

- 
- 14 : 802-829, 1999.
- 4) Compston JE : Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81 : 419-447, 2001.
  - 5) Kasperk CH, Wakley GK, Hierl T, et al : Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism *in vitro*. *J Bone Miner Res* 12 : 464-471, 1997.
  - 6) Gill RK, Turner RT, Wronski TJ, et al : Orchiectomy markedly reduces the concentration of the three isoforms of transforming growth factor beta in rat bone, and reduction is prevented by testosterone. *Endocrinology* 139 : 546-550, 1998.
  - 7) Gori F, Hofbauer LC, Conover CA, et al : Effects of androgens on the insulin-like growth factor system in an androgen-responsive human osteoblastic cell line. *Endocrinology* 140 : 5579-5586, 1999.
  - 8) Hofbauer LC, Ten RM, Khosla S : The anti-androgen hydroxyflutamide and androgens inhibit interleukin-6 production by an androgen-responsive human osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 14 : 1330-1337, 1999.
  - 9) Lin SC, Yamate T, Taguchi Y, et al : Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. *J Clin Invest* 100 : 1980-1990, 1997.
  - 10) Pederson L, Kremer M, Judd J, et al : Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 505-510, 1999.
  - 11) Huber DM, Bendixen AC, Pathrose P, et al : Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor. *Endocrinology* 142 : 3800-3808, 2001.
  - 12) Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, et al : Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol* 147 : 269-273, 2002.
  - 13) Kawano H, Sato T, Yamada T, et al : Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 9416-9421, 2003.
  - 14) Takayanagi R, Goto K, Suzuki S, et al : Dehydroepiandrosterone (DHEA) as a possible source for estrogen formation in bone cells : correlation between bone mineral density and serum DHEA-sulfate concentration in postmenopausal women, and the presence of aromatase to be enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human osteoblasts. *Mech Ageing Dev* 123 : 1107-1114, 2002.
  - 15) 足立雅広, 名和田 新 : 体液性因子における骨・血管相互作用 - DHEA-S -. *CLINICAL CACTUM* 7 (9) : 1200-1203, 1997.
  - 16) Chen F, Knecht K, Birzin E, et al : Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* 146 : 4568-4576, 2005.
  - 17) Kasperk CH, Wakley GK, Hierl T, et al : Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism *in vitro*. *J Bone Miner Res* 12 : 464-471, 1997.
  - 18) Liu D, Dillon JS : Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha (i2,3). *J Biol Chem* 277 : 21379-21388, 2002.
  - 19) Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, et al : Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging : contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 4279-4284, 2000.
  - 20) Kahn AJ, Halloran B, Wolkowitz O, et al : Dehydroepiandrosterone supplementation and bone turnover in middle-aged to elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 1544-1549, 2002.
  - 21) Miyaura C, Toda K, Inada M, et al : Sex- and age-related response to aromatase deficiency in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 280 : 1062-1068, 2001.
  - 22) Gennari L, Masi L, Merlotti D, et al : A polymorphic CYP19 TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men : effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 89 : 2803-2810, 2004.

# 造血器悪性腫瘍の病態解明と治療の進歩

久留米大学医学部内科学講座血液内科部門

岡 村 孝

## はじめに

すべての血液細胞は、骨髄に存在し自己複製能と分化成熟能を有する造血幹細胞から由来する。

この造血幹細胞は、骨髄系前駆細胞とリンパ系前駆細胞に分化し、骨髄微小環境と造血サイトカインの作用によりそれぞれの分化方向が運命づけられ成熟細胞を必要に応じて産生する。一方、造血幹細胞は、骨芽細胞と接着して骨髄ニッチに存在し自己複製能力を有し、生涯にわたり血液細胞の恒常性を保っている。

造血器悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫などが含まれる。

白血病は、これらの造血細胞の各分化段階の細胞に何らかの遺伝子異常をきたし、増殖制御機構から逸脱し増殖シグナルが恒常的に作用する。また、正常分化機構が障害されたり細胞のアポトーシスが抑制されたりすることにより白血病の病態を形成する。最近、これらの白血病の一部ではその白血化メカニズムが明らかになりつつある。このうち、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄増殖性疾患（真性赤血球増加症など）について白血化機構と新規治療について述べる。

## 1. 急性骨髄性白血病の分子病態解明の進歩

急性骨髄性白血病（AML）は、歴史的に FAB 分類で形態的に M0 から M7 に分類される。M0 から M3 までは白血病細胞の分化度により分類され、M0 は最も未分化な AML であり M1、M2 と芽球の分化度が進み、さらに M3 では前骨髄球

レベルでの白血化である。M4、M5 は単球系、M6 は赤芽球系、M7 は巨核球系形質を持つ AML である。AML は、以前には不治の病として恐れられていた疾患の一つである。多剤併用化学療法が進歩し、total cell kill 理論のもとに積極的強力治療が行われるようになり、明らかに一部の AML では治癒する症例の存在が知られる一方、あらゆる化学療法でも血液学的寛解にも至らず早期に不幸の転帰をたどる症例も存在することが注目され、AML は細胞形態だけでは計り知れないヘテロの疾患単位であり、臨床的にもより単一な疾患単位分類が可能となるような細胞の性格付けが必要であることが認識されてきた。最近 WHO 分類が提唱され染色体異常が重視されるようになった<sup>1)</sup>。染色体ならびに遺伝子異常に基づく分類において、白血化機序、治療反応性、予後において、形態分類では不可能であった疾患の均一性がみられることから、重視されるようになり、今後も新たな分子論的分類が進歩していくものと考えられる。

白血病の染色体異常は、転座型と欠失や付加など数多くの異常がみられ、まだその遺伝子同定が不十分であり白血化機序と直接繋がりが解明されているのはその一部である。このなかで最も研究が進み臨床的にも薬剤の開発に寄与し、患者診療に大きな福音を与えた二つの染色体異常について述べる。

急性前骨髄球性白血病（APL）は、FAB 分類 M3 に分類され細胞形態的に特徴を有し、細胞質内にアズール顆粒が多く見られ一部にはアウエル小体が束状に集合し Faggot 細胞がみられるのが特徴である。この細胞は、flow cytometry では、CD13、CD33 陽性であり、HLA-DR 陰性の分化

T. Okamura. Progress of pathogenesis and treatment in hematological malignancies.

した骨髄系芽球である。APLは、ほぼ95%以上に染色体異常t(15;17)(q22;q11)がみられ、15q22に存在するPML遺伝子と17q11に存在するレチノイン酸受容体 $\alpha$ 遺伝子とが融合し、PML/RAR $\alpha$ キメラ蛋白が産生されるのがAPLの本態であることが解明された。t(15;17)以外のAPL症例でもRAR $\alpha$ 遺伝子が関与している。PML/RAR $\alpha$ キメラ蛋白は、図1に示すようにホモ2量体を形成し、遺伝子のRARE (retinoic acid response element) に結合し、コレスペッサーであるN-CoR および mSin3 が会合しヒストンデアセチラーゼ (HDAC) によるヒストンのデアセチル化により転写抑制をきたす<sup>2)</sup>。PML/RAR $\alpha$ はRAR $\alpha$ のドミナントネガチブに作用し、また、正常PMLの作用も抑制する。これにより分化に必要な分子の転写が抑制され分化停止を来し、細胞増殖を来すことがAPL発症に関与すると言われている。しかし、PML/RAR $\alpha$ のトランスジェニックマウスの実験からPML/RAR $\alpha$ は、APL発症に必須ではあるが、他の二次的発症機構が関与していることが示唆されている。APLの治療薬として使用されているATRAは、PML/RAR $\alpha$ に結合することによりコレスペッサーを解離し、ヒストンデアセチル化により転写が進むことから分化停止が解除され、アポトーシスに進むことが治療効果に関与している<sup>3)</sup>。このようにATRAは、APLの治療薬として使用されるようになってからAPLの治療成績が飛躍的に向上した。もともとAPLは抗癌剤と

くにアントラサイクリン系薬剤に感受性が高く治療を望める白血病の一つであったが、抗癌剤治療では細胞崩壊が著明なために播種性血管内血液凝固(DIC)をきたし、出血で治療早期に死亡することも多かったが、ATRAは細胞の急激な崩壊を来さないことと、ATRAによる組織因子発現抑制によりDICの増悪を抑制するため出血による早期死亡例の減少により治療成績の向上に貢献したものと考えられる。図2に日本での代表的白血病治療グループJALSGの年次別APL治療成

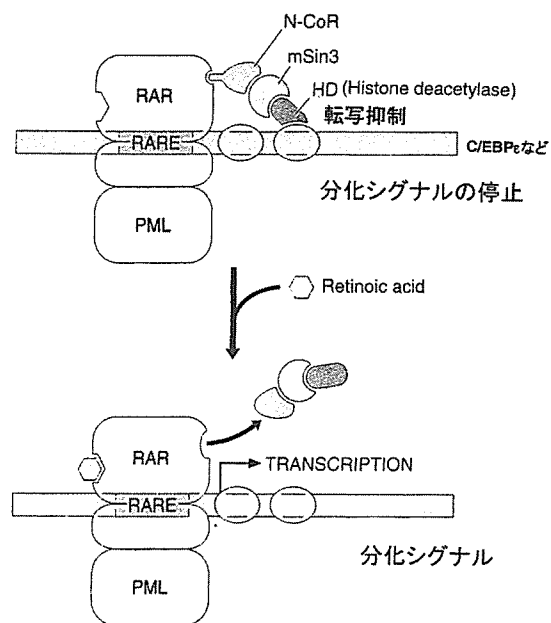


図1 APLにおけるPML/RAR $\alpha$ の分化障害とレチノイン酸の作業機序

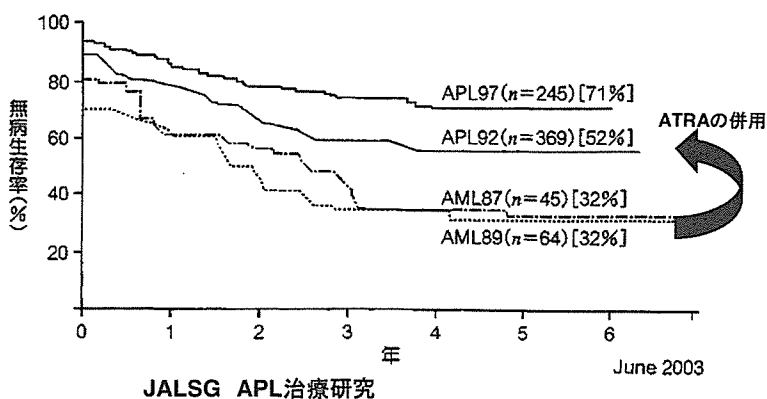


図2 APLの治療成績

績を呈示した<sup>4)</sup>。1980年代後半のAPL患者5年無病生存率は30%であったが、ATRA応用後の1990年後半になると70%になった。ATRAに加えてイダルビシンを主とした抗癌化学療法の併用が一般的であるが、治療前白血球数10,000以上の患者は予後不良となる。ATRA投与において、初期に白血球数増加を来し約10%にRA症候群（発熱、浮腫、呼吸不全、心不全、腎不全など）として有名な重篤な合併症を来すことがある。

AMLでは、その他転写因子が関与した転座型染色体異常がみられることもあり、それぞれの遺伝子異常と発症メカニズムおよび臨床的インパクトについて解明が進んでいる。しかし、転座や欠失・付加などといった染色体構造上の大きな変化を来すだけでなく、増殖や分化・アポトーシスに関与した遺伝子の塩基変異が発症と密接な関係を持っていることも明らかになってきた（表1）。FLT-3は、幹細胞レベルで発現している膜受容体型チロシンキナーゼで、FLT-3 ligandとの結合により増殖・分化・自己複製シグナルを伝えることが知られているが、近年、図3に示すようにこのFLT-3の膜貫通部近傍の遺伝子重複（Internal tandem duplication）が発見され（FLT3/ITD）、AMLの約20~30%にみられ、さらにキナーゼドメインのA-loop内D835の領域が変異・欠失する例（FLT3/KDM）がAMLの5~10%にみられることがわかり、これらのFLT-3変異はキナーゼ活性の恒常的活性化をきたし

増殖することが明確になった<sup>5)</sup>。FLT-3遺伝子の変異は骨髄系白血病に限定されリンパ系白血病ではほとんどみられない。高齢のAMLでは頻度が高く、小児例では非常に少ない。さらに、これらのFLT-3変異をもつAMLは予後不良であることが示されている。APLではこのFLT3/ITDが多くみられ、APLがPML/RAR $\alpha$ のみでは発症しないので、二次的遺伝子異常の付加が必要であることは前述したが、FLT-3変異も一つの候補になるものと思われる<sup>6)</sup>。今後FLT-3特異的チロシンキナーゼ阻害剤やFLT-3への抑制性モノクローナル抗体の開発などが期待される。

AMLの40~50%は正常核型を呈しその発症メカニズムが不明である。2005年に核内に存在するシャペロン蛋白であるNucleophosmin (NPM)が、核内から細胞質内へのdislocationを示すAMLが発見され<sup>7)</sup>、この遺伝子解析からNPM遺伝子3'末端に変異がみられるためNPMが細胞質に止まり、核内からリボゾームへの輸送が障害されていることが確認された。このNPM変異は正常核型を示すAMLの約60%にみられ、反対に染色体異常を持つAMLではNPM変異はみられなかった。特にCD34陰性の分化傾向を持つAMLに多く、このNPM異常（細胞質内NPM）を示すAMLは予後が良いことがわかった。正常核型を示すAMLは、予後別分類では、中間型を示し、このようにNPM変異およびFLT-3変異の組み合わせで分類し、予後予測に利用できる。

表1 骨髄系悪性腫瘍の遺伝子異常

• FLT3-ITD, FLT3 D835Y	AML
• N-or K-RAS mutation	AML/MDS
• C-kit mutation	AML/MDS
• P53 mutation	AML/MDS
• NPM mutation	AML(染色体正常)
• JAK-2 mutation	MPD(真性多血症)

↓

白血病発症メカニズムの解明につながるとともに  
化学療法反応性および予後を規定する因子となる。

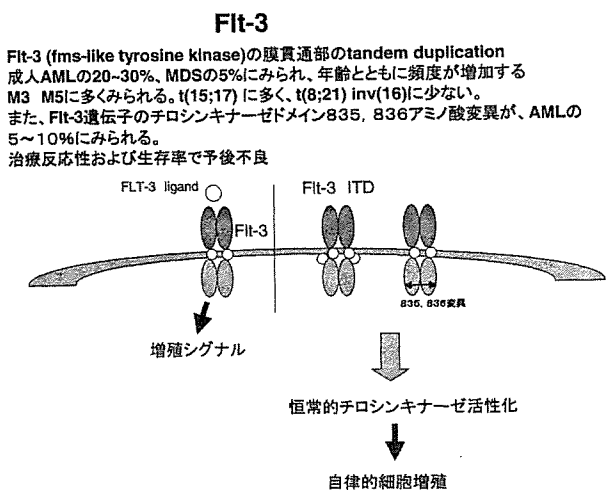


図3

## 2. 慢性骨髄性白血病の分子標的療法とその治療成績

慢性骨髄性白血病 (CML) は、白血球数が著増し脾腫をきたす疾患であるが、最近健康診断で白血球が軽度増加する程度の初期に発見されることが多くなった。本疾患の自然経過は、慢性期が3～5年持続し、その後移行期を経て急性転化をきたすと治療抵抗性となり約1年、全経過5～8年で死亡する予後不良の疾患であった (図4)。診断には、歴史的に Ph 染色体の検出が最も重要であり、CML のほぼ全例に認められる。Ph 染色体は図5に示すように t(9;22)(q34;q11) でできる骨髄系幹細胞レベルにおこる転座型異常である。22q11 に存在する bcr 遺伝子と 9q34 の存在する abl 遺伝子が融合遺伝子を形成し、bcr/abl 融合蛋白が産生される。これが CML 発症の鍵となるものであり、bcr/abl トランスジェニックマウスでも CML を再現できる。Abl 遺伝子は、もともとチロシンキナーゼ活性を有する癌遺伝子であるが通常主な機能はみられないが、bcr 蛋白が上流に融合することにより abl の持つチロシンキナーゼ活性が亢進し、bcr/abl 融合蛋白が細胞質で4量体を形成することによりおもに Ras-MAPK 系を介して恒常的に増殖シグナルを伝達することにより CML は発症する<sup>8)</sup>。CML 細胞は、AML 細胞と異なり分化はほぼ正常に保たれ

ていることである。よって、芽球の増加はなく各分化段階のそれぞれの細胞が増加している。

CML に対する治療は、従来ブスルファンやハイドロキシウレアなどの抗腫瘍剤で白血球数を正常化させたり脾腫を改善させることはできても予後を改善させることはできなかつた。唯一、治癒を望める治療は同種造血幹細胞移植であり、初回慢性期に HLA 完全一致ドナーからの移植では約60%の5年生存率が得られていた。しかし、慢性 GVHD などの合併症による生活の質が低下することが多かった。Interferon- $\alpha$  は、約10%に Ph 染色体の消失がみられ薬剤のみでの治癒が期待されたが、毎日自己注射が必要でありコンプライアンスが悪いのが難点であった。

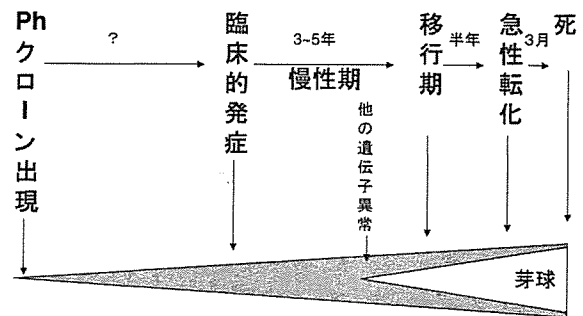
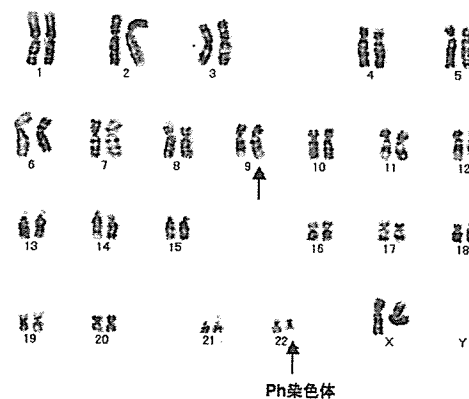
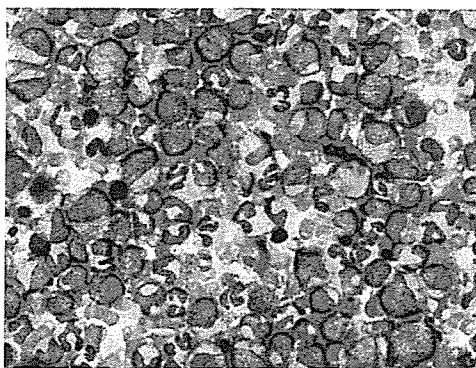


図4 CML の自然経過



	Bone Marrow		
NCC	641X10 <sup>9</sup> /L		
M:E ratio	10.1	46, XX, t(9;22)(q34;q11)	[20/20]
Meg	110/ul		

図5 慢性骨髄性白血病患者における骨髄細胞形態と染色体検査 (初診時)

2001年12月より bcr/abl に特異的に作用する新規薬剤が厚生労働省より異例の早さで承認された。これは、図6で示すように、Imatinib mesylate (Glivec) というチロシンキナーゼ阻害剤であり<sup>9)</sup>、bcr/abl 以外にも c-kit および PDGFR などのチロシンキナーゼも阻害し、CML 以外にも好酸球増加症候群などにも効果がみられ、また消化管間質腫瘍 (GIST) にも使用されている。この Imatinib は、欧米での IRIS Study<sup>10)</sup>で Imatinib 対 IFN- $\alpha$  + AraC のクロスオーバー試験がなされ、血液学的寛解率、細胞遺伝学的寛解率および薬剤耐容度において Imatinib の圧倒的有用性が確認された (図7)。

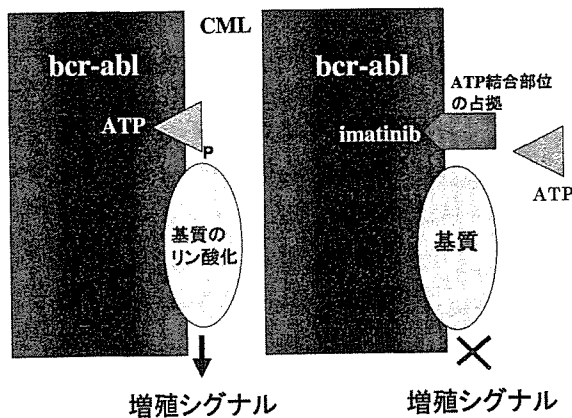
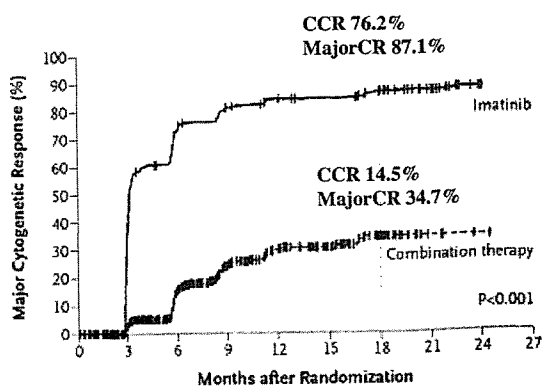


図6 imatinib の作用機序



CCR Ph chr 0  
Major CR <35%

IRIS study// NEJM 348: 994-1004,

図7 Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. Randomized trial of 1106 patients

最近5年間の長期成績も発表され細胞遺伝学的に Ph 染色体の消失は約 90%にみられ、移行期や急性転化なく生存する率も 90%以上と画期的な治療成績が得られた。この分子標的治療薬は、内服剤であり、アレルギー反応や軽度の肝障害、浮腫、嘔声などの副作用がみられるものの一時的減量・中止などの対応でほとんどの症例で長期投与が可能である。このことから Imatinib は CML 治療の first line therapy として確固たる位置を築いた。問題点は、治療抵抗性を示す症例の存在が明らかとなり bcr/abl 分子の遺伝子変異が出現しアミノ酸置換 (P ループ内 T315I) により Imatinib の結合が阻害されるメカニズムが解明されている<sup>11)</sup>。このことから他の作用機序を有するチロシンキナーゼ阻害剤の開発が進められ、新たな治療戦略の中に組み込まれるのも近いと考えられる。

### 3. 骨髄増殖性疾患の発症メカニズム

骨髄増殖性疾患 (MPD) は、骨髄幹細胞レベルでの何らかの遺伝子異常に伴い骨髄3系統の増殖がみられる疾患群であり、主に赤血球が増加する真性赤血球増加症 (PV)、血小板が著増する本態性血小板血症 (ET) ならびに骨髄が反応性に線維化する原発性骨髄線維症 (MF) に分けられる。これらの疾患は、CML と同様に細胞増殖は著明であるが、分化成熟障害はみられないのが特徴である。しかし、芽球の増加をきたす急性転化が高率にみられ、予後不良となることも CML とよく似ている。臨床的観察から MPD 発症機序も CML と同様に細胞内チロシンキナーゼ活性の恒常的活性化をきたしていることが推測され、多くの細胞内増殖に関わる分子がスクリーニングされた結果、JAK 2 分子の変異が同定された。JAK 2 分子は、エリスロポエチン受容体、トロンボポエチン受容体ならびに G-CSF 受容体などが、それぞれのリガンドと結合したとき 2 量体を形成し細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化されると、JAK 2 はこの受容体分子の細胞質内ドメインに会合し自己リン酸化されキナーゼ活性が亢進し、基質となる STAT 分子をリン酸化して、リン酸化 STAT が核内に移行し増殖に関わる遺伝子の上流に結合し転写を促し細胞増殖に導くことが知られている。MPD 患者白血球に、この JAK 2

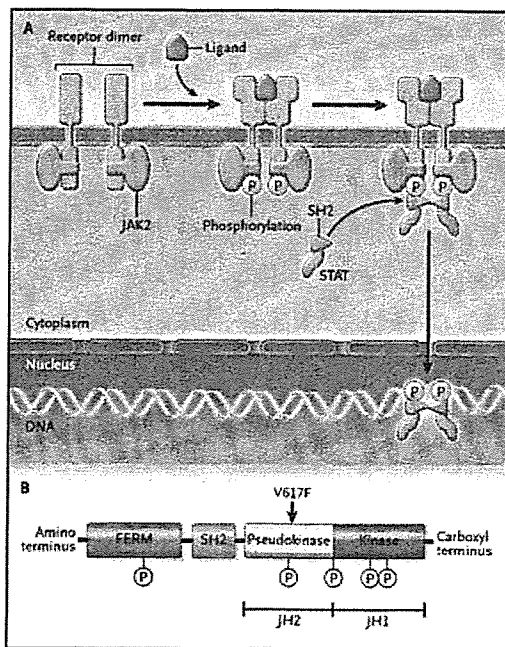
分子の pseudokinase domain V617F の変異が発見された。Pseudokinase domain は C 末端に存在するキナーゼ活性を負に制御する機能を有しているが、V617F 変異によりこの負の制御がなくなり恒常的に JAK 2 シグナルが伝達されることにより細胞増殖を来すことが明らかになった(図 8)。JAK2 変異は PV では 90 % 以上の例で見られ、ET や MF でも 50 % 程度にみられる。しかし、CML を含めた他の白血病ではみられない<sup>12)</sup>。同じ JAK 2 変異により表現型が異なる疾患が発症することは説明ができず、未知の遺伝子異常が関与していることが推察される。当然のことながら MPD の分子標的治療薬としての JAK 2 キナーゼの特異的阻害剤の開発が待たれる。

#### 4. 造血幹細胞移植の新たな動き

一般的な化学療法で寛解に至らないか再発した難治性白血病では、同種造血幹細胞移植が行われる。これには同胞間あるいは骨髄バンクを介した非血縁者に HLA が一致したドナーの存在が必須である。よって、症例によってはドナー候補がいなくて移植ができないことも多々見られた。また、感染症や臓器障害のため同種移植を断念せざるを

得ないことも多々みられる。このような移植適応制限を大きく広げることが可能となる移植術の開発も進められている。

移植細胞ソースとして、従来は骨髄幹細胞あるいは末梢血幹細胞に限られていたが、臍帯血の中にある幹細胞を利用する臍帯血移植 (cord blood stem cell transplantation: CBT) が急激に増加してきた。全国に臍帯血バンクが設立され供給も問題なく行われるようになり、以前は小児に限られていたが、成人にも行われ非血縁者間骨髄移植数を上まわりつつある。CBT の最大のメリットは、HLA が 2 座不一致までは通常移植可能であり、移植片対宿主病 (GVHD) もコントロール可能である。また、ドナーへの負担がなく、悪性細胞が急速増殖のため移植待機不可能時の緊急供給が可能である。しかし、CBT は臍帯血中の幹細胞数に限界があるため成人例では細胞数不足のこともあり、また生着までの期間が多少長くなることが問題点としてあげられる。現在 CBT の位置づけは各施設により異なるが、骨髄バンクでの HLA 一致非血縁者ドナーが不在の場合に行うことが多い。現在のところ臍帯血移植は、一定の成果が得られていることに加え、HLA の



**JAK2 変異**  
骨髄増殖性疾患で高頻度で見られる。

**JAK2**  
exon 12  
1849 G->T mutation  
V617F

**JH2 Pseudokinase domain**

Levine RL, et al. Cancer cell 7; 387-397, 2005

図 8

しびりが広がることにより移植可能症例数は、今後増加することが予想されより良い臍帯血確保が社会的に必要となるであろう<sup>12)</sup>。

従来の移植は、前処置として大量抗癌剤あるいは放射線照射によって骨髄を完全に破壊して造血免疫機構を回復不可能にし、さらに白血病細胞を根絶することにより、新たなドナー由来の幹細胞が生着することを可能にすることが必要であった。そのためレシピエントには、大きな負担を強いることになり、高齢者や臓器障害をもった患者への移植適応の限界があった。しかし、骨髄を完全に破壊しなくても免疫抑制を充分に行えばドナー由来の幹細胞の生着が得られ、自己複製能および血球細胞への分化成熟がみられることがヒトでも確認され骨髄非破壊的移植が行われるようになった<sup>14)</sup>。骨髄非破壊的移植にも、前処置の強さにより、ほとんど骨髄抑制血球減少を来さないものから、かなり強い抗癌化学療法および放射線照射をくわえるレジメンまでいろいろあり、統一されたレジメンはない。しかし、免疫抑制（フルダラビン・ATGなど）は強力に行う必要がある。この方法により55歳までが限界であった同種移植も65歳まで可能であり、化学療法中の感染症合併例や心肺肝腎機能低下例なども適応になる。骨髄非破壊的移植は、前処置としての殺細胞効果は弱いことから、主たる抗白血病作用は移植ドナー由来Tリンパ球が残存しているレシピエントの白血病細胞を攻撃する移植片対白血病効果（GVH効果）といわれる免疫反応が主体となる。よって、残存白血病細胞が多い場合は、再発が多くなるため、移植前にはなるべく白血病細胞を減らしておく必要がある。

造血幹細胞移植も、適応年齢が拡がり、移植細胞ソースも増え、HLAの不適合移植例も増加しつつある現在、移植症例は飛躍的に増加することが予想される。これにより、難治性白血病の長期生存が期待できるようになるとともにその適応基準を明確にすることが今後求められるであろう。

#### ま と め

造血器腫瘍の病態解析は急速に進み、異常遺伝子、原因蛋白のレベルで論じられるようになった。これにより白血病の分類も従来の形態だけでなく分子論的な分類も取り入れられるようになり、治

療反応性や予後についても均一な疾患分類が可能となり、この分類に基づいた治療法の選択が必要になりつつある。また、異常分子の同定に伴い、その特異的分子標的治療法の開発も急速に進行している。造血器腫瘍のみでなく他の悪性腫瘍にも応用が進み、将来の悪性腫瘍患者予後の改善に貢献できるものと期待する。

#### 参 考 文 献

- 1) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: Pathology and genetics. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press Lyon, 2001
- 2) Grignani F et al: Fusion protein of the retinoic acid receptor alpha recruits histone deacetylase in promyelocytic leukemia. *Nature*, 391: 815-818, 1998
- 3) Mistry AR et al: The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood rev*, 17: 71-97, 2003
- 4) Asou N et al: Analysis of prognostic factors in newly diagnosed patients with acute promyelocytic leukemia: the APL 92 study of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG). *Cancer Chemother Pharmacol*, 48: S65-S71, 2002
- 5) Nakao M et al: Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10: 1911-1918, 1996
- 6) Kiyoi H et al: Clinical significance of FLT3 in leukemia. *Int J Hematol*, 82: 85-92, 2005
- 7) Falini B et al: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, 352: 254-266, 2005
- 8) Sattler M, Griffin JD: Molecular mechanisms of transformation by BCR-



- ABL oncogene. *Semin Hematol*, 40 : 4 - 10, 2003
- 9) Druker BJ et al : Efficacy of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells. *Nat Med*, 2 : 561 - 566, 1996
- 10) O ' Brien SG et al : Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 348 : 994 - 1004, 2003
- 11) Gambacorti-Passerini C et al : Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukemias. *Lancet Oncol*, 4 : 75 - 85, 2003
- 12) Baxter EJ et al : Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 365 : 1054 - 1061, 2005
- 13) Takahashi S et al : Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. *Blood*, 104 : 3813 - 3820, 2004
- 14) Slavin S et al : Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*, 91 : 756 - 763, 1998

## 日本人特有の血栓性素因 —九州大学病院検査部の成果—

九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野  
九州大学病院検査部  
濱 崎 直 孝

### はじめに

単一の遺伝子異常が疾病発症と直接的に結びつく疾患（単因子疾患：monogenic disease）、例えば、ヘモグロビン異常症や血友病など、については疾病と遺伝子異常については詳細に検討されてきた。しかしながら、1983年にポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction；PCR）がK.B.Mullisによって考案されて以来、遺伝子の研究は飛躍的に発展し、今日ではヒトの全遺伝子が明らかにされた<sup>1)</sup>。このような状況になり遺伝情報が蓄積してくると、ある特定の遺伝子異常が疾病発症に直接的には結びつかなくても、ある種の体質的要因（遺伝的要因）があると生活習慣や環境要因で疾病発症が誘発される事例などが徐々に明らかにされつつある。最近、盛んに行われている一塩基変異多型（single nucleotide polymorphism, SNP）の検索と疾病との関係を明らかにしようとする研究は、このような背景のもとで行われている。このような種類の疾病は、問題となる遺伝子に変異がみられても、必ずしも発症するとは限らず、発症頻度に変異を持ってない人に比べて発症の危険性が高くなるものである。このような疾病を多因子疾患（polygenic disease）とよんでいる。血栓症は多因子疾患である。九州大学病院検査部では、血栓症あるいは血栓症疑い患者の病因解析を目的として、遺伝子診断検査について凝固系あるいは凝固制御系の機能異常に関わる因子の遺伝子検査を過去10年余りに亘って行って来ている。その10年余りの解析成果で、我々が明らかにすることが出来たことは「日本人血栓症の病因は白人血栓症の病因とは明らかに異なる」ということである。ここでは、九州大学病院検査部で行われたこれまでの成果の概略をする。

### 1. 血栓症の分類

血栓症とは血栓止血機序亢進による病気である。血管閉塞と言えば心筋梗塞や脳梗塞がすぐに頭に浮かんでくるが、このような疾患だけでなく様々な病気の主要な原因が血管の閉塞であることが明らかにされつつある。現在は、血栓が形成された部位によって区別し、その部位が静脈か動脈か微小血管なのかで大別され、それぞれ、静脈性血栓症、動脈性血栓症、微小循環血栓症に分類されている。

### 2. 解析の方法

血栓症の病因を解析するには、本来、血漿因子だけではなく血管内皮、血小板機能などもっと幅広く総合的な解析が必要であるが、取りあえず、血漿成分についてのみ解析を行ってきた。詳細は別途文献<sup>2)</sup>を参照頂きたい。血栓形成機能亢進の原因として考えられるのは、(i)凝固因子の亢進、(ii)凝固制御因子の低下、(iii)線溶因子の低下、(iv)線溶制御因子の亢進、であり、これらに注目して検査を系統的に行い、異常が示唆された因子に対しては、患者の同意が得られた場合は遺伝子検査を行っている。

---

Naotaka HAMASAKI  
Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Graduate School of Medical Sciences Kyushu University  
Japanese Thrombophilia —A Fruit from Clinical Chemistry and Laboratory Medicine in Kyushu University—

### 3. 遺伝子検査の概要

臨床検査としての遺伝子検査はほぼ例外なく PCR で増幅したサンプルを用いる。用いた遺伝子検査は遺伝子の塩基配列検査が主な目的で、その手段として PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), PCR-SSCP (PCR-single-strand conformation polymorphism), RT-PCR (reverse transcription PCR) や直接塩基配列決定法 (PCR-direct sequencing) などがある。

血栓症発症要因は様々なものが考えられるが、前述のごとく、我々は血漿中の凝固関連因子に限って検索を行った。まず、関連因子の血漿中の活性を測定し、活性低下を呈する因子が見つかったら、それをコードする遺伝子の全エクソンとエクソン/イントロン境界領域の全ての塩基配列を PCR 法で直接的に決定することで検索した。特定部位の異常を解析する時には、PCR-RFLP や PCR-SSCP は短時間に大量の検体を処理できるので有力な解析手法になるが、部位が特定できない場合は PCR 産物から直接塩基配列を決定するのが結果的には早道である。

### 4. 凝固制御因子活性低下と血栓症

解析を開始して約 10 年余で 1280 名の患者を検査した。この中で、明らかに血栓症である患者は 686 名 (平成 16 年 7 月現在) であった。この時点での患者の内訳は、静脈性血栓症 217 症例、動脈性血栓症 252 症例、その他の血栓症 217 症例である<sup>3)</sup>。静脈性血栓症は血栓の形成を何らかの形で証明できたものを、動脈性血栓症は臨床診断にしたがい、その他の血栓症は微小循環血栓症など血栓形成機能亢進が病因と推測される症例で静脈性でも動脈性でもないものを分類した。血漿成分のみの分析でも予想外に多くの症例について、病因と思われる因子異常を同定できた。主要な凝固制御系因子 Protein S, Protein C, Antithrombin の基準範囲と活性低下の定義を表 1 に示す。検索した全症例 (686 症例) の約 20% (121 症例) について Protein S 活性の低下が見出された。健常人では 126 名調べて 1 名のみが Protein S 活性低下を示しているため、凝固制御系因子の活性低下、特に、Protein S 活性低下が血栓症発症の危険因子になっていることが推測される。

### 5. 深部静脈血栓症についての解析<sup>3)</sup>

病因解析を行う場合、病名の診断が明確でないと解析が正しく行われなくなる。そこで、我々は確定診断を画像診断で確認できる深部静脈血栓症に限って、さらに詳細な解析を行った。我々のところで検索できた深部静脈血栓症は 85 症例である。その男女比並びに初発年齢の分布を表 2 に示す。併せて、表 2 には基準範囲などを決定するのに協力頂いた健常人の男女比、年齢分布も示す。深部表脈血栓症の初発年齢は予想外に若く、男女ともに 20-30 歳代にピークがあり、30 歳代以下の患者が 60% を占めるのは驚き

表 1 Criteria for Reduced Activity

Items	Reference intervals (mean±2SD)	Criteria for the reduced activity (low mean-3SD)	Number of healthy individuals examined	Healthy individuals having reduced activity
Protein S (PS)	M: 73-121% F: 59-128%	M: below 61% F: below 50%	126 (M: 73) (F: 53)	1 (M: 0) (F: 1)
Protein C (PC)	75-131%	below 61%	95	1
Antithrombin (AT)	80-120%	below 70%	95	0

M: male; F: female

- two-standard deviations (2SD) and three-standard deviations (3SD) from the mean were determined using data from healthy subjects transformed by the parametric minimal skewness method.
- A level within 2SD was regarded as the reference interval, and a level below -3SD was defined as reduced activity in this study.

表2 深部静脈血栓症 (DVT) 患者発症時年齢分布

Table 1. Age distribution

	Age	<10	10-	20-	30-	40-	50-	60-	70-	80-	M	F
			19	29	39	49	59	69	79	89	All	All
Healthy individuals	M	0	0	30	28	6	8	1	0	0	73	
	F	0	0	18	8	11	14	2	0	0		53
Deep vein thrombosis (age of the first thrombosis)	M	1	9	9	11	6	5	7	1	0	45	
	F	0	2	9	10	7	3	5	2	0		40

M: male; F: female

初発年齢：20-30 歳代にピーク

文献：Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

であった。このことは、深部静脈血栓症発症には体質的要因（遺伝的要因）が強く関与していることを示唆している。

### 6. 深部静脈血栓症患者と Protein C/Protein S 凝固制御系活性低下

深部静脈血栓症患者における凝固制御系活性低下を示している実数を表3に示す。ここに示している他に Heparin Cofactor なども測定しているが活性低下を示した症例はなかった。この表で判るようにプロテイン S, プロテイン C 活性低下がある患者が非常に多いのが特徴的である。特に、プロテイン S 活性低下の頻度が高い。

### 7. 深部静脈血栓症患者と遺伝子異常

凝固制御系活性低下をきたしている症例に関して、遺伝子検査の同意を得られた場合はその因子の全遺伝子配列を検索した。その結果を表4に示す。プロテイン S では19症例に、プロテイン C では8症例に、アンティトロンビンでは2症例について遺伝子異常が見い出された。日本人の深部静脈血栓症患者(85名)の中でプロテイン S 遺伝子異常を呈する症例は19症例、22%の高頻度であることが判明した。この頻度は欧米の報告の5-10倍の高頻度である。プロテイン C 分子異常も8症例、9%と欧米の報告よりも2倍ほど高い。アンティトロンビン分子異常は2症例、2.3%でこの頻度は欧米の頻度と同等である(文献11参照)。

我々はこれら異常分子を HEK 293 細胞に発現して、それぞれの異常因子と患者の活性低下の因果関係を調べている<sup>9)~10)</sup>。その結果は分子異常が活性低下を説明でき、血栓症発症の一つの要因と考えると良いと考えられる症例がほとんどである。

表3 深部静脈血栓症患者と PS, PC, AT 活性低下

Type of thrombosis	Examined patients	Number of patients having reduced activities of PS and/or PC	Number of patients having reduced activities of		
			PS	PC	AT
Number of DVT patients	85	49*	40	27	6
		(18 patients having reduced activities of PS and PC)			
DVT alone	55	30	23	16	2
DVT with PE	23	14	13	8	2
DVT with mesenteric venous thr.	1	1	1	0	0
DVT with portal vein thr.	6	4	3	3	2

thr: thrombosis, AT: antithrombin, PC: protein C, PS: protein S

DVT: deep vein thrombosis, PE: pulmonary embolism.

Protein C / Protein S 凝固制御系の活性低下, 特に, Protein S の活性低下があると考えられる症例が多いのが目立つ  
文献：Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

## 8. Protein C/Protein S 凝固制御系異常と Factor V Leiden (R506Q)

白人血栓症患者の主要な病因は Protein C/Protein S 凝固制御系に抵抗性の第 V 因子異常分子 (Factor V Leiden, R506Q) である<sup>11)</sup>。この変異, Factor V Leiden, は遺伝子多型の一つで, この分子の凝固活性には全く異常がない。正常の第 V 因子は 506 番目のアルギニン (R) のカルボキシ側が Protein C/Protein S 凝固制御系で切断されることで凝固活性が失われ, 過剰な凝固が起こらないように調節されている。Factor V Leiden 分子では 506 番目のアルギニン (R) がグルタミン (Q) に変異することで, Protein C/

表 4 a 深部静脈血栓症患者と PS 遺伝子異常

	Patient No.	Age at first thrombosis	Sex	Kinds of DVT	Activity (%)	Antigen Total (%)	C4bBP (%)	Previous publication	Nucleotide Changes*	Amino Acid Mutated*
Protein S patients examined probands: n=39	PS 1	9	F	DVT	<10	7 50	148	New	IVS 1-1 G>C	-
	PS 2	37	M	DVT, Mesenteric v.	10	24 58	100	New	IVS 13-2 A>G	-
	PS 3	35	M	DVT, PE	33	25 90	142		Exon 4 276 C>T	G 54 R
	PS 4	40	F	DVT, PE	34	38 63	105	New	Exon 14 122 C>T	R 520 W
	PS 5	19	M	DVT	28	34 50	130	New	Exon 15 183 A>G	Y 595 C
	PS 6	26	F	DVT, pregnancy	49	56 98	120	New	Exon 7 288 G>C	E 201 Q
	PS 7	23	M	DVT	60	73 88	141	New	Exon 15 165 C>T	T 589 I
	PS 8	16	M	DVT	33	22 46	91	New	Exon 12 244 C>A	A 450 D
	PS 9	32	F	DVT	3	36 103	111	New	Exon 6 340 G>T Exon 6 448 A>G	E 119 X K 155 E
									(compound heterozygotes)	
	PS 10	39	F	DVT	19	22 84	161	New	Exon 8 156 G>T	C 206 F
	PS 11	42	M	DVT, PE	35	78 94	127		Exon 6 448 A>G	K 155 E/K 155 E
	PS 12	23	M	DVT	58	84 84	108		Exon 6 448 A>G	K 155 E
	PS 13	63	F	DVT, Portal v.	38	49 78	80		Exon 6 448 A>G	K 155 E
	PS 14	34	F	DVT, pregnancy	50	75 88	96		Exon 6 448 A>G	K 155 E
	PS 15	22	M	DVT	6	17 42	103	New	Exon 8 262 T>G	C 241 W
	PS16/PC4	13	M	DVT	21	14 31	43	New	Exon 10 227 G>T	E 301 X
	PS 17	66	F	DVT	48	53 79	103		Exon 15 276 C>T	P 626 L
	PS 18	16	M	DVT, PE	11	10 35	106		Exon 12 123 C>T	R 410 X
PS 19	18	M	DVT	32	35 60	84		Exon 13 218 C>T	R 474 C	

Healthy individuals examined: n=47/0

日本人の DVT 患者は Protein S 分子異常頻度 (19/85; 22%) が欧米人の頻度の 5-10 倍高い。

文献: Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

表 4 b 深部静脈血栓症患者と PC 遺伝子異常

				Activity (%)	Antigen (%)		Nucleotide Changes		
Protein C patients examined n=23	PC 1	25	F	DVT, portal v.	62	73		6218 C>T	R 169 W
	PC 2	24	M	DVT	50	81		8886 G>A	G 391 S
	PC 3	63	M	DVT	34	31	New	8577 C>A	L 288 I
	PC 4/PS 16	13	M	DVT	18	31	New	1330 C>T (IVS 2-4 C>T)	-
	PC 5	30	F	DVT	60	90		6152 C>T	R 147 W
	PC 6	65	M	DVT	42	68	New	6164-6166 del AAG	K 151 del
	PC 7	55	F	DVT	59	85	New	6164-6166 del AAG	K 151 del
	PC 8	30	M	DVT	39	97		1387 C>T	R-1 C
	Healthy individuals examined: n=30								
	PC N 1	30			63	88	New	6164-6166 del AAG	K 151 del

Protein C 分子異常頻度も高いが (8/85.9%) その程度は欧米人の 2 倍程度である。

文献: Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

表 4c 深部静脈血栓症患者と AT 遺伝子異常

Antithrombin	AT1	41	F	DVT, PE	52	46	New	2495 A>T	K 11 X
patients examined: n=6	AT2	64	F	DVT	51	52	New	2511 C>A	P 16 H
Healthy individuals examined: n=24/0									2

\*Expression of nucleotide changes is according to the method described in Human Mutation 11, 1-3 (1998). X: stop codon.  
DVT: deep vein thrombosis, PE: pulmonary embolism, Mesenteric v.: mesenteric venous thrombosis,

Antithrombin 分子異常の頻度 (2/85; 2.3%) は欧米人と同程度である。

文献: Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

Protein S 凝固制御系で切断され難くなり、過剰な凝固が起こることになる。白人集団での、この多型 (R506Q) の頻度は 3%-7% であるが、白人血栓症患者集団では Factor V Leiden を持っている患者の頻度は 20%-60% までにも上昇している<sup>11)</sup>。このように血栓症患者に Factor V Leiden が蓄積していることと、Factor V Leiden 分子が Protein C/Protein S 凝固制御系で切断され難くなることを、考えあわせて、Factor V Leiden は血栓症の非常に強い危険因子であると考えられるようになっている<sup>11)</sup>。

しかしながら、第 V 因子異常分子 Factor V Leiden は日本人には一名も発見されておらず、現時点では、白人に特異的な現象であると考えられている。我々の検索では興味深いことに、日本人の血栓症患者では Factor V Leiden を持っていない代わりに、Protein S の分子異常を持っている患者が多い結果が得られている (表 4)。この事実は Protein C/Protein S 凝固制御系の凝固制御に果たす生理的・病理的役割の重要性を示していると我々は考えている。すなわち、Protein C/Protein S 凝固制御系の活性は低下していないが Protein C/Protein S 凝固制御系に抵抗性の Factor V Leiden を持っていることは (白人血栓症患者に多く見られる)、凝固制御の観点からは、Factor V Leiden は持っていないが Protein C/Protein S 凝固制御活性が低下している (日本人血栓症患者に多く見られる) ことと結果的に同じ現象になる。すなわち、日本人血栓症において、Protein S の分子異常で Protein C/Protein S 凝固制御活性低下が多いということと、白人血栓症患者で Factor V Leiden 遺伝子保有者が多いのとは、病態発症原因的には同じ意味合いがあると思える。このような状況では、凝固制御機構が正しく機能せず異常な血栓形成ができると推測される (図 1)。

### 9. 遺伝子多型と血栓症

これまでは、血栓形成に直接関係する因子の異常について述べてきたが、血栓症のような多因子疾患では、発症には遺伝的要因、年齢、食餌、環境因子を含めて様々な要因が複雑に関係していると考えられる。我々の経験でも家系検索ができた何例かの家系で、全く同一の Protein S 遺伝子異常があり、その異常が原因で血中の Protein S 活性が低下している親、兄弟でも血栓症を発症していない例は多い。このような場合は、複合的な要因が絡んでいるのだが、体質的な血栓症の発症要因として、幾つかの遺伝子多型が関係していると言われている。このような多型のなかで、我々の検索結果、何らかの関係があると考えられ

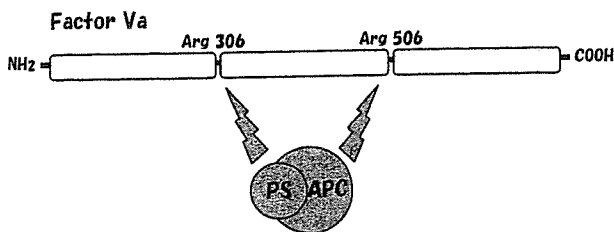
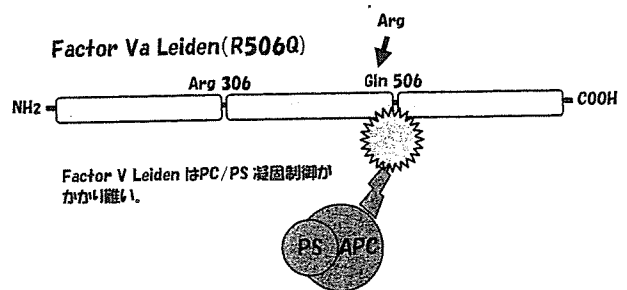


図 1a Protein C/Protein S 凝固制御系による Factor Va の制御



Factor V Leiden を有する人は凝固制御がかかりにくく、この多型は DVT の危険因子である。欧米人 DVT における Factor V Leiden 頻度は 20-50% である。

図 1b Factor Va と Protein C/Protein S 凝固制御 (欧米人の血栓性素因)

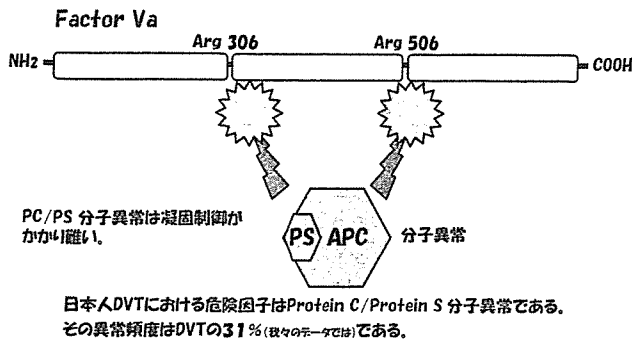


図 1 c PC/PS 凝固制御活性低下時の Factor Va の制御 (日本人の血栓性素因)

たものは、凝固第 XII 因子の 46 C/T 多型と Protein S 徳島 (K155E) がある<sup>3)12)</sup>。もう少し症例を集め血栓症の危険因子としての遺伝子多型を明確にする事ができれば、そのような人々の血栓症の予防に繋がる効果を挙げる事ができるのかもしれない。因に、Protein S 徳島 (K155E) は日本人では深部静脈血栓症発症の明らかな危険因子になる (オッズ比: 3.74)<sup>3)</sup>。

## おわりに

我々の経験を簡便にまとめてみた。血栓症発症の遺伝的要因では明らかな人種差が存在していた。疾病の種類によってこのような人種差は存在するものと、そうでないものがある筈である。疾病の病因解析を行う時は、ある特定の因子だけを調べ、その因子異常とその疾病との関連を調査するだけでは、なかなか本質が見えてこない。その疾病に関連すると思われる因子群の系統的な臨床検査を行うことが重要なポイントになる。これらの事実から、病因解析には組織化された系統的な臨床検査が有力な検索方法になりうる事が判る。

## 文 献

- 1) International Human Genome Sequencing consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860-921, 2001.
- 2) 濱崎直孝: 血栓症患者における凝固関連因子の異常: 予防および治療への探索. 血栓止血 11, 347-357, 2000.
- 3) Kinoshita S, Iida H, Inoue S, Watanabe K, Kurihara M, Wada Y, Tsuda H, Kang D and Hamasaki N: Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. Clin Biochem. 38, 908-915, 2005.
- 4) Iida H, Nakahara M, Komori K, Fujise M, Wakiyama M, Urata M, Kinoshita S, Tsuda H, Sugimachi K and Hamasaki N: Failure in the detection of aberrant mRNA from the heterozygotic splice site mutant allele for protein S in a patient with protein S deficiency. Thromb. Res. 102, 1-10, 2001.
- 5) Tatewaki H, Iida H, Nakahara M, Tsuda H, Kinoshita S, Kanaji T, Yoshida N, Miyazaki S and Hamasaki N: A Novel Splice Acceptor Site Mutation Which Produces Multiple Splicing Abnormalities Resulting in Protein S Deficiency Type I. Thromb. Haemost. 82, 65-71, 1999.
- 6) Nakahara M, Iida H, Urata M, Fujise M, Wakiyama M, Kinoshita S, Tsuda H, Okamura T, Yao K, Yao T and Hamasaki N: A novel splice acceptor site mutation of protein S gene in affected individuals with type I protein S deficiency: Allelic exclusion of the mutant gene. Thromb. Res. 101, 1-7, 2001.
- 7) Tsuda H, Urata M, Tsuda T, Wakiyama M, Iida H, Nakahara M, Kinoshita S and Hamasaki N: Four missense mutations identified in the protein S gene of thrombosis patients with protein S deficiency: Effects on secretion and anticoagulant activity of protein S. Thromb Res. 105, 233-239, 2002.
- 8) Watanabe K, Shibuya A, Ishii E, Kurihara M, Inoue S, Ono M, Wada Y, Wakiyama M, Zaitzu M, Iida H, Muraoka K, Kinoshita S and Hamasaki N: Identification of simultaneous mutation of fibrinogen alpha chain and protein C genes in a Japanese kindred. Br J Haematol. 120, 101-108, 2003.
- 9) Kurihara M, Watanabe K, Inoue S, Wada Y, Ono M, Wakiyama M, Iida H, Kinoshita S and Hamasaki N: Characterization of two novel mutations of the antithrombin gene observed in Japanese thrombophilic patients. Thromb Res. 115, 351-358, 2005.
- 10) 井上須美子, 藤井智美, 浦田美秩代, 和田結, 小野美由紀, 栗原正子, ウォラフンチュンピア, 飯田広子, 木下幸子, 津田博子, 康 東天, 濱崎直孝: プロテイン S 活性低下を示した血栓症患者に見出された変異型プ

ロテイン S 分子の機能解析. 日本血栓止血学会誌 16, 641-649, 2005.

- 11] Rosendaal FR: Risk Factors for Venous Thrombosis: Prevalence, Risk, and Interaction. Semi. Hematol. 34, 171-187, 1997.
- 12] 木下幸子, 濱崎直孝: 凝固関連諸因子の異常ならびに遺伝子多型. 臨床病理 49, 165-171, 2001.

(参考文献のうち, 数字がゴシック体で表示されているものについては, 著者により重要なものと指定された分です.)

## プロフィール

濱崎 直孝 (はまさき なおたか)

九州大学教授 (大学院医学研究院臨床検査医学専攻) 医学博士

◆**略歴** 1942年長崎県佐世保市に生る。昭和43年3月九州大学医学部医学科卒業, 昭和47年3月九州大学大学院医学研究科修了, 昭和47年4月15日国立療養所中野病院 (厚生技官医療職) に採用, 昭和50年4月1日九州大学医学部講師 (文部教官教育職) に転任, 昭和53年10月31日辞職, 昭和53年11月1日福岡大学医学部助教授に採用 (生化学), 昭和63年10月1日福岡大学医学部教授 (臨床検査医学), 平成4年12月31日福岡大学医学部を退職, 平成5年1月1日九州大学医学部教授 (臨床検査医学)

◆**研究テーマと抱負** 「赤血球の生化学」, 「血栓症の病因解析と治療」, 「臨床検査の標準化」を主たるテーマとして仕事をいたしております。特別な抱負はありませんが, それぞれについて, 独自の視点で仕事をすることをモットーにしております。

◆**趣味** テニス, 水泳



# 血栓症(とくに静脈血栓塞栓症)の 遺伝的背景

*Congenital thrombophilia in Japanese*



金地 泰典  
KANAJI Taisuke

濱崎 直孝\*  
HAMASAKI Naotaka

血栓塞栓症のすべて

Key words 静脈血栓塞栓症 プロテインS 遺伝子異常 プロテインS 徳島

静脈血栓塞栓症(深部静脈血栓症, 肺血栓塞栓症)は日本では比較的まれな疾患と考えられてきたが, 厚生労働省の人口動態調査によると肺血栓塞栓症の死亡数は1951年と比較して2000年には10倍以上となっており発症は増加している<sup>1)</sup>。

また地震の避難生活による深部静脈血栓症や, 有名スポーツ選手の肺塞栓症がニュースになることによって, エコノミークラス症候群として一般の人にもこの疾患が知られるようになってきた。

血栓症は多因子疾患であり, Virchowの仮説に従い, ①血管壁の異常, ②血液成分の異常, ③血流の変化(停滞)の3つの要因が考えられ, これらの要因が重なって発症する。先天性の血栓性素因として凝固制御系因子である, プロテインS, プロテインC, アンチトロンピン欠損症があげられ, 後天性の血栓性素因としてはSLE等の膠原病に合併する抗リン脂質症候群が知られている。血栓症と関連する遺伝子多型としては1993年にDahlbäck等により報告されたプロテインS, プロテインC凝固制御系に抵抗性を示すFactor V Leiden変異が有名である。この他にもプロトロンピンG20210A変異が知られている<sup>3)</sup>。ところがこれらの変異については, 日本人にはまったく見つかっていない。

このことから, 日本人における血栓症の遺伝的背景を明らかにすることは大変有意義と思われる。



## 日本人における先天性血栓性素因の頻度

過去10年間余りに亘って九州大学病院検査部では血栓症スクリーニングを行い, 1994年から2004

年までの10年間で1,280人の患者の検査を行い, 明らかに血栓症である患者は686人(平成16年7月現在)であった。患者の内訳は静脈性血栓症217症例, 動脈性血栓症252症例, その他の血栓症217症例である。これらの症例についてプロテインS, プロテインC, アンチトロンピンの活性, 抗原量の測定を行った(プロテインSについてはfreeプロテインSも測定している)。

久留米大学医学部血液内科学教室 \*長崎国際大学薬学部 教授・九州大学医学部 名誉教授

表1 九州大学病院検査部での活性低下(欠乏症)の定義

	基準範囲 (平均±2SD)	活性低下(欠乏症)の定義 (平均より3SD以下)	健常人での 検討人数	健常人での活性低 下(欠乏症)人数
プロテインS	男性：73～121% 女性：59～128%	男性：61%以下 女性：50%以下	126 (男性：73) (女性：53)	1 (男性：0) (女性：1)
プロテインC	75～131%	61%以下	95	1
アンチトロンビン	80～120%	70%以下	95	0

(Kinoshita S, et al : Clinical Biochemistry 38 : 908-915, 2005より引用)

表2 日本における静脈血栓塞栓症の先天性血栓性素因の頻度

	施設・人数	期間	欠乏症定義	プロテイン S	プロテイン C	アンチト ロンビン
深部静脈欠損症	大阪大 113人	1994-1999	活性平均より2SD以下かつ比活性平均 (各因子/FII etc)2SD以下	17.70%	7.96%	1.77%
静脈血栓塞栓症	九州大 85人	1994-2004	遺伝子変異	20%	5.88%	2.35%

われわれの施設での基準値と活性低下(欠乏症)の定義を示す。プロテインSの活性は性ホルモンの影響を受けるため女性は男性よりも基準値が低く、3SDより低値のものを活性低下と定義すると欠損症は50%以下となる(表1)。検索した全症例(686症例)の約20%(121症例)についてプロテインS活性低下が見出された。健常人では126名調べて1名のみがプロテインS活性低下を示しており、凝固制御系、とくにプロテインS活性低下が血栓症発症の危険因子となっていると推察された。



### 静脈血栓塞栓症(深部静脈欠損症, 肺血栓塞栓症)についての解析

診断根拠が明瞭な静脈血栓塞栓症(深部静脈欠損症, 肺血栓塞栓症)85人についての結果を紹介する<sup>4)5)</sup>。これらの症例はいずれもCT, MRI, シンチ, 血管造影等で、確定診断が得られた症例である。症例は男性45人, 女性40人で, 10～79歳までに分布している。これらの症例の約半数はワーファリンがすでに投与されている症例が含まれているが, 遺伝子変異同定の可能性を増やすためワーファリン投与の有無に関わりなく活性低下(欠乏症)の定義を満たすものについては, 各遺伝子全エクソンとエクソン/イントロン境界領域に

ついて遺伝子解析を行った。

ただしプロテインSについては, 男女ともに活性が60%以下の者について遺伝子解析を行っている。その結果プロテインSについては39人について遺伝子検索を行い, 17人に遺伝子変異を認めた。静脈血栓塞栓症85人中の頻度は20%(17/85)となった。このなかにはプロテインS徳島(K155E)変異を持つ人を4人(そのうち1人はホモ)を含んでいる(プロテインS徳島については後述する)。プロテインCに変異を持つ人は6%(5/85)でそのうち1人はプロテインS, プロテインC両方に変異を認めた。アンチトロンビンについては2.3%(2/85)に変異を認めた(表2)。

変異箇所については, プロテインCについてはある限られた変異に集中する傾向が指摘されており, 新規の変異は2症例であった。プロテインSでは徳島以外はほとんど異なる変異であり, 新規の変異(11例)が多い。またこれらの変異プロテインSを発現させ解析を行い, 発現量の低下, 活性低下を確認している<sup>6)</sup>。

われわれは正常人99人についても, プロテインS全エクソンとエクソン/イントロン境界領域について遺伝子解析を行っている。このなかには, プロテインS徳島(K155E)を含めてアミノ酸変異を伴う変異およびスプライシングに影響を及ぼす変異は同定されなかった。またこのなかでプロテ

表3 プロテイン S 徳島(K155E)の健常人および静脈血栓塞栓症患者における頻度と相対危険度

	検討人数	プロテイン S 徳島人数	オッズ比(95%信頼区間)
健常人	304	5	1
静脈血栓塞栓症患者	85	5	3.74(1.06-13.2)

イン S 活性が60%以下の人は女性1人だけであった。

比較として国内での単一施設での解析例として、大阪大学附属病院での深部静脈血栓症患者113人での報告がある<sup>7)</sup>。その結果はプロテイン S 欠乏症(17.7%)、プロテイン C 欠乏症(7.96%)、アンチトロンビン欠乏症(1.77%)となっている。しかしながら欠乏症の定義は各施設間で異なっており、注意が必要である(表2)。大阪大学の症例では平均より2SD以下で症例を選択し、例えばプロテイン S についてはプロテイン S 活性とプロトロンビンや第 X 因子の比を計算し、平均から2SD以下の症例を欠乏症と定義している。われわれのデータは活性値に基づく欠乏症の頻度ではなく遺伝子変異に基づく頻度であり、後天的な要因による活性低下は含まれておらず、結果としての頻度は近い値となっているが根本的に違うデータである。

### 日本人の静脈血栓塞栓症の40~50%はプロテイン S の活性低下を示す

われわれの静脈血栓塞栓症例ではプロテイン S 活性低下症例は47%(40/85)、プロテイン C 活性低下症例は32%(27/85)であった。ワーファリン投与を受けていない46人に絞ってプロテイン S の活性を見てみても、39%の18人が活性低下を示した。これらのうち14人についてはプロテイン S の変異が同定されたが、残りの4人については活性低下にも関わらず、変異部位が同定されていない。このなかにはプロテイン S 遺伝子の大きな欠損例などが含まれていると考えられる。また活性低下を女性50%以下で切ると、プロテイン S

活性が53%の女性1例を見落とすことになった。静脈血栓塞栓症患者のなかで半数近くがプロテイン S 活性低下を示し、その多くで遺伝子変異が見つかるといった事実は大変驚きである。

### 日本人特有の静脈血栓塞栓症の危険因子プロテイン S 徳島

プロテイン S 徳島は、日本人に多いプロテイン S の比活性が低下する遺伝子多型として報告され、山崎らが正常人での頻度を1.65%と報告している<sup>8)</sup>。われわれは正常人304人で検討を行い1.64%とかなり近い値を得ている。このデータをもとに相対危険度を計算すると表3に示すように3.74(1.06-13.2)となった。われわれの検索の結果、プロテイン S 徳島は静脈血栓塞栓症の危険因子であることが初めて明らかとなった。最近、国立循環器病センターからもわれわれと同様な結果が報告されている<sup>9)</sup>。

この2つの結果から、日本人の静脈血栓塞栓症においてはその5~10%にプロテイン S 徳島が関与していると考えられる。ただしこれらの人たちのプロテイン S 活性をみると70%を超す例も存在し、活性値だけで遺伝子検索を行うとプロテイン S 徳島を見落とす可能性がある。したがって、プロテイン S 徳島については別個に遺伝子タイピングを行う必要性があると考えられた。

### プロテイン C/プロテイン S 凝固制御系異常と Factor V Leiden(R506Q)

白人血栓症患者の主要な病因はプロテイン C/プロテイン S 凝固制御系に抵抗性の第 V 因子異

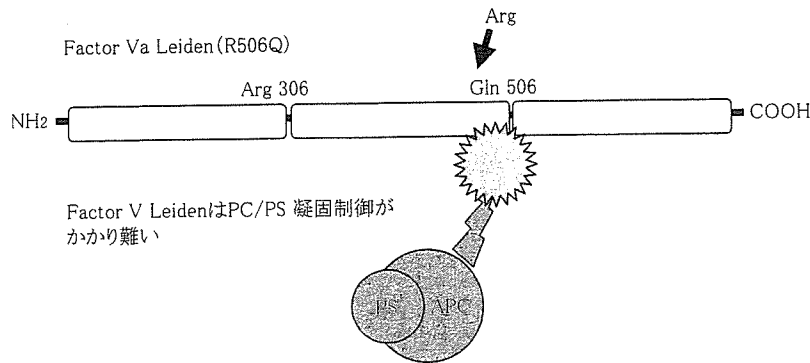


図1 Factor V Leiden とプロテイン C/プロテイン S 凝固制御(欧米人の血栓性素因)  
Factor V Leiden を有する人は凝固制御がかかり難く、この多型は DVT の危険因子である。欧米人 DVT における Factor V Leiden 頻度は20~50%である。

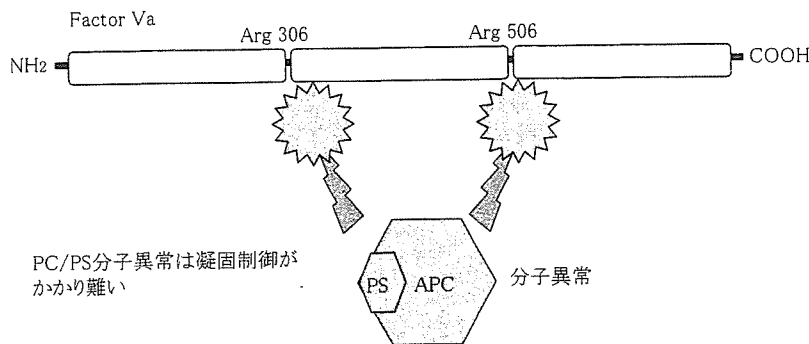


図2 PC/PS 凝固制御活性低下時の Factor Va の制御(日本人の血栓性素因)  
日本人静脈血栓塞栓症における危険因子は Protein C/Protein S 分子異常である。その異常頻度は26%(われわれのデータ)である。

常分子 (Factor V Leiden, R506Q) である。この変異, Factor V Leiden, は遺伝子多型の一つで、この分子の凝固活性にはまったく異常がない。正常の第 V 因子は506番目のアルギニン (R) のカルボキシ側がプロテイン C/プロテイン S 凝固制御系で切断されることで凝固活性が失われ、過剰な凝固が起こらないように調節されている。Factor V Leiden 分子では506番目のアルギニン (R) がグルタミン (Q) に変異することで、プロテイン C/プロテイン S 凝固制御系で切断され難くなり、過剰な凝固が起こることになる。白人集団での、この多型 (R506Q) の頻度は3~7%であるが、白人血栓症患者集団では Factor V Leiden を持っている患者の頻度は20~60%までも上昇している<sup>10)</sup>。このように血栓症患者に Factor V Leiden が蓄積していることと、Factor V Leiden 分子が

プロテイン C/プロテイン S 凝固制御系で切断され難くなることを考えあわせて、Factor V Leiden は血栓症の非常に強い危険因子であると考えられるようになっている (図1)。

しかしながら、第 V 因子異常分子 Factor V Leiden は日本人には一名も発見されておらず、現時点では、白人に特異的な現象であると考えられている。われわれの検索では興味深いことに、日本人の血栓症患者では Factor V Leiden を持っていない代わりに、プロテイン S の分子異常を持っている患者が多い結果が得られている (図2)。この事実はプロテイン C/プロテイン S 凝固制御系の凝固制御に果たす生理的・病理的役割の重要性を示しているとわれわれは考えている。すなわち、プロテイン C/プロテイン S 凝固制御系の活性は低下していないがプロテイン C/