

## 蛍光ペプチド基質を用いた ADAMTS13 活性測定法の開発

分担研究者 宮田敏行(国立循環器病センター研究所・病因部・部長)

研究協力者 小亀浩市(国立循環器病センター研究所・脈管生理部・室長)

研究協力者 坂野史明(国立循環器病センター研究所・脈管生理部・室員)

### 研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は、異常高分子量フォンビルブランド因子(VWF)マルチマーによる血小板凝集の亢進が原因であり、細小血管に生じた血小板血栓が種々の臨床症状をもたらす。異常高分子量 VWF マルチマーは、血漿 VWF 切断酵素 ADAMTS13 の活性が著減することで増加する。TTP の発症予知や溶血性尿毒症症候群との鑑別診断には、ADAMTS13 活性の測定が有用とされるが、従来法は煩雑な操作と時間を必要とする。最近我々は、VWF の部分配列 73 残基が ADAMTS13 の特異的基質となることを見出し、従来法より簡便な活性測定法を開発した。本年度は、化学修飾された VWF73 を合成することにより、さらに簡便で定量的な測定法を確立した。臨床検査レベルでの普及が期待される。

### 1. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は、フォンビルブランド因子(VWF)切断酵素 ADAMTS13 の先天的および後天的欠乏によって惹起される。ADAMTS13 は、2価金属イオン要求性のメタロプロテアーゼであり、VWF の A2 ドメイン内に位置する Y1605-M1606 間を特異的に切断する。通常、ADAMTS13 の活性によって VWF マルチマーのサイズは最適化されているが、ADAMTS13 活性が著減すると、異常高分子量 VWF マルチマーが増加し、病的血栓が生じる。ADAMTS13 活性の測定は、TTP 診断にとってきわめて重要な判断基準になり、また発症の予知にも役立つことが期待されている。これまで、ADAMTS13 活性の測定法がいくつも報告されているが、いずれも時間がかかる

方法であった。我々は、従来法の問題を克服するため、新しい活性測定法の確立をめざした。

### 2. 研究方法

ADAMTS13 の特異的基質となる 73 残基領域(VWF の D1596-R1668)の P7 位(Q1599)を 2-(N-methylamino)benzoyl(Nma)で修飾した 2,3-diaminopropionic residue(A2pr)に、P5'位(N1610)を 2,4-dinitrophenyl(Dnp)で修飾した A2pr にそれぞれ置換したペプチド FRETTS-VWF73 を化学合成した。これを緩衝液に溶解し、96 ウェルプレート上で血漿と混合した。各ウェルの蛍光を 340nm 励起/450nm 測定用フィルターを備えたプレートリーダーで経時

的に測定することにより、切断活性を測定した。

### 3. 研究結果

FRETS-VWF73 を正常血漿と反応させたところ、反応時間依存的かつ血漿用量依存的な蛍光値の上昇が見られた。種々のプロテアーゼ阻害剤の影響を受けないこと、2価金属イオンキレート剤で完全に阻害されること、TTP 患者由来の血漿で蛍光値が変化しないことなどから、FRETS-VWF73 は血漿中の ADAMTS13 特異的に切断されることが示唆された。緩衝液の組成を最適化した結果、1時間の反応で定量的に測定できるようになった。本方法で種々の患者血漿の ADAMTS13 活性を測定したところ、先天性および後天性 TTP 患者では活性が著減しており、溶血性尿毒症症候群や播種性血液凝固症候群患者では活性が観察された。

### 4. 考察

ADAMTS13 に特異的な最小基質 VWF73 に蛍光基 Nma と消光基 Dnp を導入することにより、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 現象を利用した測定系を構築することに成功した。基質溶液と血漿を混合し、蛍光プレートリーダーで測定するのみという、ごく簡単な操作で完了する。反応時間は1時間で済むため、解析時間を含めても全行程は1時間半～2時間で終了する。したがって、本法は従来法より格段に簡便化されているということができ、臨床検査レベルでの普及が期待される。実際、平成 17 年 4 月開始を目標に、国内の臨床検査会社が本法の受託検査を実施する体制を整えており、また、海外からも多くの問い合わせが来ている。米国血液学会の教育講演会で本法を紹介し、その普及に務めた。今後、多施設で有用性が評価検討され、

TTP 診断のための強力な指標となることが期待される。

### 5. 結論

ADAMTS13 に特異的な消光性蛍光基質 FRETS-VWF73 を開発し、血中 ADAMTS13 活性の簡便かつ定量的な測定法を確立した。

### 6. 健康危険情報

なし

### 7. 研究発表

#### 7-1. 論文発表

Banno F, Kaminaka K, Soejima K, Kokame K, Miyata T : Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem* 279 : 30896-30903, 2004.

Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN : Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* : 407-423, 2004.

Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T : FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol*, In press.

#### 7-2. 学会発表

Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T : Development of ADAMTS13 enzymatic assay. *Gordon Research Conferences 'Hemostasis'*, Waterville, USA, July, 2004.

Banno F, Kokame K, Okuda T, Kaminaka K, Soejima K, Miyata T : Genetic and functional characterization of mouse ADAMTS13. Gordon Research Conferences 'Hemostasis', Waterville, USA, July, 2004.

宮田敏行・小亀浩市 : ADAMTS13 酵素活性と血栓性血小板減少性紫斑病. 第 23 回日本臨床化学会夏期セミナー, 鹿児島, 2004 年 7 月.

Soejima K, Matsumoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y, Nozaki C, Nakagaki T : Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) -structure and function relationship. Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division, Nagoya, September, 2004.

小亀浩市 : 先天性および後天性の血栓性血小板減少性紫斑病. 第 66 回日本血液学会総会, 京都, 2004 年 9 月.

坂野史明・小亀浩市・奥田智彦・宮田敏行 : マウス ADAMTS13 の完全欠損は TTP 発症の十分条件にならない. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004 年 10 月

小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・宮田敏行 : フォンビルブランド因子切断酵素 ADAMTS13 の活性測定. 第 48 回日本輸血学会近畿支部総会, 京都, 2004 年 11 月.

小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・宮田敏行 : 消光性蛍光基質を用いた血漿 ADAMTS13 活性の測定. 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 奈良, 2004 年 11 月.

坂野史明・小亀浩市・奥田智彦・宮田敏行 : ADAMTS13 の欠損だけではマウスは血栓性血小板減少性紫斑病を発症しない. 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 奈良, 2004 年

11 月.

Miyata T: New ADAMTS13 assays and applications. American Society of Hematology, 46<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, Education program, Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. San Diego, USA, December 2004.

## 8. 知的財産権の出願・登録

### 8-1. 特許取得

なし

### 8-2. 実用新案登録

なし

### 8-3. その他

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・細胞医療部 辻 肇

### 研究要旨

先天性AT欠損症と診断された56家系の欠損患者において遺伝的解析を行った。Sasの分類によるタイプI欠損症（古典的欠乏症）は14家系、タイプII欠損症（分子異常症）は11家系、抗原量が不明のためタイプを確定できないものが31家系あった。さらに、タイプI欠損症において遺伝子異常が不明のものが6家系（43%）に認められ、タイプII欠損症においては1家系（9%）であった。また、エクソン6のAla384(GCA)のPro(CCA)への1塩基置換によるアミノ酸置換例が見い出され、AT-Charleville、Cambridge、Vicenza、Sudburyと同様の変異でプロテアーゼ阻害活性に異常を認める極めて稀な症例であった。

### 1. 研究目的

昨年度の本調査研究において、先天性アンチトロンビン（AT）欠損症患者を対象にして、血栓症発症の臨床的背景の検討を行った。一方、先天性AT欠損症患者の遺伝子解析が国内外において行われており、明らかにされた遺伝子異常は、欠損症における血栓症の発症機序を解明するうえで、また診断を確定するうえで重要と考えられる。しかし、欧米人において同定された遺伝的背景が、直ちに日本人集団に適用できるものではなく、血栓症発症に関与する血拴性素因としての遺伝的背景を日本人集団において明らかにすることが重要である。また、ヒト肝細胞（HuH-7）を用いた基礎的検討において、RNA/DNAオリゴヌクレオチド(RDO)法により細胞核内への遺伝子導入が可能であり、本欠損症お

けであり、本欠損症における変異遺伝子の修正が将来可能となることも予測される。現在まで進められている遺伝子解析結果は、今後の治療にも結びつくものでもあり、その成績をまとめて報告する。

### 2. 研究方法

先天性AT欠損症と診断された56家系の欠損患者において遺伝的解析を行った。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。

### 3. 研究結果

#### 1) AT欠損症のタイプ（表1）

AT欠損症の分類として、SasおよびLaneの分類が広く用いられている。Sasの分類は、免疫学的に測定される抗原量と活性によるものであり、タイプI欠損症（古典的欠乏

Sas		Lane		
Type I	14	I	8	43%
		ND	6	
Type II	11	II-HBS	2	9%
		II-RS	6	
		II-PE	2	
		ND	1	
ND	31	I	8	65%
		II-HBS	3	
		ND	20	
		56		

表1 AT欠損症のタイプ

Type I : タイプ I 欠損症 (古典的欠乏症)、Type II : タイプ II 欠損症 (分子異常症)、HBS : ヘパリン結合部位に異常を認めるもの、RS : 反応部位に異常を認めるもの、PE : 多面的影響を認めるもの、ND は確定できなかったものを示す。

症) は 14 家系、タイプ II 欠損症 (分子異常症) は 11 家系、抗原量が不明のためタイプを確定できないものが 31 家系あった。さらに、タイプ I 欠損症において、遺伝子異常が同定されたものは 8 家系あったが、不明のものが 6 家系 (43%) 認められた。一方、タイプ II 欠損症の 11 家系においては、ヘパリン結合部位に異常を認めるもの (HBS) が 2 家系、反応部位に異常を認めるもの (RS) が 6 家系、多面的影響を認めるもの (PE) が 2 家系認められた。遺伝子異常が同定されないものは 1 家系 (9%) に過ぎなかった。抗原量が不明のため

タイプを確定できないもの (31 家系) のうち、8 家系はタイプ I、3 家系はタイプ II と確定された。

## 2) 症 例

患者は、19才の男性。既往歴に特記すべきものは認められない。家族歴として、祖父が血栓性静脈炎のため治療中である (図 1)。発端者を含めて、3 世代 4 名に AT 欠損を認める。現病歴では、平成 15 年 4 月頃より、右下腿部疼痛を自覚し、5 月 6 日に呼吸困難と意識消失を認めた。臨床検査成績 (表 2) から AT 分子異常症が疑われ、血栓マーカーの上昇、胸部 CT 所見等より肺血栓

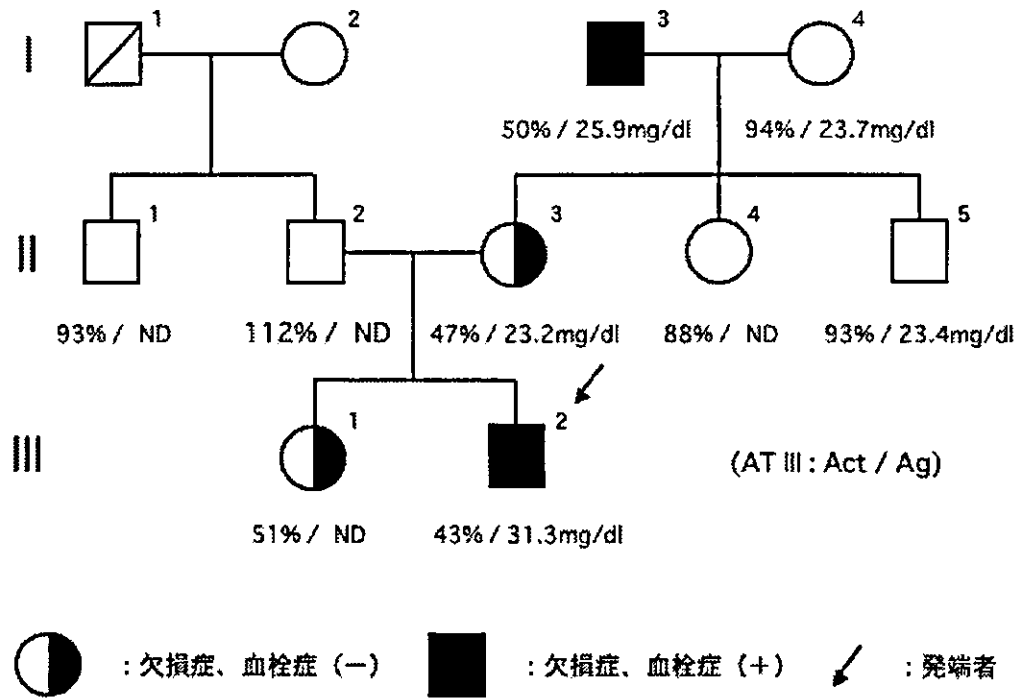


図1 先天性 AT 欠損症の家系図

WBC	13,820	/ $\mu$ L	PT	16.9	sec
RBC	485	$\times 10^4$ / $\mu$ L	PT-INR	1.96	
Hb	14.9	g/dl	APTT	39.5	sec
Ht	41.4	%	Fbg	171	mg/dl
Plts	13.2	$\times 10^4$ / $\mu$ L	D-D	30<	$\mu$ g/dl
			TAT	60<	ng/ml
			AT : Ag	31.3	mg/dl
ANF	(-)		AT : Act	43	%
LA	1.38		PC;Act	48	%
Anti-CL $\cdot$ $\beta$ GP	1.2	U/ml	PS;Act	116	%

表2 臨床検査成績

塞栓症と診断された。血栓溶解療法、両肺動脈経カテーテル的血栓除去術、抗凝固療法を施行し、6月5日退院した。

遺伝子解析においては、エクソン6において Ala 384 (GCA) のPro (CCA) への、1塩基置換によるアミノ酸置換を認めた (図2)

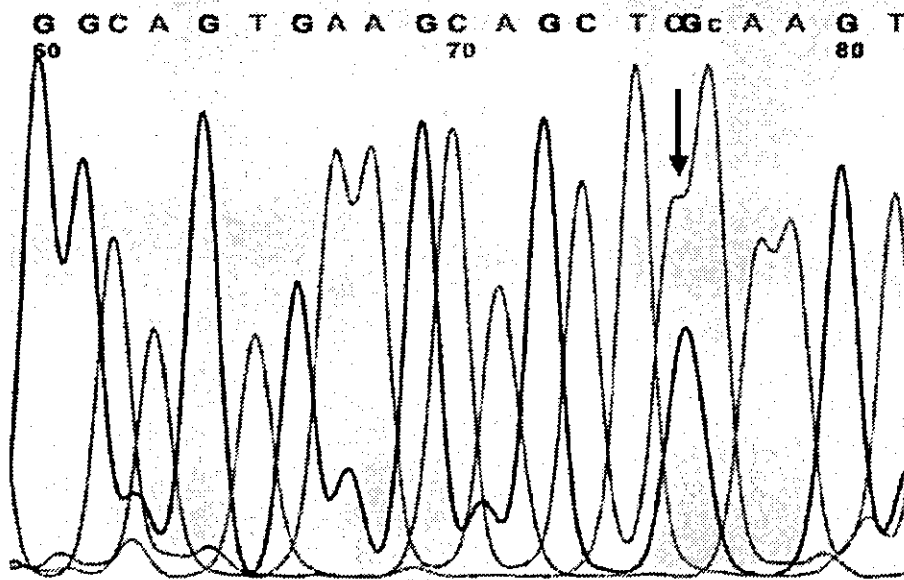


図2 エクソン6の遺伝子解析結果  
Ala384(GCA) とともにPro(CCA)への変異を認める。

#### 4/5. 考察および結論

先天性AT欠損症と診断された56家系の欠損患者において遺伝的解析を行った。AT欠損症の分類としては、Sas および Lane の分類が広く用いられている。Sas の分類は、免疫学的に測定される抗原量と活性によるものである。一方、Lane による分類

は、遺伝子異常部位から分類したものである。今回の検討において、タイプI欠損症(古典的欠乏症)は14家系、タイプII欠損症(分子異常症)は11家系、抗原量が不明のためタイプを確定できないものが31家系あった。さらに、タイプI欠損症において遺伝子異常が不明のものが6家系

(43%) に認められ、タイプ II 欠損症においては、遺伝子異常が同定されないものは 1 家系 (9%) に過ぎなかった。タイプ I 欠損症においては、今回の主としてエクソンの塩基配列を主体とする解析では見出せない異常により欠損が起る可能性がタイプ II 欠損症に比べて高いことが示唆された。また、提示した症例は、エクソン 6 の Ala384(GCA) の Pro(CCA)への 1 塩基置換によるアミノ酸置換例であり、AT - Charleville、Cambridge、Vicenza、Sudbury と同様のアミノ酸変異でプロテアーゼ阻害活性に異常を認める極めて稀な症例である。

6. 健康危険情報

なし

7. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

8. 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



平成16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」

班長：池田康夫 慶応義塾大学医学部

分担研究報告書

### 敗血症 DIC の病態と線溶系因子

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）

研究協力者 窓岩清治（自治医科大学医学部分子病態研究部講師）

#### 研究要旨

重症感染症に伴う DIC は、微小血栓に起因する虚血障害により多臓器不全を合併しやすく、致命的な病態へと進展することが多い。感染症症例で SIRS 基準を満たした病態、いわゆる敗血症を基礎疾患とする敗血症 DIC 症例 117 例と非敗血症 DIC 症例 1,627 例を対象として、重症感染症に伴う DIC の早期診断、病態および予後を把握する上で有用な新規線溶系分子マーカーを検討した。その結果、(1) 敗血症 DIC では、血漿フィブリノゲン値が高く、血清 FDP の増加が抑制されている状態にある。(2) 線溶系分子マーカーである PIC、D-ダイマーの変動が少ない。(3) 敗血症 DIC における線溶反応の抑制は、血漿 PAI-1 の増加に起因する。(4) 血漿 PAI-1 は、臓器障害の程度および診断 28 日後の予後と良く相関することが明らかとなった。これらのことから、敗血症 DIC を早期診断するためには、血漿 PAI-1 等の新規線溶系分子マーカーを加えた診断が有用である可能性が示された。

#### 1. 研究目的

成人以降に出現する原因不明の血栓症の一因として、例えば悪性腫瘍を基礎疾患とする“慢性”播種性血管内凝固 (DIC) は、鑑別すべき重要な病態である。本研究において、DIC の血栓形成に関与する線溶系因子の役割を検討した。特に、重症感染症に伴う DIC は、微小血栓に起因する虚血障害により多臓器不全を合併することが多い。感染症の治療が肝要であるものの、そのコントロールは必ずしも容易ではない。このような場合、併発する DIC に対して可及的に抗凝固療法を施

されなければ、致命的な病態へと進展することが多い。旧厚生省 DIC 診断で用いられているグローバルマーカー（血小板数、プロトロンビン時間比、血漿フィブリノゲン値および血清 FDP) のみを用いた診断基準は、感染症に併発する DIC を至適な時期に診断し抗凝固療法を開始するための十分な基準とは必ずしもいえない。本研究では、感染症症例で Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) 基準を満たした病態を敗血症と定義し、敗血症を基礎疾患とした DIC (敗血症 DIC) に対して、その早期診断、病態お

よび予後を把握する上で有用な新規線溶系分子マーカーを検討することを目的とする。

## 2. 研究方法

1984年から2004年までの当研究施設の疾患データベースに登録されている症例の中で、旧厚生省の診断基準でDICないしはDIC疑いと診断される1,744症例を対象とした。全対象症例において、DICをきたす基礎疾患の検索とともに、凝固線溶系検査項目、補助的検査項目（トロンビン-アンチトロンビン III 複合体：TAT、プラスミン- $\alpha$ 2プラスミンインヒビター複合体：PIC、D-ダイマー）、およびPAI-1について非敗血症DICと敗血症DICとの2群間での比較解析を行った。さらに敗血症DIC症例では、DIC診断時の臓器障害の指標であるSOFAスコアと、診断後28日目の予後についても評価項目とした。

統計解析は、Mann-Whitney's U-test および one-way ANOVA による検定を用いた。

(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、各検体を匿名化した上で、諸検査を施行した。

## 3. 研究結果

血液培養の陽性症例は、全敗血症症例の37.8%で、グラム陽性菌の単独感染症は28.5%、グラム陰性菌の単独感染症は36.5%であった。グラム陽性菌を起炎菌とする敗血症DIC症例のSOFAスコアは、グラム陽性菌による敗血症DIC症例に比較して有意であった。

敗血症DIC症例の血漿フィブリノゲン

濃度は、非敗血症DICと比較して有意に高値を示す一方で、血清FDP値は、敗血症DIC症例で有意に低値であった。線溶系分子マーカーのうちプラスミン- $\alpha$ 2プラスミンインヒビター複合体とD-ダイマーとは、いずれも敗血症DIC群で有意に低下していた。一方、敗血症DIC症例におけるPAI-1値は、非敗血症DIC症例と比して、有意に高値であった。

敗血症DIC症例において血漿PAI-1値とSOFAスコアの関係を見ると、血漿PAI-1値が90 ng/mL以上の群ではSOFAスコアが9点であるのに対して、血漿PAI-1値が30 ng/mL未満の群の4.6点と比較して、SOFAスコアが有意に高値を示していました。さらにDIC診断後28日目の死亡率の比較では、血漿PAI-1値が30 ng/mL未満の敗血症DIC例では死亡例がみられないのに対して、90 ng/mL以上の群での死亡率が約65%と、他の群に比較して有意に高値を示した。

## 4. 考察

グラム陰性菌による敗血症DIC症例ではグラム陽性菌によるDIC症例に比較してSOFAスコアが有意に高値を示していた。このことは、グラム陰性菌による敗血症DICでは多臓器不全を伴いやすいことを示しており、起炎菌の検索が、敗血症の重症度を知る上でいかに重要であるかを示唆するものである。

敗血症DICでは、非敗血症DICに比較してフィブリノゲン値が高く、FDPの増加が抑制されていることから、敗血症DICの病態が診断基準上の加点に結びつきにくいことを示している。さらにPIC、D-ダイマーなどの線溶系分子マーカーも、敗血症DICでの変動が少なくために、

DIC の診断に寄与する可能性が少ないものと考えられる。

PAI-1 は、プラスミノゲンアクチベータの特異的阻害因子であり、線溶反応の開始段階を制御する重要な生理的調節因子です。敗血症などの重症感染症において、PAI-1 は重要なキーファクターである。これらの病態では PAI-1 の病的な増加を伴うため、生理的な線溶反応が抑制され、止血栓の除去障害をきたすことが示唆されている。本研究では、敗血症 DIC 症例では非敗血症 DIC 症例と比較して、血漿 PAI-1 値が有意に増加していることが明らかにされただけでなく、DIC 診断時における血漿 PAI-1 値の多寡が、臓器障害と予後判定の重要な指標となる可能性が示された。

## 5. 結論

血漿 PAI-1 値は、敗血症 DIC 症例における臓器障害の程度および予後と良く相関していることが明らかとなった。敗血症 DIC を早期診断し、病態を把握し予後を判定するためには、血漿 PAI-1 値等の新規線溶系分子マーカーを加えた診断が有用である可能性が示唆された。

## 6. 健康危険情報

特記事項なし。

## 7. 研究発表

### A. 論文発表

Hamano A, Ueda M, Ueno Y, Tanaka S, Mimuro J, Sakata Y.: Latex Immunoturbidimetric Assay for Soluble Fibrin Complex. *Clinical Chemistry*. 51(1) 183-188,2005.

Satoh Y, Kita H, Kihira K, Mutoh H, Osawa H, Satoh K, Ido K, Sakata Y, Sugano K.: Gastrointestinal Angiodysplasia in a Patient with Type2 von Willebrand's Disease and Analysis of Exon 28 of the von Willebrand Factor Gene. *Am J Gastroenterology*. 99:2495-2498,2004.

Imura O, Takahashi H, Yashiro T, Madoiwa S, Sakata Y, Asano Y, Kusano E.:Effect of ureteral obstruction on matrix metalloproteinase-2 in rat renal cortex. *Clin Exp Nephrol*. 8(3)223-9,2004.

Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, Sugo T, Ishida T, Ichimura K, Sakata Y.: Expression profiles of fibrinolytic components in nasal mucosa. *Histochem Cell Biol*. 122 (1)61-73, 2004.

Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Ishiwata A, Kimura K, Takano K, Madoiwa S, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y.: Sustained transgene expression by human cord blood derived CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *J Gene Med*. 6(10):1049-1060,2004.

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. 2(5)754-762, 2004.

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  $\gamma$  Ala327 Thr: formation of fragile but fibrinolysis-resistant fibrin clots and its relevance to arterial thromboembolism. Blood 103(8)3045-3050, 2004.

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. 2:275-280, 2004.

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 adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. Gene Ther. 11:253-259, 2004.

Watanabe T, Minakami H, Sakata Y, Matsubara S, Sato I, Suzuki M.: Changes in Activity of Plasma Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Pregnancy. Gynecol Obstet Invest. 58(1):19-21, 2004.

#### B. 学会発表

松下卓、三室 淳、石渡 彰、窓岩清

治、水上浩明、卜部匡司、岡田尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也 : Hemophilia A Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Dual Vector System: Improved FVIII activity by balanced expression of heavy and light chains of FVIII 第 10 回日本遺伝子治療学会年次集会 2004.8/5~6 東京 一橋会館

Mizukami, H, Mimuro, J, Ogura, T, Okada, T, Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: A novel method for in vivo gene transfer to adipose tissue using adeno-associated virus(AAV)vectors. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting The Japan Society of Gene Therapy. 2004.8/5-6 東京 一橋会館

窓岩清治、山内忠彦、袴田陽二、小林英司、新井盛夫、諏合輝子、三室 淳、坂田洋一 新生児血友病 A マウスに対するヒト第 VIII 因子の投与は T 細胞性アネルギーを誘導する 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 2004.9/17~19 国立京都国際会館

高野勝弘、三室 淳、水上浩明、石渡彰、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一 PAI-1 promoter を用いた血管内皮細胞特異的ヒト第 IX 因子遺伝子導入と発現 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 2004.9/17~19 国立京都国際会館

石渡 彰、三室 淳、水上浩明、高野

勝弘、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、  
諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田  
洋一 第 VIII 因子欠乏マウスへのシ  
ングル AAV1 ベクターをもちいた第  
VIII 因子遺伝子導入と発現 第66回  
日本血液学会総会・第46回日本臨床  
血液学会総会 2004.9/17~19 国立  
京都国際会館

水上浩明、三室 淳、小倉 剛、岡田  
尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也：  
AAV ベクターをもちいた脂肪組織へ  
の *in vivo* 遺伝子導入法の開発 第  
66回日本血液学会総会・第46回日本  
臨床血液学会総会 2004.9/17~19  
国立京都国際会館

窓岩清治、坂田洋一：「新しい分子マ  
ーカーと新しいDIC診断基準の作成」  
線溶系分子マーカー. 第27回日本血  
栓止血学会学術集会 コンセンサ  
ス・シンポジウム 2004.11/18~20  
奈良県新公会堂

小野智子、副島見事、窓岩清治、三室  
淳、坂田洋一：フォンビルブランド切  
断酵素抗原量測定 ELISA の開発およ  
び各種疾患群における抗原量検討。  
第 27 回日本血栓止血学会学術集会  
2004.11/18~20 奈良県新公会堂

瀬嶋尊之、窓岩清治、三室 淳、諏合  
輝子、大森 司、高野勝弘、石渡 彰、  
柏倉裕志、石田 孝、市村恵一、坂田  
洋一：鼻粘膜における線溶系因子の局  
在とその役割 -特にアレルギー性炎  
症の有無による差異-。 第27回日本  
血 栓 止 血 学 会 学 術 集 会

2004.11/18~20 奈良県新公会堂

大森 司、西井清行、萩原 淳、関戸  
清貴、窓岩清治、諏合輝子、三室 淳、  
坂田洋一：市販漢方薬“寿位”による  
血小板減少. 第 27 回日本血栓止血学  
会学術集会 2004.11/18~20 奈良県  
新公会堂

諏合輝子、大森 司、窓岩清治、三室  
淳、坂田洋一：損傷血管内皮細胞の修  
復におけるフィブリンの役割. 第  
27 回日本血栓止血学会学術集会  
2004.11/18~20 奈良県新公会堂

Mimuro J, Ishiwata A, Kashiwakura Y,  
Takano K, Ohmori T, Madoiwa S,  
Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y.  
Phenotype Correction of Hemophilia A  
Mice with Adeno-Associated Virus  
(AAV) Vectors Carrying the B Domain  
Deleted Canine Factor VIII Gene. 46th  
Annual Meeting of the American Society  
of Hematology. Dec 6, 2004 San Diego,  
USA

8. 知的財産権の出願・登録  
特記事項なし。

## 血栓性素因プロテイン S 欠損症の遺伝子解析

分担研究者 小嶋 哲人 名古屋大学医学部教授

### 研究要旨

我々は血栓性素因・先天性プロテイン S 欠損症 8 症例について遺伝子解析を行い、新規ミスセンス変異を 2 種類 G508A (C80Y)、G1210A (R314H)、5 塩基欠失 887CTCTG-del (C206X) とナンセンス変異 G891T (E208X) を各 1 例ずつ同定。また、既報の G405C (V46L)、Ex10+5A→G、C2147T (P626L) を各 1 例、A732G (K155E) を 2 例に検出した。症例 2 の発端者は A732G と 887CTCTG-del の複合ヘテロ接合体であった。家族内解析の結果、PS 活性低下は症例 2 の家系では A732G の伝播と一致しなかったが、症例 5 の家系では A732G の伝播と一致した。A732G に伴う PS 活性値は家系により異なり、PS 活性変動に関与する A732G 以外の要因の存在が示唆された。

### A. 研究目的

プロテイン S (PS) はビタミン K 依存性凝固制御因子の一つで活性化プロテイン C が活性化第 V 因子および第 VIII 因子を不活化する際に補酵素として機能しており、PS 欠損症は血栓症を起こすことが知られている。我々は、先天性 PS 欠損症 8 症例について遺伝子解析を行い、計 8 種類の PS α 遺伝子の変異を同定した。

### B. 研究方法

症例はいずれも深部静脈血栓症または肺梗塞を発症、精査の結果 PS 欠損症と診断された。インフォームドコンセントを得た後、患者あるいはその家族から末梢白血球より DNA を抽出し、各 PS α 遺伝子の全エクソンをイントロンとの境界領域を含め PCR 増幅、ダイレクトシーケンシング法にて塩基配列を解析した。変異の家族内伝播様式解析は PCR-RFLP にて施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て施行した。

### C. 研究結果

Table 1. Gene abnormalities and clinical features of patients with protein S deficiency

Case	Mutation*	Predicted AA change	Location	Total PS Ag	Free PS Ag	PS Ae	Cosegregation	Thrombosis
1	405G→C	Val46Leu	exon 3	78%	25%	22%	3/5 (+)	PE***
2	732A→G	Lys155Glu	exon 6	95%	30%	<10%	2/4 (-)	DVT****
	delCTCTGdel	Cys206Stop	exon 8				3/4 (+)	
3	528G→A	Cys80Tyr	exon 5	49%	39%	21%	1/1	DVT
4	1210G→A	Arg314His	exon 10	77%	49%	36%	1/1	DVT
5	732A→G	Lys155Glu	exon 6	ND**	ND	49%	3/6 (+)	PE
6	Exon 10 +5G→A	-	intron 1	ND	ND	22%	1/1	DVT
7	G891T	Glu208Stop	exon 8	60%	26%	ND	1/1	DVT, PE
8	2147C→T	Pro626Leu	exon 15	69%	37%	30%	1/1	DVT

\*Underline = novel mutation, \*\*ND = not done, \*\*\*PE = pulmonary embolism, \*\*\*\*DVT = deep vein thrombosis

解析の結果、PSα遺伝子の新規ミスセンス変異を 2 種類 G508A (C80Y)、G1210A (R314H)、5 塩基欠失 887CTCTG-del (C206X) とナンセンス変異 G891T (E208X) を各 1 例ずつ同定し、既報の G405C (V46L)、Ex10+5A→G、C2147T (P626L) を各 1 例、A732G (K155E) を 2 例に検出した。なお、症例 2 の発端者は A732G と 887CTCTG-del の複合ヘテロ接合体であった。

#### D. 考察

先天性 PS 欠損症解析の結果、計 8 種の PS $\alpha$ 遺伝子変異を同定した。家族内解析の結果、症例 1 家系で G405C をもつ発端者、父親、長兄はいずれも PS 活性が低く、この変異は PS 欠損症の病因と考えられた。A7321G と 877CTCTG-del の複合ヘテロ接合体であった症例 2 家系では、PS 活性低下は後者と一致し、前者と一致しなかった。一方、症例 5 家系では A732G をもつ発端者と母親、娘はいずれも PS 活性が低値で、これは A732G の伝播と一致した。A732G に伴う PS 活性値は家系により異なり、症例 2 家系には PS 活性変動に関与する A732G 以外の要因の存在が示唆され、今後さらに解析が必要である。

#### E. 結論

深部静脈血栓症または肺梗塞を発症した PS 欠損症の遺伝子解析によりの計 8 種の PS $\alpha$ 遺伝子変異（新規 4 種、既知 4 種）を同定した。これらは PS 欠損症の病因と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

A. Shimizu, T. Matsushita, T. Kondo, Y. Inden, T. Kojima, H. Saito, and M. Hirai:

Identification of the Amino Acid Residues of the Platelet Glycoprotein Ib (GPIb) Essential for the von Willebrand Factor Binding by Clustered Charged-to-Alanine Scanning Mutagenesis. **J. Biol. Chem.** 279 (16): 16285-16294, 2004.

T. Koike, N. Kimura, K. Miyazaki, T. Yabuta, K. Kumamoto, S. Takenoshita, J. Chen, M. Kobayashi, M. Hosokawa, A. Taniguchi, T. Kojima, N. o Ishida, M. Kawakita, H. Yamamoto, H. Takematsu, A. Suzuki, Y. Kozutsumi and R. Kannagi: Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101 (21), 8132-8137, 2004.

H. Okada, A. Takagi, T. Murate, T. Adachi, K. Yamamoto, T. Matsushita, J. Takamatsu, K. Sugita, M. Sugimoto, A. Yoshioka, T. Yamazaki, H. Saito, and T. Kojima: Identification of protein S $\alpha$  gene mutations including four novel mutations in eight unrelated patients with protein S deficiency. **Br. J. Haematol.** 126 (2): 219-225, 2004.

T. Matsushita, H. Hayashi, S. Kunishima, M. Hayashi, M. Ikejiri, K. Takeshita, Y. Yuzawa, T. Adachi, K. Hirashima, M. Sone, K. Yamamoto, A. Takagi, A. Katsumi, K. Kawai, T. Nezu, M. Takahashi, T. Nakashima, T. Naoe, T. Kojima and H. Saito: Targeted disruption of mouse ortholog of the human MYH9 responsible for macrothrombocytopenia with different organ involvement: Hematological, nephrological, and otological studies of heterozygous KO mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**

325: 1613-1171, 2004.

## 2. 学会発表

T. Yamada, A. Takagi, H. Okada, M. Motoyama, H. Horio, K. Yamamoto, M. Ito, T. Matsushita, T. Murate, H. Saito, T. Kojima: ELISA for mouse PAI-1 using a specific antibody produced by the naked DNA method. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division. (2004)

H. Okada, A. Takagi, T. Murate, T. Adachi, K. Yamamoto, T. Matsushita, J. Takamatsu, T. Yamazaki, H. Saito, T. Kojima: Four novel mutations in eight unrelated Japanese subjects with protein S deficiency. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division. (2004)

T. Kojima, S. Kunishima, T. Matsushita, K. Yokoi, T. Yoshihara, T. Yamazaki, M. Hamaguchi, H. Saito: Somatic mosaicism in a family with MYH9 disorders. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division. (2004)

K. Hagiwara, S. Sobue, Y. Banno, K. Tamiya-Koizumi, T. Kojima, H. Asano, C. Sugisaki, Y. Nozawa, T. Murate: Determination of the promoter region responsible for the PMA induced sphingisine kinase 1 gene expression during megakaryocytic differentiation of a human leukemia cell line, MEGO-1. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division. (2004)

足立達哉、松下 正、林 睦春、村田 誠、横澤敏也、勝見 章、山本晃士、小嶋哲人、齋藤英彦、直江知樹：同種末梢血幹細胞移植後に SDAMTS13 に対するインヒビターが

出現した 1 症例 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 (2004) 林 睦春、松下 正、伊藤雅文、岩崎卓識、山田貴之、足立達哉、国島伸治、山崎鶴夫、近藤隆久、勝見 章、山本晃士、小嶋哲人、MACKMAN NIGEL、齋藤英彦、室原豊明、直江知樹：ATIII 欠損・組織因子 (TF) 低発現マウスの病態解析 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 (2004)

松下 正、清水敦哉、近藤隆久、因田恭也、足立達哉、国島伸治、山崎鶴夫、勝見 章、山本晃士、神谷香一郎、小嶋哲人、平井真理、齋藤英彦、室原豊明、直江知樹：複合体結晶構造モデルを用いた von Willebrand 因子-血小板 GPIb の相互作用様式の解析 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 (2004)

山影 望、池尻 誠、奥村 薫、京谷麻由、堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、高木 明、村手 隆、足立達哉、松下 正、山本晃士、高松純樹、国島伸治、山崎鶴夫、濱口元洋、齋藤英彦、小嶋哲人：先天性血液凝固第 V 因子欠損症の一家系解析 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 (2004)

山田貴之、池尻 誠、山影 望、京谷麻由、奥村 薫、堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、高木 明、村手 隆、小嶋哲人：マウス AT に対する抗体作製と ELISA 構築 第 27 回日本血栓止血学会学術集会 (2004)

京谷麻由、池尻 誠、山影 望、奥村 薫、堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、山田貴之、高木 明、村手 隆、杉村 基、小林隆夫、金山尚裕、足立達哉、山本晃士、松下 正、高松純樹、齋藤英彦、小嶋哲人：妊娠中に深部静脈血栓症を発症した安置トロンビン欠損症 3 例の遺伝子解析 第 27 回日本血栓止血学会学術集会 (2004)



## 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

岡田浩美、高木 明、村手 隆

：名古屋大学医学部保健学科

足立達哉、林 睦晴、勝見 章、  
松下 正、

：名古屋大学大学院医学研究科

山本晃士、高松純樹

：名古屋大学附属病院輸血部

山崎鶴夫、齋藤英彦

：名古屋医療センター

## 日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略

分担研究者：川崎 富夫 大阪大学医学部

### 研究要旨

日本においては血栓症の頻度や発生機序が欧米と異なるため、EBMに基づいた実用的な日本のガイドライン作成が急務となっている。2003年12月から大阪大学医学部附属病院において独自の血栓症予防ガイドラインを運用し、2004年6月までのデータを検討した。この期間の深部静脈血栓症/肺塞栓症患者は36名で、入院中に発症した患者が25例、入院時点で血栓症が発見された患者数は11例であった。11例中5例(全体の14%)は既往歴が無いとされていたが、詳細な既往歴聴取にて血栓症を示唆する特徴的な症状を確認できた。血栓症予防対策の一つの柱として、血栓症の詳細な既往歴聴取や触診視診など基本的な診察法の教育の充実が重要である。

### A. 研究目的

肺血栓塞栓症の予防は深部静脈血栓症の予防にほかならない。日本においては血栓症の頻度や発生機序が欧米と異なるため、欧米の血栓症予防ガイドラインをそのまま日本に当てはめることは困難である。2004年に発表された肺塞栓症研究会および日本循環器学会のガイドラインにはいずれも日本のデータがほとんど無いために実用上限られた内容となっている。そのため、EBMに基づいた実用的な日本のガイドライン作成が急務となっている。大阪大学医学部附属病院では、単なる予防ガイドラインでなく大学病院としての使命の面から独自のガイド

ラインを作成した。必要な条件として、血栓症や血管疾患の基礎教育が遅れている日本の現状に即して教育的であること、診療科や病院の規模を超えて普遍性を有していること、ガイドラインが具体的で実効性を有していること、データ解析に基づき内容の改善を行えるシステムであることがあげられる。このガイドラインは、ハイリスク患者の選定、予防法の選択、スクリーニング法および診断法、治療方法、看護介入マニュアル、院内体制、ガイドラインの改訂方法より構成されている。このガイドラインを実際に運用して、その成果の評価と今後の可能性を検討することが本研究の目的である。

## B. 研究方法

2003年12月から大阪大学医学部附属病院において本ガイドラインを運用し、2004年6月までのデータを検討した。複写式の帳票を患者入院時にカルテに添付し、入院中のリスク評価や実施した予防法を記入後、退院時に帳票を保険請求用、入院カルテ用、データ用として回収した。

患者入院時に血栓症のリスク評価を行い、リスクが中または高の患者には、下肢周囲径を測定し、左右差があれば超音波診断による血栓症の精査を行った。また、長期臥床あるいはベッド上安静後にもう一度下肢周囲径を測定して左右差あるいは術前後での周囲径の異常があった場合も血栓症の精査を行った。

## C. 研究結果

現在結果解析中であるため、検討結果の一部を示す。この期間の深部静脈血栓症/肺塞栓症患者は36名で、内科系11例、外科系25例であった。うち肺塞栓症は12例で重症8例、軽症4例であった。血栓症患者36例のうち、入院中に発症した患者が25例で全て入院中発症後に診断された症例である。入院時点（入院直後で手術前または長期臥床前におけるスクリーニング時）で血栓症が発見された患者数は11例であった。このうち6例は既往歴が明らかであったが、他の5例（全体の14%）は既往歴が明らかで無かった。この5例は、もしスク

リーニングが行われなければ深部静脈血栓症に気づかれないまま治療に入って血栓症を発症していた可能性が高く、その際には院内発症として扱われていた可能性が高かった。これらの症例について改めて詳細に既往を聴取したところ、血栓症を示唆する症状の存在を確認できた。

## D. 考察

日本ではやっと深部静脈血栓症の正確な診断が可能となりつつある段階であり、いまだ深部静脈血栓症の診断がついていない症例も多い。

大阪大学の結果は、入院中に発症したとされる深部静脈血栓症および肺塞栓症患者の中には、これら診断のついていない血栓症既往患者が無視しえない程度入院時から含まれていることを示している。これら血栓症の既往を有する症例は明らかに血栓症発症の危険度が高いので、血栓症の既往を詳細に聴取して予防対策を行うことにより血栓症および肺塞栓症の再発を未然に防ぐことができる。このように、血栓症の既往歴の聴取や触診視診など基本的な診察法の教育を徹底することが日本における血栓症の予防戦略上重要であると考えられる。

E. 参考文献

1. 腹部大血管損傷

Today's Therapy 2004 今日の治療指針 山口  
徹、北原光夫編 医学書院 東京 49-50,  
2004

2. 渋谷 卓、川崎富夫

深部静脈血栓症、肺血栓塞栓症のリスク

3. 深部部静脈血栓症予防ハンドブック

渋谷 卓、川崎富夫

医歯薬出版 東京 34-39, 2004

4. 畑 泰司、池田正孝、上田美奈子、川崎富

夫、鈴木 玲、竹政伊知郎、山本浩文、大植雅

之、関本貢嗣、門田守人

深部静脈血栓症の病因と病態

外科治療 91(3):259-264, 2004

5. 佐藤 徹、中村真潮、川崎富夫、柳本 繁

急性肺血栓塞栓症のガイドラインをめぐって-

座談会-

MEDICO 35(11), 18, 23-39, 2004