

われたが、骨髄検査を施行しなかったため ITP 疑い群とした。骨髄検査の結果から 8 例は骨髄異形性症候群 (MDS)、2 例が再生不良性貧血、1 例は無巨核球性血小板減少症と診断され、これら 11 例をあわせて非 ITP 群とした。5 例は臨床症状から ITP が疑われたが、骨髄所見で巨核球が低形成であったため診断に至らなかった (未診断群)。

ITP 群 35 例と非 ITP 群 11 例で各種臨床項目について比較した (Table 1)。

Table 1. Frequencies of clinical items at entry in patients who later diagnosed as having ITP and non-ITP

Clinical items	ITP (n = 35)	Non-ITP (n = 11)	P
Sex (%male)	26%	55%	0.16
Age at visit (< 40 years)	37%	18%	0.42
Anti-GPIIb-IIIa Ab-producing B cell frequency > 2/10 ⁵ PBMC	91%	18%	0.00001
Platelet-associated anti-GPIIb-IIIa Ab > 3.3 units	57%	9%	0.01
Plasma anti-GPIIb-IIIa Ab > 5.1 units	9%	27%	0.27
Proportion of reticulated platelet > 2%	51%	9%	0.03
Plasma TPO > 300 pg/ml	9%	73%	0.00007
Leukocytopenia	14%	45%	0.07
Anemia	20%	100%	0.00001
Platelet count < 30,000/ μ l	34%	9%	0.22
Bleeding tendency	54%	27%	0.22

ITP 群で女性が多い傾向があったが、非 ITP 群との差は有意でなかった。ITP 群では初診時年齢が 40 歳未満の若年者が多い傾向があったが、有意差は得られなかった。抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度は ITP 群 35 例のうち 32 例 (91%) で増加し、非 ITP 群 11 例中 2 例 (18%) に比べて有意に高頻度であった ($P = 0.00001$)。血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体は ITP 群 57% で陽性で、非 ITP 群の 9% に比べて有意に高頻度であった ($P = 0.01$)。ただし、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体は抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度に比べて感度が低かった。一方、血漿中の抗 GPIIb-IIIa 抗体の陽性頻度は ITP 群、非 ITP 群とも

に低く、両群間で頻度に差はなかった。網状血小板比率の増加は ITP 群の 51% でみられ、非 ITP 群の 9% に比べて有意に高頻度であった。多くの ITP 例で血漿 TPO は上昇していたが、その程度は軽度で、3 例を除いて 300 pg/ml 以下であった。それに対し、非 ITP 群では 73% の症例が 300 pg/ml を越える著明な血漿 TPO の増加を認めた。血漿 TPO 300 pg/ml をカットオフとすると、著明な TPO 増加の頻度は ITP 群、非 ITP 群の間で有意な差を認めた ($P = 0.00007$)。白血球減少は非 ITP 群で多い傾向があったが、2 群間で有意な差はなかった。貧血の頻度は ITP 群で 20%、非 ITP 群で 100% で、ITP 群で有意に少なかった ($P = 0.00001$)。一方、3 万 μ l 未満の高度の血小板減少と出血傾向の頻度は ITP で高い傾向があったが、非 ITP 群との差は有意でなかった。

以上の結果から、ITP 群と非 ITP 群とで有意な差のあった以下の 5 つの臨床項目を用いた ITP の診断指針の試案を作成した。

- ① 抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度増加
- ② 血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体陽性
- ③ 網状血小板比率増加
- ④ 血漿 TPO 濃度正常または軽度上昇 (<300 pg/ml)
- ⑤ 貧血なし

この指針を今回対象とした 69 例に当てはめ、各群間で満たす項目数を比較した (Figure 1)。

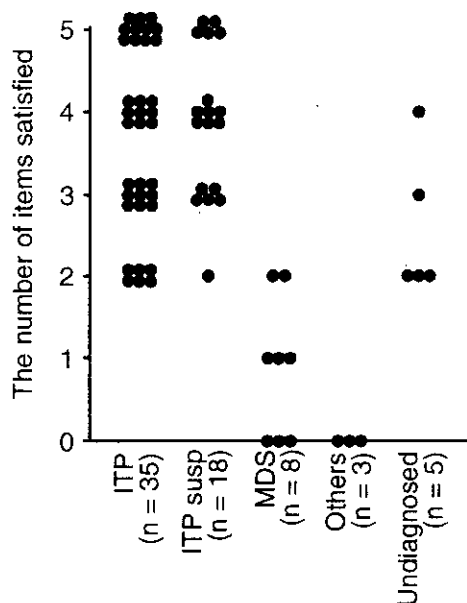


Figure 1. The number of items satisfied in patients with thrombocytopenia according to the final diagnosis

ITP および ITP 疑い群では全例が 2 項目以上満たしたのに対し、MDS 群では全例が 2 項目以下、その他(再生不良性貧血、無巨核球性血小板減少症)では 1 項目も満たさなかった。そこで、3 項目以上満たす場合を ITP とし ITP 群 35 例と非 ITP 群 11 例で検討すると、感度は 83%、特異度は 100%であった。2 項目以上を ITP とすると、感度は 100%となるが、特異度は 82%と低下した。ただし、未診断群 5 例全例が 2 項目以上を満たし、ITP 群との鑑別は困難であった。

D. 考察

今回我々は血小板減少症のために来院した患者を対象にして、ITP の診断に有用な初診時の臨床所見を抽出する前向き調査を行った。その結果、初診時の抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の増加、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体陽性、

網状血小板比率増加、血漿 TPO 正常または軽度上昇、貧血なしの 5 項目は ITP の診断と相関することが示された。ひとつの試みとして、ITP と関連する 5 つの臨床項目による診断指針を作成した。その結果、ITP を ITP 以外の疾患と鑑別することが可能であった。このようなアプローチが ITP の積極的な診断基準の作成に有用と考えられる。現在、本研究班を通じて多施設における同様の検討が進行中であり、その結果が待たれる。

現時点で抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞、血小板結合抗 GPIIb-IIIa 抗体、網状血小板比率、血漿 TPO は臨床検査として一般診療でオーダーできない。網状血小板比率、血漿 TPO に関しては市販のキットや標準化試薬があり、保健収載されれば一般臨床検査室での測定がすぐにも可能となる。しかし、ELISPOT 法や血小板溶出抗体を用いた ELISA 法の確立には標準化された精製 GPIIb-IIIa 抗原が必要であり、大量生産が可能な GPIIb-IIIa のリコンビナント蛋白の作成やそれを用いた測定キットの早急な開発が必要である。

E. 結論

抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体、網状血小板比率、血漿 TPO 濃度を組み合わせることで、感度、特異性の高い ITP の診断指針の作成が可能であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, and Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J. Immunol.* 2002; 168: 3675-3682.
- 2) Kuwana M, Okazaki Y, Kajihara M, Kaburaki J, Miyazaki H, Kawakami Y, and Ikeda Y. Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 2148-2159.
- 3) Kuwana M, Kawakami Y, and Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2003;101: 621-623.
- 4) 桑名正隆: 血小板減少症と抗リン脂質抗体、抗血小板抗体. *リウマチ科*, 28: 340-347, 2002.

学会発表

- 1) 桑名正隆、池田康夫: ステロイド/ 摘脾抵抗性 ITP-CD40 リガントを標的とした治療. 第44回日本臨床血液学会総会(横浜). 2002. 9.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者2家系の遺伝子解析:原因変異と多型

分担研究者 宮田敏行(国立循環器病センター研究所)

研究要旨

フォンビルブランド因子(VWF)は、主に血管内皮細胞で合成され、高分子量マルチマーとして血中に放出される。通常、このマルチマーは血漿中に存在するVWF切断酵素(VWF-CP)によって低分子量化され、その機能が制御される。先天的あるいは後天的要因によるVWF-CP活性の低下は、異常高分子量マルチマーVWFによる血小板凝集を亢進させ、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)を引き起こす。2001年、ヒトVWF-CPをコードする遺伝子ADAMTS13が明らかにされた。我々は、先天性TTP患者2家系の遺伝子解析を行い、機能に影響を及ぼす4か所のアミノ酸変異R268P・Q449X・P475S・C508Yを同定した。これらVWF-CP変異体を培養ヒト細胞に発現させると、R268P及びC508Y変異体は細胞外へ分泌されなかった。一方、Q449X及びP475S変異体は、正常に分泌されるものの、その酵素活性は著しく低下していた。これらの変異を日本人364名に対して調査した結果、R268P・Q449X・C508Yは稀有であるのに対し、P475Sはアレル頻度5.1%の多型であった。すなわち、日本人の約1割においてVWF-CP活性が約半分に低下していると考えられた。今後、P475S多型と血栓性疾患との関連が注目されるであろう。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)は、血小板数減少・細小血管障害性溶血性貧血・腎機能障害・発熱・動揺性精神神経症状を5徴候とする全身性の疾患である。TTPは、常染色体劣性遺伝を示す先天性と孤発性の後天性に分類される。放置すれば致死率9割以上といわれるが、血漿交換によって治療できることが知られて以来、致死率は減少している。

血小板血栓は、フォンビルブランド因子(VWF)が血管壁の損傷によって露

出したコラーゲンや、血小板表面に存在する糖蛋白質に結合することにより生じる。このVWFは血管内皮細胞で合成分泌される。分泌直後のVWFは巨大マルチマーで、マルチマーのサイズが大きいほど血小板凝集能は強い。通常、血漿中のVWF切断酵素(VWF-CP)によってTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶間が切断され、様々なサイズのマルチマーとして血中を循環する。VWF-CPは、一次構造上ADAMTSメタロプロテアーゼファミリーに属し、ADAMTS13と呼ばれる。この酵素の先天性欠損症や後天性の抗体保有患者は、血漿に巨大

VWF マルチマーが存在し、過剰な血小板凝集が起こる。

本研究では、先天性 TTP 患者2家系の ADAMTS13 遺伝子を解析し、原因変異を同定するとともに、酵素活性の消失を伴う遺伝子多型を同定した。

B. 研究方法

患者および家系構成員の末梢血液から DNA を調製し、ADAMTS13 の全エキソン領域を PCR 法にて増幅後、塩基配列を決定した。また、同定した変異を有する ADAMTS13 cDNA を作成し、HeLa 細胞をトランスフェクションし、変異体の分泌および活性をウェスタンブロット法もしくは VWF 分解酵素活性測定法にて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、試料採取施設および国立循環器病センターにて倫理面での審査をうけ承認された。また、遺伝子解析研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日)」を遵守して行った。

C. 研究結果

先天性 TTP2家系の ADAMTS13 遺伝子を解析した。家系 A は、発端者に加え、父・母・姉の遺伝子を解析した。その結果、父(活性 5.6%)に R268P 変異と P475S 変異、母(活性 36%)に C508Y 変異と Q448E 変異、姉に(活性 30%)に P475S 変異、発端者に(活性 0.3%以下)に R268P 変異、C508Y 変異、Q448E 変異をそれぞれ同定した。

家系 B は、発端者とその両親の遺伝子解析を行った。その結果、発端者は Q449X 変異のホモ接合体であり、両親は本変異のヘテロ接合体であることが判明した。

これらの5つの変異体を HeLa 細胞にて発現させたところ、R268P 変異体および C508Y 変異体は細胞外に分泌されなかった。一方、P475S 変異体、Q448E 変異体、Q449X 変異体は分泌された。次に培養上清を用いて活性を測定したところ、P475S 変異体は極めて弱いながらも活性が認められた。Q448E 変異体は正常の活性を示し、Q449X 変異体は活性がなかった。国立循環器病センターの腎・高血圧部門の患者 364 名で5つの変異の有無を調べたところ、R268P, Q449X, C508Y の各変異は見出せなかったが(ヘテロ接合体率、0.3%以下)、P475S 変異は 35 人のヘテロ体、1 人のホモ体(ヘテロ接合体率、9.6%)、Q448E 変異は 125 人のヘテロ体、8 人のホモ体(ヘテロ接合体率、31.2%)に見られた。

D. 考察

本研究の結果、先天性 TTP の原因変異は R268P, C508Y(ともに家系 A)、および Q449X(家系 B)であり、これらの変異をもつ VWF-CP は、細胞外に分泌されない、もしくは分泌されても VWF 分解酵素活性を示さなかった。これら3変異の日本人での頻度は極めて低いと考えられた。一方、P475S 変異は日本人の約 10%がヘテロ接合体であり、

この異常分子は細胞外に分泌されるものの酵素活性は極めて低いものであった。Q448E 変異は、頻度は高いものの分泌や酵素活性に影響を与えないことが明らかとなった。

ADAMTS13 はドメイン構造をとり、N 末端にメタロプロテアーゼドメインがある。この領域が酵素活性に必須であるものの、Cys-rich ドメイン以降が欠失する Q449X 変異体や Cys-rich ドメイン内に変異を有する P475S 変異体の VWF 分解活性が消失することから、VWF という巨大な基質の Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ 結合を切断するには Cys-rich ドメインが重要であることが示唆された。

本研究で同定された P475S 変異は活性の消失を伴い、その頻度が高いことから、極めて重要な変異であると考えられる。家系 A の父親は P475S 変異と R268P 変異をもち、VWF 分解酵素は 5.6% と極端に低値を示すものの TTP を発症していない。このことから、P475S 変異のホモ接合体は先天性に TTP を発症するものではないと考えられる。しかし、このような人は何らかの血栓性のリスクに晒されていると考えられるので、今後、P475S 変異と血栓症の関連を明らかにすることは重要と考えられる。

E. 結論

先天性 TTP 患者 2 家系の遺伝子解析を行い、原因変異を同定した。また、日本人の 10% に見られ、活性の低下を伴う P475S 変異を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

K. Kokame, M. Matsumoto, K. Soejima, H. Yagi, H. Ishizashi, M. Funato, H. Tamai, M. Konno, K. Kamide, Y. Kawano, T. Miyata, Y. Fujimura : Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 11902-11907. 2002

2. 学会発表

- 1) Toshiyuki Miyata : Mutation and common polymorphism in the ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. Gordon Research Conferences. Colby College, USA, 2002.7.7-12.
- 2) 小亀浩市、松本雅則、副島見事、八木秀男、石指宏通、船戸正久、玉井晋、今野武津子、神出計、河野雄平、宮田敏行、藤村吉博: 先天性 TTP 患者家系に見出された VWF 切断酵素遺伝子の変異と日本人における多型 第 64 回日本血液学会 / 第 44 回日本臨床血液学会、横浜市、平成 14 年 9 月 12-15 日
- 3) 小亀浩市、松本雅則、副島見事、八木秀男、石指宏通、船戸正久、玉井晋、今野武津子、神出計、河野雄平、藤村吉博、宮田敏行: von

Willebrand因子切断酵素をコードするヒトADAMTS13遺伝子の変異と多型 第75回日本生化学会、京都市、平成14年10月14-17日

H. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)

1. 特許取得—国内特許出願(特許番号:特願 2002-111241)
2. 実案新案 登録
3. その他

血栓症および動脈硬化症における血液凝固 XII 因子の関与

分担研究者 村田 満

A. 研究目的

動脈硬化から血栓形成への移行については広く知られている。一方、血栓形成の亢進が動脈硬化の進展へ移行する可能性も指摘されているが、不明な点も多い。今年度は血栓形成因子の中でも、凝固因子と動脈硬化の関連について、特に血液凝固 XII 因子(FXII)とその遺伝子多型について検討した。

FX II は血液凝固における接触相に働く因子の一つであり、異物である陰性荷電体に接すると活性化されセリンプロテアーゼとなり、以降の一連の内因系凝固機序へと進む。さらには線溶系の活性化、キニン生成にも関与し、広く生体防御反応に関わっており、その増加は血栓症などの血液凝固疾患と関連していると推測される。

FX II 遺伝子の exon1 には 46C/T 多型が存在し、この多型とFX II 活性・抗原量レベルが関連(T allele で低レベル)するとの報告がある。このFX II 46C/T 遺伝子変異とFX II 因子の量の違いについてはT型では 46C→T 変異により、翻訳開始コドンATGが 5bp 上流へずれるためFX II 因子の翻訳効率の低下が生じたためと考えられている。この 46C/T 多型の出現頻度と疾患との関連についての明確な報告

はみられない。

今回我々は、(1)脳血管障害患者におけるFX II 遺伝子型の出現頻度および病型、関連因子について検討を加え、(2)2型糖尿病患者における F-XII 遺伝子型と腹部 CT 画像にて評価した大動脈硬化進展度との関連ならびにXIIa 濃度の関連を検討し、(3)2型糖尿病患者における血中XIIa 濃度と脂肪の体内分布との関連を調べ、(4)さらにF-XIIの構造—機能相関の解明の為、2症例の XII 因子欠損症とその家族について、インフォームドコンセントを得た上で、遺伝子解析を行なった。

B. 研究方法

(1) インフォームドコンセントが得られた健常者 333 例(年齢 58.2±4.4 才)虚血性脳血管障害(以下CVD)患者 194 例(発症年齢 58.3±7.6 才)を対象とした。CVD の病型はアテローム血栓性脳梗塞 49 例、一過性脳虚血発作 23 例、ラクナ梗塞 122 例であった。FX II 遺伝子の多型は exon1 をターゲットとし、全血を用いたアンピダイル外試薬にてDNAのPCR増幅を行った。遺伝子型の決定はPCR産物を制限酵素Hin1 IおよびFok Iを用いたRFLP法にておこなった。

(2) 2型糖尿病患者 194 例 (男性 112

例、女性 82 例、年齢 59.3±8.8 才、BMI23.1±3.0kg/m²)を対象とし、すべての患者からインフォームドコンセントをえた。活性化 XII 因子(XIIa 濃度)は抗ヒト活性化 XII 因子ヒツジポリクロナル抗体を用いた ELISA 法にて測定した。また、患者の腹部 CT スキャン所見から解析ソフトを用いて大動脈の硬化進展度を評価し、狭窄率ならびに石灰化率で表現した。

(3) 2型糖尿病患者患者の体脂肪分布については腹部 CT スキャンで臍高の脂肪断面積を内臓脂肪(以下 V-fat)および皮下脂肪(以下 S-fat)に分け比較検討した。

(4) 2 例の XII 因子欠損症例の遺伝子解析を行った。症例1は 63 歳男性、症例2は 49 歳女性で、いずれも APTT の著明な延長により発見された。症例1、2どちらも出血症状、血栓症状はなく、XII 因子凝固活性、抗原量ともに 10%以下であった。2 症例とも循環抗凝血素および Lupus anticoagulant が陰性であった。症例 2 の子、2 名は抗原量がそれぞれ 28、43%であり、XII 因子欠損症のキャリアーである可能性が示唆された。XII 因子欠損症患者 2 名、健常人 1 名について、全血直接 PCR 法にて XII 因子遺伝子の全エクソンおよびエクソン-イントロン境界域の増幅・精製を行ない、塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

ゲノム解析に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(共通指針)に従った。学内にはこれに則った倫理委員会が設置されており、本研究に用いる試料(今後採取するもの、および既採取

試料の再利用)については既に審査が終了し、承認されている。計画の対象とする個人の人権の擁護:適切なインフォームド・コンセント、身体的安全性およびプライバシー保護など、試料等提供者の尊厳および人権を尊重した。厚生科学審議会による「遺伝子解析研究に関するガイドライン」のフォーマットを用いた同意書によって文書により同意を得た。

C. 研究結果

(1) 虚血性脳血管障害患者(CVD)におけるFXII 遺伝子多型を調べたところ、T allele でFXII 活性が低レベルとなり、その遺伝子多型が血液凝固 XII 因子レベルを決定すると考えられた。さらに、この多遺伝子型とアテローム血栓性脳梗塞が関連する可能性が考えられた。また、活性化凝固第 XII 因子(XIIa)濃度の測定意義について検討したところ、虚血性脳血管障害や閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化性疾患とコントロール群では XIIa 濃度に明らかな有意差は認められなかった。しかし、その濃度はいくつかの動脈硬化危険因子と相関があり、危険因子マーカーのひとつとなる可能性が示唆された。なお、XIIa 濃度とFXII 遺伝子多型の間にはFXII レベルと同様の関係がみられた。

(2) 2型糖尿病患者において XIIa 濃度およびFXII 遺伝子型と腹部 CT 画像にて評価した石灰化率(大動脈硬化進展度)の関連を検討したところ、ともに石灰化率に関連することが示された。

(3) XIIa 濃度と内臓脂肪・皮下脂肪との関連を検討したところ、XIIa 濃度は体脂

肪量と関連し、なかでも内臓脂肪量をより反映する可能性が示唆された。この関係は遺伝的に XIIa 濃度が高い FXII:C/C 型でより顕著であった。

(4) 症例1ではエクソン 10 に G から A への1塩基置換(392 番目のアミノ酸で Ala から Thr へのアミノ酸変異)を認めた。症例2ではエクソン 12 で G から C への1塩基置換(486 番目のアミノ酸で Trp から Cys へのアミノ酸変異)を認めた。また、症例2の子、2名はどちらもその変異がヘテロ接合体であった。

D. 考察

(1) FX II 活性、FX II a 抗原量はCVD患者のみならず、健常人でもFX II 46C/T 多型に依存していた。元来欧米人に比し、東洋人のFX II 活性・抗原量は低値となることが知られていた。これは、欧米人と東洋人のFX II 46C/T 多型の頻度に入種差がみられること、FX II 活性・FX II 抗原量・FX II a 抗原量が 46C/T 多型に依存することから説明できる。近年 Kohlerらは、冠状動脈疾患患者におけるFX II 46C/T 遺伝子多型について検討し、allele 出現頻度はコントロールと有意差を認めなかったと報告している。我々の検討でもCVD全体でみるとコントロールに比べ出現頻度に有意差はなかった。しかし、アテローム血栓性脳梗塞においてはC/C 型の頻度が高く、有意差がみられた。さらにC/C型でのFX II 活性・FX II a 抗原量の増加やAPTTの短縮がみられたことから考えあわせ、内因系凝固機序の促進が、その一因となると推測される。

これらの要因より、C/C 型がそのリスクファクターとなる可能性が考えられ、更なる検討が今後の課題である。

(2) XIIa 濃度ならびに F-XII 遺伝子型の両方が大動脈の石灰化率に関連することが示された。動脈硬化の進展には F-XII 遺伝子型が関与する可能性が示唆された。これらのことから、2型糖尿病において F-XII 遺伝子型が動脈硬化の進展のリスクになり得ること、さらに XIIa 濃度が動脈硬化病変を反映する可能性が考えられた。

(3) 血漿 XIIa 濃度は体脂肪量と関連し、なかでも内臓脂肪量をより反映する可能性が示唆された。この関係は遺伝的に XIIa 濃度が高い FXII:C/C 型でより顕著であった。そのメカニズムは今後の課題だが、ひとつには XIIa 抗原量と内臓脂肪の双方に影響する共通の要因が存在する可能性がある。

(4) 今回検討の2症例は、過去の報告例とは異なる位置のアミノ酸変異であり、どちらも未報告の症例であることが判明した。この2症例の XII 因子欠損の原因として、アミノ酸変異による蛋白構造の安定性の低下、近傍の SS 結合への影響による立体構造の変化、などが推測されるが、詳細は不明である。異種動物細胞を用いた XII 因子の発現実験で検討中である。

E. 結論

FX II 活性、FX II a 抗原量はFX II 46C/T 多型に依存し、アテローム血栓性脳梗塞においてはC/C 型の頻度が高くC/C 型がそのリスクファクターとなる可

能性が考えられた。また石灰化率の検討から動脈硬化の進展には F-XII 遺伝子型が関与する可能性が示唆された。一方、血漿 XIIa 濃度は体脂肪量と関連し、なかでも内臓脂肪量をより反映する可能性が示唆された。さらに凝固 XII 因子欠損症の患者遺伝子解析により、新たな変異を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito D, Tanahashi N, Murata M, Sato H, Saito I, Watanabe K, Fukuuchi Y. Notch3 gene polymorphism and ischemic cerebrovascular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 2002 Mar; 72(3): 382-4.

Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U. The Frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet*. 2002 Mar; 70(3): 758-62.

Matsubara Y, Murata M, Moriki T, Yokoyama K, Watanabe N, Nakajima H, Handa M, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, and Ikeda Y. A novel polymorphism,

70Leu/Phe, disrupts a consensus Leu residue within the leucine-rich repeat sequence of platelet glycoprotein Iba. *Thrombosis and Haemostasis* 87: 867-872, 2002

Kawano K, Yoshino H, Aoki N, Udagawa H, Watanuki A, Hioki Y, Hasumura Y, Yasumura T, Homori M, Murata M, Ikeda Y, Ishikawa K. Shear-induced platelet aggregation increase in patients with proximal and severe coronary artery disease. *Clin Cardiol* 25: 154-160, 2002

太田敦美、園田 啓、谷田部陽子、竹下栄子、斉藤郁夫、伊東大介、棚橋紀夫、福内靖男、菊池春人、村田 満、渡邊清明：健康診断受診者および脳血管障害患者における ANP 遺伝子多型の比較と血中 ANP 濃度 臨床病理 2002: 50(3):296-300.

2. 学会発表(発表誌名巻号・頁・発行年等も記載)

石井啓子、小口修司、谷田部陽子、竹下栄子、森木隆典、村田 満、池田康夫、渡邊清明：先天性凝固第 XII 因子欠損症 2 症例の遺伝子解析(第 49 回臨床検査医学会総会 平成 14 年 11 月、大坂) 臨床病理 vol 50 補冊・p128, 2002

H. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実案新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

血管内皮細胞における血栓形成調節に及ぼすADPの影響

分担研究者 辻 肇(京都府立医科大学輸血部)

研究要旨

特発性血栓症の発症要因の解明においては、血栓形成調節機構の詳細を明らかにすることが重要である。血管内皮細胞は血栓形成調節において重要な役割を果たしており、産生されるtPAならびにPAI-1発現に及ぼす血管作動物質であるADPの影響をラット大動脈血管内皮細胞を用いて検討した。ADPは直接的あるいはadenosineを介して血管内皮細胞におけるtPAの発現を亢進するとともに、亢進状態にあるPAI-1の発現に対して抑制的に作用することが明らかになった。これらの作用はP2Y receptor、adenosine-receptorを介することが示され、血栓形成の制御に重要と考えられるとともに、その調節の破綻は血栓症の発症要因の一つになりうると推察された。

A. 研究目的

特発性血栓症の発症要因の解明においては、血栓形成調節機構の詳細を明らかにすることが重要である。本調節機構には、凝固・線溶系、血小板、血管内皮細胞など多くの因子が関与することが知られ、これらの相互調節作用により血栓形成が制御されている。

内皮細胞においては、tissue type plasminogen activator(tPA)ならびに plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)が産生されており、それらの発現に及ぼす血管作動物質である adenosine 5'-diphosphate(ADP)の影響、さらに angiotensin II(Ang II)によるPAI-1 mRNA 発現亢進に対するADPの作用を検討し、特発性血栓症の発症要因解明に資することを目的とした。

B. 研究方法

200～250gの雄性SD系ラットより胸部大動脈を切離し、explant法にて分離・培養した第2～3世代のラット大動脈血管内皮細胞(RAECs)を実験に用いた。1%BSAを含むDMEMにて48時間の前処置後、培養上清中に各種薬剤を添加。total RNAを抽出し、tPA及びPAI-1のmRNA発現量をnorthern blotting法にて検討した。

C. 研究結果

1) tPA mRNA 発現に及ぼす ADP および adenosine の影響

ADPの添加濃度に応じて、tPA mRNAの発現は有意に亢進し、100μMの濃度ではcontrolに比べ5.7倍の発現亢進を認

めた(図1)。Adenosine においても ADP と同様に tPAmRNA の発現亢進を認めた。

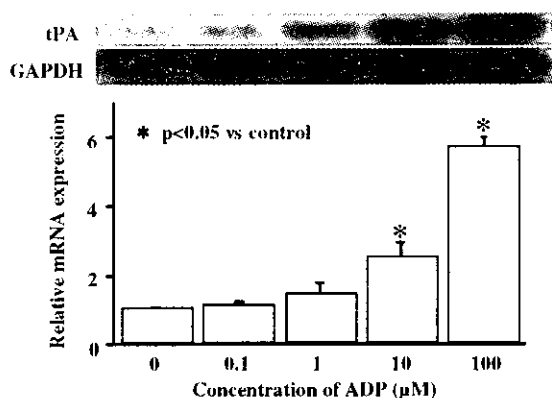


図1 血管内皮細胞における tPA mRNA 発現に及ぼす ADP の影響

2) PAI-1mRNA 発現に及ぼす ADP の影響

0.1~100μM の濃度の ADP 添加においては、PAI-1mRNA の発現の有意な変化は認めなかった。

3) Ang IIによるPAI-1mRNA 発現亢進に及ぼす ADP の影響

Ang II (1nM)の添加による PAI-1mRNA の発現亢進は、ADP 添加(1~100μM)により濃度依存的に抑制された。また、adenosine においても、ADPと同様の抑制を認めた。

4) ADP の作用機序に関する検討

血管内皮細胞上の purine-receptor である P2Y receptor の antagonist である suramin (100μM)、adenosine-receptor の antagonist である 8-SPT (1mM)、さらに suramin と 8-SPT の同時添加は、ADP (10μM)による tPAmRNA の発現亢進を有意に抑制した。さらに Ang II による PAI-1mRNA の発現亢進に対する ADP

(100μM)の抑制作用は、前述の receptor antagonist により有意に阻害された。

D. 考察

ADPは直接的あるいはadenosineを介して血管内皮細胞におけるtPAの発現を亢進するとともに、亢進状態にあるPAI-1の発現に対して抑制的に作用することが明らかになった。これらの作用はP2Y receptor、adenosine-receptorを介するものと考えられ、血管拡張作用と相まって血栓形成の制御に重要と推察された。

E. 結論

ADPならびにadenosineは、血管内皮細胞の抗血栓性を高め、その調節の破綻は血栓症の発症要因の一つになりうると推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shinzo Kimura, Hajime Tsuji, Hiromi Nishimura, Hisato Kato, Naoki Ukimura, Shingo Yano, Yasufumi Kunieda, Hidehiko Kawano, Katsumi Nakagawa, Masao Nakagawa. Bradykinin enhances in vitro procoagulant and antifibrinolytic properties of rat vascular endothelial cells. *Thromb Res* 106:41-50:2002.

2. 学会発表

加藤久人、辻 肇、矢野信吾、浮村直樹、

河野秀彦、木村晋三、菅野達也、西村浩美、中川克、中川雅夫。培養ラット大動脈血管内皮細胞におけるtPA及びPAI-1のmRNA発現に及ぼすADPの影響。第25回血栓止血学会。平成14年11月14日、神戸。

H. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)

1.特許取得

なし

2.実案新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

線溶系からみた血栓傾向

分担研究者名 坂田洋一

研究要旨

DIC 症例におけるフィブリノゲン・フィブリン分解産物の解析から、プラスミノゲンアクチベータインヒビター1が増加しプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系が抑制される病態では、白血球エラスターゼ系が作動しフィブリン血栓を分解している可能性が示唆された。線溶機構としてのプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系との連関を、プラスミノゲンノックアウトマウスを用いて解析した。プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系の欠損は、マウス直腸粘膜下の微小血栓による潰瘍形成および脱肛をもたらすことから、微小循環における血栓形成の危険因子となる可能性が示唆された。この微小循環は、予想に反して白血球エラスターゼ系を阻害することにより改善された。さらにプラスミノゲンノックアウトマウスに対して、LPS による動的血栓形成刺激を加えた際に生じる肺のフィブリン血栓形成や白血球の浸潤は、白血球エラスターゼの阻害薬により抑制された。これらのことから、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系はともに止血栓の除去や細胞遊走に深く関与するが、両系の生体における機能制御はかなり複雑であることが示唆された。

A. 研究目的

線溶系すなわちプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系が抑制される先天性および後天性の病態、例えばプラスミノゲンの欠損症、あるいは敗血症等に伴うプラスミノゲンアクチベータインヒビター1 (PAI-1) の過剰発現などが基盤にある病態では、凝固機転が作動しフィブリン血栓が形成された場合、血栓が効率良く除去されないために血栓症を発症する。一方で、好中球がサイトカン刺激を受け活性化されると、アズール顆粒中から複数の蛋白分解酵素が循環血液中に放出される。この蛋白分解酵素は、血液中に存在

する多くの蛋白質や細胞外マトリックス蛋白を基質とし分解する。本研究では、白血球由来蛋白分解酵素群のうち白血球エラスターゼに着目し、本酵素系の関わる血栓溶解機構とプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系との連関、特に血栓症抑制にかかわる両系の役割について解析を行った。

B. 研究方法

臨床例の解析: 活性化白血球から放出された蛋白分解酵素により、フィブリノゲンやフィブリンの分解を起こすような病態が実際に存在するか否かを検討した。方法

は、フィブリノゲン・フィブリン分解産物 (FDP) の測定とともに、フィブリノゲン・フィブリンの白血球エラスターゼによる分解産物を特異的に認識するモノクローナル抗体 (IF-123) を用いて、DIC 症例を対象に解析した。

遺伝子改変動物を用いた解析: (1) プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系の両者を阻害することにより、血栓形成が促進されるか否かを検討した。プラスミノゲンノックアウトマウスヘテロ接合体 (Plg+/-) およびホモ接合体 (Plg-/-) に対して、それぞれ出生後より好中球エラスターゼ阻害薬 (ONO-6818: 10-50 $\mu\text{g/gBW}$) を3回/週で経口投与し、微小血栓の表現型である直腸潰瘍および直腸脱の発症する時期 (日齢) を比較した。(2) プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系による血栓溶解が抑制されるような病態において、白血球エラスターゼ系が止血栓形成を阻止する可能性について検討した。すなわち動的血栓形成にかかわる白血球エラスターゼ系の関与を明らかにするため、予めエラスターゼ阻害薬 (ONO-5046Na 300 $\mu\text{g/gBW}$) を経静脈的に投与した Plg+/- および Plg-/- に対して、リポポリサッカライド (LPS: 5 $\mu\text{g/gBW}$) を腹腔内投与し、一定時間の後主要臓器を免疫組織学的に解析した。

(倫理面への配慮)

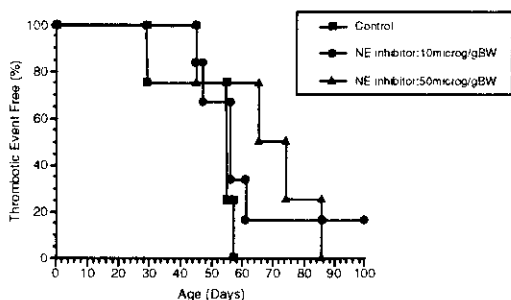
臨床検体の取り扱いに際し、個人情報保護には充分留意し、患者本人の同意を得た上で各検体を匿名化し、諸検査を施行した。本研究における動物実験は、

自治医科大学実験動物取り扱い指針に基づき実験計画を申請し同倫理委員会の承認を得た上で、動物愛護の精神のもとに遂行した。

C. 研究結果

臨床例の解析: DIC 症例を解析した結果、FDP 値と PAI-1 値との間には、必ずしも有意な相関関係がみられなかった。そこで、PAI-1 値が 100ng/mL 以上と高値を示す群のなかで、FDP 値が 90 $\mu\text{g/mL}$ 以上のグループと、それ以下のグループに分け、それぞれの E-FDP 値を解析した。その結果、FDP 値が高い群は、低い群と比較して有意に E-FDP 値が高く、この群に含まれる FDP の多くがエラスターゼ分画の FDP に由来することが明らかとなった。

遺伝子改変動物を用いた解析: プラスミノゲンノックアウトマウスに対して、出生後より好中球エラスターゼ阻害薬を経口投与し、血栓症の指標である脱肛の発症時期を比較した。その結果、Plg+/- は、コントロール群およびエラスターゼ投与群ともに、観察期間 (100 日) を通して血栓症が全くみられなかった。ところが、エラスターゼ阻害薬を投与した Plg-/- 群では、阻害薬の投与量依存性にコントロール群と比較して、直腸脱の発症時期が遅れた (図)。



プラスミノゲン欠損マウスにおける血栓症の発症時期に及ぼす白血球エラスターゼの影響

Control: Saline 投与群, NE Inhibitor: Neutrophil Elastase Inhibitor 投与群

一方 LPS 刺激を加えた $Plg^{-/-}$ では、肺血管腔内にアモルファスな構造物の沈着とともに、白血球の強い浸潤が認められた。ところが、エラスターゼ阻害薬を前投与した $Plg^{-/-}$ では、LPS 刺激を加えてもこのような構造物が目立たず、白血球の肺血管内腔への浸潤も抑制されていた。抗マウスフィブリノゲン抗体を用いた肺組織の免疫染色により、 $Plg^{-/-}$ の LPS 刺激群では肺組織に顕著なフィブリンの沈着が確認された。一方、エラスターゼ阻害薬を投与した $Plg^{-/-}$ の LPS 刺激群では、肺組織におけるフィブリンの沈着が抑制された。

D. 考察

プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系の制御因子である PAI-1 が高値を示す症例では、線溶系のシャットダウンがおりフィブリン分解が停滞し FDP が低値を示すことが知られている。ところが、DIC 症例のなかには PAI-1 が高値であるにもかかわらず FDP 値が高い例が存在し、この FDP の多くが白血球エラスターゼによるフィブリン分解物に由来することが本研究で明らかになった。すなわち、PAI-1 が増加

しプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系が抑制される病態でも、白血球エラスターゼ系によりフィブリン分解が補填されている病態が存在する可能性が示唆された。

プラスミノゲンノックアウトマウスは、発育障害や特徴的な木質様結膜炎とともに、ほぼ全例に直腸潰瘍を反復し脱肛をきたす。プラスミノゲンノックアウトマウスでみられる脱肛は、組織学的に粘膜下の微小血栓の多発が原因とされている。このことは、線溶系の低下が微小循環における血栓形成の重要な危険因子となり得ることを示唆するものである。本研究では、 $Plg^{+/-}$ における直腸脱の発症時期が、エラスターゼ阻害薬の投与量依存性に遅延した。すなわちプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系の遺伝的欠損病態で、白血球エラスターゼ系を阻害すると微小循環が保たれるという、予想に反する結果であった。今後、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系を構成する組織型プラスミノゲンアクチベータや、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ欠損マウスを用いた解析を行なう予定である。

LPS 刺激を加えた $Plg^{-/-}$ では、肺血管腔内にフィブリンの沈着とともに、白血球の肺血管内腔への強い浸潤が認められたが、エラスターゼ阻害薬を前投与した $Plg^{-/-}$ では、このフィブリン沈着や白血球浸潤がともに抑制されていた。すなわち、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系の抑制病態において、動的血栓形成刺激時の血栓形成には白血球の浸潤が深く関わること、さらに白血球エラスターゼの

制御によりその浸潤が阻害され、血栓形成が抑制されることが示唆された。

E. 結論

DIC 症例におけるフィブリノゲン・フィブリン分解産物の解析およびプラスミノゲンノックアウトマウスを用いた解析から、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系はともに一方で血栓溶解酵素として機能するが、血栓形成にもさらに複雑なメカニズムで関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報: 特記事項なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- ・ Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J, Sakata Y: Successful Induction of Immune Tolerance by Neonatal Injection of Human Factor VIII in Murine Hemophilia A. *J Thromb Haemostat*, In press.
- ・ Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Sugo T, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y: Expression of human coagulation factor VIII in adipocyte transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Therapy*. in press

- ・ Mimuro J, Ogata K, Mizukami H, Kikuchi J, Sugo T, Madoiwa S, Hanazono Y, Kume A, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y :A primate model for hemophilia B gene therapy research. *British Journal of Haematology*. in press
- ・ Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Madoiwa S, Sugo T, Naito M, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y :Sustained transgene expression by human cord blood-derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *British Journal of Haematology*. in press
- ・ Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yase T, Kariya Y, Hoshino Y, Sakata Y :Defective sorting to secretory vesicles in the trans Golgi network is partly responsible for protein C deficiency: Molecular mechanism of impaired secretion of abnormal protein C R169W, R352W and G376D. *Circulation Res*. in press
- ・ Sigeta K, Taniguchi N, Omoto K, Madoiwa S, Sakata Y, Mori M, Hatake K, Itoh K :In vitro platelet activation by an echo-contrast

- agent. J Ultrasound in Medicine. in press
- Imura O, Kusano E, Takahashi H, Yashiro T, Madoiwa S, Sakata Y, Asano Y: Effect of ureteral obstruction on gelatinase A in rat renal cortex. Exp. Nephron in press
 - Watanabe T, Ohkuchi A, Minakami H, Sakata Y, Matsubara S, Wada T, Onagawa T, Sato I :Perioperative changes in plasma antithrombin activity and platelet counts in patients undergoing gynecologic suery. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 28(6) 519- 524 ,2002.
 - Sugo T, Sakata Y, Matsuda M:Structural alterations in hereditary dysfibrinogens Current Protein and Peptide Sci.3:239-247,2002.
 - Hamano A, Tanaka S, Takeda Y, Umeda M, Sakata Y:A novel monoclonal antibody to fibrin monomer and soluble fibrin for the detection of soluble fibrin in plasma. Clinica Chimica Acta 318:25-32,2002.
 - Miyoshi T, Otsuki T, Omine K, Kirito K, Nagai T, Izumi T, Komatsu N, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y, Ozawa K. :Acute promyelocytic leukemia accompanied by retinoic acid syndrome with complications of acute myocardial infarction and cerebral infarction during treatment with all-trans retinoic acid. Rinsho Ketsueki. 43:954-959,2002.
 - Kaminishi Y, Aizawa K, Saito T, Misawa Y, Madoiwa S, Sakata Y: Modified bentall operation in a patient with Hemophilia A. The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 51(2) 68-70,2003
 - 坂田洋一:播種性血管内凝固症候群(DIC)治療の実際「 DIC 治療薬の展望」医学と薬学 48:569-576,2002.
 - 坂田洋一、内藤雅夫:末梢循環障害 -最近の知見- 「血栓による末梢循環障害」Pharma Medica 20:47-53,2002.
 - 坂田洋一:血栓症を理解するための基礎知識 線溶機構とその制御 臨床医 28: 2244-2247,2002. 中外医学社
 - 田中誠司、浜野明栄、坂田洋一: フィブリンモノマー(FM)に対するモノクローナル抗体(MoAb)の作成と血中可溶性フィブリン(SF)測定系への応用 日本検査血液学会雑誌 3:80,2002.
 - 三室 淳:検査値から読む病態と診断計画「プラスミノゲン、 $\alpha 2$ プラスミンインヒビター、プラスミン・ $\alpha 2$ プラスミンインヒビター複合体(PIC)」臨床医 28 増刊号 877-881,2002.