

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

血栓塞栓症家系の遺伝的素因に関する研究  
～ 小児・周産期領域における三大抗凝固因子の遺伝子解析 ～

研究分担者

康 東天 九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学 教授  
落合 正行 九州大学病院総合周産期母子医療センター新生児内科部門 助教  
福嶋 恒太郎 九州大学病院総合周産期母子医療センター母性胎児部門 講師  
大賀 正一 九州大学大学院医学研究院・周産期小児医療学 教授

研究協力者

堀田 多恵子 九州大学病院検査部 技師長  
浦田 美秩代 九州大学病院検査部 副技師長  
古賀 結 九州大学病院検査部 技師

**研究要旨**

日本人小児血栓症の遺伝的素因を明らかにするため、小児期発症のプロテイン S (PS)、プロテイン C(PC)及びアンチトロンピン(AT)欠乏症患者の遺伝子解析を行った。研究班発足2年目は、全国より34家系の血栓症およびその疑い(両親か同胞に血栓症あり)の相談を受けPC欠乏症20家系(4家系解析中)、PS欠乏症10家系およびAT欠乏症4家系の解析を終了した。小児例は*PROC*変異7名(全て発症 ホモ2、複合ヘテロ3、ヘテロ2)、*PROS1*変異1名(発症 ホモ)および*SERPINC1*変異(全て未発症ヘテロ)を4名同定した。PC欠損症20家系のうち10名は日齢7までの早期新生児、2名は新生児発症であった。PC活性が低いが*PROC*変異のない患児を9名同定した。10歳まで未発症の*PROC*複合ヘテロ変異の男児と17歳で深部静脈血栓症を発症した*PROS1*ホモ変異の男児を診断した。*PROS1*ホモ変異の男児に家族歴はなく、血縁のない両親は未発症で*PROS1*ヘテロ変異を有していた。我々が過去30年に確認した小児遺伝性PC欠損症患者18名(遺伝子解析による変異同定は9名: Haemophilia 2013)の10年分に相当する症例を単年度に遺伝子診断することができた。小児血栓症において新生児発症PC欠損症が最も主要な遺伝性血栓症である。

**A. 研究目的**

PS、PC及びAT欠乏症のうち日本人成人ではPS欠乏症が最も頻度の高い遺伝性血栓性素因である。日本人小児ではPC欠乏症の頻度が高いことが示唆されたが、極めて稀なためこの3大遺伝性血栓症に関する疫学情報は十分明らかでない。新規診断例の家族解析を進め、各因子活性と遺伝子解析の結果から、小児期における遺伝性血栓症の頻度と臨床的特徴を検討した。

**B. 研究方法**

1. PS, PC, AT活性測定と各遺伝子解析  
血漿PCおよびPS活性はSTA試薬シリーズ

プロテインC(クロット)、プロテインS(クロット)(Stago/ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いて各々測定した。AT活性はエルシステム・AT (シスメックス)を用いた。

*PROC*のexon1-9をPCRで増幅し、ABI PRISM3100 Genetic Analyzer(ライフテクノロジーズジャパン)にて直接法により塩基配列を決定した。PSおよびAT活性の低かった患者には、*PROS1* (exon 1-15)と*SERPINC1*(exon 1-7)解析も行った。健常成人保存血漿の $\pm 2SD$ を成人の基準範囲とし、 $<3SD$ を下とした(Clin Biochem 2005;38:908-15)。(倫理面への配慮)

遺伝子解析は倫理委員会承認(#232-02,

#448-00)の同意書を取得し、末梢血白血球由来DNAを用いて行った。遺伝性血栓症と診断した患者家族も同意を得て家系内の解析を行い、遺伝カウンセリングを行った。

## 2. 新規診断例の家系解析

本研究班設立2年目(2013年)は、小児PC欠乏症による血栓症を疑われた非血縁20家系の20歳未満の20患者(2未発症者を含む)の相談を受け血栓性素因スクリーニング(APSなど後天性も含む)と遺伝子解析を行った。またPS欠乏10家系とAT欠乏4家系の小児とその両親を対象に、この血栓性素因解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 3因子活性値によるスクリーニング

小児の3因子活性スクリーニングの方法については、初年度報告書の成果(現在投稿中)に従い各活性下限値を定義した。その後症例の集積とともに、3か月までの新生児から乳児早期におけるPCおよびPS活性値は再定義の必要性があると考えられたため、表1のようにスクリーニング下限値を設定した。発症時の消費性凝固障害とビタミンK欠乏によるPCおよびPS活性への影響から、とくにPC/PS活性比を考慮して解析を広く行った。

表1. 年齢別各因子活性の下限値の定義

年齢	PC	PS	AT
0-3か月	<45% (a)	<42% (a)	<52% (b)
3か月-2歳	<64% (c)	<51% (c)	<52% (b)
3-6歳	<64% (c)	<51% (c)	<68% (c)
7-20歳	<75% (d)	<60% (d)	<80% (d)

成人下限活性値(PC 75%, PS 60%, AT80%)の  
a:60%, b:65%, c:85%およびd:100%未満に相当する活性値

### 2. PC欠損症例

20名の臨床的背景とPC活性、PS活性、PROC変異の有無および両親の解析結果を表2に示す。4名は遺伝子解析予定または解析中であるが、16名の解析が終了した。PROC変異を同定した7名は全て発症し、ホモ1、複合ヘテロ3およびヘテロ2で新規未報告変異はなかった。PC欠損症20家系のうち10名は日齢7までの早期新生児、2名は発症

日の詳細が不明であるが新生児発症であった。PC活性が低いがPROC変異のない患児を9名同定した。変異を同定した患者の家族解析を行ったところ、患児のde novo発症はなく、両親のどちらかに変異が確認された。電撃性紫斑病での発症は3名であった。

10歳まで未発症のPROC複合ヘテロ変異の男児は、1)母がPC欠損による16歳発症の深部静脈血栓症であったこと、2)症候性てんかんを有していたこと、から明らかな血栓症患者ではなかったが、解析した。母はこのヘテロ変異であることが確認され、血栓症既往のない父は推定ヘテロ変異として現在解析中である。このPROC複合ヘテロ変異の男児はPC活性が27%で、母の活性に近く、今後思春期にかけて血栓発症のリスクがあると予想され、カウンセリングを行った。

### 3. PS欠損症例

PS欠損例は10例の相談を受け、うち20歳未満は3例であった。PS欠損の家族歴(変異確定)を有する健常1歳児にPROS1変異はなかった。もう1名の健常1歳児は、母がPS欠乏であったがこの家系にPROS1変異はなかった。17歳で深部静脈血栓症を発症したPROS1ホモ変異の男児を診断した。このPROS1ホモ変異の男児に家族歴はなく、血縁のない両親は血栓症は未発症でPROS1ヘテロ変異を有していた。23歳で肺梗塞を発症したPROS1ヘテロ変異の男性を診断した。この母はこのヘテロ変異を有する未発症者で、健常弟にもこの変異はなかった。5名のPS活性低下を示した不育症母のPROS1遺伝子解析を行ったが変異はなかった。確認された変異は全て既報告で、変異のなかった1名にPlasminogen Tochigiを同定した。

### 4. AT欠損症例

AT欠損例は4家系9名の遺伝子解析を行った。小児は5名のうち4名は未発症健常児、もう1名は肝移植後の児であったが末梢血由来DNAにSERPINC1変異は認められなかった。成人は4名で1名の未発症以外は、DVTを発症していた。9名中8名に既報告のSERPINC1ヘテロ変異を認めた。

表2. 2013年に解析した新生児小児PC欠乏症

年齢	性	周産期情報	初発症状	PC 活性	PS	PROC 変異	両親の解析
日齢0	男	39週 2978g Ap 5/7	臍帯血栓、肺高血圧、多嚢胞脳軟化	46%	(8か月) 94%	なし	
日齢0	女	34週 1296g Ap8/9	脳実質内出血	17%	43%	なし	
日齢0	男	36週 2810g Ap3/5	新生児仮死 哺乳不良	11%	43%	なし	
日齢0	女	36週胎児仮死	脳室内出血	<10%		解析予定	母 PC 活性 56%
日齢2	男*	詳細不明	電撃性紫斑、頭蓋内、硝子体出血	4%	freePS 74%	ホモ	両親ヘテロ
日齢2	男	38週 2938g 仮死なし	頭蓋内出血、両網膜下出血	<10%	未検	複合ヘテロ	両親ヘテロ
日齢2	女	38週 3225g Ap6/9	無呼吸、左 MCA 梗塞	23%	46%	なし	
日齢4	男*	なし	電撃性紫斑病 両鎖骨下静脈血栓	15%		解析中	両親活性正常
日齢6	男	38週	在胎 34週頃に水頭症			なし(PS変異もなし)	
日齢7	男	37週 2502g Ap7/9	無呼吸遷延、脳梗塞	27%	52%(抗原)	なし	両親活性正常
新生児	男	新生児	電撃性紫斑、頭蓋内	11歳	Warfarin 中	ホモ	両親推定ヘテロ
新生児	詳細不明		新生児脳室内出血	<10%		複合ヘテロ	
7か月	男	なし	右上肢麻痺 陳旧性脳梗塞	50%	未検	なし	
1歳	男	なし	脳梗塞	43%	58%	ヘテロ(PS変異なし)	父ヘテロ
1歳6月	男	39週 2683g Ap7/8	仮死 DIC 一過性 PC 欠乏	16%→72%	44%→79%	解析予定	
2歳	女	なし	乳児 ALL 治療中肺小動脈多発血栓	37%	51%	なし(AT変異もなし)	
4歳	男	なし	頭痛 上矢状静脈洞血栓	62%	73%	解析予定	両親活性低下
10歳	女	なし	胆道閉鎖,PDA ,VitK 投与後低 PCPS	36%	57%	なし(PLG 栃木)	
10歳	男	39週 3752g 異常なし	症候性てんかん	27%	73%	複合ヘテロ	母 DVT ヘテロ
14歳	男	なし	未発症	39%	90%	ヘテロ	家族歴有り

\* 日本人以外

## D. 考察

本研究班設立後2年目の単年度に、私たちが過去30年に網羅的に検索した国内報告小児遺伝性PC欠損症患者18名(遺伝子解析による変異同定は9名: Haemophilia 2013)に相当する20名を見出し、うち7名に既報告PROC変異を同定した。さらに9名はdirect sequencingで変異がないことが確認された。両親の解析からこれら変異例にはde novo発症がないことも明らかとなった。

これまでの結果から全体の25%に変異のないPC活性単独低下例があることが想定されていたが、今回はこれがほぼ半数に達した。とくに3か月未満の活性値によるスクリーニングを厳しく再設定しながらも、遺伝子解析を広く行った。このことから、PROC変異のない単独PC欠乏症の存在がより明確となり、想定された頻度よりも高いことが示唆された。

小児・新生児PC欠乏症の臨床像としては電撃性紫斑病よりも頭蓋内出血・梗塞が多いことも症例集積から明らかになった。さらに患児診断から、未発症両親の早期診断に繋がった例も少なくなかった。

一方、PS欠乏症とAT欠乏症の小児期発症血栓患者は極めて少なく、発症例の臨床

像は、成人DVTの早期発症型であった。変異例はほぼ全例に家族歴を有していた。PS活性の低い不育症の母にPROC変異が認められる頻度は、日本人一般集団の推定変異保有率から高くないことが伺われた。

## E. 結論

小児遺伝性血栓症は、新生児発症型であるPC欠乏症と小児発症型のPSおよびAT欠乏症に分けてスクリーニングを行い、その診断指針を作成することが必要であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, on behalf of the Japan Childhood Thrombophilia Study Group. Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int* 55(3): 267-71, 2013
- Ohga S, Kang D, Kinjo T, Ochiai M, Doi T, Ishimura M, Kayamori Y, Urata M, Yamamoto J, Suenobu S, Kanegane H, Ikenoue T, Shirahata A, Hara T: Pediatric presentation and treatment of c

- ongenital protein C deficiency in Japan. Haemophilia 19(3):378-84, 2013
- 3) Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Kenji I, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Taguchi T, Hara T: Clinical outcome of extremely low birth weight infants born at GW22-26: a report from a single institution in Japan. Neonatology 105(2):79-84, 2014
- 4) Hoshina T, Nakashima Y, Sato D, Nishii E, Nishio H, Nakgata H, Yamamura K, Doi T, Shiokawa Y, Kang D, Ohga S, Hara T: Staphylococcal endocarditis as the first manifestation of heritable protein C deficiency in childhood. J Infect Chemother 2013 (in press)
- 5) Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Fukumoto Y, Ito N, Doi T, Kang D, Hara T: Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of severe protein C deficiency. J Perinatol 33(3): 239-41, 2013
- 6) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusahara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. Pediatr Development Pathol 15(2):151-155, 2012
- 7) Unal S, Gumruk F, Yigi S, Tuncer M, Tavi B, Cil O, Takci S, Urata M, Hotta T, Kang D, Cetin M: A novel mutation in protein C gene (PROC) causing severe phenotype in neonatal period. Pediatr Blood Cancer 61(4):763-4, 2014
- 8) Uchiumi T, Tanamachi H, Kuchiwaki K, Kajita M, Matsumoto S, Yagi M, Kanki T, Kang D: Mutation and functional analysis of ABCC2/multidrug resistance protein 2 in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. Hepatol Res 43(5):569-75, 2013
- 9) Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, Sasaki K, Futamata N, Fukui D, Mawatari K, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Nakamura K, Kang D, Yajima T, Knowlton KU, Imaizumi T: Cardiac-specific deletion of SOCS-3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 28: 59(9):838-52, 2012
- 10) Anami A, Fukushima K, Takasaki Y, Sumida T, Waguri M, Wake N, Murashima A: The predictive value of anti-SS-A antibodies titration in pregnant women with fetal congenital heart block. Mod Rheumatol 23(4):653-8, 2013
- 11) 市山正子、大賀正一、松永友佳、金城唯宗、落合正行、堀田多恵子、浦田美秩代、古賀結、西村美香、康東天、原寿郎：小児遺伝性血栓症スクリーニングのためのprotein C, protein S及びantithrombin活性値日本産婦人科・新生児血液学会誌2013; 23(1):25-2
- ## 2. 学会発表
- 1) Ohga S. Salvage treatment of refractory LCH and HLH. The 54th Meeting of Korean Society of Hematology, Korea Histiocytosis Working Party Symposium, Changwon, Korea, November 8-9, 2013. (invited speaker)
- 2) Ohga S. Heritable thrombophilias in Japanese children. The 5th Congress of East Asia, Hemophilia Forum (EAHF), Seoul, Korea, September 7-8, 2013. (Invited speaker)
- 3) 大賀正一 診断指針作成のためのパブリックオピニオンを聴く会 新生児血栓症 第23回日本産婦人科・新生児血液学会 奈良市, 2013年6月8日
- 4) 康東天「臨床検査医/検査部長の立場から望むこと:臨床検査学サイエンティストの養成」第60回日本臨床検査医学会学術集会, (招待講演) 2013年11月1日, 神戸市.
8. 康東天「項目コード(JLAC10)を用いた多施設間検査情報のための取り組みと問題点」第60回日本臨床検査医学会学術集会, (招待講演) 2013年11月1日, 神戸市.
- 5) 市山正子、大賀正一：胎児水頭症から診断された症例. 平成25年度 第1回 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「小児新生児期における遺伝性血栓症の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」班会議 奈良市, 2013年6月8日
- 6) 大賀正一 新生児血栓症研究～現在までの解析結果とスクリーニング法について～小児遺伝性血栓症スクリーニングのためのprotein C, protein S及びantithrombin活性値 平成25年度 第1回 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「小児新生児期における遺伝性血栓症の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」班会議 奈良市, 2013年6月8日
- 7) 市山正子、大賀正一、松永友佳、金城唯

宗、落合正行、堀田多恵子、浦田美秩代、古賀結、西村美香、康東天、原寿郎

小児遺伝性血栓症スクリーニングのためのprotein C, protein S及びantithrombin活性値. 第23回日本産婦人科・新生児血液学会 奈良市, 2013年6月8日

- 8) 石渡久子、西口康介、玉木久光、大森多恵、伊藤昌弘、三澤正弘、大塚正弘、長澤正之、大賀正一: 胎生期に脳梗塞を発症した先天性プロテインC欠乏症ヘテロ接合体の一例. 第116回日本小児科学会学術集会, 広島市, 2013.

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし