◆第 28 回学術集会 教育講演◆

日本人特有の血栓性素因

ープロテインS, プロテインC分子異常ー

濱崎直孝*

濱崎直孝

Japanese Thrombophilia

Protein S/Protein C Anomaly as the major risk factor for Japanese Thrombophilia

Naotaka HAMASAKI, M.D., Ph.D.

Key words: Deep vein thrombosis; protein S gene mutation;
protein C gene mutation; factor V Leiden;
Japanese thrombophilia; protein S Tokushima.

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 退職
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)
平成18年3月31日 九州大学大学院医学研究院を退職
平成18年4月1日 長崎国際大学薬学部教授

Coagulation factor V Leiden has not been detected in Japanese patients suffering from thromboses. We have performed a systematic investigation to find out genetic risk factors for thromboses in Japanese population. Routine coagulation and fibrinolysis tests were performed to determine the activities of protein S/C, antithrombin, plasminogen, heparin cofactor II and fibrinogen. Gene analyses were performed in thrombotic patients having the low activities of these factors and the constitutional background of Japanese thrombotic patients was systematically examined from the gene analyses.

Our study indicates that the frequency ($19/85=0.22$) of mutations of protein S gene in the Japanese patients was 5–10 times higher than that of mutations of protein S gene in Caucasian patients, and the frequency ($8/85=0.09$) of mutations of protein C gene was almost three times higher than that of Caucasian patients, suggesting that Protein S/Protein C Anomaly is the major risk factor for Japanese thrombophilia. It is interesting to note that the frequency of factor V Leiden (20–50%) in Caucasian deep vein thrombosis patients is similar to that (30%) of heterozygous gene mutations of the protein S/protein C anticoagulation system in Japanese deep vein thrombosis patients. Protein S_{Tokushima} (K155E) is another risk factor for deep vein thrombosis in Japanese population.

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が, 単一遺伝子異常が疾病発症と直接的に結びつかない疾患についての解析は不

十分であった。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¹⁾。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)

* 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学〔〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1〕

Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Graduate School of Medical Sciences Kyushu University

Tel: 092-642-5748 Fax: 092-642-5772 e-mail: hamasaki@cclm.med.kyushu-u.ac.jp

現: 長崎国際大学薬学部〔〒812-8582 佐世保市ハウステンボス町2825-7〕

Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Nagasaki International University

Tel: 0956-39-2020 Fax: 0956-39-3111

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、発症頻度が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。我々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。

2. 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。

3. 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²⁾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。

4. 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 産物を直接塩基配列を決定するのが結果的には早道である。

5. 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³⁾。静脈性血栓症は血栓の形成

表1 凝固制御因子の基準範囲と活性低下の定義

Criteria for Reduced Activity

Items	Reference intervals (mean $\pm$ 2SD)	Criteria for the reduced activity (low mean-3SD)	Number of healthy individuals examined	Number of 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.**

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。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。健康人では126名調べて1名のみが Protein S 活性低下を示している。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。

6. 深部静脈血栓症についての解析³⁾

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いことになる。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康人の

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。

7. 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 Protein S, Protein 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、Protein S 活性低下の頻度が高い。

8. 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。Protein S では19症例に、Protein C

表 2 深部静脈血栓症初発年齢表（九州大学病院検査部で調査した 85 名の患者について）

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	73		
	F	0	0	18	8	11	14	2	0		53	
Deep vein thrombosis (age of the first thrombosis)	M	1	9	9	11	6	5	7	1	45		
	F	0	2	9	10	7	3	5	2		40	
M: male; F: female.												

初発年齢: 20-30歳代にピーク

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

表 3 深部静脈血栓症患者における凝固制御系因子活性低下

Type of thrombosis	Examined patients	Number of patients having reduced activities of PS and/or PC	Numbers of patients having reduced activity 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が目立つ。

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

では 8 症例に、Antithrombin では 2 症例について遺伝子異常が見出された。日本人の深部静脈血栓症患者（85 名）の中で Protein 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。Protein 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。Antithrombin 分子異常は 2 症例、2.3% でこの頻度は欧米の頻度⁴⁾と同等である。

我々はこれら異常分子を HEK293 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⁵⁻¹¹⁾。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て良いと考えられる症例がほとんどである。

9. 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⁴⁾。この変異, Factor V Leiden, は遺伝子多型の一種で、この分子の凝固活性には全く異常がない。

表 4-1: 深部静脈血栓症患者と PS 遺伝子異常

	Patient No.	Age at first thrombosis	Sex	Kind of DVT	Activity (%)	Antigen Total	C4bBP (%)	Previous publication	Nucleotide Changes*	Amino Acid Mutated*
Protein S patients examined: n=39	PS 1	9	F	DVT	<10	50	148	New	IVS1-1 G>C	-
	PS 2	37	M	DVT, Mesenteric v.	10	58	100	New	IVS13-2 A>G	-
	PS 3	35	M	DVT, PE	33	90	142		Exon4 276 C>T	G54R
	PS 4	40	F	DVT, PE	34	63	105	New	Exon14 122 C>T	R520W
	PS 5	19	M	DVT	28	50	130	New	Exon15 183 A>G	Y595C
	PS 6	26	F	DVT, pregnancy	49	98	120	New	Exon7 288 G>C	E201Q
	PS 7	23	M	DVT	60	88	141	New	Exon15 165 C>T	T589I
	PS 8	16	M	DVT	33	46	91	New	Exon12 244 C>A	A450D
	PS 9	32	F	DVT	3	103	111	New	Exon6 340 G>T	E119X
	PS 10	39	F	DVT	19	84	161	New	Exon6 448 A>G	K155E
	PS 11	42	M	DVT, PE	35	94	127		Exon8 156 G>T	C206F
	PS 12	23	M	DVT	58	84	108		Exon6 448 A>G	K155E/K155E
	PS 13	63	F	DVT, Portal v.	38	78	80		Exon6 448 A>G	K155E
	PS 14	34	F	DVT, pregnancy	50	88	96		Exon6 448 A>G	K155E
	PS 15	22	M	DVT	6	42	103	New	Exon8 262 T>G	C241W
	PS 16 /PC 4	13	M	DVT	21	31	43	New	Exon10 227 G>T	E301X
	PS 17	66	F	DVT	48	79	103		Exon15 276 C>T	P626L
	PS 18	16	M	DVT, PE	11	35	106		Exon12 123 C>T	R410X
	PS 19	18	M	DVT	32	60	84		Exon13 218 C>T	R474C
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。

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

表 4-2: 深部静脈血栓症患者と PC 遺伝子異常

	Protein C	PC 1	25	F	DVT, portal v.	Activity (%)	Antigen (%)	Nucleotide Changes	
patients examined: n=23	PC 2	24	M	DVT	50	73		6218 C>T	R169W
	PC 3	63	M	DVT	34	81		8886 G>A	G391S
	PC 4/PS 16	13	M	DVT	18	31	New	8577 C>A	L288I
	PC 5	30	F	DVT	60	31	New	1330 C>T (IVS2 -4 C>T)	-
	PC 6	65	M	DVT	42	90		6152 C>T	R147W
	PC 7	55	F	DVT	59	68	New	6164-6166 del AAG	K151del
	PC 8	30	M	DVT	39	85	New	6164-6166 del AAG	K151del
						97		1387 C>T	R-1C
Healthy individuals examined: n=30									
	PC N1	30			63	88	New	6164-6166 delAAG	K151del

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。

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

表 4-3: 深部静脈血栓症患者と AT 遺伝子異常

Antithrombin	AT 1	41	F	DVT, PE	52	46	New	2495A>T	K11X
patients examined: n=6	AT 2	64	F	DVT	51	52	New	2511C>A	P16H
									2
				Healthy individuals examined: n=24/0					
*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,									

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

1-1 正常の場合

Factor V Leiden と Protein C/Protein 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。

1-2 白人血栓症の場合

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DVT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DVTの31％(我々のデータでは)である。

1-3 日本人血栓症の場合

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

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/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⁴⁾。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く⁴⁾。

しかしながら、第V因子異常分子Factor V Leidenは日本人には1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)。

10. 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たものは、凝固第XII因子の46C/T多型とProtein S徳島(K155E)がある³⁾¹²⁾。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)³⁾。

11. 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、ある特定な因子だけを調べ、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, Hamasaki N: Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem* **38** : 908-915, 2005.
- 4) Rosendaal FR: Risk Factors for Venous Thrombosis: Prevalence, Risk, and Interaction. *Semi. Hematol* **34** : 171-187, 1997.
- 5) Iida H, Nakahara M, Komori K, Fujise M, Wakiyama M, Urata M, Kinoshita S, Tsuda H, Sugimachi K, 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.
- 6) Tatewaki H, Iida H, Nakahara M, Tsuda H, Kinoshita S, Kanaji T, Yoshida N, Miyazaki S, 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.
- 7) Nakahara M, Iida H, Urata M, Fujise M, Wakiyama M, Kinoshita S, Tsuda H, Okamura T, Yao K, Yao T, 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.
- 8) Tsuda H, Urata M, Tsuda T, Wakiyama M, Iida H, Nakahara M, Kinoshita S, 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.
- 9) Watanabe K, Shibuya A, Ishii E, Kurihara M, Inoue S, Ono M, Wada Y, Wakiyama M, Zaitzu M, Iida H, Muraoka K, Kinoshita S, 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.
- 10) Kurihara M, Watanabe K, Inoue S, Wada Y, Ono M, Wakiyama M, Iida H, Kinoshita S, Hamasaki N: Characterization of two novel mutations of the antithrombin gene observed in Japanese thrombophilic patients. *Thromb Res* **115** : 351-358, 2005.
- 11) 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, ウォラワンチュンビア, 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.
- 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.