について、抗凝固作用をもつ活性化プロテイン C (APC) に対して APCsr の低下などによって出血症状が無い群では APC 抵抗性の存在を示した。本抑制メカニズムの差異を生じ(図 2)、

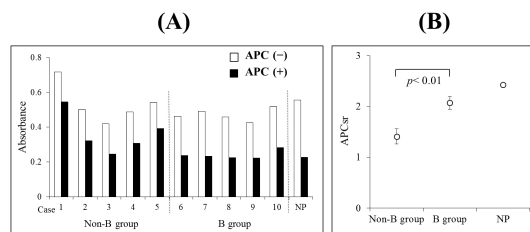


図2. B groupとNon-B groupのAPC添加の有無によるAPC抵抗性について

この結果多様性を示すことを証明した (Matsumoto T. et. al. JTH 2014)。

### 2. 診断方法の確立

#### (A) 凝固線溶動態の評価法

Thrombin(Th)と Plasmin(Pln)の産生能をリアルタイムかつ包括的に凝固線溶能を評価できる Th/Pln generation test (T/P-G) にお

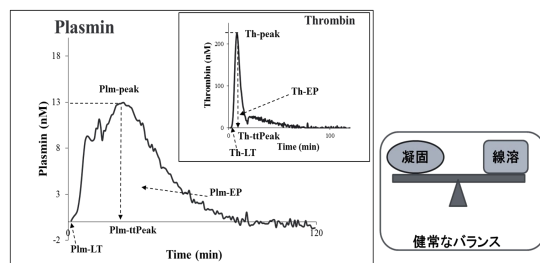


図3.凝固と線溶のバランスを評価できるThrombin/Plasmin生成能(健康人)

ける凝固と線溶の相互関連性を明らかにした(図 3)。各種凝固因子欠乏血漿の評価や血友病 A の線溶能が正常より微増したことを明らかにした (Matsumoto T. et. al. T&H. 2013)。凝固線溶動態を同時にリアルタイムに測定する方法を確立した。

### (B) 自動分析装置による VWF 測定法

また後天性 VWD の評価方法に有用な自動凝固分析装置を用いて VWF の活性であるリストセチンコファクター測定について凝固波形を用いた原理で測定する方法について報告した (Matsumoto T. et. al. IJH.2015)。

### (C) 凝固波形解析(CWA)による APTT 延長する凝固異常症の鑑別

血栓症を示す抗リン脂質抗体症候群 (APS) と重篤な出血症状をきたす AHA は共に APTT の延長を認めるも APTT による鑑別が困難である。APTT による CWA の 1 次微分波形より、各種疾患によるピークの差が明らかになった (図 4-a)。

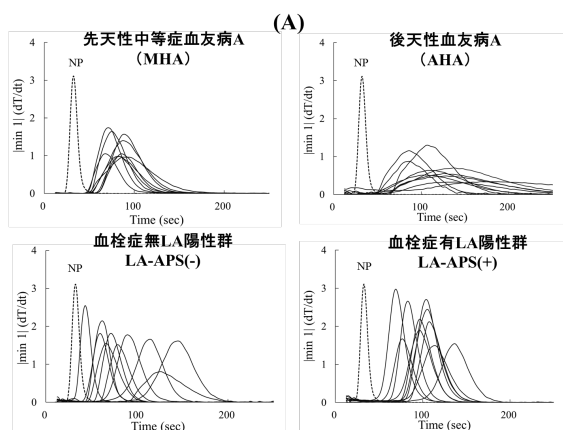


図4-a APTTが延長する凝固異常症群のCWAの1次微分波形

また CWA パラメータの最大凝固速度 ( $|min1|$ ) や最大凝固加速度 ( $|min2|$ ) のパラメータが出血症状を呈する疾患と血栓症状をきたす疾患で有意に差を認め、LA 陽性群が  $|min1|$  で HA より上昇し、血栓症状をきたす群 (APS 群) が最も高値を示すことを明らかにした。

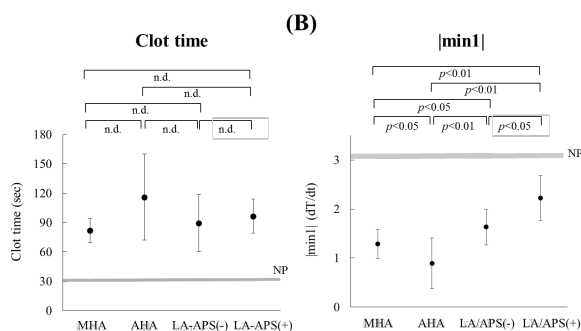


図4-b 後天性凝固異常症群のCWAのパラメータによる鑑別

(図 4-b)。CWA のパラメータによる差を示す原因のひとつに APC 抵抗性が存在することを証明し、これらの内容について論文化し、投稿中である。

### 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 10 件)

2015

1. Matsumoto T, Nogami K, Okuda M, Shima

M.

Optimization of the automated, CS-2000i™ method for measuring low levels of von Willebrand factor ristocetin cofactor activity (VWF:RCo). Int J Hematol. 査読有 101(2):126-132. 2015 doi: 10.1007/s12185-014-1720-x.

2. Yoshioka A, Ishii E, Ueno T, Usami I, Kobayashi M, Kobayashi R, Sotomatsu M, Shirahata A, Suzuki T, Taki M, Ishida Y, Matsushita T, Shima M, Nogami K, Sakai M, Kigasawa H, Fukutake K.

The International Immune Tolerance Induction Study and its follow-up study on Japanese hemophilia A patients with inhibitors. Int J Hematol. 査読有 2015 Apr;101(4):362-8. doi: 10.1007/s12185-015-1734-z.

2014

1. Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M.

Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (aPCC) moderates the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor. Int J Hematol. 査読有 99(5):577-58. 2014 doi: 10.1007/s12185-014-1572-4.

2. Matsumoto T, Nogami K, Shima M.

Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors. J Thromb Haemost. 査読有 12(9); 1503-12. 2014 doi: 10.1111/jth.12660.

3. Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, Shima M. Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. Blood. 査読有 10; 123(15):2420-2428. 2014 doi: 10.1182/blood-2013-10-530089.

4. Haku J, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M.

Optimal monitoring of bypass-therapy in hemophilia A patients with inhibitor using clot waveform analysis. J Thromb Haemost. 査読有 12(3); 355-362. 2014 doi: 10.1111/jth.12488

2013

1. Matsumoto T, Nogami K, Shima M.

Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis.

Thromb Haemost. 査読有 110; 761-768. 2013  
doi: 10.1160/TH13-04-0345.

2. Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y.

Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: Contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor. Thromb Haemost. 査読有 110: 62-75. 2013 doi: 10.1160/TH13-01-0069.

3. Yada K, Nogami K, Shima M. Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor. Br J Haematol. 査読有 2013 Oct;163(1):104-11. doi: 10.1111/bjh.12473.

4. Yada K, Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ, Shima M. The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X. Thromb Haemost. 査読有 2013 Jun;109(6):1007-15. doi: 10.1160/TH12-10-0762.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Matsumoto T, Nogami K, Shima M. A novel diagnostic system of acquired coagulation factor inhibitors using comprehensive coagulation assays; XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, 2015/6/24

2. 松本 智子、野上 恵嗣. 包括的な新規凝固線溶能の評価, 第 59 回 日本臨床検査医学会近畿支部総会、天理市、2014/6/21

3. 松本 智子、野上 恵嗣、嶋 緑倫. 血友病 A と抗リン脂質抗体症候群の診断における凝固波形解析の有用性; 第 15 回 日本検査血液学会学術集会、仙台市、2014/7/21

4. Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Distinction of APC reactivity for acquired coagulation inhibitor can predict the clinical phenotypes; 第 76 回 日本血液学会 大阪市、2014/11/2

5. Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Usefulness of thrombin generation assay (TGA) for diagnosis of prolonged aPTT with positive LA; 第 75 回 日本血液学会、札幌

市、2013/10/12

6. 松本 智子、野上 恵嗣、嶋 緑倫. Thrombin /Plasmin 生成同時測定による新規包括的凝固線溶検査; 第 60 回 日本臨床検査医学会学術集会、神戸市、2013/11/2

〔図書〕(計 1 件)

野上 恵嗣、松本 智子、中外医学社、臨床に直結する血栓止血学 (42-43)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 血液検体の凝固能の評価方法、並びにその方法に用いるための試薬、試薬キット及び装置

発明者: 嶋緑倫、野上恵嗣、松本智子、北沢剛久(中外製薬株式会社)、添田哲弘(中外製薬株式会社)、池田有香(シスメックス株式会社)

権利者: 奈良県立医科大学、中外製薬株式会社、シスメックス株式会社

種類: 特許

番号: 特許 2015 - 089865 (日本)、PCT/JP2016/060566(PCT)

出願年月日: 2015/4/24(日本)、2016/3/30(PCT)

国内外の別: 国内

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 智子 (MATSUMOTO, Tomoko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80645678

(2) 研究分担者

野上 恵嗣 (NOGAMI, Keiji)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50326328