

輸血部の「異端児」から「風雲児」へ

藤村 吉博¹⁾²⁾

キーワード：VWF, ADAMTS13, TMA コホート, 異端児, 風雲児

はじめに

卒業後 10 年間、小児科臨床医として血友病などの先天性出血症の治療に当たっていた。その傍ら、止血蛋白の精製やこれらに対する抗体産生などの基礎研究をしていた。1984 年に米国 NIH 国際奨学生として Scripps 研究所 (La Jolla) に留学する機会を得た。ボスは Theodore S. Zimmerman 博士であった。研究テーマは von Willebrand 因子 (VWF) の構造機能相関で、途中から University of Washington (UW, Seattle) の千谷晃一教授と共同研究をすることになった。3 年間の留学期間中に VWF の「血小板膜糖蛋白 GPIb に結合するドメイン¹⁾」を同定した。これは今日「VWF-A1 ドメイン」と言われている。帰国に際してボスと話し合い、共同研究は続けるが、競争を避けるために「VWF 結合蛇毒ボトロセチン」の研究をすることになり、同時期に帰国し、愛知の藤田医大教授に就任される千谷先生と研究を継続することを示唆された。

輸血部と蛇毒

1987 年初頭に帰国し、職場は医師定員 1 名の奈良医大輸血部 (講師, 副部長) で、他に技師 3 名、看護師 1 名がおり研究機材はなかった。藤田医大の客員講師になり、毎月 2 泊 3 日の日程で千谷ラボに研究出張することにし、これは約 5 年間続いた。輸血部長は小児科教授が兼任しており、私が出張時は同部長が対応して頂いた。当時、血友病の HIV 感染が大きな社会問題となっていたが、検査試薬が市販化されておらず、多くの血友病患者を抱える小児科では大変困っていた。しかしホルマリン不活化された凍結乾燥 HIV は米国から輸入可能ということが分かり、これを用いて電気泳動と western blot で検出できることを小児科助教授と共に県に提案し、臨時の予算で必要な機材一式の購入と

設備改装をしてもらえた。このレスポンスの早さは県立医大の所以であると思った。この検査に薬剤師資格の技師 1 名の協力を得て、「血友病患者の約 40% が HIV 既感染である」との結果を示した。これ以降の新規検体は殆どなかったため、購入頂いた研究機器は VWF 研究に転用した。

千谷先生との蛇毒研究は軌道に乗り、奈良医大と藤田医大の双方で数名の研究生を確保し、複数の蛇毒蛋白の精製、構造解析にて、その成果は彼らの学位論文となった²⁾。「業績の蓄積」、「関係各位のサポート」、そして「輸血部を起点にして小児科と第二内科に骨髓移植体制を確立する」という大義で、新設された輸血部教授に昇進し、専任助手 1 名が追加された。この助手には内科出身の医師が就任し、自家末梢血幹細胞移植の確立や臍帯血バンク設立に向けて幹細胞凍結保存などを担当した。

ある時某教室の秘書さんが怪訝な顔で、「藤村先生、輸血部で毒蛇飼っていらっしゃるって本当ですか？」と質問された。元来少し焦点のズレた方だったが、この質問で私の蛇毒研究の熱は急に冷めた。そこで、「より人間に近いものを」ということから、胎盤にある血小板凝集阻害物質に注目した。「蛇毒に構造が類似した抗血栓物質の発見」を期待していたが、臍帯血採取後の胎盤から精製し、解析すると「CD39 の胎盤型 isoform³⁾⁴⁾」であることが判明したので、科学的興味を失った。

VWF 切断酵素/ADAMTS13

次に興味を持ったのが 1996 年の Blood に掲載された Furlan らの論文⁵⁾である。これによると、わずか 50ml の血漿から電気泳動で可視的レベルまで VWF 切断酵素 (VWF-CP) を部分精製できるという。廃棄予定の血漿は輸血部に豊富にあるのと、蛋白精製には実績があっ

1) 奈良県立医科大学名誉教授

2) 日本赤十字社近畿ブロック血液センター相談役兼特別研究員
連絡責任者：藤村 吉博, E-mail : fujimurayoshihiro@gmail.com

〔受付日：2024 年 8 月 5 日, 受理日：2024 年 8 月 15 日〕

たので、これに飛びついた。しかし、酵素活性はVWFマルチマー (VWFM) 解析法で実施していたので、クロマト分離後、各分画の酵素活性の結果を得るのに略1週間必要で、これを3~4回繰り返すと、操作中に酵素活性は完全に消失した。振り返ってみると、この理由はクロマト操作中にフィブリンが析出してカラム操作不能となるため、フィブリノーゲンの事前除去を目的に、血漿をトロンビンとCa²⁺で処理して、一旦凝固させ、その上清を使うというFurlanの方法に準拠したためである。後年、VWF-CP (ADAMTS13) はトロンビンやプラスミンなどのserine proteaseで分解されることが示されたので、精製過程での酵素活性消失は当然のことであった⁶⁾。「他者の論文を信じてはいけない」という教訓にもなった。

最終的には出発材料の血漿量は5,000mlまで増えたが、精製蛋白は得られなかった。この間に、同酵素のcDNA cloningは製薬会社が既に終了しているとの風聞が入り体の力が抜けた。実際この時点で、成功していたのは外国のB社と本邦のK社(後述)であった。B社はFurlanらと協力し、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)患者にできたVWF-CPに対するインヒビター(IgG)を固相化したカラムで酵素を精製した。しかし精製品は電気泳動で数本のバンドからなり、分解物も混じっていると判断された⁷⁾。またK社は部分精製した酵素分画をSDS処理し、調製用電気泳動装置で分子量に応じて分画し、同時に酵素活性を測定して目的蛋白を同定していた⁸⁾。両社共に得られたN末端アミノ酸配列Ala-Ala-Gly-Gly-Ile-LysからcDNA cloningに成功している⁷⁻⁹⁾。しかしこの酵素をクロマトで芸術的に精製し、これが電気泳動で分子量15万の一本鎖糖蛋白であることと、前記N末端アミノ酸配列を同定したのはUWの藤川和夫先生ら¹⁰⁾であった。彼らはこの論文を某雑誌に投稿したところ、査読を担当したWashington University (St Louis) のJ. Evan Sadler教授が共同研究を申し込みADAMTS13-cDNA cloningに成功している¹¹⁾。因みに、千谷-Sadler-藤川の3名はいずれもUW生化学教室のEarl Davie教授の一門で、お互いよく知っている間柄だった。

TMA コホート解析に向けて

VWF-CP 活性

1998年にVWFM解析によるVWF-CP活性の測定を始めた。これは1997年のFurlanらの論文¹²⁾に準拠したものである。測定系は、精製VWFを基質として、反応混液に「尿素(1.5mol/l)を加えて、この混液を2価陽イオン(Ba²⁺)を含む低イオン強度緩衝液に対して透析し、37°Cで24時間酵素反応を行う」というものである。尿素と低イオン強度はVWFMの分子型を球型から進展

型に変化させ、VWF-A2ドメイン内の切断部位を分子表面に露出させる効果がある。

彼らは「慢性再発性TTP患者のVWF-CP活性が著減しており、これが診断の決め手になる」ことを報告したが、「両親や同胞の活性は正常である」と報告していた。我々は新生児領域で良く知られていた「Coombs試験陰性で、原因不明の新生児期重症黄疸で交換輸血を必要とする謎の出血症」とされたUpshaw-Schulman症候群(USS)患者の3家系を調べ、患者は全て活性が3%以下、その両親はいずれも50%以下であったことから、「本症は先天性TTPで常染色体潜性遺伝を示す」ことを示した。この結果を親交のあった前記のSadler教授にメール連絡したところ、彼はとても驚いてBlood雑誌への投稿を勧め、英文校正もしてくれた。2000年12月に同誌に投稿したが、査読期間が3~4カ月間に引き延ばされ、ようやく返って来た返事は「採択不可」であった。理由は、「一人のUSS患者の父はヘテロ接合体の筈なのに活性が5.6%というのはあまりにも低く、示された結果を信頼できない」というものであり、さらに「ADAMTS13は最近クローニングされたので、あなたたちの論文はもはや必要ない」という文言が付け加えられていた。やむなくInt J Hematolに投稿し、2001年の7月号に掲載された¹³⁾。そして、同年10月号のNatureにLevy-Ginsberg¹⁴⁾が「慢性再発性TTPの患者家系のpositional cloningでVWF-CPがADAMTS13であること」を発表した。文中に「この遺伝性TTPは従来原因不明の出血症とされたSchulman-Upshaw症候群と同じと考えられる」という記載も添えられていた。この経験を通して、「オリジナリティの高い論文は国内の英文誌に先に投稿しておくことの重要性」を感じた。実際、国内研究者でADAMTS13のcDNAクローニングに成功したのは前記K社(化学血清療法研究所:現在のKMバイオロジクス)の副島見事博士らで、彼らの論文は本邦英文誌のJournal of Biochemistry (Tokyo)⁸⁾に掲載されているがGoogle scholar 433と高い評価を受けている。

P475S

USSについてADAMTS13の遺伝子解析が必須となり、国立循環器病センター研究所(国循)の宮田敏行と小亀浩市の両先生を巻き込んで実施した。この中で前記のVWF-CP活性で5.6%と低値を示したUSS父親にADAMTS13-P475S変異が発見され、これは日本人の約10%のアレルに見られるSNPであることが判明した¹⁵⁾。実際、奈良医大の輸血部実習生について測定したところ、1名が血栓症状は全くないのに、活性は3%以下であった。後日、この学生はP475Sホモ変異であること、両親はそれぞれそのヘテロ接合体であることが判明した。P475Sは尿素による立体構造変化に抵抗性

を示すためと考えられる。実際、その後開発された ELISA などでは全く正常活性を示した、この P475S 変異は現在、東北アジア人のルーツを調べる法医学的検査にも利用されている¹⁶⁾。

TMA 解析センター

VWF を用いた VWF-CP 活性測定が有名となり、全国から血栓性微小血管症 (TMA) 患者の相談が来るようになり、患者検体が送られて、奈良医大輸血部は本邦の TMA 解析センターとなった。また 2006 年には ADAMTS13 活性測定の ELISA¹⁷⁾ を完成し、TTP の患者登録数は大きく増加した。この間、肝臓内科の植村正人先生を巻き込み血漿 ADAMTS13 産生臓器が肝臓であり、その肝星細胞であることを明らかにした¹⁸⁾。続いて肝硬変の重症度と ADAMTS13 活性低下の相関を明らかにするなどの結果¹⁹⁾を得て、奈良医大の 4 名(藤村、松本、杉本、植村)と国循の 2 名(宮田、小亀)の 6 名が「2008 年度のベルツ賞銀メダル²⁰⁾」を受賞することになった。

一方、この頃から aHUS の存在が目されるようになった。「奈良のこの TMA コホートの中に aHUS 患者がいるのではないかと考えて私のラボを訪問してきたのは A 社であった。これは丁度、新規の抗補体薬を販売するに当たって患者をリクルートする目的であったと思う。そこで、福島医大免疫学の藤田禎三先生に面談し、ご相談したところ、彼は即座に冷凍庫に保存していた「家兎に免疫して作った抗 CFH (complement factor H) 抗体 (約 50ml)」をご恵与下さった。これを用いてコホート検体の中で CFH 蛋白欠損症をスクリーニングしたが、患者は一名も発見できなかった。しかし、この抗体を用いて CFH 蛋白を精製し、新たに兎抗体とマウスに免疫してモノクローナル抗体を 6 種類作成した。一方、信州大学の日高先生ら²¹⁾が羊赤血球を用いる Sanchez-Corral ら²²⁾の溶血アッセイを用い、本邦初の CFH 遺伝子異常症を同定したと報告されたので、我々もこの溶血アッセイを導入することにした。この時、前記の抗 CFH モノクローナル抗体 6 種を調べたところ、2 種類の抗体が著しく溶血亢進を起こすことを確認した。そしてその程度は後に発見された CFH 遺伝子異常症の血漿で見られる溶血と同等であったので、これを 100% 溶血として「定量的溶血アッセイ」なるものを構築した²³⁾。これは、Sanchez-Corral らの原法では「100% 溶血は蒸留水を加えて赤血球数を 0 にした状態」と定義していたが、「赤血球数が 0 の TMA 患者はいない」という私の臨床医らしい発想からである。この溶血アッセイを用いると aHUS 患者の約 25% が陽性を示すので、患者発見のスクリーニング検査には有効であった。さらに国循の宮田敏行先生に aHUS の遺伝子解析を担当して頂き、研究は一挙に進んだ。2020 年以降は

「aHUS の包括的遺伝子解析」が保険診療として認められ、カズサ DNA 研究所 (千葉県) で実施されている。

この TMA 解析センターで集積した患者数は 2013 年末で 1,251 例になった (Fig. 1)。私は翌年 3 月に大学を退官し、奈良県赤十字血液センターに移り、その翌年からは日本赤十字社近畿ブロック血液センター勤務となった。TTP の診断は ADAMTS13 活性が測定できれば、その活性著減で即診断できるので、TTP コホート研究は引き続き奈良医大輸血部 (松本雅則教授、酒井和哉先生) で行うが、aHUS は様々な補体因子の遺伝子異常の集合体で診断が難しく、また適切な処置を迅速にしないと、末期腎不全に陥り易いことから腎臓専門医にお願いするのが良いと考え、東大腎臓内科の南学正臣教授にお願いした。以後、2014~2019 年の間は東大 (加藤秀樹先生) で、そして 2020 年からは名古屋大学腎臓内科 (丸山彰一教授、加藤規利先生) で aHUS コホート研究が実施されている。

輸血部の「異端児」から「風雲児」へ

自らを「異端児」と思わせる他者からのネガティブな言葉は、「VWF は輸血ですか?」、「輸血部で蛇毒研究など、勝手なことをしている」、「輸血関連シンポジウムの主催を辞退した」、「輸血学会の指名役員継続を辞退するとはけしからん」、などである。しかしある時から風向きが変わり「風雲児」に変化した。これについてポジティブな言葉を頂いたのは以下の代表 2 名である。一人は、九州大学輸血部の稲葉頌一先生で、「先生が今やっている VWF-CP は皆注目しているよ」という励ましのお言葉だった。もう一人は、東京女子医大の清水勝先生で、お言葉は、「初めは嫌いだっけど、立派な懇親会をしたので、今はとても好きだよ!」と、すごく分かりやすいコメントであった。

先日、私の長年の友人である名古屋大学輸血部前教授の T 先生に会った。彼は会うやいなや、「先生は在任中、輸血のことは何もしなかったけど、輸血学会総会と懇親会が一番豪華で立派なものをしたなど皆言っているよ!」と挨拶された。調子のいい方なので、言葉の信頼性は疑うが、私の輸血部での業務評価はやはりこの程度だったのかな? と少し気落ちしていた。しかし今年度、思いがけず、第 60 回献血運動推進全国大会 (岐阜県) で「昭和天皇記念学術賞」を受賞した。これは輸血のことを何もしなかった「異端児」が、輸血の学術研究には貢献したという評価を得て「風雲児」になったのだと改めて自分を説得した。

結 語

明治時代、日本に西洋医学の導入に貢献した「ベルツ博士が書いた日記²⁴⁾」をベルツ賞の受賞後に読んだ。

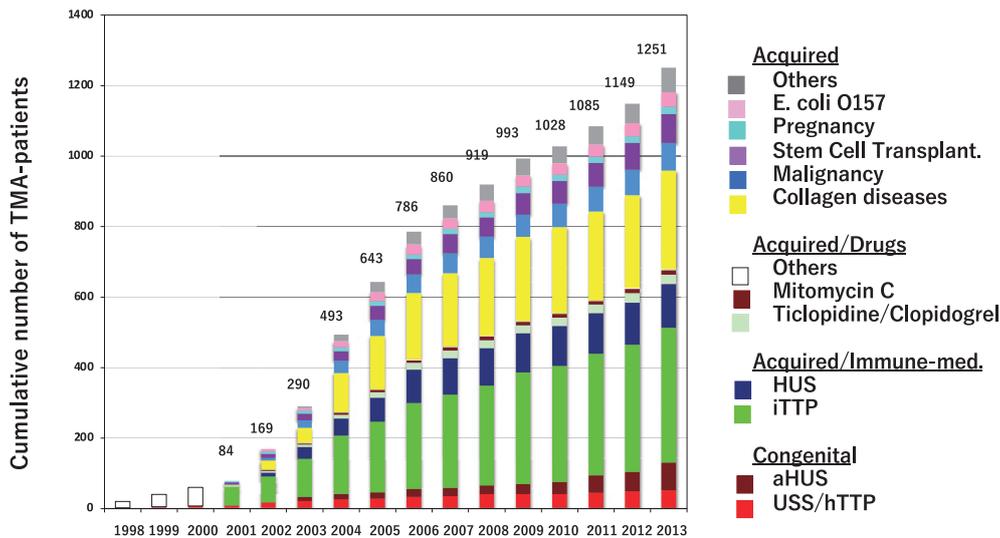


Fig. 1 Cumulative number of cohort patients with TMAs between 1998-2013 in Department of Blood Transfusion Medicine of Nara Medical University

Patient specimens with suspected TMA have been sent from medical institutions all over Japan, together with medical information. Measurements of VWF-CP/ADAMTS13 activity were started in 1998, initially using VWF multimer assay, which required a week to obtain results. Since 2005, ADAMTS13 activity has been measured by chromogenic ADAMTS13-act-ELISA, and then the turn-around time has been dramatically shortened to 1-2 days after receiving the specimen. The hemolytic assay using sheep erythrocytes was introduced in 2011 to diagnose aHUS. Thus, before 2011, aHUS has been categorized as 'congenital TMA of unknown cause', with normal ADAMTS13 activity but with the presence of clinical signs for congenital TMA.

これには、「日本人は西洋人が500年をかけて培ってきたものをわずか10年足らずで吸収してしまったが、それで満足し、それに至る経緯を理解しようとしないう一節があった。これには共感を覚え、最近、「研究は南京玉簾のようなものである」とつくづく思う。

著者のCOI開示：ADAMTS13活性測定ELISAの特許権(AI-fresa Pharma)

文献

- 1) Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, et al: von Willebrand factor: A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem*, 261: 381—385, 1986.
- 2) Fujimura Y, Kawasaki T, Titani K: Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*, 76: 633—639, 1996.
- 3) Makita K, Shimoyama T, Sakurai Y, et al: Placental ecto-ATP diphosphohydrolase: its structural feature distinct from CD39, localization, and inhibition on shear-induced platelet aggregation. *Int J Hematol*, 68: 297—310, 1998.
- 4) Matsumoto M, Sakurai Y, Kokubo T, et al: The cDNA cloning of human placental ecto-ATP diphosphohydrolases I and II. *FEBS Letters*, 453: 335—340, 1999.
- 5) Furlan M, Robles R, Lämmle B: Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*, 87 (10): 4223—4234, 1996.
- 6) Hiura H, Matsui M, Matsumoto M, et al: Proteolytic fragmentation and sugar chains of plasma ADAMTS13 purified by a conformation-dependent monoclonal antibody. *J Biochem*, 148 (4): 403—411, 2010.
- 7) Gerritsen HE, Robles R, Lämmle B, et al: Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*, 98 (6): 1654—1661, 2001.
- 8) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, et al: A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem*, 130 (4): 475—480, 2001.
- 9) Plaimauer B, Zimmermann K, Völkel D, et al: Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*, 100 (10): 3626—3632, 2002.

- 10) Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, et al: Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*, 98 (6): 1662—1666, 2001.
- 11) Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al: Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*, 276 (44): 41059—41063, 2001.
- 12) Furlan M, Robles R, Solenthaler M, et al: Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 89 (9): 3097—3103, 1997.
- 13) Kinoshita S, Yoshioka A, Park Y-D, et al: Upshaw-Schulman syndrome revisited: A concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol*, 74: 101—108, 2001.
- 14) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al: Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 413: 488—494, 2001.
- 15) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al: Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 11902—11907, 2002.
- 16) Nakagawa M, Matsusue A, Umetsu K, et al: Genotyping of the c.1423C > T (p.P475S) polymorphism in the ADAMTS13 gene by APLP and HRM assays: North-eastern Asian origin of the mutant. *Leg Med (Tokyo)*, 21: 1—4, 2016.
- 17) Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, et al: Novel monoclonal antibody-based immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion*, 46: 1444—1452, 2006.
- 18) Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al: Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*, 106: 922—924, 2006.
- 19) Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, et al: Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost*, 99 (6): 1019—1029, 2008.
- 20) 藤村吉博, 松本雅則, 植村正人, 他: 第45回ベルツ賞受賞論文: 動脈血栓症の制圧—VWF/GPIb 軸依存性血小板血栓を調節する ADAMTS13 の基礎臨床病態解析—. *最新医学*, 64 (2): 132—163, 2009.
- 21) Hidaka Y, Matsuoka D, Ken S, et al: Functional and genetic analysis of factor H mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *日本小児腎臓病学会雑誌*, 24 (1 Suppl.): E-203, 2011.
- 22) Sanchez-Corral P, Gonzalez-Rubio C, Rodriguez de Cordoba S, et al: Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol*, 41: 81—84, 2004.
- 23) Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, et al: A novel quantitative hemolytic assay coupled with restriction fragment length polymorphisms analysis enabled early diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome and identified unique predisposing mutations in Japan. *PLoS One*, 10 (5): e0124655, 2015.
- 24) トク・ベルツ編: 菅沼竜太郎訳: ベルツの日記(上, 下), 岩波書店.

FROM “HERETIC” TO “LUCKY ADVENTURER” IN THE BLOOD TRANSFUSION DEPARTMENT

Yoshihiro Fujimura¹⁾²⁾

¹⁾Professor Emeritus, Nara Medical University

²⁾Consultant and Special Researcher, Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

Keywords:

VWF, ADAMTS13, TMA cohort, Heretic, Lucky adventurer