

学位論文

Upshaw-Schulman 症候群の病因・病態解析
ー臨床経過の異なる 2 例の解析を通じてー

山形大学医学部小児科学講座

田邊 さおり

論文内容要旨

論文題目 Upshaw-Schulman 症候群の病因・病態解析
-臨床経過の異なる 2 例の解析を通じて-

指導（紹介）教授： 三井 哲夫
氏 名 ： 田邊 さおり

【内容要旨】（1，200 字以内）

背景

Upshaw-Schulman 症候群（USS）は、先天性の血栓性血小板減少性紫斑病であり、血漿中の蛋白切断酵素である ADAMTS13 活性の先天性な欠損が原因である。新生児期のクームス試験陰性の重症黄疸や、小児期の反復性血小板減少が特徴的であり、新鮮凍結血漿（FFP）輸注により回復する。世界で約 70 家系、約 100 症例しか報告されておらず、その病態・病因には不明な点が多い。また ADAMTS13 遺伝子変異と表現型との関連性は、明らかでない。新生児期の溶血性貧血で発症した 2 症例で病態・病因解析を行った。

対象・方法・結果

臨床経過の進行と共に確定診断に至り、それぞれについて、臨床経過の検討、患者家族を含め ADAMTS13 活性、抗原量、遺伝子解析、軽快期血漿のフォンヴィレブランド因子（VWF）多重体解析を行なった。

2 例とも重症黄疸に対し交換輸血を施行したが、その後の臨床経過は異なっていた。症例 1 は間接クームス試験陽性で ABO 式血液型不適合による新生児黄疸の診断で、交換輸血を受けた。その後、血小板減少を呈し慢性特発性血小板減少性紫斑病として治療されたが無効であった。2 歳 9 か月時 USS と診断し以後 2 週間毎に予防的 FFP 輸注を行い、反応性の血小板数上昇を認めた。初回投与から、約 8 年経過し、既に 200 回以上 FFP 投与を繰り返している。一方、症例 2 は新生児期重症黄疸で交換輸血の後、様々な感染症を契機に血小板減少を認めたが、FFP を投与することなく自然に正常化するため、定期的な FFP 予防投与は不要であった。ADAMTS13 遺伝子解析を

行い、それぞれ p. R398C/p. Q723K、p. Q449X/p. Q1374Sfs の複合ヘテロ接合体であった。p. Q449X、p. R398C は以前に報告があるが、p. Q723K、p. Q1374Sfs は、新規の変異であった。

2症例の軽快期の血漿中 VWF 多重体解析では、単一对称性多重体バンドを認め、健常者で認める三重構造とは異なっており、患者血漿中の VWF 多重体は蛋白分解性の修飾を受けていないと考えられた。

結語

本研究では新たな2遺伝子異常を検出し得た。2症例とも血漿ADAMTS13活性は著減していた。臨床症状の重症度に違いがあり、*ADAMTS13*遺伝子変異部位の違いから表現型に差異を生じた可能性がある。またこれまでに知られていないVWF依存性高ずり応力誘発血小板凝集の調節機構の存在の可能性が示唆される。

(1,021字)

Key words

Upshaw-Schulman 症候群、ADAMTS13、フォンヴィレブランド因子

緒言

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) は1924年に Moschcowitzが初めて報告した。TTPの症状として、古典的Moschcowitz 5徴候が知られている (1. 血小板減少症 2. 溶血性貧血 3. 腎機能障害 4. 発熱 5. 動揺性精神神経症状 (症状に幅があり、しかも大きく変動する))。これら5徴は必ずしも揃うとは限らず、症状や臨床経過は様々である。発生頻度は年間百万人あたり4~10人と、稀な疾患であり、治療しても約20%が死亡する。1980年代までTTPの病因は不明であった。その後、フォンヴィレブランド因子 (von Willebrand factor: VWF) がTTPに関与すること、VWF切断酵素であるADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type-1 motifs 13) 活性低下がTTP発症に関わることが明らかとなった。ADAMTS13活性が減弱すると、通常血漿中には認められない超高分子量VWF多重体 (unusually large VWF multimer: UL-VWF) のレベルが上昇し、高ずり応力下で微小循環での血小板凝集を生じる。

ADAMTS13は、VWFを特異的に切断することで血小板血栓形成能を制御している因子として同定された。ADAMTS13遺伝子は染色体9q34.2に位置し、約45kbpに及ぶ29個のエクソンから構成される。一次構造の特徴から、細胞外分泌型の亜鉛メタロプロテアーゼであるADAMTSファミリーの一員として分類される。翻訳されるペプチド鎖は、427アミノ酸残基からなる大きな糖蛋白酵素である。分子量は190kDで、分子はN末端側から順に、シグナル配列、プロペプチド領域、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリン様ドメイン、トロンボスポンジン1型モチーフ (TSP-1) ドメイン、システインリッチドメイン、スペーサードメイン、さらに7個連続したTSP-1ドメイン、2個のCUB (Complement 1r/s, Uegf [a sea urchin embryonic protein] and BMP (bone morphogenetic protein) 1) ドメインが続く多彩な構造から成り立っている。細胞外に分泌されたADAMTS13は、シグナル配列とプロペプチド領域が切断除去されており、1,353アミノ酸残基からなっている。血中には阻害因子が存在しないため、恒常的に活性型として血中に存在する極めて特殊な酵素である。これまでのところ、ADAMTS13の基質はVWF以外に報告されていない。多くの血漿蛋白質と同様に主に肝臓で発現しているが、実質細胞ではなく、非実質細胞の一種である肝星細胞 (伊東細胞) で合成・分泌される。この細胞以外にも、血管内皮細胞や血小板で発現していることが示されている。

TTPの70~80%は後天性であり、抗ADAMTS13自己抗体が原因である。一方、ADAMTS13遺伝子異常により先天的にADAMTS13活性が低下すると先天性TTPとなる。報告者に因み、Upshaw-Schulman症候群 (USS) と呼ばれる^{1~4)}。2010年の時点で世界的にUSS約70家系、約100

症例が知られているが、正確な頻度は未だ不明である⁵⁾。2006年に国際的な遺伝性TTP登録システム (www.ttpregistry.net) が設立された (ClinicalTrial認識名NCT01257269)。これまでに17か国から、患者とその家族178例が登録されている。宮田らは、一般日本人128例のADAMTS13遺伝子のシーケンスを行い、活性に影響を与えると考えられる稀な非同義変異の同定を試みた。その頻度は日本人約530人に1人であり、日本の人口を1億2,700万人とすると、USS罹患者は全国で112人程度、と推定した⁶⁾。

典型的なUSSは、生後早期にクームス試験陰性の重症新生児黄疸で発症し、交換輸血を要する。小児期に血小板減少や溶血性貧血の発作を繰り返し、新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma: FFP) 投与で回復する⁷⁾。多くは新生児期発症を含めた早期発症型である。一方青年期以降に、妊娠や感染を契機にTTPを発症する後発型も少数ながら認める^{4, 8)}。発症時期や重症度は一様でなく、その病態・病因には不明な点が多い。ADAMTS13活性とADAMTS13インヒビター力価を測定することで診断は可能であり、ADAMTS13遺伝子解析も行われる。治療は2～3週間毎にFFP5～10ml/kgを輸注しADAMTS13酵素補充療法を行う。

新生児期の溶血性貧血で発症した同症候群2例で病態・病因解析を行った。いずれも新生児黄疸で発症し交換輸血を行ったが、その後の臨床経過は異なっていた。症例1は幼児期から定期的な予防的FFP輸注が必要であり、症例2は、10代前期まで不要であった。症例1は当初ABO式血液型不適合を合併したため、USSの診断が遅れた。この2例とその家族のADAMTS13遺伝子解析、軽快期及び自然経過中のVWF多重体解析を含めた比較研究を行った。

対象と方法

症例

症例とその家族の臨床症状と検査所見は下記「結果」で述べる。

VWF抗原とVWF多重体解析

血清VWF抗原レベル測定は、ウサギ抗ヒトVWFポリクローナル抗血清 (DAKO、デンマーク) を用いたサンドイッチELISAで行った⁹⁾。正常ヒト血漿1ml中のVWF抗原レベルを100%とした。対照とする健常ヒト20例のVWF抗原レベルは $102\% \pm 33\%$ (平均±標準偏差) であった¹⁰⁾。

VWF多重体解析は、RuggeriとZimmermanの方法で行い¹¹⁾、以下のような修正を加えた。血清検体はドデシル硫酸ナトリウム (SDS) -1.2%寒天ゲルで電気泳動して分離し、標本は抗VWFポリクローナル抗体でのウエスタンブロット法とルミノグラムによる検出を行った¹²⁾。ブロットをスキャ

ンし、濃度測定解析はImageJソフトウェアを用いた（国立衛生研究所：
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>）。

ADAMTS13活性測定とADAMTS13インヒビターレベル

血漿ADAMTS13活性とADAMTS13インヒビターの測定には発色性ELISA法（ADAMTS13-act-ELISA；Kainos, 東京）を用いた¹³⁾。正常血漿中のADAMTS13活性を100%とした。測定限界は正常の0.5%であった。ADAMTS13インヒビター力価は Bathesda単位（BU）で表した。1BUは「ADAMTS13活性レベルを半減するのに必要な量」と定義し、力価0.5BU/ml未満を陰性とした。

ADAMTS13抗原の評価

血漿ADAMTS13抗原レベルは、2つの抗ADAMTS13モノクローナル抗体を用いて定量的サンドイッチELISA法で測定した。正常血漿中のADAMTS13抗原レベルを100%とした。測定限界は正常の0.1%であった。血漿ADAMTS13抗原レベルを、還元条件下に定量・定性ウエスタンブロット法でも測定した¹⁴⁾。還元条件下で、希釈/未希釈血漿2mlをそれぞれのレーンに加えてSDS-5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。蛋白は、電気泳動で微多孔ポリ塩化ビニリデン膜にブロットされる。一次モノクローナル抗体であるWH2-11-1と、二次抗体であるセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG（Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MO, USA）を用いてブロットからADAMTS13抗原を測定した。WH2-11-1抗体の抗原決定基は4番目のトロンボスポンジン1型モチーフ（thrombospondin type-1 motif: TSP1）領域にある。恒温放置後、ブロットをX線フィルムに露出した。ADAMTS13抗原の濃度測定解析は、190-kDバンドをImageJソフトウェアを用いて行った。この方法での血漿ADAMTS13抗原の測定限界は正常の3%であった。

ADAMTS13遺伝子解析

全てのDNA解析は、検体採取機関及び解析機関の倫理委員会の許可を得て行った。文書による説明と同意を得た。以前の報告の方法で^{15, 16)}、ADAMTS13遺伝子の全29エクソン、イントロン-エクソン境界域を含めてPCR法で増幅し、ヌクレオチド配列を直接決定した。本稿に記述した病因ADAMTS13遺伝子変異は、日本人一般住民128人のスクリーニングに基づく通常の遺伝子多型ではなかった¹⁵⁾。

結果

症例

2004年に在胎37週6日、出生体重2,750g、自然分娩で出生した。両親は血族結婚でなく、第3子である。生後11時間に、チアノーゼ、重症黄疸あり、生後12時間で総ビリルビン17.6mg/dl、皮膚に点状出血を認めた。直接クームス試験陰性、間接クームス試験陽性で、患児の血球を用いた抗体価測定試験では抗B抗体弱陽性であった。患児の血型B-Rh(D)、母の血型O-Rh(D)であり、ABO式血液型不適合による新生児溶血性貧血を疑った。交換輸血基準値を超えており、O-Rh(D)血球とAB-Rh(D)FFPの合成血を用いて交換輸血2回と光線療法を施行した。血小板数0.7万/ μ lであり、血小板輸注を行ったが、特に副作用を認めなかった。黄疸は徐々に軽快したが、血小板数は4~6万/ μ lと低値で推移した。日齢7に退院した。

生後7か月にインフルエンザA型に罹患し、軽度の貧血(Hb 7.8g/dl)と血小板減少(1万/ μ l)を認めた。LDH 1,502 IU/l、ハプトグロビン低値(10mg/dl未満)、クームス試験陰性、骨髓検査では病的所見を認めず、骨髓染色体分析は46,XY、血清補体価は正常範囲、抗核抗体・抗血小板抗体・EBウイルス抗体・ヒトパルボウイルスB19抗体・寒冷凝集素反応はそれぞれ陰性で、Evans症候群の合併を疑った。その後も発熱を契機に血小板減少を繰り返し、慢性特発性血小板減少性紫斑病の診断で、ガンマグロブリン静注療法、ステロイドパルス療法、プレドニゾロン内服等の治療を行ったが、血小板数は上昇せず2~5万/ μ l、血清LDH値は高値(446~1,502IU/l)で経過した。さらに2歳8か月時、頭部打撲の際に一過性言語障害、右不全片麻痺を呈したが、頭部CTで異常所見を認めず、数時間で自然に回復し「動揺性精神神経障害」と考えられた。また、予防接種の際など、普段から37℃台と体温は高めであり「発熱」と捉えるとMoschcowitz 5徴候のうち4徴候を呈したためUSSを疑った。2歳9か月時に奈良県立医科大学でADAMTS13解析を行ったところ、ADAMTS13活性の著減(正常の0.5%未満)、ADAMTS13インヒビター陰性(<0.5 BU/ml)であり、USSと診断した。FFP輸注前、輸注後1日、2日、3日、10日、14日の血小板数はそれぞれ1.7万、7.9万、20.9万、57.3万、62.5万、33万/ μ lと治療効果を認めた。FFP輸注前、輸注後1日、2日の血漿ADAMTS13活性はそれぞれ0.5、4.4、4.2%であった。以降2週間毎に予防的FFP輸注を反復している(図1)。初回投与から、約8年経過し、既に200回以上2週間毎のFFP投与を繰り返している。蕁麻疹、軽度の喘鳴などFFP副作用を時に認めるが、幸い重篤な症状は認めていない。月2回の通院~外来点滴の負担はあるものの、血小板数が上昇したことで、日常生活での運動制限を解除できた。

患児の父母、同胞兄2人の血漿ADAMTS13活性レベルはそれぞれ46、30、40、23%であった(図2)。ELISA法による血漿ADAMTS13抗原レベルは患児が0.1%未満、父母、兄2人はそれぞれ、24、36、23、36%であった。さらにウエスタンブロット法によるADAMTS13抗原レベルは 患児が3%未満、父母、兄2人はそれぞれ、36、34、38、38%であった。なお、父母と兄2人には出血傾向を認めない。

ADAMTS13遺伝子解析

ADAMTS13遺伝子に、p. R398C(c. 1192 C>T, exon 10) とp. Q723K(c. 2167 C>A, exon 18) の2つの変異を有する複合ヘテロ接合体であった。両親と兄2人は、2つの変異のうち一つを有するヘテロ接合体保因者であった。患児とその家族に、ミスセンス変異の原因となるような塩基多型を認めなかった。

症例2

2003年に在胎40週2日 出生体重3,018g、吸引分娩で出生した。両親は血族結婚でなく、第2子であった。日齢1に、重症黄疸(生後27時間で総ビリルビン23.7mg/dl)、チアノーゼ、血小板減少($1\text{万}/\mu\text{l}$)のため総合病院に搬送された。直接・間接クームス試験とも陰性であり、患児、父母の血型はそれぞれ、AB-Rh(D)、A-Rh(D)、B-Rh(D)であった。重症黄疸の原因は特定できなかったものの、核黄疸予防のため、O-Rh(D)血球とAB-Rh(D)FFPの合成血を用いた交換輸血を計4回施行した。さらに血小板輸注を4回施行した。その後、一過性に腎機能障害(BUN 32.4mg/dl、Cre 1.0mg/dl)を認めた。動脈管開存症とうっ血性心不全を合併し、内科的治療は無効であり、日齢29に動脈管結紮術を受けた。周術期に肝機能障害(AST 2,266 IU/l、ALT 463 IU/l、LDH 4,043 IU/l、PT 24%、APTT 33.2秒)を認め、凝固因子補充のためFFP輸注を受けた。日齢48に、PLT $27\text{万}/\mu\text{l}$ で、軽快退院した。

生後14か月時に発熱、咳嗽、紫斑、血小板減少、LDH高値を認め、補液のみで血小板数は回復し、軽症ウイルス関連血球貪食症候群を疑われた。生後15か月時に、水痘に罹患し軽度の貧血と血小板減少、LDH高値を認めた。数週間後、発熱、咳嗽を呈し重度の血小板減少($1.7\text{万}/\mu\text{l}$)、LDH上昇(1,007IU/l)を認めたが、CRPは陰性であった。骨髓検査では有核細胞中3.8%に血球貪食像を認めた。補液を行い、血小板 $14.4\text{万}/\mu\text{l}$ に改善し、ウイルス感染関連血球貪食症候群と診断された。1か月後、軽度の貧血と血小板減少を認めた(Hb 9.7g/dl、PLT $7.5\text{万}/\mu\text{l}$) が、経過観察のみで軽快し、特別な治療は不要であった。2歳2か月時にインフルエンザA型に罹患して重度の血小板減少を認めた。抗インフルエンザ薬のオセルタミビル投与により徐々に軽快した。成長に伴い、発熱の頻度が減少するにつれて点状出血も減少した。新生児期重

症黄疸及び感染を契機に点状出血、血小板減少、溶血性貧血のエピソードを繰り返したことから4歳時にUSSを疑い、2008年に奈良県立医科大学でADAMTS13解析を行ったところ、ADAMTS13活性の著減（0.5%未満）、ADAMTS13インヒビター陰性（<0.5 BU/ml）を認め、USSと診断した。

新生児期重症黄疸で交換輸血を施行したが、新生児期以降は、臨床症状が軽度であり予防的FFP輸注は行わなかった（図3）。7歳時の定期検診で、Hb 13.1g/dl、PLT 23.7万/ μ l、PT 77.5%、APTT 28.5秒（基準値 25～37）、フィブリノーゲン156mg/dl（基準値 150～400）、FDP 0.1 μ g/ml（基準値<5.0）、Dダイマー 0.26 μ g/ml（基準値 0～1.0）、VWF活性150%（基準値 60～170）、神経学的異常などの合併症を特に認めず、学校検尿でも血尿・蛋白尿などの異常を指摘されることなく、無治療で経過観察中であった。2015年（12歳時）右腹痛のために救急外来を受診し腹部CTで左右腎梗塞と診断され入院した。梗塞の大きさは右腎が大きく、疼痛あり、左腎は小さい病変であった。血小板減少（8.3万/ μ l）を認めた。Hb 13.7g/dl、LDH 422IU/l、PT 74.9%、APTT 26.8秒、フィブリノーゲン189mg/dl、FDP 2.6 μ g/ml、Dダイマー 0.65 μ g/ml、ATIII 141%、ハプトグロビン59mg/dl、尿蛋白(1+)、尿潜血(-)であった。血栓形成発作により梗塞を生じたと考え、さらなる梗塞を予防するためにFFP2単位2日間輸注し、第5病日にはPLT16.2万/ μ lと上昇した。シスタチンC 0.58mg/l（基準値0.56～0.87）であり、腎梗塞は経過観察で疼痛が消失し、第6病日に軽快退院した。麻痺などの神経脱落症状はなかったが、スクリーニングのため頭部MRIを施行したところ、陳旧性多発性脳梗塞を認めた。以降、新たな血栓形成発作予防のため2週間毎のFFP定期輸注を開始したが、FFP輸注直前の血小板数は10万/ μ l前後で推移している。抗核抗体40倍（基準値<40）、抗血小板抗体 陰性であり、貧血や高LDH血症、Dダイマー上昇、血尿・蛋白尿、低補体血症を認めていない。VWF活性再検し150%、プロテインC活性、プロテインS活性はそれぞれ72%、52%であった。

患児の父母、兄の血漿ADAMTS13活性レベルはそれぞれ50、44、38%であった（図4）。ELISA法による血漿ADAMTS13抗原レベルは、患児が0.1%未満、父母、兄はそれぞれ、48、45、54%であった。なお、父母と兄には出血傾向を認めない。

ADAMTS13遺伝子解析

症例は、p. Q449X(c. 1345 C>T, exon 12)を父から、p. Q1374Sfs(c. 4119del, exon 29)（アミノ酸残基1395の未成熟終止コドン）を母から引き継いだADAMTS13遺伝子変異の複合ヘテロ接合体であった。両親は、2つの変異のうち一つを有するヘテロ接合体保因者であった。患児とその家

族に、ミスセンス変異の原因となるような一塩基多型を認めなかった。患児のADAMTS13活性レベルと抗原レベルから、p. Q449X/p. Q1374Sfs変異は血中に蛋白分泌していないと考えられた。

軽快期のUSS患者のVWF多重体解析

血漿ADAMTS13活性が欠失し、新生児重症黄疸を呈する一般的なUSS 2症例であるにも拘らず、乳児期以降の臨床経過が異なっていた。ADAMTS13以外の潜在的な蛋白分解機構を調べるため、2症例の軽快期血漿を用いてVWF多重体解析を行った。患者2例の血漿VWF多重体バンドは単一で対称性だが、正常な対照血漿では三重構造であった(図5)。さらに、患者血漿では、正常に比べて、高分子量VWF多重体が多く、このことから、両患児の血漿VWF多重体は、ADAMTS13以外の蛋白分解による低分子化がなされていないと考えられた。

考察

日本人USS患者43人の自然歴の分析では、42% (18/43) は新生児重症黄疸で交換輸血が行われており、黄疸はUSS患者の最初のTTP発作の症状と考えられる⁴⁾。根底にある機序は完全に解明されていないが、低酸素状態により、IL-6、IL-8、TNF α などの炎症性サイトカインの産生が増えて、血管内皮細胞からのUL-VWFM放出が誘導され^{17, 18)}、さらに新生児は分娩の遷延により低酸素状態になりやすく、血管内皮細胞からUL-VWFMが放出されTTP発作が起きると考えられる。

新生児期発症のUSSは、クームス試験陰性の重症黄疸を呈し、交換輸血を要する。小児期に血小板減少を繰り返し、FFP輸注により軽快する。新生児期発症のUSS患者は早期発症型に分類され、TTP発作予防のために、生涯を通して、臨時にまたは定期的に血漿輸注で治療される¹⁹⁾。一方、小児期を過ぎて初めてTTP症状を呈するものは後発型に分類される。しかし、USS患者は時に軽度の血小板減少のみを呈し、見過ごされたり、特発性血小板減少性紫斑病やEvans症候群、溶血性尿毒症症候群などと誤診されたりすることがある。後期発症のUSSの臨床経過は実に様々である。

本研究の2症例は、新生児重症黄疸で交換輸血を受けたが、その後の臨床経過は異なっていた。症例1は、間接クームス試験陽性で、ABO式血液型不適合による新生児重症黄疸と見做され、USSの確診に至らなかった。予防的FFP輸注施行前には慢性的な血小板減少を呈していた。一方症例2は、感染症罹患の際に一過性血小板減少を認め自然軽快していたが、12歳時に症候性の腎梗塞を発症し、以降FFP輸注による治療を開始した。ADAMTS13遺伝子解析により2症例はそれぞれ、p. R398C/p. Q723K、p. Q449X/p. Q1374Sfsの複合ヘテロ結合と判明した。p. Q449X、p. R398Cは以前に報告がある^{15, 20)}が、p. Q723K、p. Q1374Sfsの報告はなく、新規の変異であった。ADAMTS13分子のうちp. Q723KはI₂ドメインに、p. Q1374SfsはCUB₂ドメインに存在する。2症例とも血漿ADAMTS13活

性は正常の0.5%未満で、ADAMTS13抗原レベルは0.1%未満であった。p. R398Cは発現実験で、蛋白分泌が阻害されたが²⁰⁾、p. Q723K、p. Q1374Sfsは血液中に蛋白分泌しているかもしれない。この可能性からUL-VWFがADAMTS13以外の蛋白分解を受けているかどうか調べるため軽快期患者血漿を用いてVWF多重体解析を行ったところ、2症例とも正常の三重構造でなく単一の対称性バンドとなった。このことから、USS患者のVWF多重体はADAMTS13酵素低下のため切断されず、低分子化されず、ADAMTS13以外の蛋白分解も受けていないと考えられた。

症例2が10代前半まで、数年間にわたりTTP発作を起こさなかった調節機構は不明である。今回の検討では、ADAMTS13とは別のVWFに関わる蛋白分解を見つけられなかったが、高ずり応力誘導性血小板凝集 (high shear stress-induced platelet aggregation: H-SIPA) におけるVWF-血小板膜糖蛋白GPIIb受容体軸に関わる液性調整機構から何らかの影響を受けている可能性がある。ずり応力の亢進により、血小板から放出される内因性アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate: ADP) 凝集の減弱が観察された²¹⁾。

2001年Levyらにより7家系の症例にADAMTS13遺伝子変異が同定された³⁾。その後、相次いでADAMTS13のシーケンス解析が行われ、世界的には、現在100種以上の原因変異が報告されている。ほとんどの症例は複合ヘテロ接合体であるが、近親婚の子である患者ではしばしばホモ接合体が見つかる。変異の種類としては、塩基1個の置換によりアミノ酸残基1個が別のアミノ酸残基に変化するミスセンス変異が最も多いが、それ以外には、塩基1個の置換により停止コドンが生じるナンセンス変異や、塩基の挿入や欠失によってコドンの読み枠がずれるフレームシフト変異、エクソン-イントロン境界部位の変異によるスプライシング異常なども報告されている。これまでに同定された変異の場所はADAMTS13の全ドメインにわたっており、特にhot spotと呼ばれるところはないが、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリン様ドメイン、システインリッチドメインに比較的多くの変異が同定されている。これらはADAMTS13の活性発現に必須のドメインである。欠失させても活性を損なわない領域、すなわちスパーサードメインよりもC末端側の領域にも多くの変異が同定されているが、同定された原因変異のほとんどは、変異の影響でADAMTS13の立体構造に異常が生じ、小胞体での蛋白質品質管理機構によって細胞内で処理され血液中に分泌されなくなるためと考えられている。実際、培養細胞を利用した発現実験では、多くのADAMTS13変異体が分泌不全を示す。本研究の症例1はT1・T2ドメイン、症例2はシステインリッチ・CUB2ドメインの組み合わせで、2例とも、酵素活性発現に関わる部位とよりC末端側の部位の変異を含んでいた。

ADAMTS13遺伝子変異と表現型との関連性は、不明なことが多い。ADAMTS13遺伝子変異部位とADAMTS13活性との関連について、細胞を用いた発現実験によると、活性測定法の感度が向上したことで、活性が絶えず0.5%未満の者とそれ以上の者では臨床症状が異なることが示された⁵⁾。

Camilleriら²²⁾は、ADAMTS13遺伝子のp. R1060Wミスセンス変異が人種特異的に後発型と関連していると報告した。その変異のホモ接合を有する白人では血漿ADAMTS13活性が5%未満となる。Taguchiら²³⁾は、USS日本人のp. C1024Rミスセンス変異のホモ接合体は、アジア人特異的な後発型となることを示した。その症例は77歳でUSSと診断された、高感度発色性分析法で、血漿ADAMTS13活性は中等度減弱していた(2.4~3.4%)。試験管内で、p. C1024R変異でコードされたプラスミドを遺伝子導入したHeLa細胞による発現実験では、培地に変異蛋白が分泌されたが、野生型蛋白に比べて有意に少量であった。さらに、p. C1024R変異蛋白分泌物の活性は野生型蛋白の3倍であり、p. C1024Rが機能獲得型変異であることが示された。これらのデータより、この症例は、小児期はUL-VWF放出の強い刺激がない限り、TTP予防可能なADAMTS13活性レベルであったと思われる。しかし、正常例でも加齢とともにADAMTS13活性レベルは徐々に低下する一方、血漿VWFレベルは上昇する²⁴⁾。よって、USS患者は、基質レベルの増加(VWF多重体増加)とADAMTS13酵素活性の低下のバランスが崩れて、血栓形成促進状態となり、TTP発作を起こしやすくなる。このようにADAMTS13活性の軽度~中等度減弱により、後発型となる可能性がある。

一般的にTTP発作は、妊娠、重症感染症、大量飲酒などサイトカインが増加するような様々なきっかけで生じると考えられており⁴⁾、生来のADAMTS13遺伝子異常に加えて、こうした環境因子や何か別の遺伝的要因がUSS患者の臨床経過の多様性の成因と推測される。Veyradier²⁵⁾らは、家系内で同じ遺伝子変異を有しながら、症状の異なる同胞例を報告した。イントロン8エクソン8の欠失(c. 825-?_?del 29bp)とp. C758R(c. 2272 T>C, exon 19)のADAMTS13遺伝子変異の複合ヘテロ接合体である患者は14歳男児で慢性溶血と血小板減少を呈し、継続的な血漿療法が必要である、一方18歳の姉は新生児期の溶血と変動性の軽度血小板減少(8万/ μ l)の他には無症状で治療を要しない。このことから、未解明の遺伝因子や環境因子の関与を示唆した。

これまでの研究では、遺伝子異常と、臨床経過などの表現型との間には、未だ特定の関連性を認めていない。解明を目指して国際的な臨床登録が始まっている。本研究では新たな2遺伝子異常を検出し得た。まだ小児である2症例が今後、どのような経過をたどるか、経過観察で得られる知見を含め、さらに症例が集積されることで、腎障害、脳血管障害の起り易さなど長期予後と遺伝子異常との関連を含めた病態解明の進展が期待される。

謝辞

本研究の実施にあたり、多大なご支援をいただきました奈良県立医科大学輸血部の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1 Schulman I, Pierce M, Lukens A, Currimbhoy Z: Studies on thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood* 1960; 16: 943-957
- 2 Upshaw JD Jr.: Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1978; 298: 1350-1352
- 3 Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al.: Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413: 488-494
- 4 Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, et al.: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Throm Haemostat* 2011; 9(Suppl 1): 283-301
- 5 Lotta LA, Garagiola I, Palla R, Cairo A, Peyvandi F: ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum Mutat* 2010; 31: 11-19
- 6 宮田敏行, 小亀浩市, 小久保喜弘: 【ADAMTS13と臨床検査】先天性ADAMTS13欠損症. *臨床検査* 2013; 57: 556-561
- 7 Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H, Yoshioka A, Matsui T, Titani K: Von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. *Int J Hematol* 2002; 75: 25-34
- 8 Furlan M, Lammle B: Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of von Willebrand factor-cleaving protease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 437-454
- 9 Bartlett A, Dormandy KM, Hawkey CM, Stableforth P, Voller A: Factor-VIII-related antigen: measurement by enzyme immunoassay. *Br Med J* 1976; 1: 994-996
- 10 Matsumoto M, Kawaguchi S, Ishizashi H, Yagi H, Iida J, Sakaki T, et al.: Platelets treated with ticlopidine are less reactive to unusually large von Willebrand factor multimers

than are those treated with aspirin under high shear stress. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2005; 34: 35-40

- 11 Ruggeri ZM, Zimmerman TS: Variant von Willebrand' s disease: characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J Clin Invest* 1980; 65: 1318-1325
- 12 Budde U, Schneppenheim R, Plendl H, Dent J, Ruggeri ZM, Zimmerman TS: Luminographic detection of von Willebrand factor multimers in agarose gels and on nitrocellulose membranes. *Thromb Haemost* 1990; 63: 312-315
- 13 Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y: Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 2006; 46: 1444-1452
- 14 Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Soejima K, Nakagaki T, Fujimura Y: Quantitative Western blot analysis of plasma ADAMTS13 antigen in patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res* 2007; 120: 381-386
- 15 Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, et al.: Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11902-11907
- 16 Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Miura M, Hayashi S, Fujii Y, et al.: Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood* 2004; 103: 1305-1310
- 17 Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, et al.: Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest* 1996; 97: 493-500
- 18 Wilkie ME, Stevens CR, Cunningham J, Blake D: Hypoxia-induced von Willebrand factor release is blocked by verapamil. *Miner Electrolyte Metab* 1992; 18: 141-144

- 19 Kinoshita S, Yoshioka A, Park YD, Ishizashi H, Konno M, Funato M, et al. : Upshaw-Schulman syndrome revisited: a concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2001; 74: 101-108
- 20 Camilleri RS, Scully M, Thomas M, Mackie IJ, Liesner R, Chen WJ, et al. : A phenotype-genotype correlation of ADAMTS13 mutations in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura patients treated in the United Kingdom. *J Thromb Haemost* 2012; 10:1792-1801
- 21 飯島かおり : 高ずり応力はADP凝集を減弱させる. *日本血栓止血学会誌* 1995; 6:341
- 22 Camilleri RS, Cohen H, Mackie IJ, Scully M, Starke RD, Crawley JT, et al. : Prevalence of the ADAMTS13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Throm Haemostat* 2008; 6: 331-338
- 23 Taguchi F, Yagi H, Matsumoto M, Sadamura S, Isonishi A, Soejima K, et al. : The homozygous p.C1024R--ADAMTS13 gene mutation links to a late-onset phenotype of Upshaw- Schulman syndrome in Japan. *Thromb Haemost* 2012; 107: 1003-1005
- 24 Kokame K, Sakata T, Kokubo Y, Miyata T: von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Throm Haemostat* 2011; 9: 1426-1428
- 25 Veyradier A, Lavergne JM, Ribba AS, Obert B, Loirat C, D. Meyer D, et al. : Ten candidate ADAMTS13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J Thromb Haemost* 2004; 2:424-429



図1 症例1の臨床経過

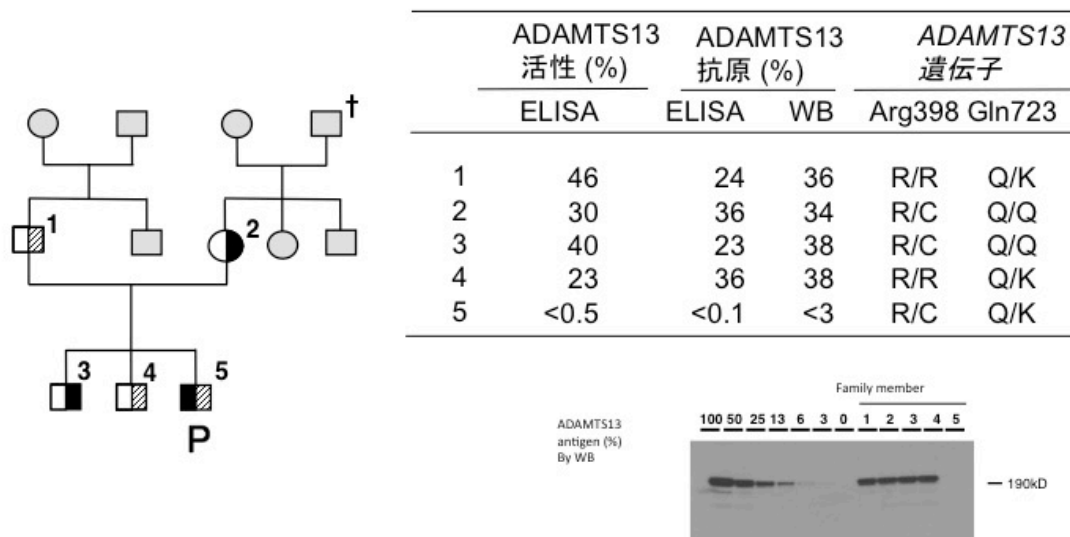


図2 症例1の家系図とADAMTS13解析

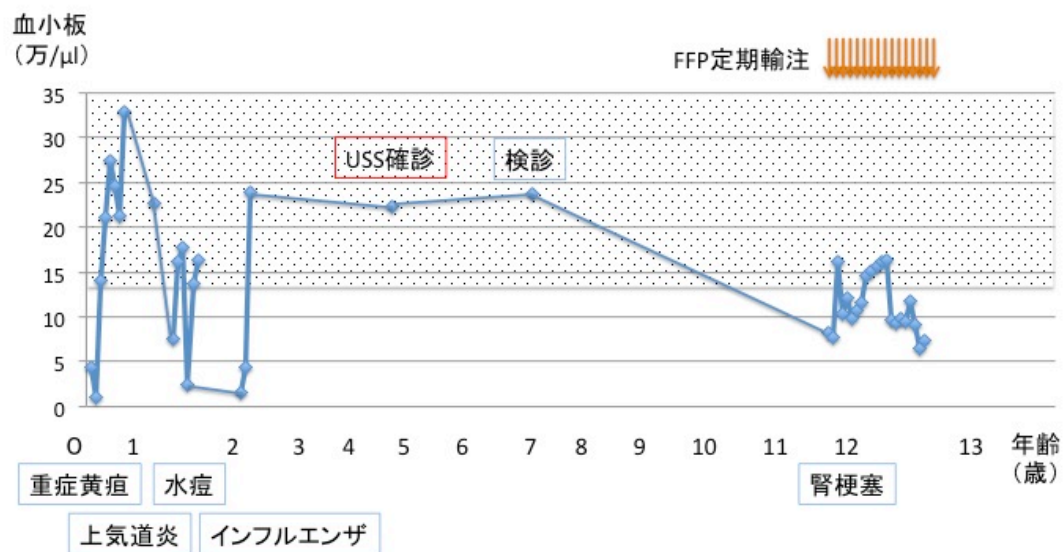


図3 症例2の臨床経過

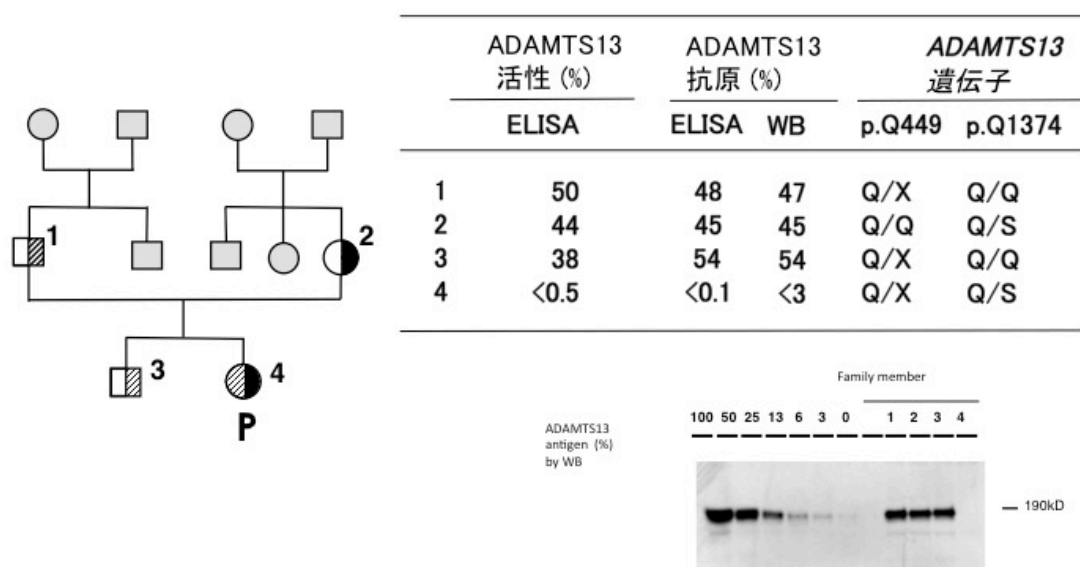


図4 症例2の家系図とADAMTS13解析

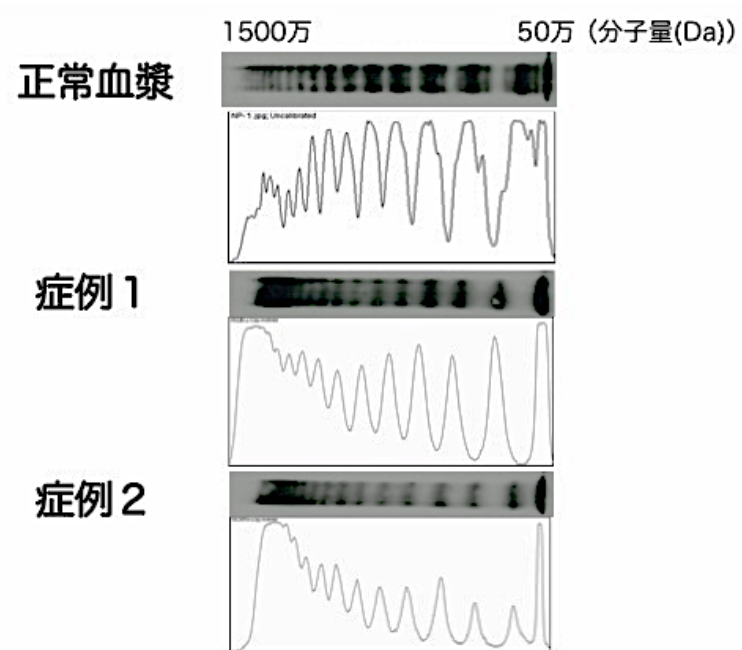


図 5 VWF多重体解析

図表の説明

図1 症例1の臨床経過。2歳9か月時にUSSと診断した。2週間毎に予防的FFP輸注を行い、反応性の血小板数上昇を認めた。

IVIg ガンマグロブリン静注療法; Pulse、ステロイドパルス療法; PSL、プレドニゾロン内服。

図2 症例1の家系図とADAMTS13解析。症例1は「5」と示した発端者。父母、兄2人は無症候性保因者である。□は男、○は女を示す。灰色の者は未検査である。十字記号は故人を示す。

ADAMTS13活性は活性ELISA法で測定し、ADAMTS13レベルは抗原ELISA法とウェスタンブロット法で測定した。結果は、正常に対する百分率で示した(右上)。ADAMTS13の変異は、アミノ酸一文字に省略した。患者家族の血漿ADAMTS13抗原をウェスタンブロット法で測定した(右下)。

図3 症例2の臨床経過。新生児期重症黄疸で交換輸血を受けたにも拘らず、新生児期以降は症状が軽度でありFFP定期輸注をせず経過観察した。12歳時に腎梗塞を発症した。

図4 症例2の家系図とADAMTS13解析。症例2は「4」と示した発端者。父母、兄は無症候性保因者である。

ADAMTS13活性は活性ELISA法で測定し、ADAMTS13レベルは抗原ELISA法とウェスタンブロット法で測定した。結果は、正常に対する百分率で示した(右上)。ADAMTS13の変異は、アミノ酸一文字に省略した。患者家族の血漿ADAMTS13抗原をウェスタンブロット法で測定した(右下)。

図5 軽快期のUSS患者のVWF多重体解析。正常血漿では、バンドは三重構造となる(上段)が、患者の血漿VWF多重体バンドは単一で対称性である(中段は症例1、下段は症例2)。さらに、患者血漿では正常に比べて、高分子量VWF多重体の割合が高かった。