

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血白血球より 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ス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 Ac	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****
	delCTCTG887	Cys206Stop	exon 8				3/4 (+)	
3	508G→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 j	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

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

解析の結果、PS α 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 α 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 α 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 α 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

血栓性血小板減少性紫斑病の分子病態解析 TMA 患者における血漿 ADAMTS13 抗原解析

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

TTP/HUS 患者において、血漿中の ADAMTS13 活性や同インヒビターについては多数の報告があるが、同抗原の報告は全くない。本年度、私は ADAMTS13 抗原の解析のため、3 種類のマウスモノクローナル抗体を作成した。これらの抗体は、現在までに報告されているものとは異なり、血漿 ADAMTS13 抗原を Western blotting(WB)にて直接検出可能であった。これらの抗体を用いると正常血漿中の ADAMTS13 抗原は、非還元下 WB で 190/180kDa のダブルバンドとして検出されるが、180kDa のバンドは還元下 WB では検出されなかった。また、これらの抗体を用いて、先天性および後天性 TTP の多数例における血漿 ADAMTS13 抗原解析を行っている。

1. 研究目的

TTP や HUS などの TMA 患者での ADAMTS13 活性や同インヒビター測定については多くの報告があるが、TMA 患者における ADAMTS13 抗原の解析については、全く報告がない。

私は、recombinant (r) ADAMTS13 を用いて、モノクローナル抗体(mAb)を 3 種類作成した。これらを用いて ADAMTS13 抗原を測定する ELISA 法を確立したが、酵素活性が 3%未満に著減している TTP 症例でも、ADAMTS13 抗原量は必ずしも著減しておらず、抗原量と活性は解離が認められた。そこで、Western blotting (WB) 法を用いて ADAMTS13 抗原

の定性的解析を行った。

2. 研究方法 (倫理面への配慮)

1. r ADAMTS13 は HeLa 細胞を用いて発現し、抗 Flag mAb 固相化カラムを用いて、ADAMTS13 抗原を精製した。この抗原をマウスに免役し、常法に従ってマウス mAb を作成した。

2. mAb の認識部位を決定するため、全長の ADAMTS13(WT)から C 末端のドメインを順に欠損した変異体を 12 種類作成し、HeLa 細胞で発現した。

3. mAb の ADAMTS13 活性阻害は、正常血漿 (NP) に種々の IgG 濃度

のモノクローナル抗体を添加し、37°C 2 時間付置後、AFAMTS13 残存活性を測定した。

4. 患者血漿中の ADAMTS13 抗原解析の WB は、非還元条件は A10 で、還元条件は WH 2-11-1 を使用して行った。

3. 研究結果

1. mAb は、奈良医大で 2 種類 (A10 と C7) 作成し、WH2-11-1 は化学及血清療法研究所 (副島見事博士) より供与を受けた。それぞれの mAb の認識部位は、A10: disintegrin(D) ドメイン、C7: thrombospondin type 1(T) の 7/8 ドメイン、WH2-11-1: T4 ドメインであった。また、サブクラスは、A10: IgG2b-κ、C7: IgG1-κ、WH2-11-1: IgG1-κ であった。(図 1 A,B)
2. これらの mAb の ADAMTS13 活性阻害は、A10 は final 50 ug/ml で完全阻害を示し、C7 は final 100 ug/ml でも部分阻害しか示さなかった。WH2-11-1 は全く阻害活性を示さなかった。(図 1C)
3. これらの mAb を用いて、血漿中の ADAMTS13 を WB で検出すると、非還元条件下では、190/180kDa のダブルバンドが検出可能であった。還元条件下では、A10、C7 とは反応せず、WH2-11-1 のみ 200kDa のバンドが検出された。(図 2A)
4. 正常血漿中の 190/180kDa のダブルバンドを Superose 6 カラムで分離した。図 2B に示すように、Fraction No 30 前後に ADAMTS13 抗原が認められた。非還元条件下では、No 29 では 190kDa の 1 本バンドのみであったが、その後 180kDa のバンドが認められるようになり、No36 では 180kDa のバンドのみが認められた。これらの Fraction を還元条件下で WB すると、No 29-33 までは 200kDa のバンドが認められたが、No 36 ではバンドが認められなかった。すなわち、190kDa のバンドは還元すると 200kDa となり、180kDa は還元すると検出できなかった。
5. Upshaw-Schulman 症候群 (USS) は、遺伝子解析を終了している 9 家系 9 症例について患者および家族の WB を行った。非還元条件では、両親やヘテロ接合体である同胞では、ADAMTS13 は正常血漿よりやや薄くぼやけたバンドであり、患者では極めて薄いバンドは存在した。還元条件では、両親、同胞の ADAMTS13 は、はっきりとしたバンドとなり、患者においてほとんどバン

ドは認めなくなった。

6. 後天性、特発性 TTP では、ADAMTS13 活性が著減している症例でも、非還元条件下 WB では ADAMTS13 抗原が弱く観察されることが多く、還元条件下ではほぼ消失するものからはっきり観察される症例まで多様であった。

4. 考察

血漿中のADAMTS13抗原の解析を行うために、我々は3種類のマウス mAbを作成した。これらのmAbは、現在までに報告されているmAbとは異なり、血漿中のADAMTS13を検出することが可能であった。このうち、WH2-11-1は還元条件下においても、ADAMTS13抗原と反応した。非還元条件下のWBでは、ADAMTS13抗原は190/180kDaのダブルバンドとして検出されるために、この2つのバンドを分離し、検討した。190kDaのバンドは還元後には200kDaバンドとして検出されるが、180kDaのバンドは還元後に認められなかった。このことより、180kDaのバンドは、何らかの proteolytic な修飾を受けているのではないかと予想している。また、少数例ながら、患者血漿のADAMTS13抗原を WBで解析した。活性が著減している症例でも

抗原は認められることがあり、今後の検討課題である。

5. 結論

血漿中の ADAMTS13 抗原を WB で検出できる mAb を作成したので、今後患者血漿中の ADAMTS13 抗原の動態について解析が可能となった。

6. 健康危険情報

なし

7. 研究発表 (発表誌名、巻号、頁、発行年等)

論文発表

1. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. Submitted, 2005.
2. Kosugi S, Matsumoto M, Ohtani Y, Take H, Fujimura Y, Kuyama J. Rituximab provided long-term remission in a case with refractory relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* (in press), 2005.
3. Fujisaki K, Matsutani K, Yoshimitsu T, Nakanishi K, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Fujimura Y, Takeda K, Hirakata H, Iida M. Thrombotic

- thrombocytopenic purpura associated with polyarthritis nodosa: demonstration of the inhibitor against von Willebrand factor-cleaving protease. **Clinical Nephrology** (in press), 2005.
4. Fujimura Y. Down-regulation of ADAMTS13 activity by serine proteases. In: Inside Blood. **Blood (Review)** 105: 911-912, 2005.
 5. Sugimoto T, Saigo K, Kanenda Y, Manabe N, Narita H, Wakuya J, Imoto S, Murashima T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nishimura R, Koizumi T, Kumagai S. Von Willebrand factor-cleaving protease activity remains at the intermediate level in thrombotic thrombocytopenic purpura. A CML case treated with interferon- α . **Acta Haematologica** (in press), 2005.
 6. Uemura M, Ishikawa M, Matsuyama T, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai S, Toyohara M, Yamazaki M, Yoshiji H, Yamao J, Matsumoto M, Ishizashi H, Fujimura Y, Fukui H. Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. **Alcohol Clin Exp Res** (in press), 2005.
 7. Hatakeyama K, Hao H, Imamura T, Ishikawa T, Shibata Y, Fujimura Y, Eto T, Ogawa H, Asada Y. Decreased CD39 expression in coronary atherosclerotic lesions is implicated in plaque instability and thrombus formation. **Am J Cardiol** 95: 632-635, 2005.
 8. Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y. Adenovirus-mediated transfer of human placental ecto-ATP diphosphohydrolase I to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus formation in vivo. **Circulation** 111: 808-815, 2005.
 9. Yagita M, Uemura M, Yamahara H, Kitano T, Kunitomi A, Konaka Y, Nakamura T, Matsumoto M, Ishizashi H, Fukui H, Fujimura Y. Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. **J Hepatology** 42: 420-421, 2005.
 10. Kawahara M, Kanno M, Matsumoto M, Nanno H, Danno D, Murata K, Nakamura S, Fujimura Y, Ueno S. Diffuse neurodeficits in intravascular lymphomatosis with ADAMTS13 inhibitor. **Neurology** 63: 1731-1733, 2004.

11. Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. **Blood** 104: 2081-2083, 2004.
12. Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Miura M, Hayashi S, Fujii Y, Iwai A, Ito E, Tsuji Y, Takada-Shitaka M, Iwadata M, Umeyama H, Yagi H, Ishizashi H, Banno F, Nakagaki T, Miyata T, Fujimura Y. Molecular characterization of *ADAMTS13* gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. **Blood** 103: 1305-1310, 2004.
13. Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Wada H, Fujimura Y. The Japanese experience with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. **Semin Hematol** 41: 68-74, 2004.
14. Kokame K, Miyata T: Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. **Semin Hematol** 41:34-40, 2004.
15. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. **Blood** 103: 607-612, 2004.
16. 森美貴、和田英夫、珠玖洋、八木秀男、松本雅則、藤村吉博. TMA症例におけるADAMTS13活性と血管内皮細胞マーカーの検討。臨床血液 45: 378-382, 2004
17. 植村正人、石川昌利、松山友美、田村信宏、藤本正男、今津博雄、小寫秀之、櫻井伸也、石井禎暢、浪崎正、豊原真久、山崎正晴、吉治仁志、山尾純一、福井博、松本雅則、八木秀男、藤村吉博、石指宏通. アルコール性肝炎におけるvon Willebrand 因子(vWF)特異的切断酵素(ADAMTS13)の動態. アルコールと医学生物学 24. 132-136. 2004

総説

(著書・分担)

1. 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP). 血液疾患診療の EBM. pp201-206, 2004.
2. 松本雅則、藤村吉博. Ecto-ATP diphosphohydrolase. 血小板生物学. pp333-340, 2004.
3. 八木秀男、藤村吉博. von Willebrand 因子. 血小板生物学. pp341-348, 2004.
4. 藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病と溶血性尿毒症症候群. 血液の

辞典. pp369-371, 2004.

(総説)

1. 松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病の病因. 内科診療 Q&A 38:158-159, 2004
 2. 松本雅則、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病の診断と治療. 内科診療 Q&A 38:160-161, 2004
 3. 八木秀男、藤村吉博. TTP の発症機序と病態. 血液腫瘍科 49:128-134, 2004.
 4. 藤村吉博. TTP/HUS 患者への血漿交換療法の適応と血小板輸血の禁忌. 奈良県医師会透析部会誌. 9: 13-22, 2004.
 5. 藤村吉博. TTP と HUS. 医学のあゆみ (別冊) . pp109-112, 2004.
 6. 藤村吉博. VWF 切断酵素 (ADAMTS13) の動態解析による TTP/HUS 診断法の進歩. 日本内科学会雑誌. 93:451-459, 2004.
 7. 加藤誠司、藤村吉博. VWF 切断酵素 (von Willebrand factor-cleaving protease: VWF-CP). 血液と循環. 12:188-192, 2004.
 8. 藤村吉博. TTP/ADAMTS13 の動態解析. Hematological Malignancy Review 30:1-4, 2005.
- #### 学会発表
1. 藤村吉博. TMA での VWF 切断酵素 (ADAMTS13) 解析 (特別講演). 第 2 回千葉造血器腫瘍研究会 (於 千葉京成ホテルミラマーレ、2004 年 5 月 28 日).
 2. 植村正人、松本雅則、石指宏通、田村信宏、八木秀男、松山友美、藤本正男、今津博雄、小寫秀之、櫻井伸也、石井禎暢、石川昌利、藤村吉博、福井博. アルコール肝炎における von Willebrand 因子 (VWF) 特異的切断酵素 (ADAMTS13) の動態. 第 12 回肝病態生理研究会. (於 浦安・ヒルトン東急ベイ 2004 年 6 月 5 日)
 3. 松本雅則、藤村吉博、石指宏通、秋山暢. 血小板減少と貧血を認めた妊婦の 1 例. 第 47 回日本臨床検査医学会近畿支部総会 (プレナリーセッション) (於 奈良県立医科大学大講堂 2004 年 6 月 12 日).
 4. 藤村吉博. ADAMTS13 から見た TTP/HUS (特別講演). 第 5 回腎とバイオロジー研究会 (於: 東京・東海大学校友会館 2004 年 7 月 17 日).
 5. 松本雅則、八木秀男、石指宏通、神野正敏、和田英夫、相原守夫、西浦哲雄、井原彰裕、中村忍、藤村吉博. Intravascular lymphoma 5 症例における ADAMTS13 活性とそのインヒビター. 第 66 回日本血液学会総会 / 第 46 日本臨床血液

- 学会総会 (ワークショップ) (於 国立京都国際会館 2004年9月17日)
6. 奥田慎也、名取一彦、和泉春香、長瀬大輔、藤本吉紀、菅澤康幸、荒井ちあき、加藤元浩、梅田正法、石指宏通、松本雅則、藤村吉博、倉石安庸. 妊娠時の TTP 発症を契機に Upshaw-Schulman 症候群の診断に至った姉妹例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (於 京都・国立京都国際会館 2004年9月17日)
 7. 長井一浩、大曲勝久、田口潤、宮崎泰司、河野茂、上平憲、藤村吉博、朝長万左男. 慢性に経過する血栓性血小板減少性紫斑病に原発性硬化性胆管炎を合併した 1 症例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (於 国立京都国際会館 2004年9月17日)
 8. 杉尾康浩、長岡克弥、牧野茂義、上田章、松本雅則、藤村吉博. 免疫抑制療法と長期の血漿交換療法にて救命しえた血栓性血小板減少性紫斑病の一例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (於 国立京都国際会館 2004年9月17日)
 9. 藤村吉博. TTP/HUS の病態と治療. 第 34 回日本腎臓学会西部学術大会 (教育講演) (於 岡山コンベンションセンター 2004年10月2日)
 10. 藤村吉博. TTP と VWF (特別講演). 第 8 回岡山血液セミナー (特別講演) (於 ホテルグランビア岡山 2004年10月9日).
 11. 植村正人、松本雅則、石指宏通、松山友美、石川昌利、八木秀男、櫻井伸也、浪崎正、藤本正男、小寫秀之、石井禎暢、藤村吉博、福井博. 急性肝疾患における von Willebrand 因子特異的切断酵素の動態. 第 46 回日本消化器病学会大会. (於 福岡国際会議場 2004年10月21日)
 12. 小亀浩市、宮田敏行、松本雅則、藤村吉博. 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 (シンポジウム) (於 京都大学医学部芝蘭会館, 2004年11月13日)
 13. 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総会.(於 奈良県新公会堂, 2004年11月19日)
 14. 石西綾美、八木秀男、西村仁美、松本雅則、藤村吉博、石指宏通、岩本顕聰、森俊雄、副島見事、中垣智弘. I. 抗 ADAMTS13 マウス

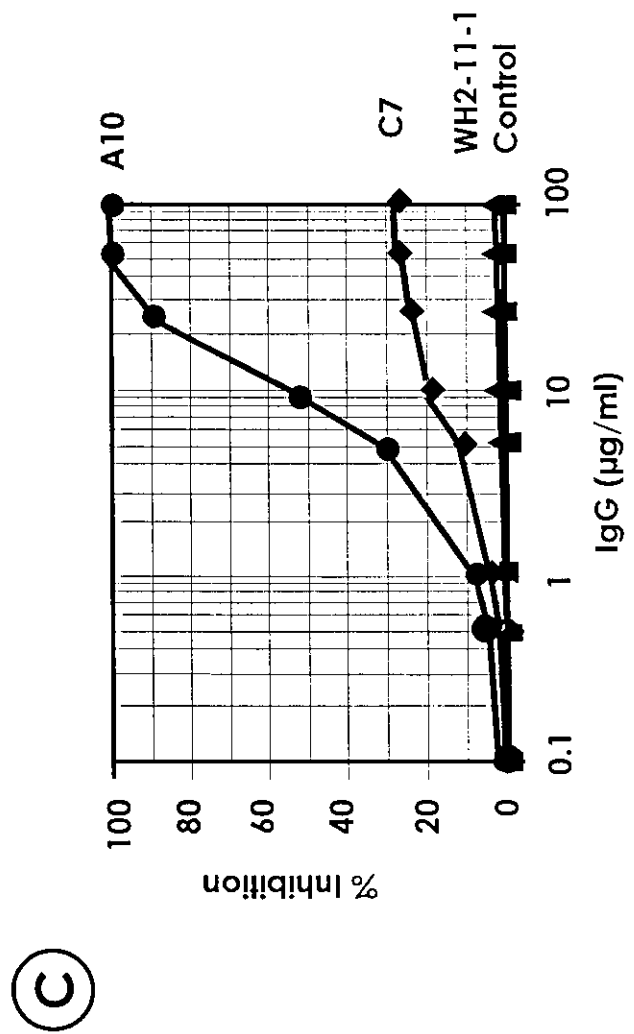
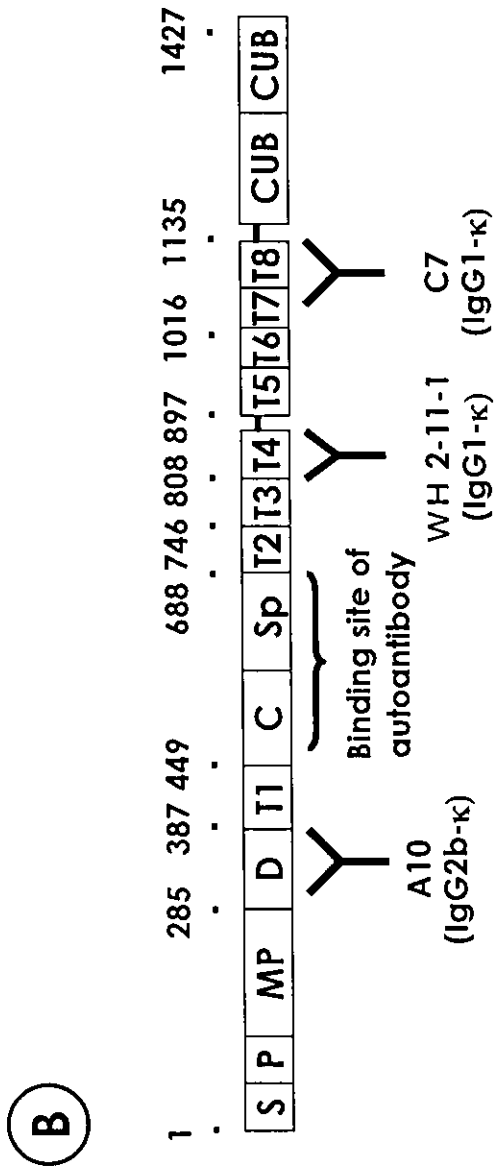
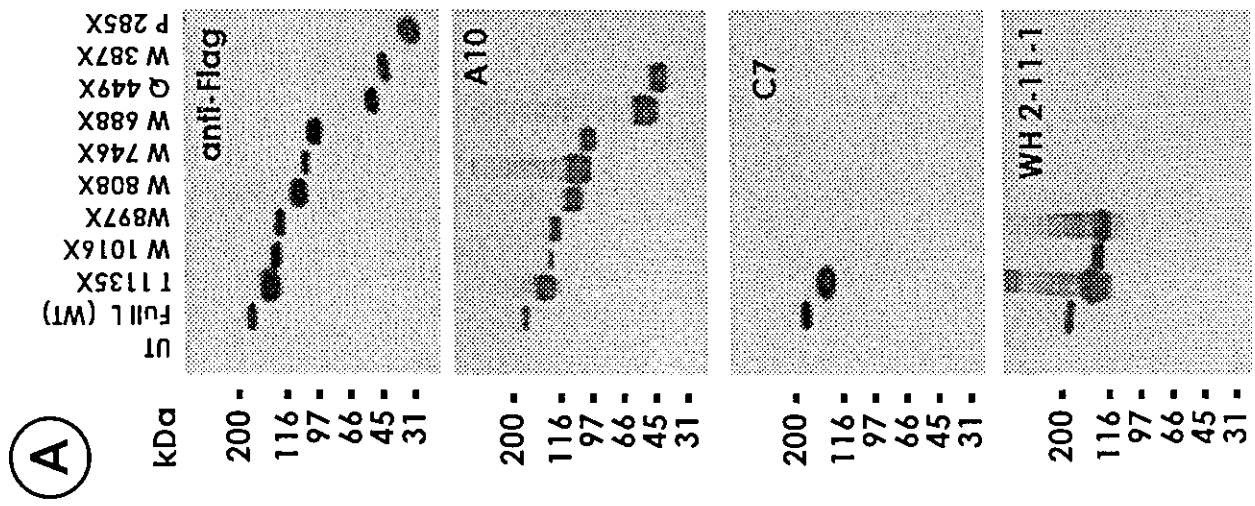
モノクローナル抗体の作成とその性状. 第 27 回日本血栓止血学会学術総会. (於 奈良県新公会堂, 2004 年 11 月 19 日)

15. 松本雅則、八木秀男、石西綾美、西村仁美、藤村吉博、石指宏通、岩本顕聰、森俊雄、副島見事、中垣智弘. II. TTP 患者における血漿 ADAMTS13 抗原解析. 第 27 回日本血栓止血学会学術総会. (於 奈良県新公会堂, 2004 年 11 月 19 日)
16. 古小路英二、松本雅則、山下篤、八木秀男、櫻井嘉彦、丸塚浩助、畠山金太、藤村吉博、浅田祐士郎. 胎盤由来 ecto-ATP Diphosphohydrolase I は傷害動脈壁における血栓形成を抑制する. 第 27 回日本血栓止血学会学術総会. (於 奈良県新公会堂, 2004 年 11 月 19 日)
17. 藤村吉博. 多彩な基礎疾患に合併する TMA の病態解析の進歩 第 27 回日本血栓止血学会学術総会 (ランチョンセミナー). (於: 奈良・奈良県新公会堂、2004 年 11 月 19 日)
18. 藤村吉博. VWF 切断酵素 (ADAMTS13) と血栓症 第 12 回東海肝移植研究会 (特別講演. (於 名古屋・栄ガスビル、2004 年 11 月 19 日)
19. 藤村吉博. ADAMTS13 を中心と

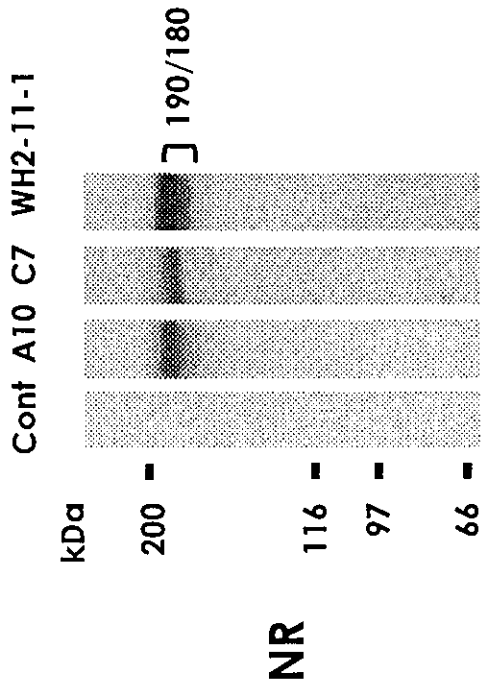
した血栓性微小血管障害症(TMA)の病態解析 第 6 回北陸血管病変研究会 (特別講演). (於 ホテル日航金沢, 2005 年 2 月 24 日)

8. 知的財産権の出願・登録 (予定を含む)

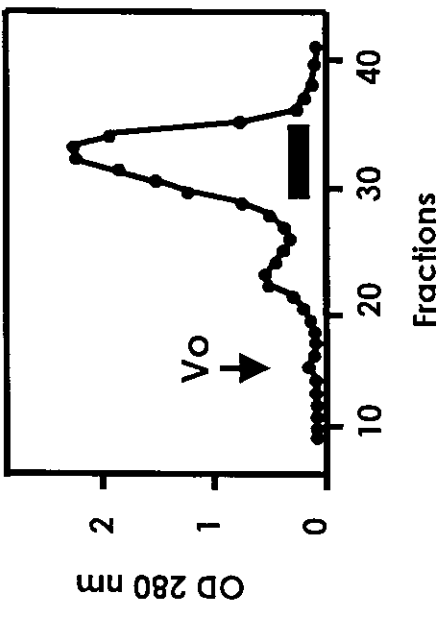
1. 抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体
出願人: 株式会社日本臨床医学検査研究所、藤村吉博、松本雅則、森俊雄
発明人: 藤村吉博、松本雅則、森俊雄
2004 年 10 月 19 日国内出願
2. ADAMTS13 活性検定抗体及び活性検定方法
出願人: 株式会社日本臨床医学検査研究所
発明人: 加藤誠司、日裏久英、松本雅則、藤村吉博
2005 年 2 月 14 日国内出願



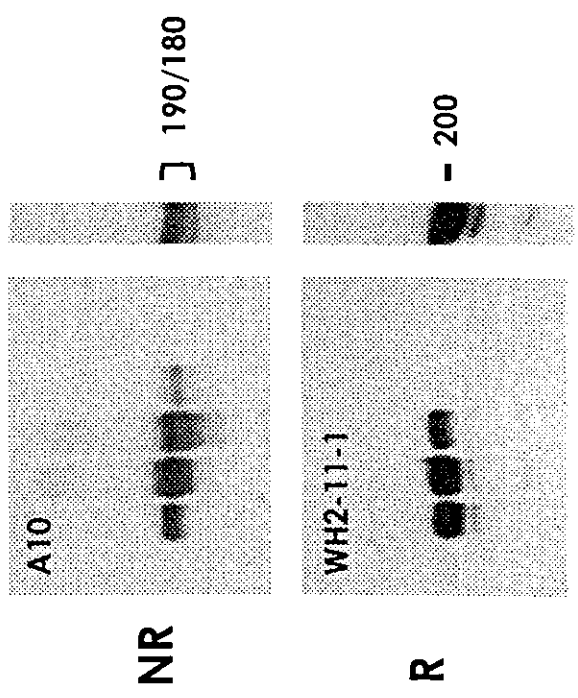
A



B



Fr. 27 29 31 33 36 38 40 NP



分担研究報告書

ADAMTS13 と血栓症

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部内科・講師

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。しかし本酵素の軽度の低下が多因子疾患である動脈血栓症の原因の一つとなるか否かに関しては不明である。本研究では ADAMTS13 遺伝子多型や ADAMTS13 活性と、その基質である VWF や血栓形成能、動脈硬化との関連を、健常人 (検診受診者) を対象に検討した。その結果、ADAMTS13 遺伝子多型 (P475S) は健常人において血中 ADAMTS13 活性と強く関連することが明らかとなった。しかし ADAMTS13 活性と血中 VWF (抗原量、活性) に有意な相関はなく、また ADAMTS13 遺伝子多型と血中 VWF (抗原量、活性) にも有意な相関はなかった。一方、血中 VWF 値と *in vitro* 血栓形成能の指標のひとつである GTT 閉塞時間の間には弱い負の相関がみられ、また血中 VWF 値と動脈硬化の指標の一つとされる脈派伝導速度の間に正相関が示された。従って ADAMTS13 の正常範囲内での変動は血中 VWF 量と関連しないが、VWF 量は易血栓性と関連する可能性が示された。

A. 研究目的

Von Willebrand factor 切断酵素 (VWF-CP : ADAMTS-13) の著明な活性低下は HUS/TTP の発症に関与することが知られている。一方、本酵素の軽度の低下が血栓症の発症に及ぼす影響については必ずしも明確ではない。軽度の低下は各種後天的要因や疾患のみならず、

先天的な要因、特に ADAMTS13 遺伝子多型によっても起こりうる。VWF と血栓性疾患の関連に関しては、血中 VWF の上昇は心筋梗塞の危険因子あるいは予後不良因子であり、動物実験で VWF に対するモノクローナル抗体が動脈血栓の発症を抑えたとの報告もあるが、VWF 活性を生理的に制御する筈の

ADAMTS13と、体内でのVWF活性や血小板機能との関連はこれまで十分に検討されていなかった。これまでの国立循環器病センターや我々の研究で、頻度の高い一塩基置換が日本人で数種類同定されており、これらの多型が血栓性疾患に及ぼすインパクトを見極める事は日本人における血栓症の原因を探る上で甚だ重要である。

ここでは、(1) ADAMTS13 遺伝子多型 vs ADAMTS13 活性、(2) ADAMTS13 活性 vs 血中 VWF (抗原量、活性)、(3) ADAMTS13 遺伝子多型 vs 血中 VWF (抗原量、活性)、(4) 血中 VWF vs ずり依存性血小板機能、など in vivo における関連について健常人検体を用いて検討した。

B. 研究方法

某企業健診受診者約 300 名を対象とした。クエン酸加全血から白血球 DNA および血漿を分離した。また採血直後の抗凝固剤未添加全血を用いて血栓形成能評価法のひとつである Gorog Thrombosis Test (GTT, Montrose Diagnostics, UK) による閉塞時間を測定した。同時に足関節上腕血圧比 (ABI)、脈波伝播速度の他、フォンビルブランド因子抗原量 (VWF:Ag)、フォンビルブランド因子活性 (VWF:RCo) などを含む血液凝固系の各因子を測定した。ADAMTS13 活性測定は Furlan らの方法に準じ、奈良県立医科大学で行われた。P475S は in vitro 研究で活性を低下さ

せると報告されているため、475 に関して wild type (PP) とヘテロ接合体 (PS) がほぼ同数となるよう対象者を選択し、これに一例のホモ接合体 (SS) を追加して ADAMTS13 活性を測定した。VWF 活性と抗原については全例を対象に測定した。

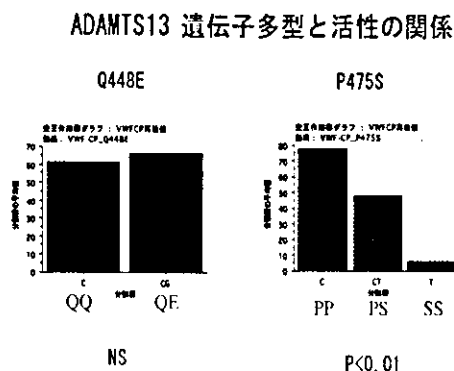
(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム遺伝子解析研究であるため、合同指針の則りまず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、解析された。

C. 研究結果

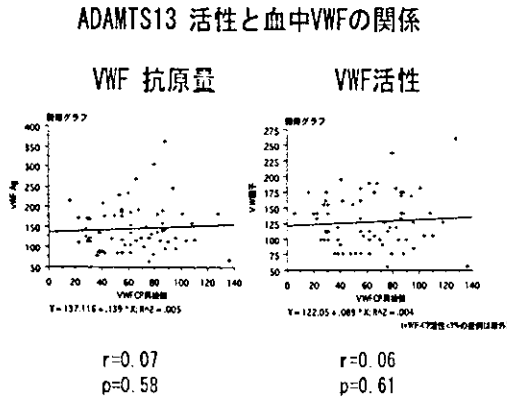
ADAMTS13 遺伝子解析により、既報の遺伝多型 (Q448E, P475S) が同定された。多型出現頻度は既報と同様であった。Q448E 多型は活性に影響を与えなかったが、P475S はアリル数依存的に活性に影響を与えた (図 1)。

図 1



ADAMTS13 活性と血中 VWF (抗原量、活性) の間に有意な相関は見られなかった (図 2)。

図 2



同様に ADAMTS13 遺伝子多型 (Q448E, P475S) と血中 VWF (抗原量、活性) の間に有意な関連は見られなかった (図 3、図 4)。

図 3

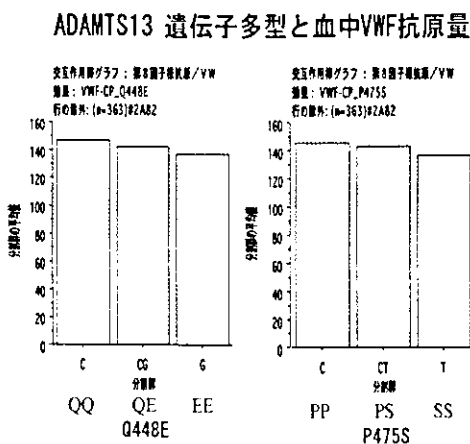
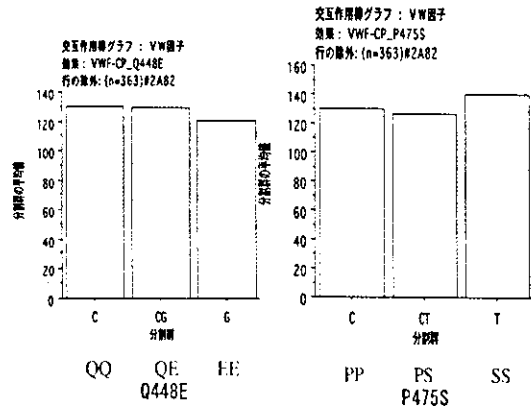


図 4

ADAMTS13 遺伝子多型と血中VWF活性



次に血中 VWF 抗原量と GTT 閉塞時間を調べたところ弱い負相関がみられた。すなわち、VWF が高値であるとより早期に血栓による閉塞がおこる傾向が示された (図 5)。

図 5

血中VWF抗原量とGTT 閉塞時間

