ることが判明している。もし、これらの欠乏症の頻度推定が正しいとすると、これらの欠乏症のキャリヤーは全国で１００万人を越えると推定される。

血栓症の遺伝性素因は、日本人と欧米人で大きく異なる事が知られており、日本人にはプラスミノーゲン Tochigi 変異およびプロテインS Tokushima 変異の集積が見られる。また、日本人の約１０％に TTP の原因遺伝子 ADAMTS13 の活性低下をもたらすP475S 変異が確認されている。静脈血栓症患者群を対象に、血栓に関連する次の 5 つの遺伝子多型をタイピングし、一般住民を対象にして得られた遺伝子頻度と比較することにより、静脈血栓症の遺伝的背景を検討する。

血栓に関連する候補遺伝子多型は下記の 5 多型である。なお、多型番号は「ヒト遺伝子変異の命名法の勧告」(4) にしたがい、アミノ酸番号は、翻訳開始 Met を 1 とし、塩基番号はこの ATG の A を 1 とした。

1) ADAMTS13、Pro475Ser 変異。
国立循環器病センター研究所の研究から、日本人の約10人に1人が本変異のヘテロ接合体であり、変異体はフォンビルブランド因子切断活性が著減することが明らかになっている (5)。

2) プラスミノーゲン Ala620Thr 変異
(成熟型での番号は Ala601Thr 変異)。
自治医科大学の研究から、日本人の 30-40 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であり、変異体は酵素活性が著減することが明らかになっている (6)。

3) プロテイン S Lys196Glu 変異
(成熟型での番号は Lys155Glu 変異。プロテインS 徳島変異ともよばれる)。
名古屋大学の研究から、日本人の約 80 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であることが明らかとなっている。その後、鈴木らの研究により、本変異体はプロテインS 活性が著減することが明らかになっている (7、8)。

4) XII 因子 C46T 変異。
九州大学の研究からアレル頻度は C/T＝0.27/0.73 であり、変異により新しくできた開始 Met からフレームがずれて転写され、その結果本来の XII 因子の転写が低下し、血中 XII 因子量が低下することが明らかとなっている (9)。

5) プラスミノーゲン活性化因子インヒビター1 (PAI-1) 4G/5G。
スウェーデンの研究から、プロモーター領域にある 5G アレルは、転写抑制因子が結合することにより転写が抑制され、その結果血中 PAI-1 が低値を示すことが明らかとなっている (10)。

2．研究方法

特発性血栓症サブグループを構成する 6 施設で静脈血栓症患者を対象に試料と臨床情報を収集した。遺伝子試料は試料採取施設にて匿名化後、国立循環器病センター研究所に移送し、5 遺伝子多型のタイピングを行った。多型タイピングは TaqMan 法を用いた。即ち、6ngDNA を用いて、PCR 法にて多型部位を含む領域を増幅し、多型を識別できる蛍光標識されたプローブを用いてタイピングを行った。静脈血栓症群の遺伝子型頻度を、既に決定済みの一般住民 (約 3,650 名) を対象として得られた遺伝子頻度と χ^2 検定により比較することにより、静脈血栓症の遺伝的背景に検討を加えた。血栓症の遺伝子解析を行うため、検体収集施設および遺伝子解析施設にて、研究計画を倫理委員会で承認を受けた。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究は「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)」を遵守して行う。各施設は研究計画の倫理面を倫理委員会で承認を受けた。試料の外部機関への移送に先立ち、施設間で Material Transfer Agreement を交わし、試料管理の責任などを明確にした。

3．研究結果

特発性血栓症サブグループ６施設（慶応大学医学部、京都府立医大、自治医大、名古屋大学医学部、大阪大学医学部、国立循環器病センター）で遺伝子解析研究申請が倫理委員会で承認を受けた。

特発性血栓症サブグループとして静脈血栓症 161 例を収集した。患者群の特徴を表 1 に示した。この患者群を対象に 5 多型の遺伝子タイピングを施行した。その結果、ADAMTS13-Pro475Ser 変異、PP：139 名、PS：20 名、SS：1 名、プラスミノーゲン-Ala620Thr 変異、AA：152 名、AT：9 名、TT：0 名、プロテイン S-Lys196Glu 変異、KK：146 名、KE：13 名、EE：2 名、XII 因子 C46T、CC：23 名、CT：75 名、TT：63 名、PAI-1-4G/5G、4G4G：61 名、4G5G：69 名、5G5G：30 名、であった。この頻度を約 3,650 名の一般住民で求めた頻度と比較したところ、唯一プロテイン S Lys196Gly 変異が $P<0.001$ で有意差を示した。すなわち、静脈血栓症患者群に Glu アレルが多いことが明らかとなった。

４．考察

日本人の静脈血栓症患者 161 名を対象に 5 つの遺伝子多型のタイピングを行い、プロテイン S Lys196Glu 変異の遺伝子型の頻度が、静脈血栓症患者群と一般住民群の間で有意な差が観察された。静脈血栓症患者群で Glu アレルが多く、Glu アレルが静脈血栓症の遺伝的背景になることが明らかとなった。

Glu196 をもつプロテイン S 変異体は、プロテイン S 徳島として知られている。本変異は第 2EGF 様ドメイン内に位置し、異常プロテイン S として血中に存在する。日本人での本変異のアレル頻度は 0.82%と報告され、当初は機能に影響を与えない変異と考えられたが（7）、その後の発現実験により、本プロテイン S 変異体は活性化プロテイン C に対するコファクター活性を示さないことが明らかとなった（8）。

Glu アレル頻度は本研究のコントロールに用いた一般住民群でも 0.90%であり、名古屋大学の結果とよく一致した。このアレル頻度から計算すると、約 55 人に 1 人はプロテイン S Lys196Glu 変異のヘテロ接合体であると推察され、約 12,000 人に 1 人はホモ接合体であると推察される。日本人の人口を 1 億 2000 万人とすると、約 1 万人が、ホモ接合体と推定された。このようの多くの日本人がプロテイン S Lys196Glu 変異により血栓症のリスクに晒されていると考えられた。日本人の血栓症患者にプロテイン S 活性の低下が多く見られるとのこれまでの報告とよく一致する（11）。

Glu196 をもつプロテイン S は異常分子として血中に存在するため、血中プロテイン S 抗原量は正常値を示す。本異常分子は活性化プロテイン C のコファクター活性に障害を示すので、血中プロテイン S 活性は低値を示すと考えられる。現在、プロテイン S 抗原量の測定は保険収載されているものの、活性測定は保険外となっている。日本人の血栓症発症を未然に防ぐため、プロテイン S 活性の保険収載が必要と考える。

５．結論

日本人の静脈血栓症発症には、プロテイン S Lys196Glu 変異が遺伝的背景になる可能性を明らかにした。本プロテイン S 変異体は血中の抗原量は正常であるが、活性は低下する異常分子である。したがって、血栓症患者ではプロテイン S 活性の測定が重要であろう。

参考文献

(1) Okamoto A, et al.: Population-based distribution of plasminogen activity, and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in Japanese: The Suita Study. ***J. Thromb. Haemost.***, 1, 2397-2403, 2003.

(2) Sakata T., et al.: Protein C and antithrombin deficiency are important risk factors for deep vein thrombosis in Japanese. *J. Thromb. Haemost.*, 2, 528-530, 2004.

(3) Sakata T., et al.: Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population; The Suita Study. ***J. Thromb. Haemost.***, 2, 1012-1013, 2004.

(4) Antonarakis SE: Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. ***Hum Mutat***, 11:1-3, 1998.

(5) Kokame K, et al.: 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.

(6) Sakata Y, et al.: Molecular abnormality of plasminogen. ***J Biol Chem***, **255**:5442-5447, 1980.

(7) Yamazaki T, et al.: A phenotypically neutral dimorphism of protein S: the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. ***Thromb Res***, 70:395-403, 1993.

(8) Hayashi T, et al.: Protein S Tokushima: abnormal molecule with a substitution of Glu for Lys-155 in the second epidermal growth factor-like domain of protein S. ***Blood***, 83:683-690, 1994.

(9) Kanaji T, et al.: A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. ***Blood***, 91:2010-2014, 1998.

(10) Eriksson P, et al.: Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, 92:1851-1855, 1995.

(11) Tsuda H, et al.: Screening for aetiology of thrombophilia: a high prevalence of protein S abnormality. ***Ann Clin Biochem***, 36 (Pt 4):423-432, 1999.

6．健康危険情報

なし

7．研究発表

1.論文発表

辻　肇，中川雅夫．ヘパリン，低分子量ヘパリン．櫻川信男，青崎正彦，上塚芳郎，和田英夫編．抗凝固薬の適正な使い方．東京：医歯薬出版，211-232，2002．

辻　肇．VI　凝固・線溶系．ヘパリン類似物質による血栓制御．高久史麿、溝口秀昭，小宮山淳，坂田洋一，金倉譲編．Annual Review 血液2003．東京：中外医学社，198-203，2003．

辻　肇．主要疾患の診療ポイント．血液疾患．血栓性血小板減少性紫斑病．高久史麿，溝口秀昭，矢崎善雄，狩野庄吾，武藤徹一郎編．外来診療のすべて．東京：メジカルビュー社，856-857，2003．

嶋緑倫、田中一郎、川合陽子、辻　肇、中村伸、森田隆司．本邦における血液凝固後天性インヒビターの実態．血栓止血誌．14(2)；107-121，2003．

Sakata T, et al.: Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population: the Suita Study. ***J Thromb Haemost***, 2:1012-1013, 2004.

Okada H, et al.: Identification of protein Sα gene mutations including four novel mutations in eight unrelated patients with protein S deficiency. ***Br J Haematol***, 126: 219-225, 2004.

Tsukahara A, et al.: Compound hetero-zygosity for two novel mutations in a severe factor XI deficiency. ***Am J Hematol***, 73: 279-284, 2003.

辻　肇．アンチトロンビン欠損症、

平井久丸、押味和夫、坂田洋一編. 血液の事典. 東京：朝倉書店、340-342、2004.

辻　肇. Part 5 DIC 治療薬の将来展望を探る. DIC 治療薬の新しい動向から治療戦略を探る. 丸藤哲編. DIC 治療の新たなストラテジー. 東京：先端医学社、140-145、2004.

辻　肇.　特集・血液疾患と救急医療. 第1部一般的救急医療の代表的症候と救急医療. 3. 呼吸困難ー血栓症ー. 血液フロンティア.　14(4)：29-35, 2004.

辻　肇.　血栓症を治療する-エビデンスを活かしたアプローチ[基本的な診療の進め方]抗血栓薬の治療モニタリング. Medicina 41 (6)：958-960, 2004.

2.学会発表

内藤雅夫、三室　淳、遠藤仁司、窓岩清治、尾形享一、菊池次郎、諏合輝子、坂田洋一：先天性プロテインCの欠乏症の分子機構：ゴルジネットワークから分泌顆粒への輸送障害第 64 回日本血液学会総会 2002 年 9 月 11-15 日；横浜

J. Mimuro, et al.: 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, San Diego, USA, December 2003.

T. Miyata. Genetic studies on thrombotic diseases, Symposium 2: Genetic studies on thrombotic diseases. Third Asian Pacific Congress of Thrombosis and Hemostasis, Bangkok, October 14-16, 2004.

M. Murata. Genetic studies on thrombotic diseases, Symposium 2: Polymorphism in thrombotic diseases. Third Asian Pacific Congress of Thrombosis and Hemostasis, Bangkok, October 14-16, 2004.

H. Okada, et al.: Four novel mutations in eight unrelated Japanese subjects with protein S deficiency. The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division, Nagoya, September 1-4, 2004.

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 PSα遺伝子解析　第 26 回日本血栓止血学会学術集会、2003 年；東京

辻　肇：「血栓症に対する抗凝固療法の新しい展開」第５２回日本心臓病学会学術集会. 2004 年 9 月 15 日；京都.

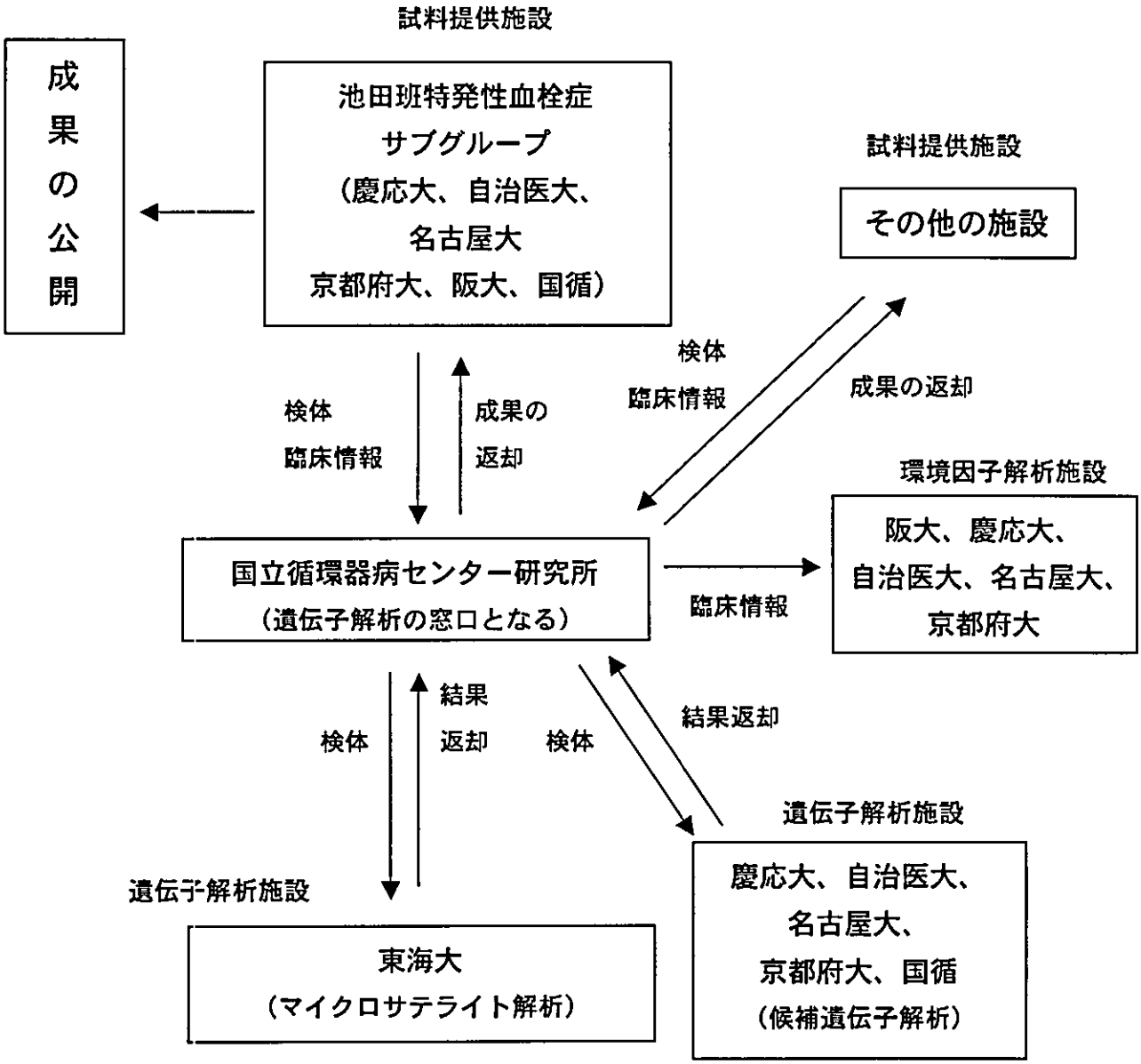
京谷麻由、池尻　誠、山影　望、奥村薫、堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、山田貴之、高木　明、村手　隆、杉村基、小林隆夫、金山尚裕、足立達哉、山本晃士、松下　正、高松純樹、齋藤英彦、小嶋哲人：妊娠中に深部静脈血栓症を発症したアンチトロンビン欠損症３例の遺伝子解析　第 27 回日本血栓止血学会学術集会 2004 年 11 月 18-20 日；奈良

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年11月18-20日；奈良

8．知的財産権の出願・登録

なし

特発性血栓症サブグループの検体と情報の流れ（案）



特発性静脈血栓症　疾患遺伝子プロジェクト診療情報共通記録用紙

患者氏名[　　]　カルテ番号[　　]

採血施設[　　]　記録者[　　]

匿名化番号[　　]

切　取　線

採血施設[　　]　記録者[　　]匿名化番号[　　]

生年月M／T／S／H[　　]年[　　]月生まれ

性別　　[　1. 男　　2. 女]　　身長、体重[　　cm　　kg]

発症日M／T／S／H　[　　]年[　　]月[　　]日

記録日M／T／S／H　[　　]年[　　]月[　　]日

採血日M／T／S／H　[　　]年[　　]月[　　]日　　採血時年齢　[　　]歳

病歴　・家族歴

・病歴（深部静脈血栓症発症時の状態）

外科手術周術期[1. あり 2. なし]　外傷[1. あり 2. なし]　悪性腫瘍 [1. あり 2. なし]

悪性腫瘍：放射線／化学療法[1. あり 2. なし]　感染症[1. あり 2. なし]　妊娠[1. 中　2. 産褥期]

心疾患[1. あり 2. なし]　糖尿病[1. あり 2. なし]　高脂血症[1. あり 2. なし]　抗高脂血症剤使用[1. あり 2. なし]

炎症性腸疾患[1. あり 2. なし]　慢性腎不全[1. あり 2. なし]　自己免疫疾患[1. あり 2. なし]

ベーチェット病[1. あり 2. なし]　エストロゲン[1. あり 2. なし]　ステロイド[1. あり 2. なし]

喫煙[1. あり 2. なし]　高血圧[1. あり 2. なし]　カテーテル留置（直接原因）[1. あり 2. なし]

骨髄増殖性疾患[1. あり 2. なし]

脱水[1. あり 2. なし]　神経筋疾患[1. 麻痺あり　2. 麻痺なし]　ギプス固定[1. あり 2. なし]

腫瘍による静脈圧迫[1. あり 2. なし]　安静臥床[1. あり 2. なし]

その他[　　]

・家族歴

深部静脈血栓症　1. 罹患者がいる　2. いない　3. 不明

続柄[　　]　発症年齢[　　]　部位[1. 上肢　2. 下肢] [1. 右　2. 左　3. 両側　4. 不明]

続柄[　　]　発症年齢[　　]　部位[1. 上肢　2. 下肢] [1. 右　2. 左　3. 両側　4. 不明]

続柄[　　]　発症年齢[　　]　部位[1. 上肢　2. 下肢] [1. 右　2. 左　3. 両側　4. 不明]

肺塞栓症　1. 罹患者がいる　2. いない　3. 不明

続柄[　　]　発症年齢[　　]

続柄[　　]　発症年齢[　　]

続柄[　　]　発症年齢[　　]

採血施設[　　]　記録者[　　]匿名化番号[　　]

・深部静脈血栓症は、

診断[1.確実　2.疑い]

肺塞栓合併確実／疑い／不明　[1.確実　2.疑い　3.不明]

初発[　]　初発年齢[　　]　発症部位[1.上肢　2.下肢] [1.右　2.左　3.両側　4.不明]

再発[　]　その際再発までの病歴

初発年齢[　　]　発症部位[1.上肢　2.下肢] [1.右　2.左　3.両側　4.不明]

再発年齢[　　]　発症部位[1.上肢　2.下肢] [1.右　2.左　3.両側　4.不明]

再発年齢[　　]　発症部位[1.上肢　2.下肢] [1.右　2.左　3.両側　4.不明]

凝固線溶系検査値	活性値	抗原量 (各施設の正常値を報告ください)
プラスミノーゲン	[　　] %	[　　] mG/mL
アンチトロンビン	[　　] %	[　　] mG/mL
プロテインC	[　　] %	[　　] mG/mL
遊離プロテインS	[　　] %	[　　] mG/mL
総プロテインS	-	[　　] %

	血中濃度
抗β2GPI抗体	[　　] U/mL
抗カルディオリピン抗体	[　　] U/mL
ループスアンチコアグラント	有　・　無
PT	[　　] INR
APTT	[　　] sec
血中総ホモシステイン	[　　] nmol/mL
フィブリノゲン	[　　] mG/dL
FDP	[　　] μg/mL
Dダイマー	[　　] μg/mL

その他

白血球数 [　　] /μL　赤血球数 [　　] X10⁴/μL　血小板数 [　　] X10⁴/μL

血清総タンパク [　　] g/dL

総コレステロール [　　] mG/dL　(空腹時値)

トリグリセリド [　　] mG/dL　(空腹時値)

採血時の状態

肝蛋白合成能低下 [1.あり　2.なし]

使用薬剤　1.ワーファリン　2.ヘパリン　3.ウロキナーゼ　4.アルガトロバン　5.抗血小板薬

6.ステロイド　7.エストロゲン　8.その他 [　　]

輸血 [1.あり　2.なし]

自由記載欄

厚生労働省　特定疾患対策事業　血液凝固異常症に関する調査研究
特発性血栓症遺伝子解析における試料等の提供に関する
合意文書（Material Transfer Agreement）

1. 本文書は○△大学（以下、甲）と×△大学（以下、乙）の間で授受される特発性血栓症遺伝子解析研究に係る遺伝子検体の取り扱いについて定めるものである。
2. 本文書が対象とする遺伝子検体は、特発性血栓症関連遺伝子検索の目的で甲が収集し、かつ適切に取得されたものであることを甲が保証したものとする。
3. 甲は匿名化した遺伝子検体を乙に分与する。分与の数、時期、方法については別に定める。
4. 乙は提供された遺伝子検体を用い、2 項に掲げた目的のための遺伝子解析を行うことができる。
5. 乙が定める遺伝子検体管理者は、甲から提供された遺伝子検体及びその解析結果を「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（3 省共通指針）及び本文書に基づいて適切に管理するものとする。
6. 乙は、研究終了後の残余の遺伝子検体を甲に返却するものとする。

上記の申し合せにつき合意する。

甲：○△大学
研究責任者：
平成１６年　　月　　日

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿印

乙：×△大学
研究責任者：
平成１６年　　月　　日

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿印

平成１６年　　月　　日

○△大学
　研究責任者　　殿

遺伝子検体受領書

○△大学と×△大学が合意したＭＴＡにしたがい、下記のとおり遺伝子検体を受領しました。

数：　　検体

量：

所属　　×△大学

　　研究責任者　　印

（この用紙を２枚作成し、それぞれの機関が保管することとする）

（様式２）

国立循環器病センター倫理委員会審査判定通知書

平成１４年１２月２４日

（申請者）
病因部長　宮 田　敏 行　　殿

国立循環器病センター
倫理委員会委員長　武　部　　啓

受付番号　１４－２６

課 題 名　静脈血栓症の遺伝的素因に関する研究

代表者名　病因部長　宮 田　敏 行

上記課題を、平成１４年１２月１６日の委員会で審議し、下記のとおり判定したので通知する。

記

判定	承　認　　条件付承認　　不承認　　非該当　　継続審議
理由	（参　考） ・共同研究機関一覧において、役割分担（解析機関、試料提供機関）を明確にすることが望ましい。 ・当該研究対象者は静脈血栓症の患者及びその家族であるが、説明文書には遺伝的背景が記載されていないため、不用意に不安を与えることも懸念されるので、遺伝子解析を行う理由を明記することが望ましい。 ・説明文書がやや難解であり不適切な箇所が見られるので、適切で解りやすい表現に改めること。

別記様式第３号（第８条関係）

遺伝子解析研究許可決定通知書

平成１５年３月１１日

申請者（研究責任者）
分子病態研究グループ
坂　田　洋　一　　殿

自治医科大学
学長　高　久　史　麿

受付番号　遺０２－４７　号
課題名
静脈血栓症遺伝的素因に関する研究

さきに申請のあった上記の課題について、遺伝子解析研究倫理審査委員会及び生命倫理委員会での審議及び審査結果を踏まえ、研究の実施を許可することに決定したので通知します。

なお、生命倫理委員会の判定結果は下記のとおりでした。

記

判定結果	(承認)　条件付承認　変更の勧告　不承認　中止　その他
理由、条件、勧告又は意見	

(名大医倫理書式３)

審査結果通知書

平成１５年４月１１日

実施責任者

小 嶋 哲 人　殿

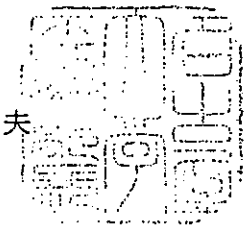
課題名 ： 静脈血栓症の遺伝的素因に関する研究

承認番号 ： ４２

申請日:平成１５年２月２１日

名古屋大学医学部長

杉 浦 康 夫



あなたの申請された上記の研究課題について検討した結果、下記と決定しましたので通知します。

記

①. 承 認

２. 条件付承認 ： 条件

３. 不承認

以上

倫 理 審 査 結 果 通 知 書

平成15年11月7日

内科学
専任講師 村田 満 様

医学部倫理委員会
委員長 北 島 政 樹

平成15年9月6日に提出された倫理審査申請（15-56）について10月27日に審査した結果，下記のとおり判定しましたのでお知らせいたします。

記

課題名	静脈血栓症の遺伝的素因に関する研究
判定	条件付承認
勧告または理由	✓申請書(9)遺伝情報の開示に関する考え方の項目に「匿名化のうえ公表することがある。」との記載は該当しない。研究成果の項目が望ましい。 ✓申請書(17)研究資金の調達方法は具体的な名称を記載すること。 ✓患者説明文書の中に遺伝子によって体質の中に性格は含めないこと。 ✓患者説明文書の遺伝子の数を統一すること。 ✓患者説明文書3ページ3行目と同意書の2.は同じ目的の研究を限定とした表現にすること。 ✓研究期間を患者説明する際は実際日を記載すること。 ✓申請書(15)と患者説明文書(4)2行目簡潔に患者にわかりやすく記載すること。 ✓説明文書と同意文書の項目を整え、照合できるようにすること。 ✓患者説明文書(5)過去のデータとの比較を記載すること。 ✓別紙2遺伝子解析施設のフローを訂正する。 ✓患者説明文書（10）遺伝子カウンセリングの体制の中の医事課職員は削除する。 以上の諸点を確認したうえ、承認する。

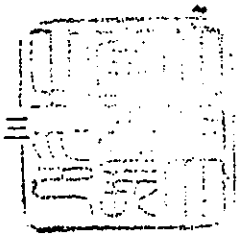
以 上

許可番号	16

平成14年　5月30日

医学系研究科　助手
川　崎　富　夫　殿

総　長　岸　本　忠　三



ヒトゲノム研究審査結果通知書

課　　題　　名：「静脈血栓症患者の凝固制御系蛋白質の遺伝子変異および多型に関する研究」

研究責任者所属氏名：医学系研究科　助手　川崎富夫

上記に係る実施計画等（研究）を平成14年　5月27日開催の委員会で審査し、結果承認したので通知します。

決　定　通　知　書

平成15年12月１日

血液病態制御学
助教授　辻　肇　様

京都府立医科大学長　井　端　泰　彦

下記の研究については、京都府立医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の審査を経て、下記のとおり決定したので通知します。

記

研究計画名	静脈血栓症の遺伝的素因に関する研究　（受付番号　２５）
申請者	所　属　血液病態制御学　職・氏名　助教授　辻　肇
判定	承　認　　条件付承認 不承認　　非該当
条件又は理由	

血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 ADAMTS13 に関する研究

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、血漿中の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、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 マルチマーの蓄積は、VWF 切断酵素 ADAMTS13 の活性著減で起こる。本研究では、先天性 TTP 患者家系の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、変異がもたらす効果を明らかにした。また、マウス ADAMTS13 を同定し、TTP 研究のモデル動物としての有用性を示した。一方、TTP 診断を補助する指標として ADAMTS13 活性測定は重要であるが、従来法は操作が煩雑で時間もかかった。本研究で新しい活性測定法を開発し、従来よりも簡便かつ迅速な方法を確立した。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、血小板数減少・細小血管障害性溶血性貧血・腎機能障害・動揺性精神神経症状・発熱を主徴とする重篤な疾患である。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。

TTP 患者の細小血管では、血漿中の異常高分子量フォンビルブランド因子(VWF)マルチマーによる過剰な血小板凝集が起こっており、これが諸症状をもたらしている。通常、VWF マルチマーは血漿中において適度に断片化され、様々な分子量のマルチマーとして循環するが、TTP 患者では断片化に障害が生じているのである。近年、VWF の切断を担う酵素として、ADAMTS13 が同定された。

本研究では、先天性 TTP 患者家系の ADAMTS13 遺伝子を解析し、原因変異を同定するとともに、酵素に対する変異の影響を調べることを目的の一つとした。

一方、TTP には溶血性尿毒症症候群や播種性血液凝固症候群といった類似疾患が存在し、その鑑別が困難であることが多い。患者血漿の ADAMTS13 活性測定は、TTP 診断にとってきわめて重要な判断材料となり、また TTP 発症の予知に役立つことも期待されている。しかし、従来の測定法は操作が煩雑で時間もかかった。そこで本研究では、ADAMTS13 特異的な合成基質を開発し、簡便かつ迅速な活性測定法を確立することも目的の柱とした。

2. 研究方法

先天性 TTP 患者および家系構成員の末梢血液から DNA を調製し、ADAMTS13 遺伝子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、マウスのADAMTS13 遺伝子も解析した。TTP 患者家系に同定した変異をもつ ADAMTS13 を培養細胞で発現させ、分泌効率を調べた。また、従来のVWF 切断活性測定法を利用し、変異体の活性を測定した。

ADAMTS13 は、VWF の A2 ドメインに存在するY1605-M1606 間を切断する。そこで、A2 ドメインのアミノ酸配列に基づき、種々のペプチドを大腸菌で発現させた。精製および検出のため、N 末端に GST タグを、C 末端に His タグを付加しておいた。これを血漿と反応させ、電気泳動とウェスタンブロッティングにより、切断状態を解析した。

上述の実験で特定した 73 残基ペプチド(VWF の D1596-R1668 に相当)の P7 位を蛍光基 Nma 付加ジアミノプロピオン酸残基に、P5'位を消光基 Dnp 付加ジアミノプロピオン酸残基にそれぞれ置換したペプチド FRETS-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。種々の反応条件を試験することにより、反応の至適条件を検索した。

[倫理面への配慮]本研究の実施は、試料採取施設および国立循環器病センターの倫理委員会で承認された。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)」を遵守した。

3. 研究結果

先天性 TTP 患者を含む2家系の遺伝子解析を行った。家系 A では、発端者・父・母・姉を対象とした。解析の結果、4つのミスセンス変異を同定した。血漿の VWF 切断活性と比較分析したところ、R268P 変異と C508Y 変異が原因変異であり、発端者は両変異をもつ複合ヘテロ体であるとわかった。P475S 変異は活性の低下を招き、Q448E 変異は活性に影響を与えないことも示された。家系 B では、発端者・父・母を対象とした。その結果、Q449X 変異が同定された。発端者は Q449X のホモ体であった。

これらの5つの変異体を培養細胞で発現させたところ、R268P と C508Y 変異体は分泌されないこと、P475S、Q448E、Q449X 変異体は効率よく分泌されることが判明した。培養上清で活性を測定したところ、Q449X 変異体には活性は認められず、P475S 変異体には弱い活性が、Q448E 変異体には正常の活性が認められた。

国立循環器病センターの腎・高血圧部門の患者364名で5つの変異を調べたところ、TTP 原因変異と考えられた R268P, Q449X, C508Y は見出せなかったが、P475S はヘテロ体 35 人、ホモ体 1 人が、Q448E はヘテロ体 125 人、ホモ体 8 人が確認された。

マウス ADAMTS13 をクローニングしたところ、129/Sv 系統ではヒト ADAMTS13 と同じドメイン構造を保っていたが、C57BL/6 など多くの系統ではC末端領域が欠落していた。

種々の VWF 部分領域を血漿と反応させたところ、切断される最小領域は D1596-R1668 に相当する 73 残基であることが判明した(この領域を VWF73 と命名)。VWF73 は、正常血漿で用量依存的に切断される一方、TTP 患者の血漿では切断されなかった。

蛍光基と消光基を導入した 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で特異的に切断されることが示唆された。緩衝液の組成等を最適化した結果、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活性を測定すると、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管内凝固症候群患者では活性が観察された。

4. 考察

ADAMTS13 の R268P、C508Y、Q449X は、先天性 TTP の原因変異であり、これらの変異体は分泌されないか、あるいは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かった。一方、P475S は日本人の約 10%がヘテロ接合体であるが、酵素活性は低下していた。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。

P475S 変異は、先天性 TTP を発症させるものではない。しかし、何らかの血栓性リスクになっている可能性があり、今後、血栓症との関連を明らかにすることが重要と考えられる。

マウスでは、C 末端領域が欠失した ADAMTS13 を発現している系統が存在していた。マウスは、C末端領域の役割を in vivo で解析するための良いモデルかもしれない.

ADAMTS13の最小基質VWF73を開発した。大腸菌発現リコンビナント GST-VWF73-His を使用すると、5時間で活性が測定できる。この測定法は、平成 14 年7月から新規チクロピジン投薬患者を対象に、TTP 診断の一助として臨床検査で使用され始めた。

さらに、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、解析時間を含めても全行程は1時間半ー2時間で終了する。したがって、従来法より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、海外からも多くの問い合わせが来ている。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

先天性 TTP 患者2家系の遺伝子解析を行い、発症の原因となる変異を同定した。また、日本人の約 10%に見られ、活性低下を伴うP475S 変異を同定した。

ADAMTS13 に特異的な消光性蛍光ペプチド基質 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

Kokame K, Matsumoto M, Soejima K,

Yagi H, Ishizashi H, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y : Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. Proc Natl Acad Sci USA 99 (18) : 11902-11907, 2002.

Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C, Miyata T, Fujimura Y, Nakagaki T : ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. Blood 102 (9) : 3232-3237, 2003.

小亀浩市 : 血栓性血小板減少性紫斑病とADAMTS-13. 実験医学 21 (4) : 530-534, 2003.

小亀浩市 : 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)と遺伝子異常. 日本血栓止血学会誌 14 (1) : 40-43, 2003.

小亀浩市 : ADAMTS-13の活性測定法. 血液フロンティア 13 (6) : 749-755, 2003.

Kokame K, Miyata T : Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. Semin Hematol 41 (1) : 34-40, 2004.

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 (2) : 607-612, 2004.

Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Miura M, Hayashi S, Fujii Y, Iwai A, Ito E, Tsuji Y, Takeda-Shitaka M, Iwadate 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 (4) 1305-1310, 2004.

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 (29) 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.

小亀浩市・宮田敏行 : 血栓性血小板減少性紫斑病. Molecular Medicine 41 (12) : 1542-1548, 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

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, 2002 年 9 月.

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，2002年10月．

Miyata T : Mutation and common polymorphism in the ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. Gordon Research Conferences 'Hemostasis', Waterville, USA, July, 2002.

Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata Y : D1596-R1668 of von Willebrand factor is a minimal region recognized as a specific substrate for ADAMTS-13. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, July, 2003.

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. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, July, 2003.

Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Nakagaki T, Yagi H, Ishizashi H, Miura M, Hayashi S, Ito E, Iwai A, Fujii Y, Miyata T, Fujimura Y : Mutations of ADAMTS13 gene in four Japanese families with Upshaw-Schulman syndrome. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, July, 2003.

脇正人・小亀浩市・宮田敏行・宮田茂樹・窪田良次・徳田道昭・渡辺裕子・廣畑衛：血栓性血小板減少性紫斑病を合併したシェーグレン症候群の一例．第65回日本血液学会，大阪，2003年8月．

Kokame K, Banno F, Miyata T, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y : ADAMTS-13, a new member of ADAMTS family involved in hemostasis. 第76回日本生化学会大会，横浜，2003年10月．

Banno F, Kaminaka K, Soejima K, Kokame K, Miyata T : Strain-specific insertion of retrotransposon into the mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. 第76回日本生化学会大会，横浜，2003年10月．

藤村吉博・松本雅則・小亀浩市・宮田敏行・副島見事・中垣智弘・梅山秀明：Upshaw-Schulman症候群7家系のADAMTS13遺伝子変異とリモデリングによる立体構造解析．第45回日本小児血液学会，金沢，2003年10月．

小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・宮田敏行：Specific small substrate to develop a new assay system of ADAMTS-13 activity. 第26回日本血栓止血学会学術集会，東京，2003年11月．

小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・宮田敏行：VWF切断酵素ADAMTS-13の最小人工基質「VWF73」．第26回日本血栓止血学会学術集会，東京，2003年11月．

坂野史明・上仲一義・副島見事・小亀浩市・宮田敏行：C末端ドメイン欠失型VWF切