

- activity during moderate to much consumption of ethanol in healthy volunteers: Differences between normal and heterozygous mutant aldehyde dehydrogenase-2 Alleles. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2013.7.1 Amsterdam, Netherland
27. Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Quantitative PCR assay demonstrated exon deletions of ADAMTS13 in two unrelated patients with Upshaw Schulman. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2013.7.1 Amsterdam, Netherland
 28. Yagi H, Kato S, Konno M, Tanaka R, Hasegawa Y, Kanai R, Yamaguchi S, Isonishi A, Matsumoto M, Fujimura Y. Kinetics and half-life of plasma ADAMTS13 after plasma infusion in four patients with Upshaw-Schulman Syndrome. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2013.7.1 Amsterdam Netherland
 29. Takaya H, Uemura M, Fujimoto M, Ishii S, Morioka C, Kawaratani H, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y, Fukui H. Decreased ADAMTS13 activity and its clinical significance in patients with idiopathic portal hypertension. 2013.7.2.
 30. Sorvillo N, Kaijen P, Matsumoto M, Fujimura Y, Fabian V, Zwaan C, Fijnheer R, Voorberg J, Meijer A. Identification of glycosylation sites in plasma derived ADAMTS13 employing tandem mass spectrometry . 2013.7.4.
 31. Teleghani M M, Fujimura Y, George J, Hrachovinova I, Lämmle B, Knoebl P, Paulsen P Q, Schneppenheim R, Hovinga J. International registry for patients with hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura(TTP)- Upshaw Schulman syndrome. 2013.7.4.
 32. Fujimura Y, Yoshii Y, Matsumoto M, Isonishi A, Hayakawa M, Yoshida Y, Yagi H, Kokame K, Miyata T. A long-term phenotype analysis of 51 patients with Upshaw -Schulman Syndrome in Japan, with special references to pregnancy and renal failure that requires hemodialysis. **The 55th Annual Meeting of American Society of Hematology.** New Orleans (USA), 2013.12.7
 33. Hayakawa M, Matsumoto M, Yoshii Y, Yagi H, Kimura H, Fujimura Y. HSCT-associated hepatic VOD is initiated with preceding appearance of unusually large von Willebrand factor multimers in

patient plasmas. The 55th Annual Meeting of American Society of Hematology. New Orleans (USA), 2013.12.9

34. Yoshida Y, Xinping F, Ohyama Y, Kokubo T, Matsumoto M, Yagi H, Shirohani-Ikejima H, Miyata T, Fujimura Y. Atypical hemolytic uremic syndrome in Japan characterized by the inhibitory antibody-based hemolytic assay and the gene analysis. The 55th Annual Meeting of American Society of Hematology. New Orleans (USA), 2013.12.8

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

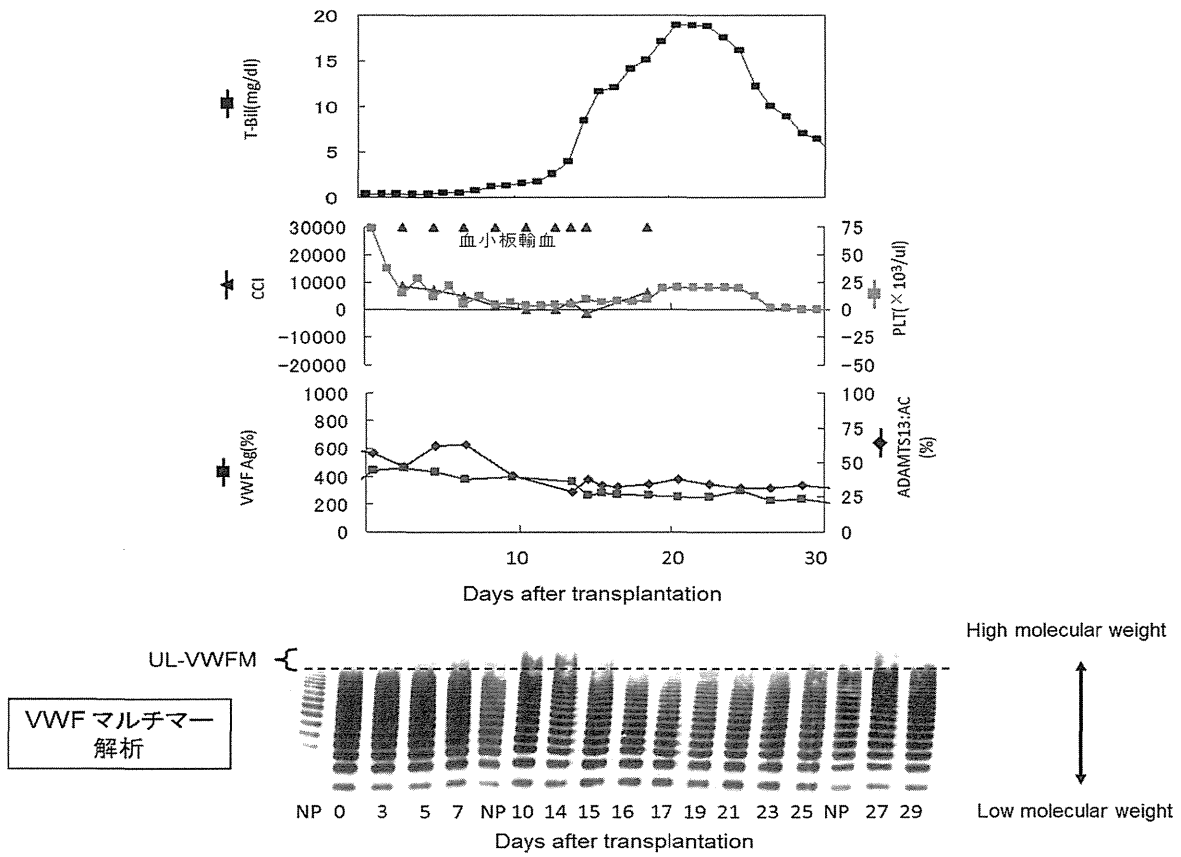


図1 肝VODの代表例の臨床経過とVWFマルチマー解析

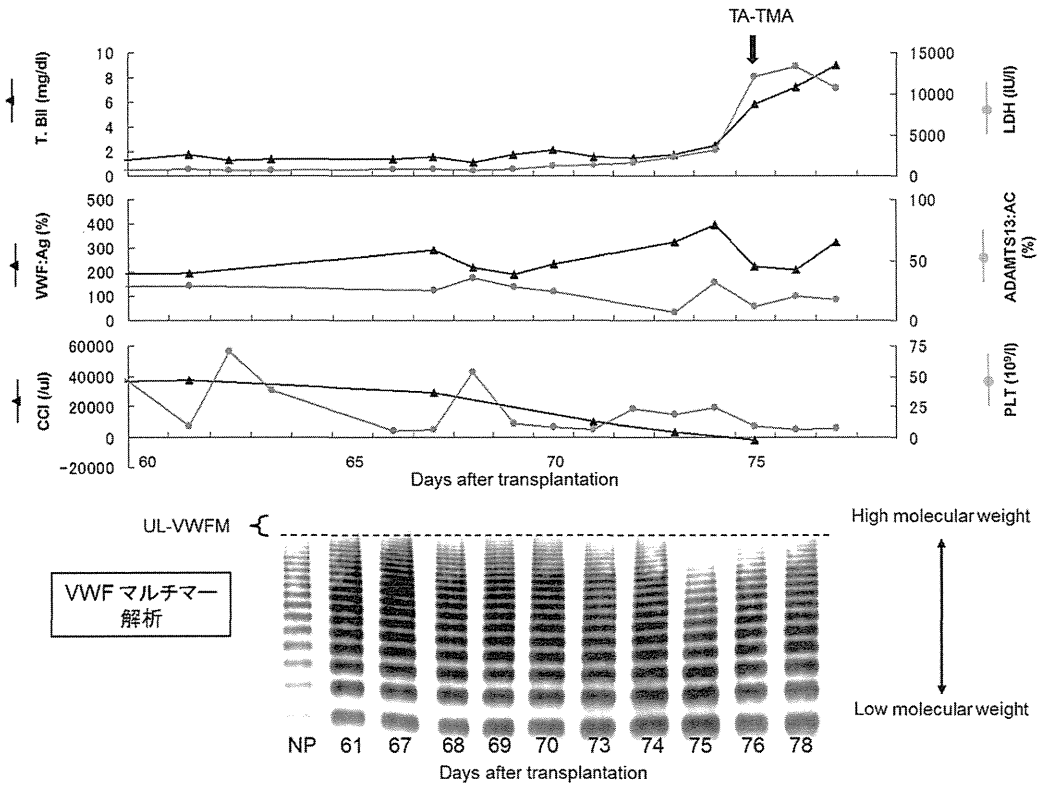


図2 移植後TMAの臨床経過とVWFマルチマー解析

補体活性化のマーカーである C5b-9 の測定

研究分担者 和田 英夫 三重大学 医学部臨床検査医学 准教授

研究要旨

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) は補体活性化により、溶血、血小板減少ならびに微小血栓を併発する全身性の疾患である。補体活性化の指標として、C5b-9 値をサンドイッチ ELISA にて測定した。健常人の C5b-9 の正常値は 82.5 ng/ml (59.9 - 128.7 ng/ml) で、クエン酸ならびに EDTA で補体の活性化は抑制できたが、一部高値を示す健常人も見られた。また、古い検体や凍結融解を繰り返した検体では、C5b-9 値は著しい高値を示した。1 例だけの検討ではあるが、aHUS 症例では C5b-9 値 229 ng/ml と高値を示し、Eculizumab 投与後正常値以下に低下した。

以上、aHUS の診断ならびに治療効果の判定に、C5b-9 の測定が有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、ADAMTS13 に関連する TMA 以外に、aHUS が注目されるようになってきた。aHUS の発症は、補体調節因子である CFH, MCP, CFI, THBD 遺伝子の機能消失型変異、もしくは補体因子である C3 と CFB 遺伝子の機能亢進型変異が原因となる。本邦では、遺伝子解析を含めて aHUS の検討は充分進行していない。

今回は、補体系活性化のマーカーである C5b-9 について、健常人ならびに TMA 患者で検討した。

B. 研究方法

対象：健常成人 78 名と Eculizumab を投与された aHUS 患者

方法：C5b-9 の測定検体は EDTA 血漿、クエン血漿ならびに血清を用いた。

C5b-9 測定はベクトンデッキソン (BD) 社の BD OptEIA™ の Human C5b-9 ELISA キットを用いて、サンドイッチ ELISA 法に

て測定した。aHUS 患者については、Eculizumab 投与前。3 日後、7 日後、10 日後、14 日後に、C5b-9 値を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は三重大学の倫理審査委員会で研究計画の承認を受けており、研究参加者からインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

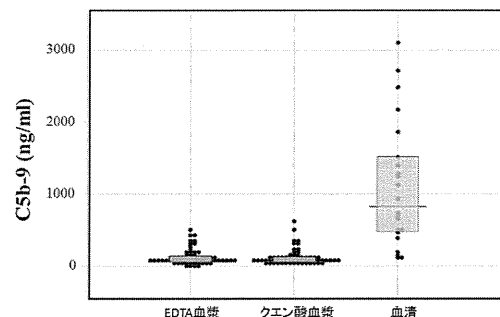


図1 健常人における C5b-9 値

健常人における C5b-9 値 {中央値 (25 - 75%tile)} は、クエン酸血漿 86.5 ng/ml (60.0 - 136.1 ng/ml)、EDTA 血漿 82.5

ng/ml (59.9 - 128.7)、血清 825.0 ng/ml (475.0 - 1515.0 ng/ml) であった(図1)。血清中の C5b-9 値は、クエン酸血漿ならびに EDTA 血漿の約 10 倍であったが、クエン酸血漿ならびに EDTA 血漿の一部でも高値を示した(図2)。

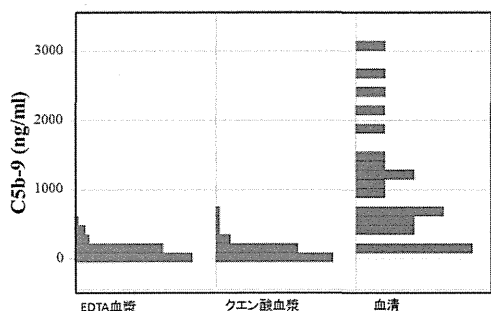


図2 クエン酸ならびに EDTA 血漿、血清名の C5b-9 の分布

Eculizumab 投与前の aHUS 患者の C5b-9 値は 229ng/ml と高値を示し、投与後著しく低下した。

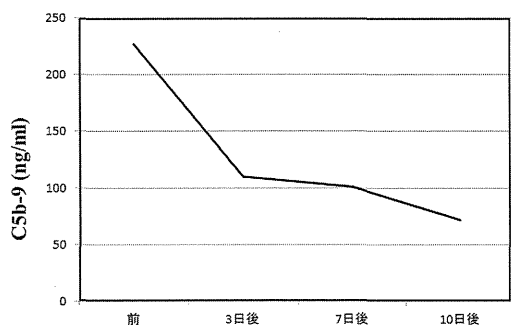


図3 aHUS 患者における Eculizumab 投与前後の C5b-9 値

また、凍結融解を繰り返した検体ならびに古い検体では、C5b-9 値は 2000ng/ml 前後と著しい高値を示した。

D. 考察

今回の血清、クエン酸ならびに EDTA 採血による健常人 C5b-9 値の検討から、血清では補体は著しく活性化されるが、クエン酸採血あるいは EDTA 採血にて抑制されることがわかった。以降、健常人の C5b-9 の正常値はクエン酸血あるいは EDTA 血で検討され、60~136 ng/ml と決定された。しかし、C5b-9 の分布幅は広く、著しく高値を呈する健常人も見られた。aHUS 症例の C5b-9 値は著しく高値であったが、検討症例数は少なく、他疾患との鑑別に用いるには、多数例での検討が必要と考えられた。一方、抗 C5 抗体である Eculizumab 投与により、aHUS 症例の C5b-9 は著しく低下し、Eculizumab の治療効果の判定には有用と考えられた。

E. 結論

健常人の C5b-9 は、EDTA あるいはクエン酸の添加により、補体系の活性化を防ぐことができ、正常値を 82.5 ng/ml (59.9 - 128.7 ng/ml) と確定できた。ただし、血清、古い検体、凍結融解を繰り返した検体では補体系が活性化され、C5b-9 は著しい高値を示す。また、一部の健常人では C5b-9 が高値を示し、さらなる検討が必要である。また、Eculizumab 投与により C5b-9 は著しく低下し、治療効果の判定にも有用であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y: A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 2013; 90: 164-168
- 2) Takahashi N, Wada H, Usui M, Kobayashi T, Habe-Ito N, Matsumoto T, Uemoto S, Nobori T, Isaji S: Behavior of ADAMTS13 and Von Willebrand factor levels in patients after living donor liver transplantation. *Thromb Res.* 2013; 131:225-229
- 3) Habe K, Wada H, Ito-Habe N, Suzuki H, Nobori T, Mizutani H : Two patients with antiphospholipid antibody developed disseminated intravascular coagulation. *Intern Med.* 2013; 52: 269-272
- 4) Habe K, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Ikejiri M, Matsubara K, Morioka T, Kamimoto Y, Ikeda T, Katayama N, Nobori T, Mizutani H. : Presence of antiphospholipid antibody is a risk factor in thrombotic events in patients with antiphospholipid syndrome or relevant diseases. *Int J Hematol.* 2013; 97: 345-350
- 5) Toyoda H, Azuma E, Kawasaki Y, Iwasa T, Ohashi H, Otsuki S, Iwamoto S, Hirayama M, Itoh-Habe N, Wada H, Kondo M, Keida Y, Ito T, Komada Y: Cord blood transplantation combined with rituximab for Wiskott-Aldrich syndrome with autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:226-227
- 6) Hasegawa M, Wada H, Wakabayashi H, Yoshida K, Miyamoto N, Asanuma K, Matsumoto T, Ohishi K, Shimokariya Y, Yamada N, Uchida A, Sudo A: The relationships among hemostatic markers, the withdrawal of fondaparinux due to a reduction in hemoglobin and deep vein thrombosis in Japanese patients undergoing major orthopedic surgery. *Clin Chim Acta.* 2013; 425: 109-113
- 7) Seki Y, Wada H, Kawasugi K, Okamoto K, Uchiyama T, Kushimoto S, Hatada T, Matsumoto T, Imai H; Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC Subcommittee A prospective analysis of disseminated intravascular coagulation in patients with infections. *Intern Med.* 2013;52: 1893-1898.
- 8) Wada H, Thachil J, Di Nisio M, Mathew P, Kurosawa S, Gando S, Kim HK, Nielsen JD, Dempfle CE, Levi M,

- Toh CH; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis.: Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. *J Thromb Haemost.* 2013;11: 761-767
- 9) Gando S, Wada H, Tachil J; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis (ISTH). Differentiating disseminated intravascular coagulation (DIC) with the fibrinolytic phenotype from coagulopathy of trauma and acute coagulopathy of trauma-shock (COT/ACOTS). *J Thromb Haemost.* 2013;11:826-835
- 10) Wada H, Thachil J, Di Nisio M, Kurosawa S, Gando S, Toh CH; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis.: Harmonized guidance for DIC from the ISTH and the current status of anticoagulant therapy in Japan: a rebuttal. *J Thromb Haemost.* 2013; 11:2078-2079.
- 11) Yamashita Y, Naitoh K, Wada H, Ikejiri M, Mastumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N: Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic microangiopathy. *Thromb Res.* 2013 (in press)
2. 学会発表
- 1) Wada H: Chairman's report, 59th SSC meeting, Amsterdam, June 29-30, 2013
- 2) Matsumoto T, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Yoshida K, Miyamoto N, Asanuma K, Ohishi K, Shimokariya Y, Yamada N, Uchida A, Sudo A: The relationships among hemostatic markers, the withdrawal of fondaparinux due to a reduction in hemoglobin and deep vein thrombosis in Japanese patients undergoing major orthopedic surgery. XXIVth ISTH Congress, Amsterdam, June 29-July4, 2013
- 3) Sakon M, Kobayashi T, Wada H, Seo N: Study of enoxaparin sodium [subcutaneous injection kit] used in clinical setting in patients undergoing abdominal surgery [general surgery and gynecology]-specified drug-use survey. XXIVth ISTH Congress, Amsterdam, June 29-July4, 2013
- 4) Wada H: Educational Lecture, Guidance for diagnosis and treatment of DIC, 59th SSC meeting, Amsterdam, June 29-30, 2013

- 5) 和田英夫：旧厚生省基準などスコアリングによる DIC 診断基準のエビデンス、DIC 部会、第 7 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2013 年 1 月 12 日、東医健保会館
- 6) 和田英夫：DIC、医師シンポジウム「救急から集中治療へ・臓器不全対策」、第 21 回日本集中治療医学会東海北陸地方会、2013 年 6 月 15 日、岐阜、じゅうろくぶらざ
- 7) 和田英夫：2013 年に公表される新しい ISTH の DIC 診療ガイドライン、第 35 回日本血栓止血学会学術集会、2013 年 6 月 1 日、山形、山形国際ホテル

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

定量 PCR および次世代シーケンサーを用いた ADAMTS13 遺伝子解析

研究分担者 小亀 浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 室長

研究協力者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター分子病態部 部長

研究協力者 樋口(江浦)由佳 国立循環器病研究センター分子病態部 派遣研究員

研究要旨

ADAMTS13 はフォンビルブランド因子を切断する血漿プロテアーゼである。遺伝子異常や自己抗体の出現などによる血漿 ADAMTS13 活性の損失は、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の要因となる。特に ADAMTS13 遺伝子の異常によって発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (USS) と呼ぶ。これまでに我々は奈良県立医科大学輸血部と共に、USS 患者 43 家系の ADAMTS13 遺伝子解析をダイレクト・シーケンシング法を用いて実施し、40 家系の患者 46 名に複合ヘテロ接合性あるいはホモ接合性の非同義変異を同定した。本研究では、定量 PCR を利用した遺伝子解析法を導入することで、ダイレクト・シーケンシング法では検出できなかった欠失異常 c. 746_987+373del および c. 3751_3892+587del を 2 名の患者にそれぞれ同定した。USS 患者では初めて同定されたタイプの遺伝子異常である。定量 PCR 法でも異常が検出されなかった患者 1 名の家系に対し、次世代シーケンサーを利用して ADAMTS13 遺伝子全体を調べたが、原因と思われる変異は見出されなかった。この患者には、未知のタイプの ADAMTS13 遺伝子異常あるいは ADAMTS13 以外の遺伝子異常が存在するのかもしれない。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の発症は、フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼ ADAMTS13 の活性著減で起こる。ADAMTS13 活性の損失は、先天的な ADAMTS13 遺伝子異常あるいは後天的に生じる抗 ADAMTS13 自己抗体によって起こる。特に ADAMTS13 遺伝子異常によって劣性遺伝形式で発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (Upshaw-Schulman syndrome; USS)

と呼ぶ。我々は、USS 患者の ADAMTS13 遺伝子解析、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の分析、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、ADAMTS13 分子の立体構造解析などに重点をおいて研究を進めてきた。本研究事業では、USS 患者の遺伝子解析、ADAMTS13 変異体の立体構造解析などを主な研究テーマとしている。

我々はこれまで、USS 患者およびその家系構成員を対象に ADAMTS13 遺伝子の塩基配列を調べ、USS 発症の原因となる遺伝子異常を特定してきた。一般に、遺伝性疾患が疑われる患者の遺伝子の塩基配列は、

標的遺伝子の各エクソンを PCR で増幅して塩基配列を解読する方法、すなわちダイレクト・シーケンシング法によって決定される。我々も ADAMTS13 遺伝子に対して定法にしたがい、各エクソンの外側に PCR プライマーを設計し、検体 DNA から各エクソンを選択的に増幅させ、その塩基配列を決定してきた。

これまでに奈良県立医科大学輸血部と共同でダイレクト・シーケンシング法による遺伝子解析を行った USS 患者は 49 名 (43 家系) であるが、うち 46 名 (40 家系) に複合ヘテロ接合性あるいはホモ接合性の非同義変異 (ミスセンス、ナンセンス、フレームシフト、スプライシング異常) を同定することができた。ADAMTS13 遺伝子の両アレルに非同義変異が存在することは、劣性遺伝形式を示す USS の発症をうまく説明することができる。しかしながら、残りの患者 3 名 (3 家系) のうち、2 名には 1 アレルしか非同義変異が検出されず、1 名には変異が全く検出されなかった。ダイレクト・シーケンシング法では、比較的大きな欠失等の遺伝子異常を見逃す可能性がある。

そこで本研究では、ダイレクト・シーケンシング法を補完することを目的とし、定量 PCR を利用する解析と次世代シーケンサーを利用する解析を試みた。

B. 研究方法

ダイレクト・シーケンシング法では、ある種の遺伝子異常を見逃す可能性がある。ダイレクト・シーケンシング法を補完する目的で、しばしば Multiplex Ligation-dependent Probe

Amplification (MLPA) 法やアレイ Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法が利用されるが、これらにおいても、検出プローブから外れた領域の変異は見逃されるため、ダイレクト・シーケンシング法を完全に補完できるとは言えない。

そこで本研究では、ゲノム DNA を鋳型とするリアルタイム定量 PCR に独自の工夫を加え、ダイレクト・シーケンシング法を効果的に補完できる解析法を開発した。その工夫とは、定量 PCR で用いるプライマーとして、定量 PCR に適した比較的小さいエクソン領域 (<~500 bp) に対してはダイレクト・シーケンシング法と同一のプライマーペアを、定量 PCR に不向きな大きい領域 (>~500 bp) に対してはダイレクト・シーケンシング法と同一のプライマーと新たに設計したプライマーのペアを使用することである。この定量 PCR 法とダイレクト・シーケンシング法を組み合わせれば、標的エクソン領域内で生じる異常を見逃す可能性がなくなる。一定量の DNA 試料に対してリアルタイム定量 PCR を行い、標的領域ごとの反応の cycle threshold (Ct) 値を算出し、試料間の Ct 値を比較することで、エクソン領域の相対的コピー数を分析した。Ct 値が 1 大きければその領域のヘテロ接合性欠損を、Ct 値が 0.58 小さければその領域のヘテロ接合性重複を意味する。

また、ダイレクト・シーケンシング法と定量 PCR 法で変異が検出されなかった患者家系を対象に、いずれの方法でも解析対象外であったイントロン領域をすべて含む ADAMTS13 遺伝子全体 (約 45 kbp) の塩基配列を次世代シーケンサーで解析

した。ong-range PCR により、ADAMTS13 遺伝子全体を互いにオーバーラップする 6 個の断片（それぞれ約 10 kbp 長）に分けて増幅調製し、それらを等モル比で混合したのち、次世代シーケンサーシステム MiSeq（イルミナ社）に供した。

（倫理面への配慮）

本研究は国立循環器病研究センターおよび奈良県立医科大学の倫理委員会で研究計画の承認を受けた上で実施した。研究参加者からは書面でのインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

ダイレクト・シーケンシング法で発症要因が特定できなかった USS 患者 3 名に対し、本研究で開発した定量 PCR 法を行った。その結果、1 名の患者ではエクソン 7 の一部とエクソン 8 が、別の 1 名の患者ではエクソン 27 が、それぞれ片側アレルで欠失していることが明らかになった。両患者の DNA で PCR マッピングを行ったところ、エクソン 7 の一部とエクソン 8 の欠失は c. 746_987+373del と表記される 1,782 bp の欠失であり、エクソン 27 の欠失は c. 3751_3892+587del と表記される 729 bp の欠失であることが明らかになった。

c. 746_987+373del を保有する患者は、すでにダイレクト・シーケンシング法でミスセンス変異 p. G550R を保有していることがわかっていたため、両変異の複合ヘテロ接合体であることが予想された。同患者の両親の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、患者の複合ヘテロ接合性を確認した。同様に、c. 3751_3892+587del を保有する

患者はミスセンス変異 p. C281S を保有していたため、上述の患者と同様に両変異の複合ヘテロ接合性を確認した。

本研究で定量 PCR 法の解析対象となった 3 名のうち 1 名の患者では、ダイレクト・シーケンシング法だけでなく、定量 PCR 法による解析でも遺伝子異常は検出されなかった。そこで、次世代シーケンサーを利用して患者および両親の ADAMTS13 遺伝子全体の塩基配列を解析した。ダイレクト・シーケンシング法の結果と同様、エクソン領域には原因と思われる異常は全く見つからなかった。イントロン領域には既知および新規の多様性が見られたが、少なくとも現時点において、USS 発症の原因につながると予想される変異は見出されなかった。

D. 考察

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、原因変異を特定することはきわめて重要である。次世代シーケンサーの普及に伴い、遺伝子解析の方法は変化していくと予想されるが、希少疾患で、かつ、USS のように責任遺伝子が限定されている場合、依然としてダイレクト・シーケンシング法がコスト面等で優れている。しかし、ダイレクト・シーケンシング法では見逃される遺伝子異常が存在し、そのために確定診断に疑問の余地が残る場合がある。

本研究では、ダイレクト・シーケンシング法で見逃される変異を捕捉する目的で、定量 PCR を利用した遺伝子解析を導入した。その結果、これまで検出できていなかった遺伝子欠失を 2 名の患者に見

出すことができた。USS の診断を支持する重要な成果である。国内外を通して、エクソンを含む大きな領域の欠失を ADAMTS13 遺伝子に見出したのは本研究が初めてである。49 名の USS 患者のうち 2 名が大きな領域の欠失をヘテロ接合性で保有するという事は、異常 ADAMTS13 遺伝子の約 2% にそのようなダイレクト・シーケンシング法で見逃される変異が存在することになる。この事実は、今後の USS 患者の遺伝子解析に対して有用な影響を与えると思われる。

ダイレクト・シーケンシング法、定量 PCR 法、次世代シーケンシング法のいずれにおいても ADAMTS13 遺伝子に異常が見出されない患者が 1 名残った。この患者には、これらの方法で検出できないタイプの遺伝子異常（例えば逆位や転座等）が ADAMTS13 遺伝子に存在する、あるいは ADAMTS13 の合成や分泌等に関わる他の遺伝子に原因が存在するという可能性が考えられる。

E. 結論

USS 患者の ADAMTS13 遺伝子解析において、定量 PCR を利用した解析法を導入することにより、ダイレクト・シーケンシング法では検出できなかった遺伝子異常を発見することができた。定量 PCR 法の開発および新規変異の発見は高く評価され、国際誌 *Molecular Genetics & Genomic Medicine* に原著論文として掲載された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masanobu Morioka, Masanori Matsumoto, Makoto Saito, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfus*, in press.

Masashi Akiyama, Daisuke Nakayama, Soichi Takeda, Koichi Kokame, Junichi Takagi, Toshiyuki Miyata: Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism. *J Thromb Haemost*, 11 (7), 1399-1406 (2013)

Yoshie Takizawa, Yukiko Kosuge, Hiroyo Awaji, Emi Tamura, Ayako Takai, Takaaki Yanai, Reiko Yamamoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Rieko Nakata, Hiroyasu Inoue: Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), silent mating type information regulation 2 homologue 1 (SIRT1) and autophagy-related genes by repeated treatments with resveratrol in human umbilical vein endothelial cells. *Brit J Nutr*, 110 (12), 2150-2155 (2013)

Yusuke Satoh, Takafumi Yokota, Takao Sudo, Motonari Kondo, Anne Lai, Paul W. Kincade, Taku Kouro, Ryuji Iida, Koichi

- Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoko Habuchi, Keiko Matsui, Hirokazu Tanaka, Itaru Matsumura, Kenji Oritani, Terumi Kohwi-Shigematsu, Yuzuru Kanakura: The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages. *Immunity*, 38 (6), 1105-1115 (2013)
- Koki Mise, Yoshifumi Ubara, Masanori Matsumoto, Keiichi Sumida, Rikako Hiramatsu, Eiko Hasegawa, Masayuki Yamanouchi, Noriko Hayami, Tatsuya Suwabe, Junichi Hoshino, Naoki Sawa, Kenichi Ohashi, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Kenmei Takaichi: Long term follow up of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) on hemodialysis for 19 years. *BMC Nephrol*, 14, 156 (2013)
- Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Hata: Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*, 40 (1), 247-249 (2014)
- Shohei Shinozaki, Tsuyoshi Chiba, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Eiji Kaneko, Kentaro Shimokado: A deficiency of Herp, an endoplasmic reticulum stress protein, suppresses atherosclerosis in apoE knockout mice by attenuating inflammatory responses. *PLoS One*, 8, e75249 (2013)
- Riccardo Bernasconi, Carmela Galli, Koichi Kokame, Maurizio Molinari: Auto-adaptive ER-associated degradation defines a pre-emptive unfolded protein response pathway. *Mol Cell*, 52 (6), 783-793 (2013)
- Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, Koichi Kokame, Yaacov Barak, Yoel Sadovsky: NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology*, in press.
- Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiro Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata: Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Mol Genet Genomic Med*, in press.
- 小亀浩市. ADAMTS13 と血栓性血小板減少性紫斑病. *循環器病研究の進歩*, 34 (1), 69-75 (2013)
- 藤村吉博, 松本雅則, 石西綾美, 八木秀

男, 小亀浩市, 宮田敏行: 血栓性血小板減少性紫斑病. 臨床血液, 55 (1), 93-104 (2014)

小亀浩市, 樋口由佳: Upshaw-Schulman 症候群の ADAMTS13 遺伝子解析. 細胞, 46 (2), 61-63 (2014)

2. 学会発表

小亀浩市, 秋山正志, 宮田敏行: ADAMTS13 の正常な分泌にはシクロフィリン B によるプロリン残基異性化が必要である. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日

坂野史明, 喜多俊行, 柳本広二, 田嶋優子, 小亀浩市, 宮田敏行: プロテイン S 徳島 (PS-K196E) 変異ノックインマウスの樹立と解析. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日

小堺貴司, 森山雅人, 布施一郎, 柴崎康彦, 増子正義, 瀧澤淳, 鳥羽健, 吉田邦彦, 小亀浩市, 宮田敏行, 松本雅則, 藤村吉博, 曾根博仁: 妊娠を契機に診断された新規の遺伝子変異を伴う Upshaw-Schulman 症候群 (USS) の一例. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日

土井政明, 松井英人, 竹田征治, 斎藤能彦, 武田麻衣子, 松成泰典, 西尾健治, 嶋緑倫, 坂野史明, 秋山正志, 小亀浩市, 宮田敏行, 杉本充彦: マウス急性心筋梗塞モデルにおける ADAMTS13 の心筋保護作

用. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日

Koichi Kokame: Quantitative PCR-based analysis of ADAMTS13 genetic defects. The 59th Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Amsterdam, The Netherlands, June 29-30, 2013.

Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiro Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, and Toshiyuki Miyata: Quantitative PCR assay demonstrated exon deletions of ADAMTS13 in two unrelated patients with Upshaw-Schulman syndrome. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, The Netherlands, June 29-July 4, 2013.

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, and Toshiyuki Miyata: Exacerbated venous thromboembolism in mice with the protein S Tokushima mutation. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, The Netherlands, June 29-July 4, 2013.

樋口 (江浦) 由佳, 小亀浩市, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: 血栓性血小板減少

性紫斑病患者の ADAMTS13 遺伝子に伏在していた変異の発見：ゲノム DNA を用いた定量 PCR 法の開発. 第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 豊中, 2013 年 8 月 16-17 日

樋口 (江浦) 由佳, 小亀浩市, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: 日本における先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子解析. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013 年 9 月 11-13 日

Yoshihiro Fujimura, Yumi Yoshii, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Masaki Hayakawa, Yoko Yoshida, Hideo Yagi, Koichi Kokame, and Toshiyuki Miyata: A long-term phenotype analysis of 51 patients with Upshaw-Schulman syndrome in Japan, with special references to pregnancy and renal failure that requires hemodialysis. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

特発性血栓症サブグループ

グループリーダー：小嶋 哲人 名古屋大学医学部 教授
研究分担者：坂田 洋一 自治医科大学医学部 教授
 宮田 敏行 国立循環器病研究センター研究所 部長
 川崎 富夫 厚生会第一病院 健康医学研究所 所長
 横山 健次 慶應義塾大学医学部 講師
 小林 隆夫 浜松医療センター 院長
 榛沢 和彦 新潟大学大学院 講師
研究協力者：中村 真潮 三重大学大学院 教授
 山田 典一 三重大学大学院 講師
 太田 寛史 三重大学大学院 助教
 平井 久也 浜松医療センター 副医長
 尾島 俊之 浜松医科大学 教授
 杉浦 和子 浜松医科大学 博士課程

平成25年度（総括）研究報告書

特発性血栓症サブグループ研究

グループリーダー：小嶋 哲人 名古屋大学大学院
研究分担者：坂田 洋一 自治医科大学
宮田 敏行 国立循環器病研究センター
川崎 富夫 厚生会第一病院
横山 健次 慶應義塾大学
小林 隆夫 浜松医療センター
榛沢 和彦 新潟大学大学院
研究協力者：中村 真潮 三重大学大学院／山田典一 三重大学大学院
太田 覚史 三重大学 / 平井久也 浜松医療センター
尾島 俊之 浜松医科大学 / 杉浦和子 浜松医科大学

研究要旨

本研究班における特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症のエビデンス収集とともに、その発症要因や発症メカニズムを明らかにし、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防の対策確立を目的とする。数年来の本研究班活動を通じた特発性血栓症の診療・予後改善に向けた医療行政上の成果として、日本人に多いプロテインS異常症の診断に欠かせない「プロテインS活性測定検査の保険収載」、ならびに「ヘパリン在宅自己注射の保険適用」があげられる。また、個別研究として「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症の全国調査研究」、「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」、「日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略に関する研究」、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」、「日本人の血栓性遺伝素因プロテインS K196E 変異の地理的分布」、「特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法の有効性と安全性に関する臨床研究」、「日本人血栓症患者における血栓性素因の調査研究」、「Bortezomib が巨核球、血小板に与える影響の解析、および多発性骨髄腫患者における静脈血栓塞栓症発症の解析」、「震災後の静脈血栓塞栓症に関する長期的観察研究」が行われた。

A. 研究目的

本研究班における特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症の日本人でのエビデ

ンスを収集するとともに、静脈血栓塞栓症の発症原因と発症メカニズムを明らかにし、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予

知・予防のための対策確立を目的とする。

B. 研究方法

特発性血栓症研究班／静脈血栓症サブグループ研究は、全国の医療施設を対象にしたアンケート調査研究と日本人静脈血栓塞栓症患者を対象とした調査研究等から構成される。本年度の各個研究においては、それぞれ「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症の全国調査研究」、「日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略に関する研究」、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」、「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」、「日本人の血栓性遺伝素因プロテイン S K196E 変異の地理的分布」、「特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法の有効性と安全性に関する臨床研究」、「日本人血栓症患者における血栓性素因の調査研究」、「Bortezomib が巨核球、血小板に与える影響の解析、および多発性骨髄腫患者における静脈血栓塞栓症発症の解析」、「震災後の静脈血栓塞栓症に関する長期的観察研究」が行われた。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針および疫学研究の倫理指針に則り、また、遺伝子解析研究においても「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して、各施設の倫理委員会の承認を得た後に実施した。研究対象者には人権を配慮し、研究への参加は自由意思で書面にてインフォームドコンセントを得て施行した。

C. 研究結果

全国の医療施設を対象にしたアンケート調査研究として「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症の全国調査研究」では、9383施設(医育機関 2797 講座, 病院 6586 施設)にアンケートを送付した結果、推定で肺血栓塞栓症は年間 16096 件、深部静脈血栓症は 24538 件発症しており、経年的に増加していることが示された。また、「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」では、9,318 診療科の一次調査(回収率 44.2%)、「症例あり」回答の 500 診療科に対し二次調査(現時点での回答率は 68.2%)を行っており、得られた調査結果を今後解析する予定である。「日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略に関する研究」では、止血検査精度の向上と血栓予防・治療薬の安全性の向上に貢献した。「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」では、VTE 高リスク患者の APC-sr および PS 抗原と PS 活性の比活性測定が VTE 予知に寄与する可能性が判明した。「日本人の血栓性遺伝素因プロテイン S K196E 変異の地理的分布研究」では、本変異は日本人にだけ見られる血栓性遺伝子変異で比較的新しく生じたものと考えられることが示された。「特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法の有効性と安全性に関する臨床研究」では、ワルファリン療法における PT-INR 自己測定の実施は、安全で有効な手法であることを明らかにした。「日本人血栓症患者における血栓性素因の調査研究」では、*SERPINC1*、*PROC*、あるいは *PROS1* 遺伝子変異の発見率は欧米諸国の知見と同様、AT 欠損症 > PC 欠損症

>PS 欠損症の順であったことが報告された。「Bortezomib が巨核球、血小板に与える影響の解析、および多発性骨髄腫患者における静脈血栓塞栓症発症の解析」では、Bortezomib は血小板機能に影響を与えるものの、巨核球分化、血小板産生には影響を与えなかったこと、また多発性骨髄腫患者の VTE 発症率は欧米の報告と同等であること、が報告された。「震災後の静脈血栓塞栓症に関する長期的観察研究」では、震災後の DVT は様々な因子によるものである。しかし自家用車による車中泊避難は本研究により国内外で危険性が特に高いことが示唆された。

D. 考察

数年来の本研究班活動を通じた「日本人に多いプロテイン S 異常症の診断に欠かせないプロテイン S 活性測定検査の保険収載」、ならびに「ヘパリン在宅自己注射の保険適用」の医療行政上の成果は、日本人での特発性血栓症での診療・予後改善に寄与することが期待される。今年度の全国調査研究では特に肺血栓塞栓症の経年的増加が示され、また周産期血栓症にも関わる女性ホルモンと血栓症の関連調査では日本人における貴重なエビデンスの収集が期待される。肺血栓塞栓症の予防・診断・治療ガイドラインは国民を対象としたもので、患者のみならず社会のメリットが最大限になることが求められる。APC-sr および PS 比活性測定が日常臨床で応用されれば入院患者における VTE 予知に寄与でき、厚労行政にとって大きなメリットとなることが期待できる。プロテイン S K196E 変異は日本人特有の

血栓性素因であることが示され、その簡便な診断法が開発され日本人の特発性血栓症予防医療に生かされることが期待される。日本人患者におけるワルファリン療法中の PT-INR の自己測定は安全で有効な手法であると考えられ、今後の普及が期待される。AT 欠損症、PC 欠損症、PS 欠損症でのそれぞれ正確な遺伝子変異診断は病態解析に重要と思われる。多発性骨髄腫患者では欧米人と同様に VTE 発症に注意が必要と思われる。震災後の車中泊は欧米においても肺塞栓症発症の危険性が明らかになり、震災後の車中泊時では肺塞栓症予防が特に重要と思われる。

E. 結論

日本人での静脈血栓塞栓症のエビデンスを収集するとともに、その発症原因・発症メカニズムの解明は、我が国における特発性血栓症の予知・予防のための対策確立に重要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura M, Miyata T, Ozeki Y, Takayama M, Komori K, Yamada N, Origasa H, Satokawa H, Maeda H, Tanabe N, Unno N, Shibuya T, Tanemoto K, Kondo K, Kojima T: Current venous thromboembolism management and its outcomes in Japan: the nationwide JAVA observational study. *Circ J*. 2014

- in press.
- 2) Murata M, Takagi A, Suzuki A, Okuyama E, Takagi Y, Ando Y, Kato I, Nakamura Y, Murate T, Matsushita T, Saito H, Kojima T: Development of a new laboratory test to evaluate antithrombin resistance in plasma. *Thromb Res.* 133(2): 293-298, 2014.
 - 3) 安藤裕実、小嶋哲人: 新規抗凝固薬 (抗Xa、抗トロンビン薬) のポテンシャル 血液疾患 最新の治療 2014-2016 直江知樹、小澤敬也、中尾眞二編 南江堂 東京 pp54-58, 2014.
 - 4) 小嶋哲人: 血栓症・血栓性素因の臨床検査 日本内科学会雑誌 102(12), 3147-3153, 2013.
 - 5) 村田萌、小嶋哲人: アンチトロンビンレジスタンス *International Review of Thrombosis* 8(4), 30-33, 2013.
 - 6) Djordjevic V, Kovac M, Miljic P, Murata M, Takagi A, Pruner I, Francuski D, Kojima T, Radojkovic D.: A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia- the first cases of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost.* 2013 Oct;11(10):1936-9.
 - 7) 小嶋哲人: 凝固障害、線溶障害 改訂第8版 内科学書 Vol. 6 血液・造血器疾患、神経疾患 小川聡編 中山書店 東京 pp187-192, 2013.1
 - 8) 高木 明、小嶋哲人: 凝固因子 臨床に直結する血栓止血学 朝倉英策編 中外医学社 東京pp67-69, 2013.
 - 9) Suzuki N, Kunishima S, Ikejiri M, Maruyama S, Sone M, Takagi A, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T, Matsushita T. Establishment of Mouse Model of MYH9 Disorders: Heterozygous R702C Mutation Provokes Macrothrombocytopenia with Leukocyte Inclusion Bodies, Renal Glomerulosclerosis and Hearing Disability. *PLoS One.* 2013 Aug 20;8(8):e71187.
 - 10) 竹下享典、小嶋哲人: 動脈硬化、血栓性疾患の発症と予防における抗凝固薬の役割 動脈硬化予防 12(2), 85-93, 2013.
 - 11) Okuyama E, Suzuki A, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito H, Kojima T: Molecular mechanisms of syndecan-4 upregulation by TNF- α in the endothelium-like EAhy926 cells. *J Biochem.* 2013 Jul;154(1):41-50.
 - 12) Fukuda T, Kamisato C, Honda Y, Matsushita T, Kojima T, Furugohri T, Morishima Y, Shibano T.: Impact of antithrombin deficiency on efficacy of edoxaban and antithrombin-dependent anticoagulants, fondaparinux, enoxaparin, and heparin. *Thromb Res.* 2013 Jun;131(6):540-6.
 - 13) Mizutani N, Kobayashi M, Sobue S,