

抗凝固療法には不応であったが、血栓溶解薬の使用やIVRによる血栓治療では効果があるのかなどについては今後の検討を要するものと言える。今回の検討例ではいずれも抗凝固療法不応血栓が肝内門脈に限局していたことから、その後の門脈閉塞によっても病態に大きな変化はみられていない。しかし、このような薬物治療不応血栓の病態や対策については、緊急治療を要するような広範囲な門脈血栓症への適切な対応を図る上から、また成人での肝外門脈閉塞症の発症予防の上からも極めて重要と考えられる。

E. 結 論

門脈血栓症では抗凝固療法の治療効果に関連した血栓画像の特徴が認められた。抗凝固療法不応血栓への対策は門脈血行異常症の発症や病態進展を予防する上で重要である。

F. 文 献

- 1) Deleve LD, Valla DC, Garcia-Tsao G. Vascular disorders of the liver. *Hepatology* 2009; 49: 1729-1764
- 2) Bates SM, Ginsberg JS. Treatment of deep vein thrombosis. *N Engl J Med* 2004; 351:268-77.
- 3) Condat B, Pessione F, Denninger MH, et al. Recent portal or mesenteric venous thrombosis: increased recognition and frequent recanalisation on anti coagulant. *Hepatology* 2000; 32: 466-470.
- 4) Francoz C, Belghiti J, Vilgrain V, et al. Splanchnic vein thrombosis in candidates for liver transplantation: usefulness of screening and anticoagulation. *Gut* 2005; 54: 691-697.
- 5) 澤田 晋、山田雅哉、安田 宏、他. 慢性に経過する門脈血栓症に対する抗凝固・血栓溶解療法. *日本門脈圧亢進症学会雑誌* 2008; 14: 297-300.
- 6) Turnes J, Garcia-Pagan JC, Gonzalez M, et

al. Portal hypertension-related complications after acute portal vein thrombosis: impact of early anticoagulation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 1412-7

- 7) Plessier A, Darwish-Murad S, Hernandez-Guerra M, et al. Acute portal vein thrombosis unrelated to cirrhosis: a prospective multicenter follow-up study. *Hepatology* 2010; 51:210-218.
- 8) 應儀成二、金岡 保 肺塞栓と深部静脈血栓症の超音波診断. *超音波医学* 2004;31:337-346
- 9) 竹内和男、橋本光代、中島正男、煎本正博. 肝内門脈血栓の超音波像—1剖検例での病理所見との対比—. *超音波医学* 1984; 11: 219-225
- 10) Parvey HR, Raval B, Sandler CM. Portal vein thrombosis: imaging findings. *Am J Roentgenol* 1994; 162: 77-81

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松谷正一、福沢 健、渡辺悠人、水本英明、横須賀 収：門脈血栓症の診断と治療. *肝胆膵* 2010; 61: 259-268.
- 2) Maruyama H, Ishihara T, Ishii H, Tsuyuguchi T, Yoshikawa M, Matsutani S, Yokosuka O. Blood flow parameters in the short gastric vein and splenic vein on Doppler ultrasound reflect gastric variceal bleeding. *European Journal of Radiology* 2010; 75: e41-e45
- 3) Kasuga H, Mizumoto H, Matsutani S, Kobayashi A, Endo T, Ando T, Yukisawa H, Maruyama H, Yokosuka O. Portal hemodynamics and clinical outcomes of patients with gastric varices after balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. *Journal of Hepatobiliary and Pancreatic Science* 2010; 17: 898-903

2. 学会発表

- 1) 渡辺悠人、水本英明、小山田新、小林照宗、安藤健、松谷正一 経皮経肝的塞栓術 (PTO) による治療を行った直腸静脈瘤の一例 第2回集学的静脈瘤治療研究会 2010年5月 東京
- 2) 松谷正一、福沢 健、水本英明 門脈圧亢進症における血液凝固関連因子の検討－門脈血栓との関連について 第17回日本門脈圧亢進症学会総会 2010年9月 富山

H. 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

門脈血行異常症におけるプロテインC遺伝子変異解析

研究分担者 小嶋 哲人（名古屋大学医学部教授）

研究要旨

バッドキアリ症候群（BCS）や肝外門脈血栓症（EHO）など、門脈血行異常症の基礎疾患には、アンチトロンビン欠損症、プロテインC欠損症、プロテインS欠損症などの血栓性素因が数多く報告されている。今回、我々は本研究班・全国検体保存センターに収集された日本人BCSおよびEHO症例において、プロテインC遺伝子（*PROC*）を解析しその変異検出を試みた。解析の結果、BCSの13例中2例に*PROC*遺伝子での原因と思われる遺伝子変異を認めた。これらはいずれも日本人先天性PC欠損症の複数家系で認められる変異であった。なお、プロテインS遺伝子（*PROS1*）解析ではいずれにも変異を認めなかった。

A. 研究目的

門脈血栓症の発症要因に、まれではあるが血栓性素因の関与が指摘されており、今までに我々も本研究班において日本人に比較的多くられる血栓性素因のアンチトロンビン欠損症、プロテインS欠損症に伴う門脈血栓症の病態解析研究の報告をしてきた。

バッドキアリ症候群（BCS）や肝外門脈血栓症（EHO）など、門脈血行異常症の基礎疾患には、アンチトロンビン欠損症、プロテインC欠損症、プロテインS欠損症などの血栓性素因が数多く報告されている。今回、我々は本研究班の検体保存センターに収集されたBCS症例においてプロテインC遺伝子（*PROC*）ならびにプロテインS遺伝子（*PROS1*）を解析しその変異検出を試みた。

B. 研究方法

各施設倫理委員会承認のもと、本研究班の検体保存センターに収集されたBCS症例13例ならびにEHO症例1例において、各ゲノムDNAのアンチトロンビン遺伝子（*SERPINC1*）の特異的なプライマーを用いイントロンならびにその境界領域を含

めて各エクソンのPCR増幅を行った。PCR増幅後、そのPCR産物をQIAEX IIキットを用いてゲル生成し、これをDirect Sequence法にて*PROC*ならびに*PROS1*の各遺伝子エクソンおよびエクソン-イントロン境界領域の塩基配列を解析した。

（倫理面への配慮）

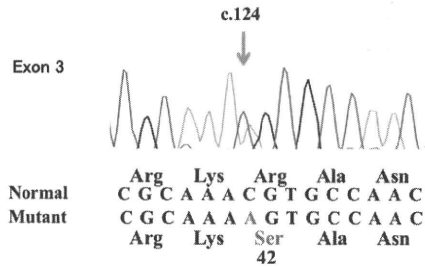
本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守するとともに、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て解析した。

C. 研究結果

本研究班の全国検体保存センターに収集された日本人BCS13症例およびEHO1症例においてプロテインC遺伝子（*PROC*）を解析した結果、BCS2症例に原因と思われる*PROC*遺伝子変異を認めた（図1）。

これらはいずれも日本人の先天性PC欠損症の複数家系で認められる変異であった。なお、プロテインS遺伝子（*PROS1*）解析ではいずれにも変異を認めなかった。

症例3 c.124C>A (p.Arg42Ser) : Protein C Osaka 10
Miyata (1995) Thromb Haemost 74,1003



症例8 c.1268delG (p.Gly423ValfsX82) : Protein C Nagoya
Yamamoto (1992) J Clin Invest 90: 2439

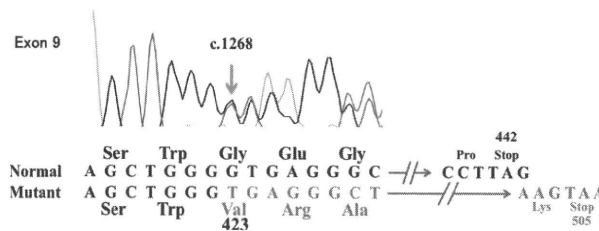


図1 BCS の2症例に同定された PROC 遺伝子変異

D. 考 察

BCS の発症リスクは、遺伝的および後天的な凝固亢進や他の様々な原因を含めて、およそ75パーセントの患者に特定できるとされる。また、しばしば複数の発症リスクの存在が指摘されることがあり、その発症リスクとしてアンチトロンビン欠損症、プロテインC欠損症、プロテインS欠損症などの血栓性素因が知られている。

今回、本研究班・全国検体保存センターに収集されたBCS 13症例およびEHO 1症例において、プロテインC遺伝子 (*PROC*) 解析を行った結果、2症例に日本人血栓症患者での報告のある変異を認めた。しかし、プロテインS遺伝子 (*PROS1*) 解析ではいずれにも変異を認めなかった。

本研究班・全国検体保存センターに収集された日本人BCS症例には、前回までの本班会議で報告もあわせて、欧米人症例に多い *JAK2* V617F 変異は全く見られず、アンチトロンビン遺伝子、プロテインS遺伝子にも変異は検出されなかったが、プロテインC遺伝子に日本人特有の遺伝子変異を認めた。

これらの解析結果より、日本人BCS症例の原因

リスクは欧米人症例の原因リスクとは異なることが示唆された。

E. 結 論

本研究班・全国検体保存センター収集された日本人BCS 13症例およびEHO 1症例において血栓性素因・プロテインC欠損症を起こす *PROC* 変異を検索した結果、BCS 2症例に日本人血栓症患者での報告がある変異を認めた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A Suzuki, N Sanda, Y Miyawaki, Y Fujimori, T Yamada, A Takagi, T Murate, H Saito, T Kojima: Down-regulation of *PROS1* gene expression by 17 β -estradiol via estrogen receptor α (ER α)-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein140 and the corepressor-HDAC3 complex. *J. Biol. Chem.* 285(18): 13444-13453, 2010.
- 2) H Okada, S Kunishima, M Hamaguchi, A Takagi, K Yamamoto, J Takamatsu, T Matsushita, H Saito, T Kojima, T Yamazaki: A novel splice site mutation in intron C of *PROS1* leads to markedly reduced mutant mRNA level, absence of thrombin-sensitive region, and impaired secretion and cofactor activity of mutant protein S. *Thromb Res.* 2010 May;125(5):e246-50.
- 3) H Okada, Y Toyoda, A Takagi, H Saito, T Kojima, T Yamazaki: Activated protein C resistance in the Japanese population due to homozygosity for the factor V R2 haplotype. *Int J Hematol.* 91(3): 549-550, 2010.

4) Y Miyawaki, A Suzuki, Y Fujimori, A Takagi, T Murate, N Suzuki, A Katsumi, T Naoe, K Yamamoto, T Matsushita, J Takamatsu, T Kojima: Severe hemophilia A in a Japanese female caused by an F8-intron 22 inversion associated with skewed X chromosome inactivation. *Int J Hematol.* 92(2): 405-408, 2010.

2. 学会発表

- 1) 宮脇由理、鈴木敦夫、藤森祐多、山田貴之、高木 明、村手 隆、鈴木明伸、勝見 章、松下正、小嶋哲人：複合的遺伝子再構成を認めた重症血友病A症例 第33回日本血栓止血学会学術集会、鹿児島
- 2) 小嶋哲人：プロテインSと血栓症—日本人血栓症予防におけるプロテインS定量の意義— 第11回日本検査血液学会学術集会、東京
- 3) K Yokoyama, T Kojima, Y Sakata, T Kawasaki, H Tsuji, T Miyata, S Okamoto, M Murata: A survey of venous thromboembolism in Japanese patients with inherited anticoagulant deficiency 第72回日本血液学会総会、横浜
- 4) A Suzuki, Y Miyawaki, J Fujita, A Maki, Y Fujimori, A Takagi, T Murate, M Teranishi, H Saito, T Kojima : A novel endoglin gene mutation associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia in a Japanese 第72回日本血液学会総会、横浜
- 5) N Suzuki, N Sanda, T Mtsushita, T Kojima, K Yamamoto, A Katsumi, K Hirashima, Y Kajimura, M Takatsu, T Naoe: A case of type 3 von Willebrand Disease who developed anaphylactic anti-VWF inhibitor. 第72回日本血液学会総会、横浜

6) T Kojima : Genetic Disorders Related to Coagulopathy Prevalent in the Far East. 6th Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis (APSTH Bali 2010)), Bali

7) A Suzuki, Y Miyawaki, J Fujita, A Maki, Y Fujimori, A Takagi, T Murate, H Saito, T Kojima : Receptor interacting protein 140 (RIP140) mediated ER α -Sp1 and corepressor-HDAC3 complex association in 17 β -estradiol dependent down-regulation of protein S. 第33回日本分子生物学会年会生化学会、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

出願番号：特願2010-289686

出願日：平成22年12月27日

発明の名称：凝固因子として作用する異常トロンビンのためのトロンビン不活化動態測定方法及び試験方法、並びに、ポリヌクレオチド

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

門脈圧亢進症と免疫異常

研究分担者 馬場 俊之（昭和大学内科学講座消化器内科学部門講師）

研究要旨

特発性門脈圧亢進症（IPH）の病因には免疫異常の関与が推測されている。IPH では制御性T細胞（Treg）の減少に伴う免疫活性化状態が推測され、病因に関連している可能性がある。

A. 研究目的

特発性門脈圧亢進症（IPH）は免疫異常の関与が推測されている。IPH では免疫活性化状態にあり、リンパ球の活性化や肝内皮細胞における共刺激分子の発現増強により、末梢門脈の潰れや線維化生じると推測されている。また免疫の調節機構にはヘルパーT細胞（Th）1/2、制御性T細胞（Treg）、Th17などが複雑に関与しているが、IPH では相対的にTh1優位であると報告されている。我々はこのような免疫活性化状態やTh1優位となる要因として、制御性T細胞（Treg）に注目してきた。Tregは転写因子FoxP3を特異的に発現しており、FoxP3陽性細胞について解析を行った。

B. 研究方法

【対象】 C型慢性肝疾患（HCV-CLD）または肝硬変（HCV-LC）、自己免疫性肝炎（AIH）、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、アルコール性肝障害（ALD）または肝硬変（AL-LC）、健常者（HD）またはcontrol（消化器癌患者の正常肝組織または正常脾組織）、IPHを対象とした。

【方法】

①自己免疫反応：末梢血を採取し、免疫グロブリン

の定量、抗核抗体の陽性率を解析した。

②末梢血中の活性化リンパ球の頻度：末梢血単核球（PBMC）中のCD69陽性細胞をFACSで解析した。

③Th1/Th2バランス：PBMC（ 2×10^5 細胞）をPHAで刺激し、IFN- γ 産生細胞とIL-4産生細胞をELISPOT法で解析した。Th1/Th2バランスの指標は、IFN- γ spots/IL-4 spotsとした。

④肝浸潤単核球中のTreg（FoxP3陽性細胞）の頻度：肝組織のパラフィン包埋切片を用い、FoxP3の免疫組織化学染色を行った。門脈域を中心に200倍で3視野のFoxP3陽性細胞数をカウントした。陽性細胞の頻度は、総単核球数に対するFoxP3陽性細胞数の割合を算出し、百分率（%）で表した。

⑤脾組織内単核球中のTreg（FoxP3陽性細胞）の頻度：脾組織のパラフィン包埋切片を用い、FoxP3の免疫組織化学染色を行った。顕微鏡下に白脾髄を中心に、200倍で3視野を観察し、陽性細胞数をカウントした。陽性細胞の頻度は④に従った。

⑥末梢血中のTreg（FoxP3陽性細胞）の頻度：PBMC中のFoxP3+/CD4+細胞をFACSで解析した。

（倫理面への配慮）検体提供者に対し十分な説明を行い、文書にて同意を得た。

C. 研究結果

①自己免疫反応

【IgG】HCV-LC (21例) : 2211±791mg/dl、AIH (26例) : 2379±1069mg/dl、PBC (36例) : 1820±668mg/dl、ALD (9例) : 1810±523mg/dl、IPH (5例) : 1545±225mg/dl、HD (12例) : 1190±264 mg/dl。

【IgA】HCV-LC (21例) : 445±347mg/dl、AIH (26例) : 405±193mg/dl、PBC (36例) : 320±115mg/dl、ALD (9例) : 592±193mg/dl、IPH (5例) : 303±49mg/dl、HD (12例) : 196±78 mg/dl。

【IgM】HCV-LC (21例) : 174±186mg/dl、AIH (26例) : 282±318mg/dl、PBC (36例) : 391±227 mg/dl、ALD (9例) : 124±52mg/dl、IPH (5例) : 200±188mg/dl、HD (12例) : 97±56mg/dl。

【抗核抗体】HCV-LC (18例) : 20.0%、AIH (50例) : 92.3%、PBC (54例) : 68.8%、ALD (12例) : 33.3%、IPH (5例) : 0%、HD (12例) : 0%。

IPH では、IgG および IgA は各種肝疾患よりも有意に低値であったが、基準値範囲内であるものの健常者よりも有意に高値であった。IgM および抗核抗体は AIH、PBC よりも有意に低値であったが、健常者とは有意差が認められなかった。

②末梢血中の活性化リンパ球 (CD69陽性細胞) の頻度

HCV-CLD (9例) : 4.5 (1.8-6.9) %、ALC (7例) : 3.9 (1.4-7.8) %、IPH (4例) : 5.6 (3.4-7.8) %、HD (9例) : 3.2 (1.1-6.7)%。

IPH では健常者に比較し有意差は認められなかったが、高値を示していた。

③Th1/Th2バランス(IFN- γ spots/IL-4 spots)

HCV-LC (15例) : 17.3(1.5-75.7)、ALC (9例) : 35.8(4.5-137.6)、IPH (5例) : 88.0(3.7-308.5)、HD (17例) : 6.5(1.8-107.0)。

IFN- γ spots/IL-4 spots も同様に、IPH では健常者に比較し有意差は認められなかったが、高値を示していた。

④肝浸潤単核球中の Treg (FoxP3 陽性細胞) の頻度

度

HCV-CLD (26例) : 6.0(0.2-19.6) %、AIH (19例) : 5.2(0.4-13.8) %、PBC (21例) : 7.2(0.5-23.4) %、IPH (9例) : 1.6(0.0-10.0) %、control (14例) : 1.2(0.0-6.5) %。

これまでの検討では、IPH では肝浸潤単核球中の FoxP3 陽性細胞は殆ど存在しなかった。同じ組織切片を再染色したところ、肝浸潤単核球中に散在する FoxP3 陽性細胞が認められたが、IPH では各種肝疾患および control よりも有意に低かった。

④脾組織内単核球中の Treg (FoxP3 陽性細胞) の頻度

IPH (2例) : 0.1(0.0-1.4) %、control (4例) : 0.7(0.0-1.1) %。

これまでの検討と同様に、IPH では control に比較し有意に低かった。

⑤末梢血中の Treg (FoxP3 陽性細胞) の頻度

HCV-LC (14例) : 3.1(0.7-6.7) %、ALC (14例) : 2.5(0.6-6.4) %、IPH (5例) : 1.9(1.3-4.5) %、HD (10例) : 2.4(0.6-5.1) %。

IPH では、各種肝疾患および健常者に比較し有意差は認められなかったが、低値を示していた。

D. 考察

IPH では、IgG および IgA は各種肝疾患よりも有意に低値であったが、基準値範囲内であるものの健常者よりも有意に高値であった。また活性化リンパ球や IFN- γ spots/IL-4 raio も高値を示す傾向があり、Th1 優位の免疫活性化状態にある可能性が示唆された。肝組織、脾組織における Treg の頻度は、各種肝疾患、control よりも優位に低く、末梢血中の Treg も低値を示す傾向があった。以上より、IPH における免疫活性化状態は、Treg の動態と関連がある可能性が推測された。

E. 結論

IPH では Treg の減少に伴う免疫活性化状態が推測され、病因に関連している可能性がある。

F. 健康危険状態

なし

G. 研究発表

なし

H. 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

I P H肝組織特異タンパクのネットワーク解析

研究分担者 塩見 進（大阪市立大学大学院医学研究科核医学教授）

研究要旨

質量分析装置を用いて IPH 特異タンパクの解析を行った。症例ごとに検討する方法と IPH 症例をまとめて測定する 2 通りの方法で検討した。症例ごとに検討する方法では特異的なネットワークを見出せなかったが、症例をまとめて測定する方法では特異的なネットワークを認めることができ、heat shock protein (HSP) が候補として挙げられた。さらに、各種 term を追加して解析することにより、疾患として脂肪肝や骨・軟骨疾患との関連性が示唆された。

共同研究者

川村悦史（大阪市立大学大学院医学研究科核医学）

森川浩安（同 肝胆膵内科）

田守昭博（同 肝胆膵内科）

A. 研究目的

我々は、特発性門脈圧亢進症（IPH）に特異的に発現する遺伝子、蛋白の解析を行ってきた。IPH 症例において Connective tissue growth factor (CTGF) が異常高値を示す群が存在することが確認され、mRNA レベルでの発現を IPH 肝組織中に確認した（1）。さらに IPH 血清でのプロテインチップを用いた検索では CXCL4, CXCL7 が特異的に高値であった（2）。今回、質量分析装置を用いて臨床プロテオーム解析を行い、IPH 患者の肝臓における特異的蛋白を解析した。

B. 研究方法

IPH 症例の肝臓 3 検体と他疾患治療時摘出正常肝 3 検体を用いた。プロテオーム解析は Tissue Protein Extraction Reagent を使用した。各肝臓組織からタンパク質を抽出し、サンプル個別にトリ

プシン消化を行い、iTRAQ® 試薬を用いて標識した。測定サンプルの混合を行い、QSTAR® Elite Hybrid LC/MS/MS System にて測定した。測定は 3 回を行い、2 回以上検出されたタンパクのみリストアップした。得られた測定結果を Ingenuity Pathways Analysis (INGENUITY® SYSTEMS) を用いてネットワーク解析を行った。解析は第 1 の方法として IPH および正常肝を症例ごとに解析し、第 2 の方法として IPH および正常肝の検体をそれぞれまとめて解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪市立大学倫理委員会の承認を受け、同意を得た検体を使用しタンパク分析を行った。

C. 研究結果

IPH を症例ごとに解析する方法では 99% の信頼性で 151 個のタンパクが検出された。一方 IPH をまとめて解析すると 66% の信頼性であったが有意差をもって同定されたタンパクは 51 個であり、高発現のタンパクは 49 で低発現のタンパクは 2 であった。ネットワーク解析では IPH を症例ごとに測定した場合、特異的なネットワークは見出せなかった。一方、IPH をまとめて測定した場合、developmental

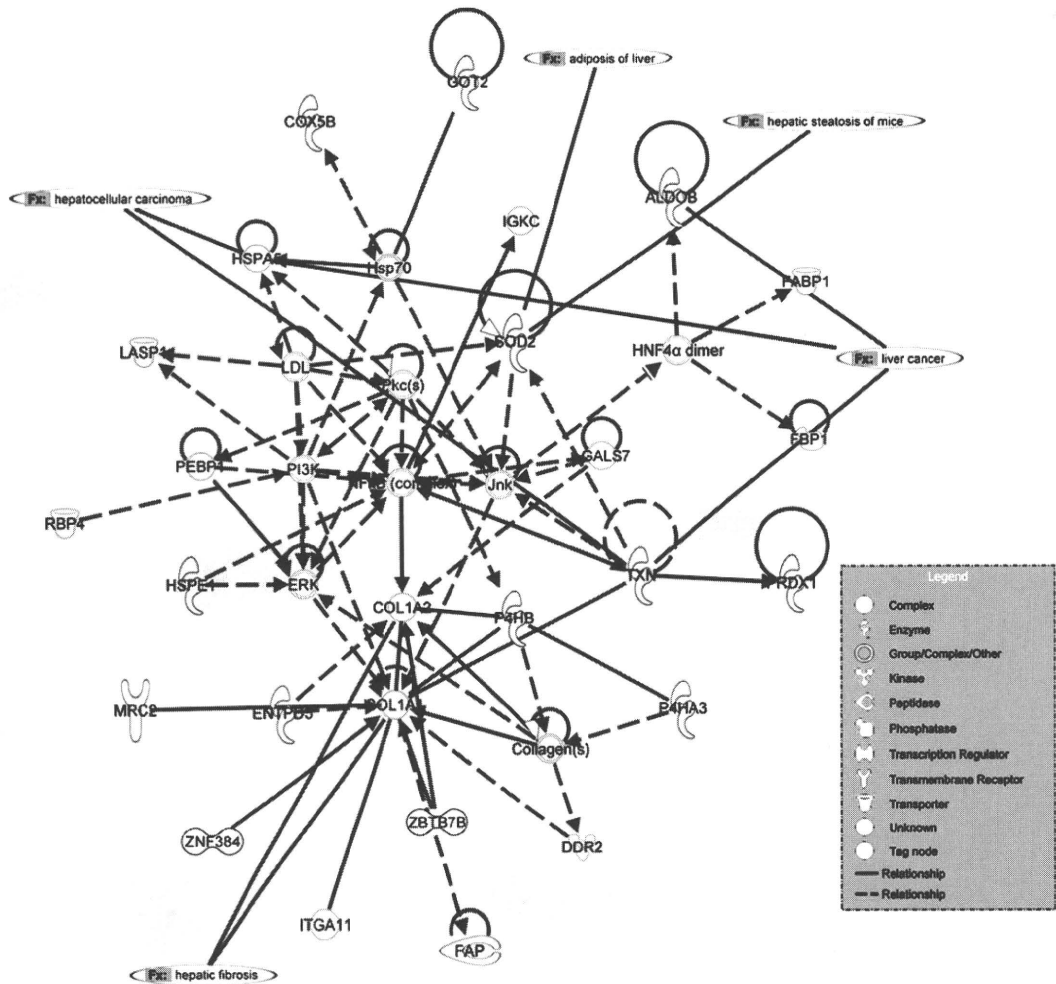


図 1. Hepatic system disease でのネットワーク解析

disorder, tumor morphology 系と drug metabolism, lipid metabolism 系の 2 つのネットワークが指摘された。さらに、developmental disorder, tumor morphology 系において hepatic system disease の term で解析すると、疾患として HCC、hepatic fibrosis、hepatic steatosis、adeposi などが指摘された(図1)。また immunology の term で解析すると allergy、eosinophyilia などの疾患が指摘された。さらに genetic の term で解析すると amyotrophic lateral sclerosis (ALS)、psoriatic arthritis (乾癬性関節炎)、osteochondrodysplasia (骨軟骨異形成症)、osteogenesis imperfecta (骨形成不全症)、Dupuytren contracture (デュピイトラン拘縮)、dwarfism (小人症)、Ehlers-Danlos syndrome、osteoporosis、coronary artery disease などの疾患が指摘された

(図2)。このことはこれらの疾患が IPH と病態において関連性がある可能性を示唆している。またいずれの解析においてもタンパクとして heat shock protein (HSP) がネットワークの中心で高いネットワークを構築していた。

D. 考 察

我々は IPH 特異タンパクを調べる目的で IPH を症例ごとに測定する方法と IPH 症例をまとめて測定する 2 通りの方法で解析を行った。その結果症例ごとに測定する方法では 99% の高い信頼性であったが、151 と多くのタンパクが検出された。またネットワーク解析では症例ごとに差があり、IPH に特異的なネットワークは認められなかった。一方、IPH を

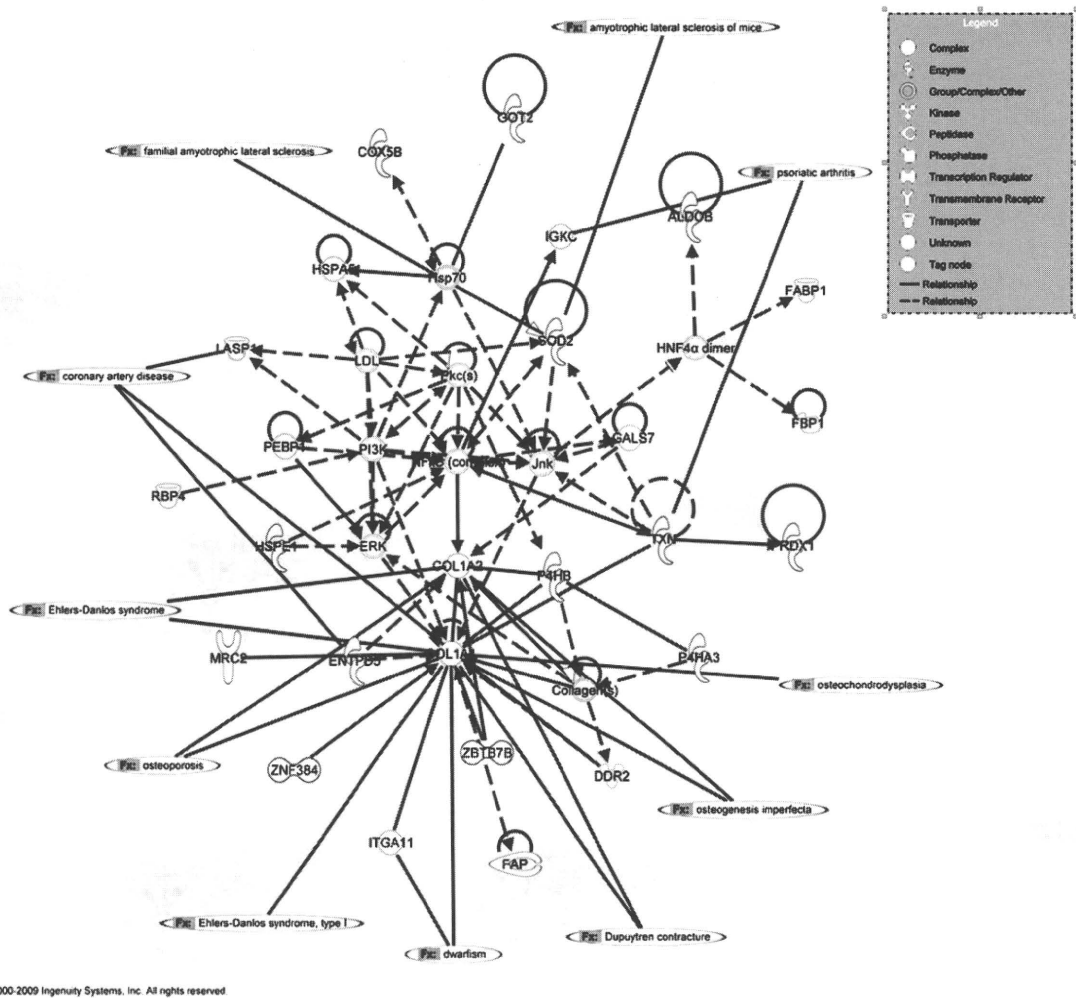


図 2. Genetic でのネットワーク解析

まとめて測定した場合、信頼性は66%と低値であったが、タンパクは51個でありそのうち49個が有意の高発現を認めた。さらにネットワーク解析の結果、developmental disorder, tumor morphology 系において hepatic system disease の term で解析すると肝臓と脂肪肝関連の疾患が IPH に関連する可能性が指摘され、genetic disorder の term で解析すると骨・軟骨関連の疾患や冠動脈疾患との関連が指摘された。IPH は中年女性に好発するが、骨粗鬆症など骨疾患も中年女性に好発することより疫学的面からも両疾患の関連性が推測される。さらに疾患として脂肪肝関連の疾患も指摘されたが、別のネットワーク (drug metabolism, lipid metabolism) 解析にて脂肪代謝が指摘された点や脂肪肝も女性に多い点などを考慮すると脂質代謝も IPH の発症にな

んらかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。我々はすでに IPH の症例ごとの解析にて acyl-CoA synthetase、peroxiredoxin が有意に高発現していることを報告している (3)。acyl-CoA synthetase は脂肪酸代謝に関する蛋白であり、今回脂質代謝と関係があったことと一致する。また IPH をまとめて測定した場合、IPH 特異タンパクとしては HSP との関連が示唆されたが、両者の関係に関しては更なる検討が必要である。

E. 結 論

質量分析装置を用いて IPH 特異タンパクの解析を症例ごとに検討する方法と IPH 症例をまとめて測定する 2 通りの方法で検討した。症例ごとに検討

する方法では特異的なネットワークを見出せなかったが、症例をまとめて測定する方法では特異的なネットワークを認めることができ、HSP が候補として挙げられた。さらに、各種 term を追加して解析することにより、疾患として脂肪肝や骨・軟骨疾患との関連性が示唆された。

F. 文 献

- 1) Morikawa H, Tamori A, Nishiguchi S, Enomoto M, Habu D, Kawada N, Shiomi S. Expression of connective tissue growth factor in the human liver with idiopathic portal hyper- tension. Mol Med 2007 ; 13:240-245.
- 2) 塩見 進、森川浩安、西口修平、他：特発性門脈圧亢進症の遺伝子に関する研究。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成15年度研究報告書 2004:5-8.
- 3) 塩見 進、他：質量分析を用いた IPH 肝組織特異タンパクの解析。厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成20年度研究報告書 2009:74-76.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 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

IPH における抗血管内皮細胞抗体の出現と病態形成への関与

研究分担者 中沼 安二（金沢大学医学系研究科形態機能病理学教授）

研究要旨

昨年の本班会議で、我々は IPH の患者血清に抗血管内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody、AECA）が存在することを示す予備的な研究成果を報告した。今回、IPH の病態形成における AECA の関与を血管内皮細胞のアポトーシス、ならびに血管内皮細胞における線維化関連分子の発現との関連から検討した。ヒト皮膚微小血管内皮細胞（human dermal microvascular endothelial cell、HMVEC）を用いた cell-based ELISA 法により血清 AECA を測定した結果、AECA 陽性率は IPH で30%（10/33例）、ウイルス性肝炎/肝硬変で17%（5/29例）であり、IPH で高率であったが2群間に統計学的有意差はなかった。HMVEC に IPH 血清を反応させると、健常者およびウイルス性肝炎/肝硬変の血清を反応させた場合より HMVEC のアポトーシスが有意に亢進した。さらに、IPH 血清は HMVEC における elastin の発現を誘導した。HMVEC におけるアポトーシス誘導や elastin の発現誘導における AECA の直接的な関与は低いと思われたが、IPH 血清中には血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する因子、さらに、血管内皮細胞における elastin の発現を誘導する何らかの因子が存在する可能性が示され、IPH の病態形成への関与が示唆された。

共同研究者

佐藤保則（金沢大学医学系研究科形態機能病理学）

（コラーゲン生合成に関与）の発現が亢進することが報告されている（4）。

A. 研究目的

特発性門脈圧亢進症（IPH）は末梢門脈域の線維化と末梢門脈枝の潰れ・閉塞が病態形成の主体をなす。IPH では全身性硬化症（SSc）を合併することがあり、我々はこれまでに IPH と SSc の病態の共通性に着目した検討を行ってきた（1、2）。

SScの15-84%の患者血清中には抗血管内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody, AECA）が存在することが報告されており（3）、昨年の本班会議で我々は IPH の患者血清にも AECA が存在することを示す予備的な研究成果を報告した。

SSc では培養血管内皮細胞に患者血清を反応させると、AECA により血管内皮細胞にアポトーシスが誘導され、さらに血管内皮細胞における fibrillin-1

今回、IPH の病態形成における AECA の関与を血管内皮細胞のアポトーシス、ならびに血管内皮細胞における線維化関連分子の発現との関連から検討した。

B. 研究方法

（1）AECA の測定：

血清 AECA はヒト皮膚微小血管内皮細胞（human dermal microvascular endothelial cell, HMVEC）を用いた cell-based ELISA 法により測定した。AECAはIgG、IgA、IgM の各分画を測定した。血清サンプルは IPH33例、対照として健常者（16例）とウイルス性肝炎/肝硬変（29例）の患者血清を使用した。

（2）アポトーシスの測定：

HMVEC を20%患者血清を含む培地で72時間培養した。血清による HMVEC のアポトーシス誘導の程度は ssDNA Apoptosis ELISA Kit (CHEMICON) を用い、吸光度 (410 nm) を測定することで定量した。

(3) 線維化関連分子の発現:

HMVEC を10%患者血清を含む培地で24時間培養した。HMVEC より RNA を抽出後、線維化関連分子の遺伝子発現を RT-PCR 法で検討した。検討した分子は TGF-β1、CTGF、fibrillin-1、fibulin-5、fibronectin、COL1A1、elastin である。

C. 究結果

(1) 血清 AECA 測定結果:

血清 AECA の測定結果を図1に示す。平均値で比較した場合、IgG-AECA と IgA-AECA は、IPH において健常者とウイルス性肝炎/肝硬変より有意に高値を示した。IgM-AECA は検討した3群間で有意差はなかった。

健常者での AECA 測定値の平均値 +2SD をカットオフとした場合の AECA 陽性率を表1に示す。IgG、IgA、IgM いずれかの分画の AECA が陽性となる割合は IPH で30% (10/33例)、ウイルス性肝炎/肝硬変で17% (5/29例) であり IPH で高率であったが、この2群間に統計学的有意差はなかった。

(2) 血管内皮細胞のアポトーシス:

HMVEC に IPH 血清を反応させると、健常者およびウイルス性肝炎/肝硬変の血清を反応させた場合と比較して、HMVEC のアポトーシスが有意に亢進した (図2)。

このアポトーシスの定量値と AECA の測定値をプロットしたところ、両者の間に直線的な相関関係は認められず、AECA が直接的に HMVEC のアポトーシスを誘導している可能性は低いと思われた。

(3) 血管内皮細胞における線維化関連分子の発現:

血清反応後の HMVEC における線維化関連分子の遺伝子発現を RT-PCR 法で検討した結果を図3に示す。検討した7種類の線維化関連分子のうち、IPH 血清反応後の HMVEC において、elastin の発

現誘導が高頻度に見られた。Elastin 以外の6つの分子に関しては、IPH 血清によって発現が誘導される傾向は明確でなかった。

この検討には AECA の発現状態が異なる IPH 9例、健常者3例、ウイルス性肝炎/肝硬変5例の血清を使用した。個々の症例の AECA の発現状態を図3に示したが、AECA の存在と HMVEC での elastin の発現誘導との間における直接的な関係は低いと思われた。

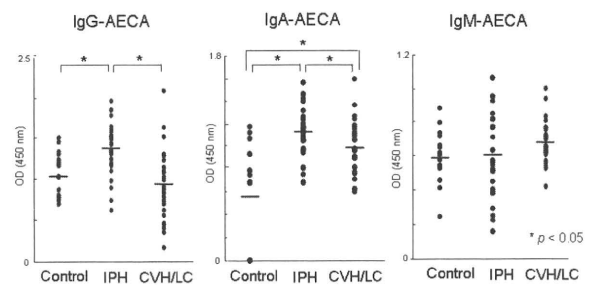


図1 血清AECA(抗血管内皮細胞抗体)測定結果

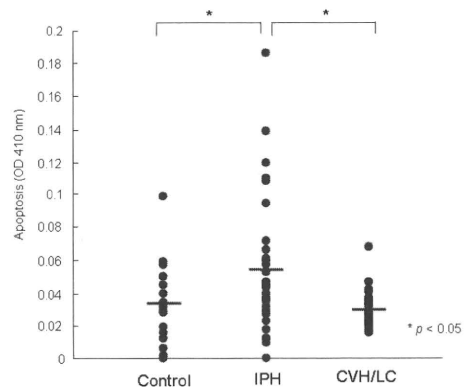


図2 血清による培養血管内皮細胞のアポトーシス誘導効果

TGF-β1	Control			IPH			CVH/LC		
CTGF	Control			IPH			CVH/LC		
Fibrillin-1	Control			IPH			CVH/LC		
Fibulin-5	Control			IPH			CVH/LC		
Fibronectin	Control			IPH			CVH/LC		
COL1A1	Control			IPH			CVH/LC		
Elastin	Control			IPH			CVH/LC		
GAPDH	Control			IPH			CVH/LC		
IgG AECA	-	-	-	-	+	+	-	-	-
IgA AECA	-	-	-	-	-	+	-	-	+
IgM AECA	-	-	-	-	+	+	-	-	-

図3 血清による培養血管内皮細胞での線維化関連分子の発現誘導

表1 血清AECA(抗血管内皮細胞抗体)陽性率

	Control	IPH	CVH/LC
n	16	33	29
IgG-AECA	0 (0%)	6 (18%)	2 (7%)
IgA-AECA	0 (0%)	2 (6%)	1 (3%)
IgM-AECA	0 (0%)	5 (15%)	2 (7%)
Total	0 (0%)	10 (30%)	5 (17%)

D. 考 察

Cell-based ELISA 法で測定した血清 IgG-AECA、IgA-AECA の平均値は、IPH で健常者やウイルス性肝炎/肝硬変より有意に高値を示した。しかし、健常者における AECA 平均値 +2SD をカットオフとした場合の AECA 陽性率は、IPH でやや高い傾向にあったものの、IPH とウイルス性肝炎/肝硬変の 2 群間で統計学的有意差はなかった。この結果は、昨年の本班会議で我々が報告した、HMVEC を用いた酵素抗体法で評価した AECA の検討結果と類似していた。

血管内皮細胞のアポトーシスの誘導における AECA の直接的な関与の可能性は低いと思われたが、IPH 血清には培養血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する何らかの因子が存在する可能性が示された。これまでに我々は、IPH の肝組織で抗 ssDNA 抗体を用いた免疫染色を行うと、末梢の門脈内皮細胞における ssDNA 陽性率が対照疾患であるウイルス性肝炎/肝硬変より高率であることを示しており、IPH の末梢門脈枝の潰れ・閉塞には門脈内皮細胞のアポトーシスが関与している可能性が示唆される。

IPH 血清が HMVEC における elastin の発現を誘導した結果は IPH の病態形成を考察する上で興味深い。これまでに我々は IPH の大型～中等大の門脈壁における elastin 沈着に fibulin-5 が関与している可能性を示したが (5)、末梢門脈域における elastin 沈着の機序は不明であった。IPH 血清に存在する elastin 誘導因子の同定や誘導機序を明らかにすることは IPH の治療にも繋がると考えられることから、今後、さらに検討を進めたい。

今回の結果から、AECA の血管内皮細胞におけるアポトーシス誘導や elastin の発現誘導への関与は低いと思われた。我々は以前、IPH 血清の TGF- β 1 濃度を ELISA 法で測定したが、IPH 血清の TGF- β 1 の測定値と今回の AECA 測定値をプロットすると、IgG-AECA と TGF- β 1 との間に直線的な強い相関関係を認めた ($p = 0.0035$)。今回の検討では IPH 血清を HMVEC に反応させても TGF- β 1 の発現が誘導されることはなかったが、全身レベルでは AECA の出現と TGF- β 1 の発現は相互に関連した現象なのかも知れない。

E. 結 論

培養血管内皮細胞 (HMVEC) を用いた in vitro の検討で、IPH 患者血清中には血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する因子、さらに、血管内皮細胞における elastin の発現を誘導する何らかの因子が存在する可能性が示された。これらを誘導する因子としての AECA の直接的な関与は低いと思われたが、血管内皮細胞でのアポトーシス亢進や elastin の発現亢進が IPH の病態形成に深く関与していることが示唆された。

F. 文 献

- 1) Nakanuma Y et al. Pathology and pathogenesis of portal venopathy in idiopathic portal hypertension: Hints from systemic sclerosis. *Hepato Res* 2009;39:1023-31.
- 2) Kitao A, Nakanuma Y et al. Endothelial to mesenchymal transition via transforming growth factor-beta1/Smad activation is associated with portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension. *Am J Pathol* 2009;175:616-26.
- 3) Tobon GJ et al. Are autoantibodies triggering endothelial cell apoptosis really pathogenic? *Autoimmun Rev* 2009;8:605-10.
- 4) Ahmed SS et al. Induction of apoptosis and

fibrillin 1 expression in human dermal endothelial cells by scleroderma sera containing anti-endothelial cell antibodies. Arthritis Rheum 2006;54:2250-62.

- 5) Sato Y, Nakanuma Y et al. Fibulin-5 is involved in phlebosclerosis of major portal vein branches associated with elastic fiber deposition in idiopathic portal hypertension. Hepatol Res 2008;38:166-73.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue R, Nakazawa A, Tsukada N, Katoh Y, Nagao T, Nakanuma Y, Mukai K. POEMS syndrome with idiopathic portal hypertension: autopsy case and review of the literature. Pathol Int 2010;60:316-20.
- 2) 佐藤保則、北村星子、北尾梓、中沼安二 特発性門脈圧亢進症の病理と病態。肝胆膵 2010; 61:133-40.

2. 学会発表

- 1) 佐藤保則、原田憲一、佐々木素子、中沼安二 特発性門脈圧亢進症 (IPH) における抗血管内皮細胞抗体の出現 第46回日本肝臓学会総会 山形 2010年5月
- 2) 佐藤保則、中沼安二 特発性門脈圧亢進症における血管内皮細胞のアポトーシスの関与 第14回日本肝臓学会大会 横浜 2010年10月

H. 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

検体保存センターの登録及びデータ解析の現況について

研究分担者 橋爪 誠（九州大学大学院医学研究院教授）

研究要旨

はじめに：門脈血行異常症研究班の対象とする IPH、BCS、EHO の病因は未だ不明である。3 疾患は、全国的にみても症例数が少なく、系統的な疾患の研究解析が困難であるのが現状である。対象と方法：現在の厚生労働省の倫理指針に沿った新しい検体保存センターの再編として、1. 倫理審査委員会の設置（検体提供施設、検体保存施設、検体解析施設）2. 匿名化のシステムが確立 3. 同意書取得を網羅したシステムづくりを行った。これにより検体提供施設は分担研究者施設のみに限定した。また門脈血行異常症の検体だけでなく、健常人、肝硬変、非肝硬変肝疾患患者の対照群についても検体保存することとした。検体は臨床データ（個人調査表）と匿名連結可能なようにし、各研究者が共有できるものとした。結果：平成18年に九州大学にてヒトゲノムに関する倫理委員会の承認の後、平成22年12月現在までにヒトゲノム倫理審査委員会の承認が得られている施設は6施設であり、登録状況は現在35症例であった。昨年度からは、現時点において BCS が3例、IPH が2例と症例の登録が追加された。考察：症例登録および解析においてもそれぞれの施設が倫理委員会の承認を必要となったことが検体保存センターの登録症例数の減少の原因と考えられた。今後の対策として症例が発生した場合には、倫理委員会の承認がえられている施設に患者を紹介してもらい、検体登録する必要がある。また班会議の分担研究施設で倫理委員会の承認を得ていない施設もあるので、少なくとも研究分担施設は倫理委員会での承認を得る必要があると考えられる。

共同研究者

赤星朋比古（九州大学大学院医学研究院）

富川 盛雅（九州大学病院）

での倫理委員会の承認状況と登録症例の現状について検討した。

B. 研究方法

A. 研究目的

近年のヒトゲノムおよび遺伝子解析研究における倫理指針の改訂にともない、当班会議においても、現在の社会情勢に沿った検体保存センターのシステム作りが必要となった。平成18年3月、厚生労働省の倫理指針に沿った新しい検体保存センターが、九州大学大学院医学研究院倫理委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会により承認されたが、検体を解析する施設はもとより登録する施設にも施設倫理委員会の承認が必要となった。各施設

現在の厚生労働省の倫理指針に沿った新しい検体保存センターの再編として、1. 倫理審査委員会の設置（検体提供施設、検体保存施設、検体解析施設）2. 匿名化のシステムが確立 3. 同意書取得を網羅したシステムづくりを行った。これにより検体提供施設は分担研究者施設のみに限定した。また門脈血行異常症の検体だけでなく、健常人、肝硬変、非肝硬変肝疾患患者の対照群についても検体保存することとした。検体は臨床データ（個人調査表）と匿名連結可能なようにし、各研究者が共有できるも

のとした。具体的には調査対象：IPH、EHO、BCS、対照群：肝硬変、非硬変性疾患（転移性肝癌、胃癌、脾嚢胞など）、健常人とした。採取される試料の種類と量については、血液（30ml以下）、肝組織（ホルマリン・凍結：肝切除症例、3g以下）脾組織（ホルマリン・凍結：脾摘症例、3g以下）とした。（図1）

研究計画

調査対象：IPH、EHO、BCS
 対照群：肝硬変、非硬変性疾患（転移性肝癌、胃癌、脾嚢胞など）、健常人

採取される試料の種類、量：

- 血液（30ml以下）IPH、EHO、BCS、肝硬変、健常人
- 肝組織（ホルマリン・凍結：肝切除症例、3g以下）IPH、EHO、BCS、肝硬変、非硬変性疾患（転移性肝癌）
- 脾組織（ホルマリン・凍結：脾摘症例、3g以下）IPH、EHO、BCS、肝硬変、非硬変性疾患（胃癌、脾嚢胞）

図1

検体保存センターの流れとしては図2の如く倫理委員会承認施設にて、患者からの同意を得、検体を連結可能匿名化した後にエスアール社にて検体の回収とDNA抽出を行い九州大学にある検体保存センターにて登録保存する。（図2）

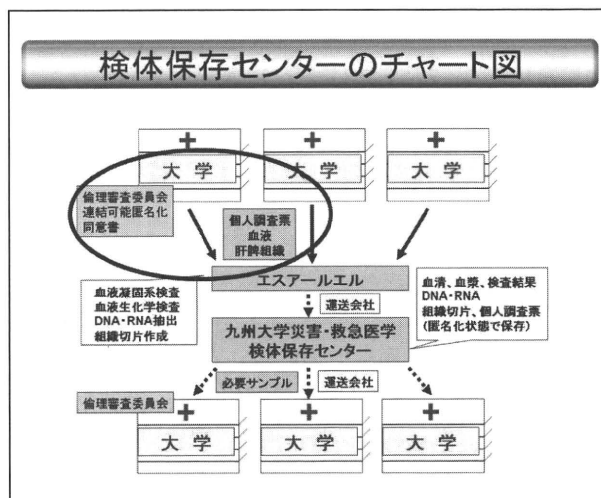


図2

C. 研究結果

平成22年12月現在までにヒトゲノム倫理審査委員会の承認が得られている施設は九州大学大学院 災害救急医学、消化器・総合外科、長崎大学大学院 移植消化器外科、大阪市立大学大学院 核医学、公衆衛生学、大分大学 第一外科、琉球大学 機能制御外科 昭和大学消化器内科の6施設であり、登録状況は現在35症例（IPH 4例、EHO 1例、BCS23例と対照症例7例）であった。昨年度から現在までBCSが3例、IPHが2例と増えたのみであった。一方、平成17年度末までの症例登録数はIPH98例、EHO51例、BCS39例の188例であり、症例登録数は大幅に減少していた。（図3）

検体保存センター登録状況(3)

1) 平成17年度末までの登録症例数

IPH	98例
EHO	51例
BCS	39例
計188例	

2) 平成18年から平成22年11月までの登録症例数

IPH	4例
EHO	1例
BCS	23例
LC	6例
NPH	1例
計35例	

図3

D. 考察

ヒトゲノム遺伝子検査における指針の改定により、検体登録および解析施設には、倫理委員会審査および承認の必要性が生じた。それに伴い、検体登録施設は、倫理委員会の設置される協力施設のみでなければ登録できず、この5年間で門脈血行異常症の登録は35症例のみで、少ない登録数である。

以前の研究班では、研究班の努力により666施設もの協力施設えることができ、170症例もの門脈血行異常症の登録を得ることができていたが、それにくらべるとかなり登録数はすくなく、国内のかなり

の門脈血行異常症の症例が登録されていないのが、現状であると考えられた。これに関しては、症例が発生した場合には、倫理委員会の承認がえられている施設に患者を紹介してもらい、その後に同意を得、検体登録する必要がある。研究分担施設以外にも、この検体保存センターの存在と検体登録の重要性を啓蒙してゆくのは、当検体保存センターの役目でもあると考える。(図4、5)

また、現在は班会議の分担研究施設は施設あるが、倫理委員会の承認を得ている施設はまだ5施設であり、各施設でのさらなる倫理委員会での承認が必要である。

以上の2つの要件を早急に進めることが検体保存センターの登録症例の増加につながり、さらに有機的な疾患解明の検討が可能なものになると考えられる。

検体保存センター登録手続き

【前準備】

1. 事務局による実務担当者の確認
2. 各施設倫理委員会の承認をいただく
(事務局より資料を配付します)

【検体提出時】

1. 患者さんに対する説明および同意書取得 (各担当医師から)
2. 個人調査票・登録用紙を記載 (各施設に送付します)
3. 全国検体保存センター(事務局:九州大学)に登録用紙をFAX
4. 事務局から登録番号を通知(匿名化)
5. 登録番号受領後SRL担当者に連絡 (SRL用伝票は送付します)
6. 血清・血漿を分離し(あるいは肝・脾臓を採取し)、SRL担当者に伝票とともに手渡す

図4

システム運営上のお願い

- **実施担当者の確認**
→事務局から確認の連絡を行います。
- **分担研究施設の倫理審査委員会に提出する各種資料、書類**
→事務局から資料を配付を行います。

症例登録の際はまず、全国検体保存センター事務局九州大学大学院先端医療医学講座;担当 赤星または富川まで事務的にご連絡ください。
電話:092-642-5992
E-メール: tomohiko@surg2.med.kyush-u.ac.jp
mtomikaw@surg2.med.kyushu-u.ac.jp

図5

E. 結 論

門脈血行異常症症例の登録数増加には、研究分担施設すべての倫理委員会の承認が不可欠である。本班会議の意図する、稀少疾患の集約と体系的研究の推進を図る上で研究分担施設が協力する体制を今後さらに強化することが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

なし

Budd-Chiari 症候群患者における予後関連因子 —臨床調査個人票の集計結果—

研究分担者 廣田 良夫（大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学教授）

研究要旨

電子入力された臨床調査個人票の情報を用いて、縦断的手法により Budd-Chiari 症候群の予後を検討した。

2001年度～2009年度の新規申請者を対象とし、以降の更新情報に基づき予後を追跡した。予後指標としては、更新申請時の「黄疸・肝性脳症・全身倦怠感（肝機能障害）」を用いた。予後との関連を検討した項目は、新規申請時電子入力された臨床調査個人票の情報を用いて、縦断的手法によりの年齢、性別、臨床症状、各種検査所見および治療状況などである。2001年度～2009年度の新規申請者119人のうち、新規申請時に「黄疸・肝性脳症・全身倦怠感（肝機能障害）」の所見がなかった者は44人であった。この中で、更新時に「黄疸・肝性脳症・全身倦怠感（肝機能障害）」を発現した者は6人であり、Incidence Rateは1000人当たり146であった。経過中の「肝機能障害」発現に関連する因子は、「女性」、「新規申請時の年齢47歳未満」、「腹水」、「下腿浮腫、下肢静脈瘤」、「門脈の狭窄/閉塞」などであった。一方、「閉塞・狭窄に対する治療」を受けた者では、肝機能障害を呈する者は少なく、予後改善の可能性を示唆していた。

共同研究者

大藤 さとこ（大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学講師）
村井 陽子（相愛大学人間発達学部発達栄養学科准教授）

A. 研究目的

Budd-Chiari 症候群に関しては、これまでに複数回、全国疫学調査が実施されており、いずれにおいても性比、年齢分布、臨床症状、予後などの臨床疫学特性が報告されている¹⁾²⁾。直近の調査（2005年実施）によると、2004年1年間の年間受療者数（95%信頼区間）は推定270人（190–360人）、確定診断時の年齢ピークは20–30代、予後として「悪化/死亡」を報告した者は21%である²⁾。ただし、全国疫学調査はある1時点における有病患者としての検討であり、Length biasを受けている可能性は否定できない。一般的に、予後の検討には、横断的

法よりも、精度の高い情報が得られる縦断的手法の方が適していると考えられている。

そこで、本研究では2001年度以降の Budd-Chiari 症候群：臨床調査個人票データを患者毎に連結させ、縦断的手法により同疾患の予後を検討した。

B. 研究方法

厚生労働省から2001年度～2009年度の Budd-Chiari 症候群：臨床調査個人票の使用許可を得て、集計解析を行った。

電子入力された臨床調査個人票データは、申請年度別、および新規・更新別の合計18ファイルで構成されている。そこで、更新時の情報を患者ごとに連結させるため、個人識別 ID 番号を用いて、総てのファイルのデータを Linkage した。ID 番号は必ずしも同一患者を表しているとは限らないため、患者