

断酵素 ADAMTS-13 のマウス系統特異的発現. 第 26 回日本血栓止血学会学術集会, 東京, 2003 年 11 月.

Miyata T, Kokame K, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y : Genetic analysis, polymorphism, functional domains and novel assay system of ADAMTS13 responsible for thrombotic thrombocytopenic purpura. 3rd General Meeting of the International Proteolysis Society associated with the International Conference on Protease Inhibitors, Nagoya, Japan, November, 2003.

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.

## 8. 知的財産権の出願・登録

### 8-1. 特許取得

血栓形成傾向素因の検査方法 : 出願人; 国立循環器病センター総長, 発明人; 宮田敏行・小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・河野雄平, 特願 2002-111241, 2002 年 4 月 12 日出願.

フォンビルブランド因子切断酵素の特異的基質および活性測定法 : 出願人; 国立循環器病センター総長が代表する日本国, 発明人; 宮田敏行・小亀浩市,

PCT/JP02/10816 , 特願 2004-544704 ,  
2002 年 10 月 18 日出願.

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

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。また、遺伝子解析においてはエクソン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

先天性アンチトロンビン (AT) 欠損症は、先天性血栓性素因として重要であり、本欠損症における血栓症発症要因の検討は、特発性血栓症の成因の解明ならびに予防に資すると考えられる。本欠損症を対象にして、血栓症発症の臨床的背景の検討を行うとともに、その遺伝子解析により血栓症の発症機序を解明し、日本人集団における遺伝的背景を明らかにすることを目的として調査研究を行った。

### 2. 研究方法

独立した先天性AT欠損患者32家系

の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受けた。

### 3. 研究結果

#### 1) 対象患者 (表1)

欠損患者64名のうち、血栓症の既往のあるものは41名、血栓症未発症のものは23名であった。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 $35.4 \pm 16.7$  (15~74)才であった。

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

表1 対象患者の性別・年令

		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

## 2) 血栓症の内訳 (表2)

静脈血栓症、特に下肢深部静脈血栓が32名(73%)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。

## 3) 血栓症の発症誘因 (表3)

発症誘因は、10名(24%)に手術、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は認められなかった。

## 4) AT欠損症のタイプ (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。

## 5) 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。発端者を含めて、3世代4名にAT欠損を認めた。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

ルの血栓除去術、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1)。

## 4 / 5. 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  $35.4 \pm 16.7$  (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。このような臨床背景は、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。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。

		血栓症あり	血栓症なし
I		26 (64%)	10(43%)
II	II-HBS	12 (29%)	11 (48%)
	II-RS		1
	II-PE		3
	ND		6
ND		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 :  
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。

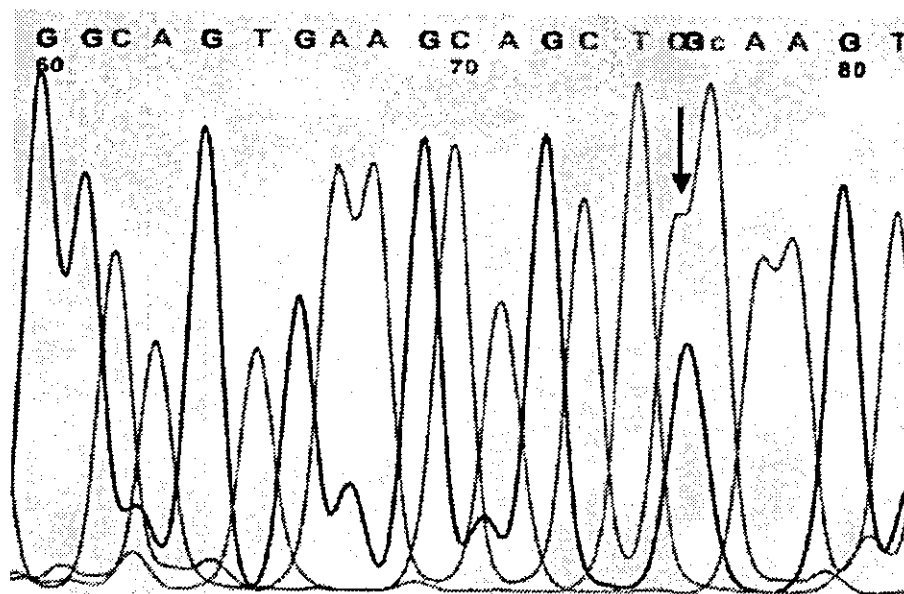


図1 エクソン6の遺伝子解析結果  
Ala384(GCA) とともにPro(CCA)への変異を認める。

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

## 線溶系およびその補填機構と血栓症

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

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 症例と、非敗血症 DIC 症例において新規線溶系分子マーカーを比較解析した。その結果、敗血症 DIC では血漿 PAI-1 の増加により線溶反応が抑制されていること、および血漿 PAI-1 値が臓器障害の重症度および予後と良く相関することが明らかとなった。血漿 PAI-1 値が、敗血症 DIC の早期診断、病態把握および予後判定の有用な指標となり得ることが示された。

さらに、DIC 症例におけるフィブリノゲン・フィブリン分解産物（FDP）の詳細な解析から、FDP が高値を示すものの白血球エラスターゼ由来フィブリン分解産物（GE-FDP）の変動が軽度に留まる群と、GE-FDP が高値を示す群が存在することが明らかとなった。これらのことは、PAI-1 が増加し線溶系が抑制される病態において、白血球エラスターゼ系が止血栓を分解する可能性を示している。白血球エラスターゼを介する止血栓溶解機構が、線溶系に対する補填機構としての役割を有する可能性が示唆された。

### 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しやすく、致命的な病態へと進展することが多い。まず本研究では、感染症症例で Systemic Inflammatory Response Syndrome（SIRS）基準を満たした病態（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について検討した。

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。我々は、これらの史実から、白血球エラスターゼによる血栓溶解が、線溶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いう仮説を立てた。そこで本研究では、白血球エラスターゼによる血栓溶解機構の役割を明らかにするために、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) を解析した。

## 2. 研究方法

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(トロンピン-アンチトロンピン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。

さらにDIC症例を対象に、白血球エラスターゼの血栓溶解への関わりを明らかにするために、GE-FDPを解析した。GE-FDPの測定に用いたIF-123は、フィブリノゲン分子A $\alpha$ 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。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

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90ng/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30ng/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た。さらに、血漿PAI-1値が30ng/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DIC診断後28日目死亡率が約65%と、他の群に比較して有意に高値を示した。

対象としたDIC症例の多くは、FDPとGE-FDPの間に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（プラスミンによるフィブリン・フィブリノゲンが主である群）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群）群が存在した。

血漿PAI-1値が100 ng/mL以上のPAI-1高値を示すDIC症例のなかで、FDP値が90 µg/mL以上の症例群と、それ以下の症例群に分け、GE-FDP値の多寡について解析した。その結果、FDP高値群は、FDP低値群に比較してGE-FDP値が有意に高値を示した。すわなち、PAI-1高値にも関わらず増加しているFDPは、多くの場合、白血球エラスターゼの分解に起因することが明らかとなった。

GE-FDP値が高値を示したDIC症例について、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 $\alpha$ 鎖のN末端の16番目のアルギニンとグリシンがトロンピ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。

#### 4. 考察

PAI-1は、プラスミノゲンアクチベ-

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。

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結果、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ン・フィブリノゲン分解が主であると考えられる群）の2群に分類される。

特に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。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ある。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と、白血球エラスターゼが、止血栓溶解において線溶系の補填機構を備えている可能性が推測された。

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。

## 5. 結論

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。

白血球エラスターゼを介する線溶機構は、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。

## 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 Type 2 von Willebrand's Disease and Analysis of Exon 28 of the von Willebrand Factor Gene. *Am J Gastroenterology*. 99:2495-2498,2004.

Iimura 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 CD34<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.
- Mimuro J, Hamano A, Tanaka T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y.: Hypofibrinogenemia caused by a nonsense mutation in the fibrinogen B $\beta$  chain gene. *J. Thromb. Haemost.* 1(11):2356-9, 2003.
- 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. *Blood.* 102(11):314, 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. Thor Cardiovasc Surg.* 51(2) :68-70, 2003.
- 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 surgery. *Sem Thromb Hemost.* 28(6) :519-524, 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. Clin Chim Acta 318:25-32, 2002.

Sugo T, Sakata Y, Matsuda M. : Structural alterations in hereditary dysfibrinogens. Curre Prot Pep Sci.3:239-247, 2002.

Sekine O, Sugo T, Ebihara K, Umeyama H, Iwahana H, Arlette Ruiz-Saez, Norma de Bosch, Matsuda M.: Substitution of Gly-548 to ala in the substrate binding pocket of prothrombin perija leads to the loss of thrombin proteolytic activity. Thromb Haemost.87:282-287, 2002.

#### B. 学会発表

窓岩清治、坂田洋一：「癌の凝固線溶系への挑戦」第3回日本検査血液学会学術集会シンポジウム 2002.7/6 東京 慶應義塾大学

窓岩清治、山内忠彦、新井盛夫、小林英司、三室 淳、諏合輝子、坂田洋一：第 VIII 因子欠損マウスを用いた新生児免疫寛容誘導の試み 第25回日本血栓止血学会学術集会 2002.11/14~16 神戸国際会議場

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(Defecut of sorting to secretory vesicles in the Golgi is responsible for type I protein C

deficiency)第64回日本血液学会総会 2002.9/11~15 横浜パシフィコ

菊池次郎、三室 淳、尾形享一、上田泰治、久米晃啓、窓岩清治、諏合輝子、内藤雅夫、長谷川 護、水上浩明、花園 豊、小澤敬也、坂田洋一：SIVベクターを用いた CD34 陽性細胞への凝固第 VIII 因子遺伝子導入による血友病 A の遺伝子治療法の検討 (Transplantation of Human Factor VIII producing Cord Blood derived CD34+cells into NOD/SCIDmice)第64回日本血液学会総会 2002.9/11~15 横浜パシフィコ

尾形享一、三室 淳、菊池次郎、上田泰治、水上浩明、内藤雅夫、窓岩清治、諏合輝子、長谷川 護、花園 豊、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：血友病 A 遺伝子治療の基礎検討(Haemophilia A Gene Therapy:Expression of Factor VIII Transgene in Adipocytes)第64回日本血液学会総会 2002.9/11~15 横浜パシフィコ

Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Ogata K, Madoiwa S, Sugo T, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y:Sustained Production of Human Factor VIII from Human Cord Blood-Derived CD34+ Cells Transduced by Simian Immunodeficiency Virus agmTYO1-Based Vectors Carrying the Human Factor VIII Transgene in NOD/SCID Mice. American Society of Hematology 44<sup>th</sup> Annual Meeting and

Exposition 2002.12.(p-200) USA  
窓岩清治、坂田洋一：線溶異常による  
血栓形成機序 第23回日本静脈学会  
2003.4/10~11 東京 学術総合セン  
ター

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  
2003.8/28~31 大阪国際会議場

水上浩明、三室淳、小倉剛、望月慎  
史、松下卓、岡田尚巳、花園豊、久  
米晃啓、村松慎一、窓岩清治、坂田  
洋一、小澤敬也。：AAV ベクターの血  
清型による発現の比較 マウス骨格  
筋への凝固第2因子遺伝子導入を用い  
た検討  
第65回日本血液学会第45回日本臨床  
血液学会 2003.8/28~31 大阪国際  
会議場

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。  
脂肪組織を標的とした AAV ベクター  
による in vivo 遺伝子導入法の開発  
日本癌学会 62 回総会記事 P233  
2003.9/25~27 名古屋国際会議場

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 2003.11/27~29 東京  
京王プラザ

Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y,  
Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J,  
Sakata Y : Neconatal injection of human  
factor VIII induces immune tolerance in  
murine hemophilia A. The International  
Society on Thrombosis and Haemostasis.  
XIX CONGRESS and 49<sup>th</sup> Annual SSC  
Meeting. 2003.7/14~17 Birmingham,  
UK.

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. 2003.12/6~9 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.  
2003.12/6~9 San Diego, USA.

Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Ono F,  
Kobayashi E, Muramatsu S, Madoiwa S,  
Matsushita T, Okada T, Hanazono H,  
Kume K, Terao K, Sakata Y, Ozawa K.

Muscle-Mediated Human Factor IX Expression in Cynomolgus Monkey using AAV Vectors. Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. 2003.6 Washington, DC, USA

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 細胞性アレルギーを誘導する 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。



1. (論文発表) 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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 CD34+ 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

## 特発性血栓症の分子病態解析

分担研究者名 小嶋哲人 名古屋大学医学部教授

研究協力者名 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 : 名古屋大学医学部附属病院輸血部

山崎鶴夫、齋藤英彦 : 名古屋医療センター

### 研究要旨

特発性血栓症における血液流動性維持機構の障害とその病態を解明すべく、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 PAI-1 発現 (H14 年度) ならびに TF 発現 (H15 年度) との関連について検討した。拘束ストレス負荷後に血中の PAI-1 抗原値の上昇、各組織の PAI-1 mRNA や TF mRNA の発現増加を認めた。これらは、老齢個体や肥満個体により著明で、特に腎臓や脂肪組織では微小血栓の形成とよく相関し、ストレス誘発性血栓傾向の背景には組織特異的な PAI-1 ならびに TF の発現増加があると考えられた。H16 年度には血栓性素因・先天性プロテイン S 欠損症 8 家系の遺伝子解析を行い、新規変異と新規変異をそれぞれ 4 種類ずつ同定した。2 家系に A732G ヘテロ接合体を認めたが、家族内解析の結果 PS 活性低下が A732G の伝播と一致する家系と一致しない家系がみられ、A732G 以外に PS 活性変動に関与する他の要因の存在が示唆された。

#### 1. 研究目的

脳梗塞、心筋梗塞を代表とする血栓性疾患は、我が国においても食生活の欧米化ならびに高齢化社会を迎えてますます増加傾向にあり、その対策が急務である。しかしながら、多くの研究者の努力にもかかわらず血栓形成の分子機構はまだ完全に解明されているとは言い難い。本研究では、血栓症誘発動物モデルを用いての各血液凝固線溶因子の血栓症発症に関わる分子機構の解明を行うとともに、血栓性素因の一つで日本人にも多く存在するプロテイン S (PS) 欠損症における分子病態解析を行ない、血栓性疾患の発症予防・予知、さらにはその治療法の確立に寄与することを目的とする。

#### 2. 研究方法

平成 14・15 年度は 8 週、12 ヶ月、24 ヶ月齢のオス C57BL/6J マウスを 50 ml チューブ内に一定時間閉じ込める拘束ストレス負荷実験を行った。拘束負荷後、それぞれ血漿と主要臓器を採取し、各組織 RNA を抽出して competitive RT-PCR 法により PAI-1 mRNA ならびに TF mRNA を定量するとともに、t-PA binding assay 法にて血漿中の活性型 PAI-1 抗原量を測定、Western blot 法にて組織抽出液中の TF 蛋白量を半定量解析した。また、in situ hybridization 法にて各組織での PAI-1 ならびに TF の mRNA 発現局在についても検討した。さらに、HE および PAS 染色により 20 時間拘束ストレス負荷後の腎臓・脂肪組織における微

小血栓沈着の有無について若年マウス・老齢マウス間、および肥満マウス・対照マウス間で比較検討を行った。

平成 16 年度は深部静脈血栓症または肺梗塞を発症した PS 欠損症について、インフォームドコンセントを得た患者あるいはその家族の末梢血白血球 DNA の各 PS $\alpha$  遺伝子の全エクソンをイントロンとの境界領域を含めた PCR 増幅産物のダイレクトシーケンシス解析とともに、変異の家族内伝播様式解析を PCR-RFLP にて施行した。

(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。また、PS 欠損症の遺伝子解析は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て施行した。

### 3. 研究結果

H14・15 年度の拘束ストレス負荷実験では、2 時間後に血中の PAI-1 抗原値は有意に上昇し、組織での PAI-1 mRNA 発現も増加した。この変化はストレス負荷 20 時間後にはさらに著明となり、特に脂肪組織での PAI-1 mRNA 増加が顕著であった。一方、TF mRNA 発現も拘束ストレス負荷 20 時間後に、種々の組織で有意な増加を認めた。これらの PAI-1 や TF の発現増強は、老齢個体や肥満個体により著明で、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。すなわち、H16 年度には血栓性素因・先天性プロテイン S 欠損症 8 家系の遺伝子解析を行い、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。

### 4. 考察

拘束ストレス負荷によって *in vivo* での PAI-1 や TF 発現は組織特異的、加齢依存的に著明に増大し、脂肪組織での発現増加が顕著で、これらは全身的な血栓傾向に寄与していると思われた。とくに、老齢個体や肥満個体においては、腎臓や脂肪組織での PAI-1 や TF 発現増加が、組織内微小血管における血栓形成の原因の一つとなっていると考えられた。すなわち、ストレス誘発性・血栓傾向の背景には組織特異的な PAI-1 や TF の発現増加があり、これらの発現制御が血栓症予防のカギとなると推察された。これらの分子病態メカニズムの解明は、ストレス誘発性血栓症の予防・治療への応用が期待できる。また、先天性 PS 欠損症解析では、A732G (K155E) 変異に伴う PS 活性値は家系により異なり、PS 活性変動に關与する A732G 以外の要因の存在が示唆された。

### 5. 結論

マウスに拘束ストレス負荷を与えることによって、血中および主要臓器での PAI-1 増加や腎臓や脂肪組織などでの TF 発現は有意に増加し、これらの変化は老齢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 PAI-1 や 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。また、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、これらは PS 欠損症の

病因と考えられた。

6. 健康危険情報

特になし

7. 研究発表

1. 論文発表

M. Yanada, T. Kojima, K. Ishiguro, Y. Nakayama, K. Yamamoto, T. Matsushita, K. Kadomatsu, M. Nishimura, T. Muramatsu, and H. Saito: The impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: LPS and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin deficient mice. **Blood** 99:2455-2458, 2002.

K. Yamamoto, T. Shimokawa, H. Yi, K. Isobe, T. Kojima, D. J. Loskutoff, and H. Saito: Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis: increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and LPS signaling with aging. **Am. J. Path.** 161:1805-1814, 2002.

K. Yamamoto, T. Shimokawa, H. Yi, K. Isobe, T. Kojima, D. J. Loskutoff, and H. Saito: Aging and obesity augment the stress-induced expression of tissue factor gene in the mouse. **Blood** 100:4011-4018, 2002.

K. Takeshita, K. Yamamoto, M. Ito, T. Kondo, T. Matsushita, M. Hirai, T. Kojima, Y. Nabeshima, D. J. Loskutoff, H. Saito, and T. Murohara: Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, "klotho" mouse. **Semin. in Thromb. Hemost.** 28:545-553, 2002.

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.

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