

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）

血液凝固異常症に関する調査研究班

分担研究報告書

血栓性血小板減少性紫斑病と関連する ADAMTS13 変異

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部内科講師

研究協力者 和田英夫 三重大学医学部臨床検査医学助教授

研究要旨 HUS/TTP の発症には von Willebrand factor 切断酵素 (VWF-CP : ADAMTS-13) の活性低下が関与することが知られている。今回、先天性（家族性）TTP と考えられる患者のゲノム DNA を用いた遺伝子解析を行った。症例は HUS 症状を頻繁に示す成人男性で、ADAMTS-13 活性は 3% 以下であった。また、父親の ADAMTS-13 活性にも著明な低下が認められた。同意を得た上で末梢血からゲノム DNA を抽出し、ADAMTS13 遺伝子の全 exon と exon-intron 境界領域について塩基配列を解析した。ヒト胎児肝臓 cDNA ライブラリーから得られた ADAMTS13 の cDNA をクローニングし、HEK293 細胞を用いた発現系で検討した。その結果、患者サンプルから metalloprotease domain に 2 つの新規変異が見出された。一つは Ala250Val で、他方は exon3 直後イントロン内の guanine から adenine への変異である (intron3 G/A)。発現実験により、A250V 変異は ADAMTS13 酵素活性を著明に低下させること、intron 3 G/A 変異は RNA スプライシング異常を引き起こすことで蛋白産生障害をおこすことが示された。これらの結果より intron3 G/A と A250V が本症例の原因変異と考えられた。

A. 研究目的

HUS/TTP の発症には von Willebrand factor 切断酵素 (VWF-CP : ADAMTS-13) の活性低下が関与することが知られている。先天性の TTP 患者における ADAMTS13 遺伝子異常の解析はこの分子の構造-機能相関に重要な知見をもたらすものと考えられる。最

近我々は先天性（家族性）TTP と考えられる患者を経験した。そこでゲノム DNA を用いた遺伝子解析を行うとともに異常 ADAMTS13 分子の遺伝子発現実験を行った。

B. 研究方法

症例は HUS 症状を頻繁に示す成人男性

で、平成12年痔の手術後より痙攣発作出現したためA病院を受診、腎不全、貧血、血小板減少からTTPが疑われた。FFPの投与により症状は改善したが平成13年8月上記症状が再燃し、B病院入院、FFPの投与により再び改善した。以後外来でFFP4単位/週の投与を受けていた。入院時：末梢血 RBC $212 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、Hb 6.8g/dl、WBC $3600 / \mu\text{l}$ 、PLT $7.0 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、Reticulocyte $13 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、生化学 LDH 414u/L、T-Bil 2.2mg/dl、BUN 44mg/dl、Creatinine 3.8mg/dl、血漿 ADAMTS13 活性：本人 3%未満、父 46%、母 46%、本人 ADAMTS13 インヒビターは陰性であった。同意を得た上で患者本人およびその母親の末梢血からゲノム DNA を抽出した。ADAMTS13 遺伝子の全 exon と exon-intron 境界領域について塩基配列を解析した。PCR を用いて ADAMTS13 遺伝子の全 29exon と exon-intron 境界領域を増幅し、ABI 3100 sequencer を用いて塩基配列の解析を行った。発見された変異の頻度の検討は TTP/HUS を有さない集団

(intron3 G/A 772 例、A250V66 例) について塩基配列を解析した。A250V 発現系の構築は、発現ベクター (pcDNA3.1) に ADAMTS13 および A250V 変異体の cDNA を導入し、HEK293 細胞に発現させた。培養上清を Western blot と ADAMTS13 活性測定に供した。intron3 G/A はスプライス異常を来す可能性があるため、

mini-gene 発現系で産生される mRNA を検討した。ヒト胎児肝臓 cDNA ライブラリーから得られた ADAMTS13 の cDNA をクローニングし、HEK293 細胞を用いた発現系で検討した。

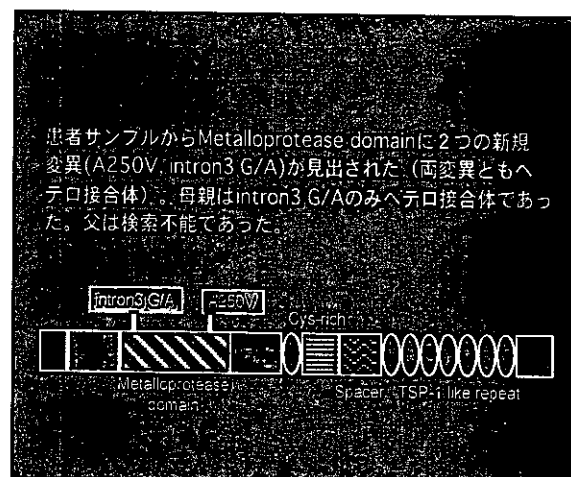
(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム遺伝子解析研究であり、合同指針の則り、まず当該施設の倫理委員会で承認を受けた。すべての検体提供者から十分な説明の後インフォームドコンセントをえた。検体はすべて匿名化した後、解析施設に送られた。

C. 研究結果

患者サンプルから metalloprotease domain に2つの新規変異が見出された (両変異ともヘテロ接合体)。一方は1アミノ酸変異 (Ala250Val) を引き起こし、他方は exon3 直後イントロン内の guanine から adenine への変異で (intron3 G/A)、新たなスプライス部位が形成される結果、RNA スプライシングに影響を及ぼす可能性が考えられた (図1)。

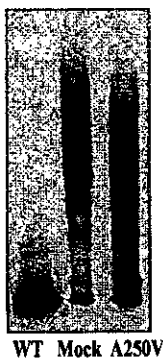
図1



母親は intron3 G/A のみヘテロ接合体であった。父は検索不能であった。TTP/HUS の既往のない一般人口で A250V は 66 例、 intron3 G/A は 772 例について塩基配列を解析したが、それぞれの変異を有する個体は一例も見出されなかった。A250V および intron3:G/A は、患者家系に特異的な変異と考えられた。A250V を HEK293 細胞に導入したところ、正常と同じサイズの ADAMTS13 分子の分泌が確認された。この培養上清の ADAMTS13 活性を、VWF を基質として測定したところ（奈良県立医科大学藤村吉博教授、松本雅則博士により実施）正常型と比較して著明な活性低下が見られた（図2）。

図2

A250Vの酵素活性測定

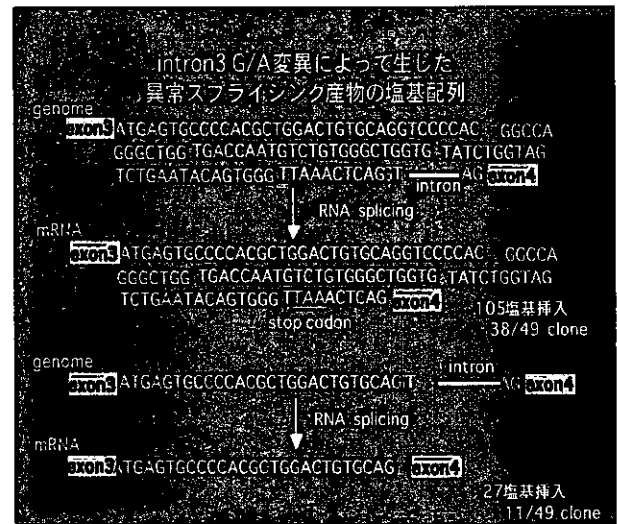


A250V変異型ADAMTS-13はVWF切断活性の著明な低下を示した。

intron3:G/A 変異については、mini-gene 発現系を用い、遺伝子導入後産生される RNA の配列を解析したところ、intron3:G/A では正常 RNA は見られず、RNA スプライシングの異常によっ

て生じる変異 RNA の存在を確認した。PCR 産物をクローニングして塩基配列を調べると、105 塩基挿入型（停止コードンを含む）と、27 塩基挿入型が観察された（図3）。

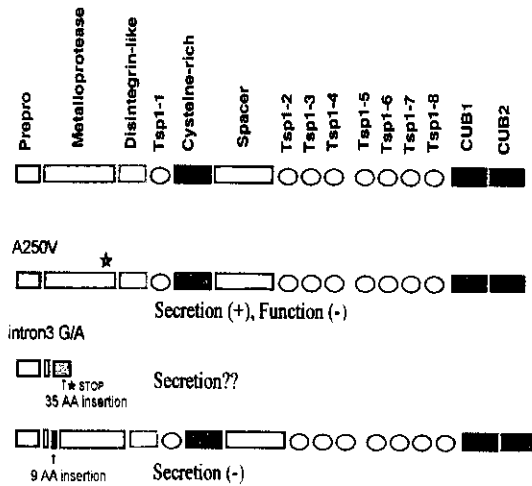
図3



D. 考察

今回見出された症例は ADAMTS13 遺伝子に複合ヘテロと思われる変異が存在した。父親の遺伝子は調べることができなかったが、母親の遺伝子解析結果と発現実験より、見いだされた2つの変異が疾患の原因と思われた。A250V は metalloprotease domain に位置し、酵素活性に重要である。一方、intron 3 G/A 変異は大部分の RNA splicing の共通認識配列である GT-AG motif を破壊することから、異常 splice 産物が生成されることが予想された（図4）。

図 4



実際、発現実験で異常 RNA の存在が確認された。ADAMTS13 は、その酵素活性発現のためには N 末端～ metalloprotease domain～spacer domain の存在が重要と考えられており、今回の我々の結果はこれを支持するものといえる。

E. 結論

TTP 家系を検索し、ADAMTS13 遺伝子に新たな 2 つの変異を見出した。発現実験により、A250V 変異は ADAMTS13 酵素活性を著明に低下させること、intron 3 G/A 変異は RNA スプライシング異常を引き起こすことで蛋白産生障害をおこすと考えられた。以上より intron3 G/A と A250V が本症例の原因変異と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y. Detection of von Willebrand factor – cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 2; 313(1): 212-6.

2. 学会発表

Murata M, Uchida T, Suzuki M et al. Screening of single nucleotide polymorphisms in the *ADAMTS13* (von Willebrand factor-cleaving protease) gene and studies on their association with stroke and coronary artery disease. 45th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology, December, 2003, San Diego, USA

Uchida T, Wada H, Iwashita M et al. Identification of novel mutations in *ADAMTS13* in an adult patient with recurrent hemolytic-uremic syndrome. 45th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology, December 2003, San Diego, USA

Suzuki M, Murata M, Matsubara Y et al. ADAMTS13 (von Willebrand factor-cleaving protease) is

expressed in human platelets. 45th
Annual Meeting and Exposition, The
American Society of Hematology,
December 2003, San Diego, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

先天性アンチトロンビン欠損症 –血栓症の遺伝的背景–

分担研究者 京都府立医科大学輸血部 辻 肇

研究要旨

独立した先天性アンチトロンビン（AT）欠損家系（32家系）の欠損患者64名を対象に、血栓症の臨床的ならびに遺伝的背景を検討した。血栓症の既往は、男性に多く、血栓症の平均初発年齢は35.4才であった。血栓症の内訳では、静脈血栓症、特に下肢深部静脈血栓が最も多く、他の静脈系血栓の重複を認めた。また、その76%は誘因なく発症し、さらに詳細な検討を要すると考えられた。

A. 研究目的

先天性AT欠損患者は、血栓素因を有するため、さらに異なる血栓症の発症要因（遺伝的および環境要因）が重複して作用すると、非欠損者に比べて容易に血栓症を発症すると推測される。本欠損患者における発症要因の検討を試み、特発性血栓症の成因の解明ならびに予防に資することを目的にした。

B. 研究方法

独立した先天性AT欠損患者32

家系の欠損患者64名を対象に、血栓症の臨床的ならびに遺伝的背景を検討した。

遺伝子解析は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理方針（平成13年3月29日）」を遵守し、倫理委員会での承認をうけた。

C. 研究結果

欠損患者64名のうち、血栓症の既往のあるものは41名、血栓症を未発症のものは23名であった（表1）。

	血栓あり	血栓なし
患者数 (男:女)	41 (27:14)	23 (12:11)
年齢(才)	44.7±16.9 (15~78)	41.0±18.3 (12~75)
初発年齢(才)	35.4±16.7 (15~74)	

表1 対象欠損患者の性別・年齢

男女比では、血栓症の既往のあるものにおいて、男性の比率が高かった。年齢に差はなく、血栓症の初発は 35.4 ± 16.7 (15~74)才であった。

血栓症の内訳 (表2) では、静脈血栓症、特に下肢深部静脈血栓が32名(78%)と最も多く、15名は、肺血栓塞栓症、上腸間膜静脈血栓、脳

血管障害を重複していた。

血栓症の発症誘因 (表3) は10名(24%)に認められ、手術、外傷、妊娠、長期座位、経口避妊薬の内服が認められたが、31名(76%)においては発症誘因を認めずに血栓症の発症を認めた。

		患者数	
DVT	DVT	32(78%)	17 (41%)
	DVT&PE		9 (22%)
	DVT&SMVT		2 (5%)
	DVT&PE&CVA		4 (10%)
PE		3 (7%)	
CVA		2 (5%)	
AMI		1	
不明		3	
合計		41	

表2 血栓症の内訳

DVT:下肢深部静脈血栓症 PE:肺血栓塞栓症

SMVT:上腸間膜静脈血栓症 CVA:脳血管障害 AMI:急性心筋梗塞

発症誘因		患者数	
あり	手術	10 (24%)	3
	外傷		2
	妊娠		2
	長期座位		2
	経口避妊薬		1
なし		31 (76%)	

表3 発症誘因

AT欠損症のタイプ別では (表4)、血栓症の既往のあるものにおいて、タイプ I (古典的欠乏症) は 26 名

(64%)、タイプ II (分子異常症) は 12 名(29%)であった。

		血栓症あり		血栓症なし
I		26 (64%)		10 (43%)
II	II-HBS	12 (29%)	2	11 (48%)
	II-RS		1	
	II-PE		3	
	N.D.		6	
N.D.		3		2
合計		41		23
AT活性 (%)		50.5±6.6		53.0±5.5

表4 AT欠損症のタイプ

I : タイプI 欠損症 (古典的欠乏症) II : タイプII 欠損症 (分子異常症)

HBS: heparin binding site RS: reactive site

PE: pleiotrophic effect N.D.: not determined

D/E. 考察および結論

独立した先天性AT欠損患者32家系の欠損患者64名を対象に、血栓症の臨床的ならびに遺伝的背景を検討した。血栓症の既往は、男性に多く、血栓症の平均初発年齢は35.4±16.7(15~74)才であった。血栓症の内訳では、静脈血栓症、特に下肢深部静脈血栓が最も多く、他の静脈系血栓症の重複を認めた。また、その75%は誘因なく発症した。

前述の臨床背景は、海外における同様の報告と合致するものである。とりわけ、血栓症を発症した欠損患者の76%は、誘因なく発症しており、さらに詳細な検討を要すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

白血球エラスターゼを介する線溶反応の検討

分担研究者 坂田洋一（自治医科大学医学部分子病態研究部教授）

研究要旨

プラスミンを介さない血栓溶解反応、特に白血球エラスターゼによる血栓溶解機構を臨床例においてモニタリングすることを検討した。フィブリノゲンおよび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抗体（IF-123）を用いて、DIC 症例における GE-FDP および GE-XDP を測定した。DIC 症例には、FDP が高値を示すものの GE-FDP の変動が比較的軽度に留まる群（プラスミンによる線溶反応が主であると考えられる群）と、FDP の変動が軽度であるものの GE-FDP が高値を示す群（白血球エラスターゼによるフィブリン・フィブリノゲン分解と考えられる群）の 2 群が存在した。さらに GE-FDP と GE-XDP とは、正相関を示す群が存在する一方で、GE-FDP が高値を示すものの GE-XDP がほとんど変動しない群がみられた。前者は、凝固反応に引き続き形成されたフィブリン血栓を白血球エラスターゼが分解した結果であり、後者は機能亢進した白血球エラスターゼによるフィブリノゲン分解の結果であると考えられた。白血球エラスターゼを介する線溶機構は、プラスミン系と協調的に作用する新たな血栓溶解機構である可能性とともに、プラスミン系の血栓溶解に対する補填機構としての働きを持つ可能性が示唆された。

A. 研究目的

プラスミノゲンの先天性欠損症には、抗原量、活性値ともに低下する I 型欠乏症と、抗原量はほぼ保たれているものの活性値が低下する II 型欠乏症とがある。プラスミノゲン I 型欠乏症では、眼瞼結膜に特徴的な木質様結膜炎をきたすものの、血栓症

が臨床的に問題になることが少ない。ところがプラスミノゲン II 型欠乏を遺伝的負荷にもつ症例では、何らかの誘因により発症した深部静脈血栓症や肺塞栓血栓症などの血栓症が反復かつ重篤化する場合がある。一方、プラスミノゲン I 型欠損症では有意に白血球エラスターゼの血中濃度が

高いが、プラスミノゲン II 型欠損症ではこのような濃度の違いは認められない。白血球エラスターゼによる血栓溶解が、プラスミン系の代償性機構として作動することにより、臨床病型の違いをもたらすのではないかと推測される。本研究では、フィブリノゲンおよび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抗体 IF-123 を用いて、播種性血管内凝固症候群 (DIC) 症例を対象に、白血球エラスターゼ由来フィブリノゲン・フィブリン分解産物 (GE-FDP) および白血球エラスターゼ由来フィブリン分解産物 (GE-XDP) を解析した。

B. 研究方法

DIC 症例を対象に、実際の臨床例において白血球エラスターゼがどのように血栓溶解ないしフィブリン分解に関わっているのかを検討するために、プラスミンおよび白血球エラスターゼ由来フィブリノゲン・フィブリン分解産物を解析した。対象症例は、過去 3 年間に於ける当院入院症例のうち、DIC を併発した 436 例である。基礎疾患の内訳は、造血器腫瘍が 201 例と約半数を占めており、固形癌が 90 例、感染症が 34 例であった。このうち造血器腫瘍は、急

性前骨髄球性白血病 (APL) が 34 例、急性リンパ球性白血病 (ALL) が 35 例、および悪性リンパ腫

(Malignant lymphoma) が 37 例であった。測定に用いた IF-123 は、フィブリノゲン分子 A α 鎖のうち、白血球エラスターゼにより 204 番目のロイシンと 205 番目のイソロイシンとの間が切断された際に生じるカルボキシ末端の 9 つのアミノ酸を特異的に認識する抗体である。

(倫理面への配慮)

臨床検体の取り扱いに際して、個人情報保護には充分留意し、自治医大の倫理規約にのっとり各検体を匿名化した上で、諸検査を施行した。

C. 研究結果

(1) DIC 症例におけるフィブリノゲン・フィブリン分解産物 (FDP) と D-dimer の測定値の比較: 全 DIC 症例における FDP 値と D-dimer 値との相関係数 (r^2) は、0.71 と正相関を示した。ところが、FDP が増加しているにも関わらず D-dimer の増加を伴わない症例、すなわち fibrinolysis の病態を有すると推測される FDP と D-dimer との乖離例も存在していた。

(2) 各種基礎疾患別の白血球エラスターゼ由来フィブリノゲン・フィ

ブリン分解産物 (GE-FDP) : DIC 併発例の各種基礎疾患ごとの GE-FDP の変化を検討すると、造血器腫瘍、婦人科腫瘍などの固形癌の一部に、GE-FDP 値が増加する症例がみられた (図 1)。ところが、血管性疾患やリウマチ性疾患ではほとんど GE-FDP の変動がみられない。婦人科腫瘍、とくに子宮体癌や卵巣癌において、さらに固形癌、特に耳鼻科領域の悪性腫瘍や腎臓癌を基礎疾患として DIC を発症した症例では、GE-FDP が高値を示した。造血器腫瘍では、急性骨髄球性白血病 (AML) -M2 や M4 を基礎疾患とした DIC 例で、GE-FDP が高値であった。さらに、Malignant lymphoma の多くの症例において GE-FDP の増加がみられた。

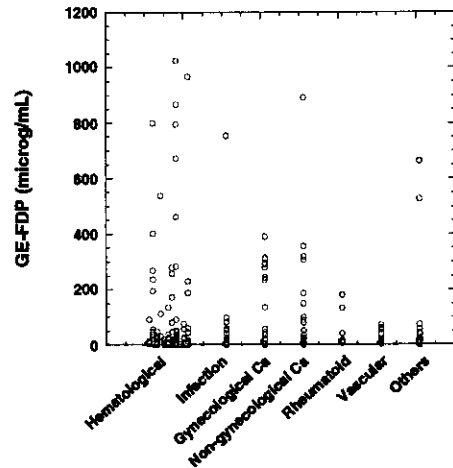


図 1 : GE digests in plasma derived from patients with various diseases.

(3) DIC 症例におけるプラスミン由来フィブリノゲン・フィブリン分解産物 (P-FDP) と GE-FDP との関係 : 研究対象とした多くの DIC 症例では、FDP と P-FDP とは相関係数が 0.83 と高い正相関を認めた。ところが、FDP と GE-FDP との間には、このような相関関係を認めなかった。

FDP と GE-FDP との非相関例は、FDP が高値を示すものの GE-FDP の変動が比較的軽度に留まる群 (プラスミンによる線溶反応が主であるものと考えられる群) と、FDP の変動が軽度であるものの GE-FDP が高値を示す群 (白血球エラスターゼによるフィブリン・フィブリノゲン分解が起きていると考えられる群) の 2 群が存在した。

(4) DIC 症例における P-XDP および GE-XDP との関係 : プラスミンによるフィブリン分解産物 (P-XDP) および白血球エラスターゼによるフィブリン分解産物 (GE-XDP) との関係を、DIC 症例において検討した。DIC は、凝固反応に引き続く二次線溶反

応の亢進が基本的な病態であり、本研究における多くの DIC 症例でも P-FDP と P-XDP とは正相関を示した。ところが GE-FDP と GE-XDP とは、正相関を示す群が存在する一方で、GE-FDP が高値を示すものの GE-XDP がほとんど変動しない群も存在していた。

(5) IF123 抗体固相化カラムを用いたフィブリノゲン・フィブリン分解産物の解析：GE-FDP 値が特に高値を示した DIC 症例について、実際のフィブリノゲン・フィブリン分解がどのような形で起こっているのかを明らかにするために、IF-123 抗体固相化カラムを用いて、患者血中から分解産物を回収し N 末端のアミノ酸配列を解析した。得られたバンドは、

(1) A α 鎖の N 末端の 16 番目のアルギニンとグリシンがトロンビンで切断されたフラグメント、(2) 81 番目のリジンとアスパラギン酸および (3) 104 番目のアルギニンとアスパラギン酸とがプラスミンにより切断を受けたと推測されるフラグメントであった。

D. 考察

凝固反応の亢進によりもたらされる血栓形成と、その溶解反応である線溶反応とが複合的に生じている

DIC では、その病態を詳細に把握することが、基礎疾患の治療とともに極めて重要である。GE-FDP の増加する症例は、多くの場合が予後不良であるものの、一時的な寛解期には GE-FDP 値も低下し、GE-FDP の多寡は限定的であるが臨床病態を反映するものと考えられる。

DIC におけるフィブリノゲン・フィブリン分解産物の検討を行ったが、FDP と GE-FDP とは、多くの症例において有意な相関関係を示さなかった。これらの非相関群は、FDP が高値を示すものの GE-FDP の変動が比較的軽度に留まる群（プラスミンによる線溶反応が主であると考えられる群）と、FDP の変動が軽度であるものの GE-FDP が高値を示す群（白血球エラスターゼによるフィブリノゲン・フィブリン分解が主であると考えられる群）の 2 群に分類された。すなわち GE-FDP は、DIC の病態を知る上での FDP とは独立した新たな指標となり得ることが示唆された。

DIC は、凝固反応に引き続く二次線溶反応の亢進が基本的な病態であり、本研究の対象例においても P-FDP と P-XDP とは正相関を示した。ところが、GE-FDP と GE-XDP との関係を見ると、正相関を示す群が存在する一方で、GE-FDP が高値を示すもの

の GE-XDP がほとんど変動しない群も存在していた。前者は、凝固反応に引き続き形成されたフィブリンを白血球エラスターゼが分解した結果であり、後者は期能亢進した白血球エラスターゼによるフィブリノゲン分解の結果であると考えられる。

白血球エラスターゼは、フィブリン血栓分解においてプラスミン系の補填機構を備えていると推測される。今回対象とした DIC 症例においても、PAI-1 値と FDP との関係を見ると PAI-1 値が高くプラスミン系が作動し得ない病態下においても、FDP が増加している症例が存在している。その多くは、FDP の由来が D-dimer ではなく、GE-FDP であることから、プラスミン系がシャットダウンされた病態においては、血栓溶解が白血球エラスターゼによりもたらされている可能性が高い。

IF123 抗体固相化カラムを用いたフィブリン分解産物の解析結果は、フィブリン分子の N 末端がプラスミンで、C 末端が白血球エラスターゼの作用を受けた分解産物であることを示しており、ある種の DIC においては、プラスミンと白血球エラスターゼとが協調的に働いて止血栓の溶解および除去を行っている可能性を示唆するものである。

E. 結論

白血球エラスターゼを介する線溶機構は、プラスミン系と協調的に作用する新たな血栓溶解機構である可能性とともに、プラスミン系の血栓溶解に対する補填機構としての働きを持つ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

Hamano A, Mimuro J, Aoshima M, Itoh T, Kitamura N, Nishinarita S, Takano K, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Niwa K, Ono T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y: Thrombophilic dysfibrinogen Tokyo V with the amino acid substitution of γ Ala-327 to Thr: Formation of fragile but fibrinolysis-resistant fibrin clots and its relevance to arterial thromboembolism. Blood in press.

Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa S, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y: Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques.

J. Thromb.Haemost. 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. *J. Gene Med.* in press.

Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J, Sakata Y.: Induction of immune tolerance by neonatal intravenous injection of human factor VIII in murine hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2004 May issue, in press.

Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Takano K, 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 Ther.* 11:253-259, 2004.

Mimuro J, Hamano A, Tanaka T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y.:

Hypofibrinogenemia caused by a nonsense mutation in the fibrinogen B β chain gene. *J. Thromb. Haemost.* 1(11):2356-9, 2003.

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 Med.* 22:365-373, 2003.

Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yasu 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. *Circ. Res.* 92:865-872, 2003.

Kaminishi Y, Aizawa K, Saito T, Misawa Y, Madoiwa S, Sakata Y.: Modified bentall operation in a patient with hemophilia A. *J. J. Thor*

Cardiovasc Surg .51(2) :68-70,
2003.

2、学会発表

窓岩清治、坂田洋一. 白血球プロ
テアーゼによる線溶機構 第 26
回日本血栓止血学会 2003 年 11
月、東京.

三室 淳、水上浩明、小野文子、
高野勝弘、窓岩清治、小倉 剛、
松下 卓、岡田尚巳、花園豊、
久米晃啓、寺尾恵治、小澤敬也、
坂田洋一. カニクイザルをモデ
ルとした血友病 B 遺伝子治療の
基礎的検討 第 65 回日本血液学
会第 45 回日本臨床血液学会
2003 年 8 月 31 日、大阪.

窓岩清治、坂田洋一. 線溶異常
による血栓形成機序 日本静脈
学会 2003 年 4 月、東京.

Mimuro J, Naito M, Endo H,
Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J,
Sugo T, Yasu T,
Kariya Y, Hoshino Y, Sakata Y.:
Defective sorting to secretory
vesicles in the trans Golgi networks
partly responsible for protein C
deficiency: Molecular mechanisms
of impaired secretion of abnormal
protein C R169W, R352W, and
G376D. 45th Annual Meeting of the

American Society of Hematology.
Dec 6, 2003. San Diego, USA.

Mimuro J, Ogata K, 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
adipocytes transduced with the
simian immunodeficiency virus
agmTYO1-based vector for
haemophilia A gene therapy. 45th
Annual Meeting of the American
Society of Hematology. Dec 7, 2003.
San Diego, USA.

Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata
Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T,
Mimuro J, Sakata Y : Neonatal
injection of human factor VIII
induces immune tolerance in murine
hemophilia A. The International
Society on Thrombosis and
Haemostssis. XIX CONGRESS and
49th Annual SSC Meeting. July 2003.
Birmingham, UK.

H. 知的財産権の出願・登録
特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）
分担研究報告書

In vivo ストレス負荷モデルにおける TF の組織特異的発現と血栓形成

分担研究者 小嶋 哲人 名古屋大学医学部教授

研究
要
旨

近年我が国で増加している血栓性疾患は種々の身体的・精神的ストレスによっても誘発されることが知られ、血栓症の予防や治療法の開発にはその発症分子病態の解明が不可欠である。我々は拘束ストレス負荷後のマウス組織における微小血栓形成と、凝固開始因子である TF 発現との関連について検討した。拘束ストレス負荷 20 時間後に、種々マウス組織における TF mRNA 発現の有意な増加を認めた。このようなストレス負荷後の TF 発現の増強は、老齢個体や肥満個体においてさらに著明となり、特に腎臓や脂肪組織では微小血栓の形成とよく相関していた。また、ストレスにより誘導される TF 発現は、一部 TNF- α 依存性であることも明らかとなった。

A. 研究目的

近年の高齢化とともに増加する血栓性疾患（脳梗塞、心筋梗塞など）は、種々の身体的・精神的ストレスが発症誘因となることが知られている。ストレスが誘因となる血栓症の発症メカニズムを追究することは重要な課題であるが、その病態には、血管弾性や血圧の変動、ホルモンバランスの変化、自律神経系のレスポンスなど様々な要素が絡んでおり、いまだ十分には解明されていない。我々はストレスによる血液凝固能の変化と血栓傾向との関連という点に着目し、ストレス負荷個体における血栓形成のメカニズムを明らかにすることを目的として拘束ストレス負荷後のマウス組織における微小血栓形成と凝固開始因子である TF の発現変化について解析した。また、老齢マウスや肥満マウスを用いても同様の解析を行い、ストレス誘発性の血栓傾向に及ぼす加齢や肥満の影響についても検討した。

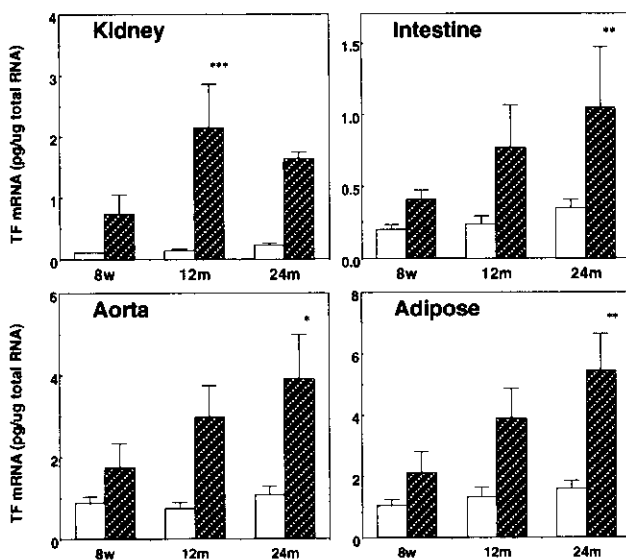
B. 研究方法

各週齢・月齢（8 週、12 ヶ月、24 ヶ月齢）の C57BL/6J マウスを 50 ml 用チューブ内に一定時間（最短 2 時間、最長 20 時間）閉じ込めて拘束ストレスを負荷した後、主要臓器を採取した。各組織より RNA を抽出して competitive RT-PCR 法により TF mRNA を定量するとともに、組織抽出液中の TF 蛋白量を Western blot 法にて半定量的に解析した。また in situ hybridization 法を用いて組織における TF mRNA 発現の局在についても検討した。最後に PAS 染色による組織学的な検討にて、20 時間の拘束ストレス負荷後の腎臓・脂肪組織における微小血栓沈着について半定量的な解析を行った。同様の比較検討を、肥満マウスとその対照マウス間でも行った。（倫理面への配慮）

動物実験に際しては名古屋大学医学部動物実験指針に基づき、動物愛護の精神のもとに動物に与える苦痛が最小限となるよう留意した。

C. 研究結果

拘束ストレス負荷 20 時間後に腎臓、小腸、副腎、大動脈、脂肪組織において TF mRNA 発現量の有意な増加を認めた (2 倍~5 倍)。このようなストレス負荷後の TF 発現増加は、12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢の老齢マウスや肥満マウスでは対照マウスと比べてより顕著であった。一方、ストレス負荷前に抗 TNF- α 抗体を投与した場合の TF mRNA 発現変化を非投与群と比較検討した結果、抗 TNF- α 抗体前投与により、ストレス後の TF mRNA 発現増加が腎臓や脂肪組織において約 50%抑制された。



in situ hybridization 法による TF mRNA 発現の局在解析では、腎尿細管上皮細胞、小腸絨毛内の平滑筋細胞、血管平滑筋および外膜細胞、脂肪細胞などにおいて TF mRNA 発現の増強を認めたが、いずれの臓器においても血管内皮細胞においては TF mRNA の明らかな発現増強を認めなかった。また組織学的な検討により、20 時間の拘束ストレスを負荷した老齢マウスでは、腎糸球体内や脂肪組織における微小血管内に血栓の沈着を認めたが、若年マウスではいずれの組織においても微小血栓沈着は認められなかった。

D. 考察

拘束ストレス負荷によって in vivo での TF 発現は組織特異的、加齢依存的に有意に増大し、この変化が全身的・局所的な血栓傾向に寄与していると推測された。老齢個体や肥満個体においては、主として腎臓や脂肪組織での TF 発現増加が、組織内微小血管における血栓形成のひとつの原因となっていると考えられた。また、ストレス負荷により誘導される TF 発現は、一部 TNF- α 依存性である可能性が示唆された。

E. 結論

マウスに拘束ストレス負荷を与えることによって、腎臓や脂肪組織などの組織における TF の発現は有意に増加し、この変化は老齢個体や肥満個体でより顕著であった。ストレス誘発性の血栓傾向の背景には組織特異的な TF の発現増加があると考えられ、この発現制御が血栓症予防のカギとなることが推察された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

S. Kunishima, T. Matsushita, T. Kojima, M. Sako, F. Kimura, E. Jo, C. Inoue, T. Kamiya, and H. Saito: Immuno-fluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A (NMMHCA) in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations. **Lab. Invest.** 83 (1): 115-122, 2003.
S. Kunishima, T. Kojima, C. Inoue, T. Kamiya, and H. Saito: GATA-1 transcription factor is mutated in CMK megakaryoblastic cell line. **Br. J. Haematol.** 120 (3): 542-543, 2003.
A Tsukahara, T. Yamada, A. Takagi, T. Murate,

T. Matsushita, H. Saito, and T. Kojima: Compound heterozygosity for two novel mutations in a severe factor XI deficiency. **Am. J. Hematol.** 73 (4): 279-284, 2003

K. Ishiguro, T. Kojima, and T. Muramatsu: Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. **Glycoconjugate J** 19: 315-318, 2003.

T. Yamada, A. Takagi, K. Takeshita, K. Yamamoto, M. Ito, T. Matsushita, T. Murate, H. Saito and T. Kojima: Enzyme immunoassay for measurement of murine plasminogen activator inhibitor-1, employing a specific antibody produced by the DNA vaccine method. **Thromb. Res.** 111 (12): 285-291, 2003.

K. Takeshita, M. Hayashi, S. Iino, T. Kondo, Y. Inden, M. Iwase, T. Kojima, M. Hirai, M. Ito, D. J. Loskutoff, H. Saito, T. Murohara, and K. Yamamoto: Increased Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cardiomyocytes Contributes to Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction. **Am. J. Pathol.** 164 (2): 449-456, 2004.

2. 学会発表

Tetsuhito Kojima: *In vivo* functions of a heparan sulfate proteoglycan, ryudocan (syndecan-4). International Symposium on Biological Science of Heparan Sulfate Proteoglycans (2003)

萩原和美、中出祐介、祖父江沙矢加、田川容子、坂野嘉子、小泉恵子、浅野治彦、高木明、小嶋哲人、野澤義則、村手隆: PMA 刺激ヒト白血病細胞株 MEG-O1 におけるスフィンゴシンキナーゼ 1 の発現調節機序の解析 第 45 回日本臨床血液学会総会 (2003)

原田直明、岡島研二、内場光浩、小嶋哲人: アンチトロンビンの抗炎症作用は主にカプサイシン感受性知覚神経の活性化

を介する 第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

中出祐介、高木明、小嶋哲人、村手隆: ヒト白血病細胞株 MEG-O1 を用いたスフィンゴシンキナーゼ 1 の発現調節機序の解析 第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

岡田浩美、河井怜子、山田貴之、高木明、村手隆、小嶋哲人、足立達哉、松下正、山本晃士、高松純樹、齋藤英彦: プロテイン S 欠損症 16 例における PS α 遺伝子解析 第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

山田貴之、河井怜子、岡田浩美、高木明、村手隆、伊藤雅文、足立達哉、山本晃士、松下正、齋藤英彦、小嶋哲人: マウス PAI-1 に対する抗体作製と ELISA 構築 第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

河井怜子、岡田浩美、山田貴之、高木明、村手隆、伊藤雅文、足立達哉、山本晃士、松下正、齋藤英彦、小嶋哲人: 血液凝固第 XI 因子欠損症 4 症例の遺伝子解析 第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (2003)

H. 研究発表

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

I. 研究協力者

高木明、村手隆

: 名古屋大学医学部保健学科

足立達哉、林 陸晴、竹下享典、松下正、

: 名古屋大学大学院医学研究科

山本晃士、

: 名古屋大学附属病院輸血部

齋藤英彦

: 国立名古屋病院

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服研究事業)
血液凝固異常症に関する調査研究班

先天性 TTP(Upshaw-Schulman 症候群:USS)患者における
ADAMTS13 遺伝子解析

分担研究者 藤村吉博 奈良県立医科大学輸血部教授

研究要旨

本年度新たに本邦の USS 5 家系 5 症例について ADAMTS13 遺伝子解析を行い、8 つの新たな変異を確認した。これらのうち、エクソンとイントロン境界部の異常の 3 種類のうち 2 種類について、RT-PCR を行いスプライシングの異常であることを確認した。また、残りの 5 つの異常について HeLa 細胞を用いた発現実験を行い、4 つは細胞からの分泌障害、R193W はわずかに分泌されるものの活性をほとんど持たないことを見出した。現在までに本邦の 7 症例の USS について ADAMTS13 遺伝子解析が終了したが、2 例がホモ接合体、5 例が複合ヘテロ接合体の遺伝子異常を持つことを明らかにした。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の病因として、その多く症例で VWF 切断酵素(別名 ADAMTS13)活性が低下していることが明らかにされた。後天性 TTP は、IgG 型のインヒビター(自己抗体)の存在によって本酵素活性が低下するが、先天性の TTP (Upshaw-Schulman 症候群:USS)では遺伝的に本酵素活性が低下する。昨年、宮田班員は本邦の USS の 2 家系 2

症例の ADAMTS13 遺伝子解析について報告し、ADAMTS13 活性低下を伴う P475S 変異をヘテロ接合体で持つ日本人が約 10%に存在することを明らかにした。本年度、新たに 5 家系 5 症例の日本人 USS において ADAMTS13 遺伝子解析を行い、日本人における USS の遺伝的特徴を明らかにする。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

対象とした USS7 例の家系図及び家族全員の ADAMTS13 活性を

図 1 に示す。これらの患者は、奈良医大輸血部にて ADAMTS13 活性が測定感度以下の 3%未満であること、およびインヒビターが存在しないことを2回以上確認した。7 例の患者の中で患者 C の両親のみが、明らかな血族結婚（従兄弟）であったが、他の 6 例は非血縁であった。

倫理面への配慮として、奈良県立医科大学および遺伝子解析を實際行った国立循環器病センターは もちろん検体を採取した 7 病院すべてで倫理委員会の許可を得て遺伝子解析を行った。

C. 研究結果

ADAMTS13 の遺伝子解析の結果も図 1 に示す。7 症例のうち 2 症例がホモ接合体、5 症例が複合ヘテロ接合体であった。今回新たに発見した *ADAMTS13* 遺伝子変異は 8 種類で、エクソンに 5 種類、エクソンとイントロンの境界部に 3 種類の変異を認めた。エクソンとイントロンの境界部位に存在する変異は、スプライシングが正常に行えないことが予想された。そこで、414+1 G>A と 1244+2 T>G の 2 つの変異について患者及び家族の末梢血から mRNA を採取し、RT-PCR を施行したところスプラ

イシングに異常があることを確認した。また、残りの 5 つの変異について変異体を作成し HeLa 細胞で発現実験を行った。5 つのうち R193W 以外の 4 つの変異体は細胞内では発現しているが上清中には分泌されず、分泌障害であることが予想された。R193W は上清中には分泌されるものの野性株と比べて有意に分泌量が低く、ウエスタンブロット (WB) による計測では野性株の 23%であった。上清における WB での ADAMTS13 発現量を一定にして野性株と R193W の ADAMTS13 活性を比較すると R193W の活性は有意に低かった。よって、R193W は発現効率が低いうえに、発現蛋白の ADAMTS13 活性も低いことが判明した。また、これら 8 種類の変異を正常人 96 名で検討しても 1 名もこれらの変異を持つ正常人は見つからなかった。

D 考察

USS は以前から、兄弟姉妹で同様の症状が認められるが、両親には認められないことより、常染色体劣勢遺伝が予想されていた。しかし、患者両親のほとんどが血族結婚でないことより、USS の遺伝形式に疑問が持たれていた。今回、