

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26305027

研究課題名(和文) アジア人固有の血栓症発症要因の病態解明と新たな予防治療戦略の確立

研究課題名(英文) Investigation into thrombophilia indigenous to Asian populations and establishment of new strategy for preventing thrombosis

研究代表者

津田 博子 (TSUDA, Hiroko)

中村学園大学・栄養科学部・教授

研究者番号：30180003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本、韓国、シンガポール、ハンガリー、ブラジルの研究者と国際学術調査体制を構築し、静脈血栓塞栓症(VTE)の遺伝的要因について検討した。PS Tokushimaは日本人のみに、PC p.Arg189Trp はシンガポールのVTE患者の20.5%、PC p.Lys193delは日本、韓国、シンガポールの患者の2.5%、5.5%、7.2%に同定したが、ハンガリー、ブラジル人には同定せず、人種差が明らかになった。血漿や肝細胞を用いた解析から、プロテインS、プロテインCの発現がグルコースやアポリポタンパク質と関連すること、血中プロテインS比活性測定系がDOACs内服の影響を受けないことを証明した。

研究成果の概要(英文)：We established the international investigation network with researchers in Japan, South Korea, Singapore, Hungary, and Brazil to elucidate the genetic risk factor for venous thromboembolism (VTE). Protein S Tokushima mutant allele is found in 4.2% of Japanese VTE patients, PC p.Arg189Trp mutant allele is in 20.5% of Singaporean patients, and PC p.Lys193del mutant allele is in 2.5%, 5.5%, 7.2% of Japanese, South Korean, and Singaporean patients, respectively, however neither of these mutant alleles was found in Hungarian and Brazilian patients, indicating the racial differences in genetic risk factors. The analyses using plasma and hepatocytes revealed that the expression of protein S and protein C is closely related with the metabolism of glucose and apolipoprotein. Finally, the protein S specific activity assay is found to be able to evaluate the thrombophilic state even on medication for direct oral anticoagulants.

研究分野：血栓止血学

キーワード：遺伝性血栓性素因 静脈血栓塞栓症 アジア人 プロテインS プロテインC 国際学術調査

1. 研究開始当初の背景

静脈血栓塞栓症は深部静脈血栓症とその合併症である肺血栓塞栓症を含むが、肺血栓塞栓症は致死率が30%と著しく高い。アジア人では白人や黒人に比べて静脈血栓塞栓症は稀れと考えられてきたが、近年多発することが分かり有効な予防治療法の確立・普及が求められている。

静脈血栓塞栓症の発症には遺伝要因(遺伝性血栓性素因)と環境要因が関与する。遺伝性血栓性素因としては、血液凝固第Ⅲ因子遺伝子多型 F Leiden と第Ⅲ因子遺伝子多型 F G20210A が白人一般集団にそれぞれ10%、3%と高頻度に認められるが、アジア人には同定されない。研究代表者らおよび宮田らは、血液凝固制御因子プロテイン S 遺伝子多型 protein S Tokushima (PS p.Lys196Glu)が遺伝性血栓性素因であり、変異アレル保有者が日本人一般集団の2%に存在することを明らかにした(Kinoshita et al. Clin Biochem 2005、Kimura et al. Blood 2006)。また、Huらは2種の血液凝固制御因子プロテイン C 遺伝子多型(PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del)が遺伝性血栓性素因であり、変異アレル保有者が中国人一般集団にそれぞれ0.9%、2%存在することを報告した(Tang et al. 2012)。プロテイン S は活性化プロテイン C による活性化第Ⅴ因子・第Ⅲ因子の不活化を促進して血栓形成を制御していることから、研究代表者らはプロテイン C 血液凝固制御系の機能異常がアジア人固有の遺伝性血栓性素因であると考えている(Hamasaki et al. Ann Lab Med 2013)。

静脈血栓塞栓症の環境要因としては、加齢、肥満、長期臥床、大手術、癌、妊娠などがあるが、人種によってリスクの度合いが異なることが示唆される。研究代表者らは、ワインに含まれるポリフェノールのレスベラトロールが、株化ヒト肝細胞のプロテイン S 発現を抑制することを見出し、食物成分が静脈血

栓塞症の環境要因となる可能性を示した(Hirotto et al. Thromb Res 2011)。

静脈血栓塞栓症の発症要因については、これまで主に白人を対象とした欧米中心の研究が行われており、アジア人固有の発症要因を主眼とした国際学術調査は全く実施されていない。

2. 研究の目的

本研究は、国際学術調査によりアジア人固有の静脈血栓塞栓症の発症要因を明らかにし、新たな予防治療戦略の確立をめざすことを目的とする。研究拠点は日本とし、韓国、シンガポール、ハンガリー、ブラジルの研究者との共同研究により、以下のことを明らかにする。

- 1) 静脈血栓塞栓症の遺伝要因、環境要因の人種差の解明
- 2) アジア人固有の静脈血栓塞栓症の予防治療戦略の確立

3. 研究の方法

- 1) 静脈血栓塞栓症の遺伝要因、環境要因の人種差の解明

日本血栓止血学会 SSC 委員会、国際血栓止血学会 SSC 委員会、アジア太平洋血栓止血学会の支援により、日本、韓国、シンガポール、ハンガリー、ブラジルの研究者との国際学術調査ネットワークを構築する。各研究者が所属施設の倫理審査委員会の承認を受けたのち、静脈血栓塞栓症患者および健常者を対象に標準化された登録票を用いて調査を実施し、血液検体を採取する。登録票では、性、年齢、人種、身長、体重、閉経、静脈血栓塞栓症患者ではさらに血栓症の発症日、部位、診断方法、抗凝固療法有無、血栓症既往、長期臥床、大手術、癌、妊娠の有無を調査する。登録データおよび血漿、DNA 検体(一部白血球分画)は各研究者により連結可能匿名化処理後、インターネ

ットないし凍結輸送で研究代表者に送付される。血漿検体は研究分担者および研究協力者の津田らの研究室において、総プロテイン S 活性、総プロテイン S 抗原量を測定し、プロテイン S 比活性を算出する (Tsuda et al. Blood Coagul Fibrinolysis 2012)。研究代表者の研究室で白血球分画から DNA を精製後、protein S Tokushima、PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del の遺伝子解析を実施する。なお、日本人対象者の一部の遺伝子解析は、当該施設で実施する。解析結果を研究代表者に集約し、各要因の人種による違いを明らかにする。

2) アジア人固有の静脈血栓塞栓症の予防治療戦略の確立

研究代表者の研究室において、肥満女性および女子大学生を対象とした横断研究により血中総プロテイン S 抗原量に関連する要因を探索するとともに、株化ヒト肝細胞 HepG2 を用いて、プロテイン S、プロテイン C mRNA 発現に影響を与える食物成分を探索し、発現調節のメカニズムを推定する。研究分担者の研究室において、近年開発された直接作用型経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulants: DOACs) が総プロテイン S 測定系に及ぼす影響を検討し、診断特性および治療効果判定への有用性を検証する。

4. 研究成果

1) 静脈血栓塞栓症の遺伝要因、環境要因の人種差の解明

Protein S 遺伝子多型 (protein S Tokushima) の変異アレル保有者は、日本の静脈血栓塞栓症患者 237 名のうち 10 名 (4.2%: ヘテロ接合体 9 名、ホモ接合体 1 名)、健常者 635 名のうち 13 名 (2.0%: ヘテロ接合体のみ) に同定したが、韓国、シンガポール、ハンガリーの静脈血栓塞栓症患者、健常者、

ブラジルの静脈血栓塞栓症患者には同定しなかった。

Protein C 遺伝子多型 (PC p.Arg189Trp) の変異アレル保有者は、シンガポールの静脈血栓塞栓症患者 83 名のうち 17 名 (20.5%: ヘテロ接合体 16 名、ホモ接合体 1 名)、健常者 74 名のうち 2 名 (2.7%: ヘテロ接合体のみ) に同定し、中国系が 6 割、マレー系が 3 割を占めた。日本では静脈血栓塞栓症患者 126 名のうち 1 名 (0.8%: ヘテロ接合体) に変異アレル保有者を同定したが、健常者には同定しなかった。一方、韓国、ハンガリー、ブラジルでは同定しなかった。

Protein C 遺伝子多型 (PC p.Lys193del) の変異アレル保有者は、日本の静脈血栓塞栓症患者 237 名のうち 6 名 (2.5%: ヘテロ接合体 5 名、ホモ接合体 1 名)、健常者 360 名のうち 4 名 (1.1%: ヘテロ接合体のみ) に同定し、韓国の静脈血栓塞栓症患者 91 名のうち 5 名 (5.5%: ヘテロ接合体 4 名、ホモ接合体 1 名)、健常者 134 名のうち 2 名 (1.5%: ヘテロ接合体 1 名、ホモ接合体 1 名) に同定した。シンガポールでは静脈血栓塞栓症患者 83 名のうち中国系 6 名 (7.2%: ヘテロ接合体のみ) に変異アレル保有者を同定したが、健常者 74 名には同定しなかった。一方、ハンガリー、ブラジルでは同定しなかった。

したがって、これらのプロテイン C 血液凝固制御系の機能異常をきたす遺伝子多型がアジア人固有であることが明らかになった。Protein S Tokushima は日本人固有であり、PC p.Arg189Trp は漢民族だけでなくマレー系など東南アジアの民族の主要な遺伝性血栓性素因である可能性が高く、PC p.Lys193del は日本・韓国・中国などの東アジアの民族に集積していた。2015 年に 1000 Genomes Project で公表された世界 26 地域の健常者 2504 人の SNPs 解析結果でも、protein S Tokushima は日本人 1 人、PC p.Arg189Trp は漢民族 11 人とベトナムキン

族8人、PC p.Lys193delは日本人2人と漢民族2人に同定されており、今回の結果とほぼ一致していた。研究成果は日本血栓止血学会、国際血栓止血学会、アジア太平洋血栓止血学会のSSC委員会や総会で随時報告したが、すべての解析終了後に論文として発表する予定である。

2) アジア人固有の静脈血栓塞栓症の予防治療戦略の確立

日本人中年肥満女性62名および若年非肥満女性160名を対象とした解析から、血中総プロテイン抗原量は中年肥満女性で有意に高値であり、重回帰分析の結果、血中総プロテインS抗原量の正の予測因子として血中プロテインC、ApoCII、フィブリノーゲンが重要であることが明らかになった。

ApoCIIはリポタンパク質リパーゼの補助因子として中性脂肪分解を制御することから、プロテインC血液凝固制御系と脂質代謝系との関連が示唆された(業績)。

レスベラトロールがNAD依存性脱アセチル化酵素SIRT1を活性化してカロリー制限作用を示すことから、培養液のグルコース濃度低下の影響を検討したところ、株化ヒト肝細胞HepG2のプロテインS、プロテインC、ApoCIIの遺伝子発現が抑制されることを見出した。また、発現抑制には、SIRT1ではなくAMP-activated protein kinase (AMPK)が関与することが示唆された。

DOACsとしてFXa阻害薬(エドキサバン、リバーロキサバン、アピキサバン)およびトロンピン阻害薬(ダビガトラン)を健常人血漿に種々の濃度で添加し、総プロテインS活性、総プロテインS抗原量、プロテインS比活性への影響を検討したところ、いずれにもほとんど影響を与えないことが分かった。したがって、DOACs投与中の静脈血栓塞栓症患者の診断や治療に際して、プロテインS比活性測定系によって休業せず

に易血栓症状態を正確に評価できることを証明した(業績)。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Kuma, H., (7人略), Tsuda, H., and Hamasaki, N. Protein S-specific activity assay system is not affected by direct oral anticoagulants. *Thromb Res*, 査読有, 168:60-62, 2018. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.06.008

Otsuka, Y., Ueda, M., Nakazono, E., Tsuda, T., Jin, X., Noguchi, K., (8人略), and Tsuda, H. Relationship between plasma protein S levels and apolipoprotein C-II in Japanese middle-aged obese women and young nonobese women. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 査読有, 20(1):39-47, 2018. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000662

津田博子: 特発性血栓症. 臨床血液, 査読無, 58(10): 279-287, 2017.

津田博子: 静脈血栓症の遺伝的要因, in「動脈・静脈の疾患(上)-最新の診断・治療の動向-」. 日本臨床, 査読無, 75(増刊号4): 129-134, 2017.

Shinohara K., Hamasaki N., (12人略): Multianalyte Conventional Reference Material (MacRM): A Useful Tool for Nationwide Standardization of Laboratory Measurements for Medical Care-A Model Study in Japan, *Clin Chem*. 査読有, 62(2): 392-406, 2016. DOI: 10.1373/clinchem.2015.245621

津田博子: 静脈血栓塞栓症の先天性要因の人種差. 医学のあゆみ, 査読無, 257(7): 759-763, 2016.

<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/index.aspx>

津田博子: 先天性血栓性素因を有する静脈血栓塞栓症(特発性血栓症). 血液フロンティア, 査読無, 26(3):51-57, 2016. <https://www.iyaku-j.com/#>

津田博子: 先天性プロテインC欠乏症と先天性プロテインS欠乏症. 血液フロンティア, 査読無, 25(1): 29-35, 2015. <https://www.iyaku-j.com/#>

濱崎直孝: プロテインS比活性測定: 易血栓症状態予知マーカー. 臨床病理, 査読無, 63(12): 1412-1418, 2015. <https://www.jslm.org>

[学会発表](計16件)

津田博子: 特発性血栓症. 第79回日本血液学会学術集会「教育講演」, 東京(東京

国際フォーラム) 10月22日2017年(招待講演)

隈博幸、河野善明、横田奈津子、津田博子、加藤聖子、濱崎直孝: 婦人科担癌患者の周術期におけるプロテインS比活性, 第57回日本臨床化学会学術集会, 北海道大学, 10月7日2017年

Otsuka Y., Ueda M, Nakazono E., Tsuda T., Jin, X., Noguchi K., Miyazaki H., Nakano S., Tsuda H.: Positive correlation of plasma protein S levels to apolipoprotein C-II in middle-aged obese women and young non-obese women. XX Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Berlin (CityCube Berlin), Germany, July 11, 2017

Tsuda H.: Racial differences. "Plasma coagulation inhibitors", 63rd Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Berlin (CityCube Berlin), Germany, July 8, 2017 (招待講演)

能口健太、宮真南、佐田志穂子、津田博子: 韓国とハンガリーの健常者におけるプロテインS、プロテインC遺伝子多型の検討. 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋(名古屋国際会議場)、6月9日2017年

Tsuda H., Noguchi K., Nakazono E., Tsuda T., Jin, X.: Protein S specific activity analysis can accurately identify the carrier of Protein S Tokushima. 9th Congress of Asian-Pacific Soc. Thromb. Haemost., Taipei (Taipei International Convention Center), Taiwan, October 7, 2016

津田博子: ISTH-SSC Subcommittee プロジェクト報告、第5回プロテインS研究会シンポジウム「静脈血栓塞栓症: 臨床的重要性とその予防」、第38回日本血栓止血学会学術集会、奈良(奈良春日野国際フォーラム)、6月17日2016年(招待講演)

佐田志穂子、津田博子: Glucose濃度低下によるHepG2細胞の脂質代謝関連因子とprotein S遺伝子発現の検討. 第38回日本血栓止血学会学術集会、奈良(奈良春日野国際フォーラム)、6月18日2016年

能口健太、古賀結、中園栄里、堀田多恵子、内海健、康東天、津田博子: 日本人健常者におけるプロテインC遺伝子多型の検討. 第38回日本血栓止血学会学術集会、奈良(奈良春日野国際フォーラム)、6月18日2016年

Tsuda H.: Update on Ongoing Project: Racial differences in Plasma Coagulation Inhibitors. "Plasma coagulation inhibitors", 62nd Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Montpellier (Le Corum Conference Centre), France, May 26, 2016 (招待講演)

Tsuda H., Noguchi K., Nakazono E., Tsuda T., Jin, X.: Evaluation of protein S specific activity permits accurate diagnosis of protein S Tokushima, a missense mutation with type II protein S deficiency. XXV Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Toronto (Metro Toronto Convention Center), Canada, June 22, 2015

Tsuda H.: Current Project: Racial differences. "Plasma coagulation inhibitors", 61th Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Toronto (Metro Toronto Convention Center), Canada, June 20, 2015 (招待講演)

津田博子: ISTH-SSC Scientific Subcommittee 新規プロジェクト - Investigation into racial differences in genetic risk factor for venous thromboembolism- プロテインS研究会シンポジウム、第37回日本血栓止血学会学術集会、甲府(甲府市総合市民会館)、5月22日2015年(招待講演)

Tsuda H.: Genetic abnormalities of protein C and S in Asia. "Topic: Laboratory Hemostasis and Coagulation", 8th Congress of Asian-Pacific Soc. Thromb. Haemost., Hanoi (Convention Center), Vietnam, October 11, 2014 (招待講演)

Tsuda H.: Subcommittee Project Update: Racial differences in genetic risk factors for venous thromboembolism. "Plasma coagulation inhibitors", 60th Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Milwaukee (Wisconsin Center), USA, June 24, 2014 (招待講演)

津田博子: ISTH-SSC Scientific Subcommittee 新規プロジェクト - Investigation into racial differences in genetic risk factor for venous thromboembolism- プロテインS研究会シンポジウム、第36回日本血栓止血学会学術集会、大阪(大阪国際交流センター)、5月30日2014年(招待講演)

〔図書〕(計1件)

津田博子: プロテインC、プロテインS、血管内皮プロテインCレセプターの基礎と臨床(一瀬白帝、丸山征郎、和田英夫編: 新・血栓止血血管学 -抗凝固と線溶-) 金芳堂, pp.22-29/pp.133 (10.20.2015出版)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: 静脈血栓塞栓症の治療用組成物
発明者: 濱崎直孝、隈博幸、波多江日成子、

津田友秀
権利者：学校法人九州文化学園
種類：特許
番号：5896468号
取得年：平成28年
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 博子 (TSUDA, Hiroko)
中村学園大学・栄養科学部・教授
研究者番号：30180003

(2) 研究分担者

濱崎 直孝 (HAMASAKI, Naotaka)
長崎国際大学・薬学部・名誉教授
研究者番号：0091265

隈 博幸 (KUMA, Hiroyuki)
長崎国際大学・薬学部・准教授
研究者番号：40435136

(3) 連携研究者

中園 栄里 (NAKAZONO, Eri)
福岡医療短期大学・保健福祉学科・講師
研究者番号：10343732

能口 健太 (NOGUCHI, Kenta)
中村学園大学・栄養科学部・助手
研究者番号：90757494

森下 英理子 (MORISHITA, Eriko)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：50251921

加藤 聖子 (KATO, Kiyoko)
九州大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：10253527

林 辰弥 (HAYASHI, Tatsuya)
三重県立大学・看護学部・教授
研究者番号：00242959

尾崎 由基男 (OZAKI, Yukio)
笛吹中央病院・院長
研究者番号：30134539

宮田 敏行 (MIYATA Toshiyuki)
国立循環器病研究センター・シニア研究員
研究者番号：90183970

小嶋 哲人 (KOJIMA Tetsuhito)
名古屋大学医学(系)研究科・教授
研究者番号：40161913

(4) 研究協力者

津田 友秀 (TSUDA, Tomohide)
株式会社シノテスト・上席研究員

Doyeun Oh, MD, PhD
CHA University, South Korea

Lai Heng Lee, MD, PhD
Singapore General Hospital, Singapore

Zsuzsanna Bereczky, MD, PhD
University of Debrecen, Hungary

Luci Dusse, MD, PhD & Maria Carvalho, MD, PhD
University Federal de Minas Gerais, Brazil