

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460398

研究課題名(和文) プロテインS分子異常と血栓症発症要因に関する研究

研究課題名(英文) Studies on thrombophilia -deficiency and mutation of protein S-

研究代表者

濱崎 直孝 (HAMASAKI, Naotaka)

長崎国際大学・薬学部・客員教授

研究者番号：00091265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回、我々は新たなプロテインS比活性測定法を開発し、保険適用とすることができた。本検査法はプロテインS分子異常を微量の血液採取により判断することが可能であり、本検査法を用いた各種検体の測定では、血栓症を発症し、かつプロテインS比活性が低下している検体のうち、原因が明らかな症例を除くとほぼ100%の確率でプロテインS遺伝子に何らかの変異が見つかった。このことから、日本人における血栓性素因の一つとして、APC (Activated Protein C) 複合体の関与、特にプロテインS変異が関わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed new assay system to be an effective screening tool for protein S (PS) deficiency. This assay named "PS specific activity test" was covered by insurance last year. When our new assay of PS specific activity was performed in blood samples of thrombosis patients, all of patients with low PS specific activity have genetic mutation. These data clearly show that protein S deficiency is one of major Japanese thrombophilia.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：プロテインS 血栓性素因 深部静脈血栓症 プロテインS比活性

1. 研究開始当初の背景

静脈血栓塞栓症は欧米白人のみならず、我々日本人にも高頻度に発症する疾患であることが分かってきた。下肢深部静脈に好発する深部静脈血栓症 (= エコノミークラス症候群) が代表的なものであり、肺塞栓症などを併発し致死的になりうる重篤な疾病である。静脈血栓塞栓症は、発症しやすい体質を有する個人・家系があることも経験的に知られている。静脈血栓塞栓症など血栓症を発症しやすい体質のことを **血栓性素因** (Thrombophilia) と称している。

血液凝固系は、多くの因子が関与するカスケードから成り立っており (図1)、最終的にフィブリンが生成することにより凝固が生じる。この際、トロンピンが APC 凝固制御系 (プロテイン C、プロテイン S) を活性化させ、凝固第 因子、第 因子を切断することにより、過剰な凝血が起こらないようコントロールされている。しかしこれら凝固制御系因子に異常があると、凝血にブレーキがかからず過剰に凝固が生じることになる (図1)。

欧米白人の血栓性素因は、凝固系第 因子の多型の一つである Factor V Leiden (R506Q) やプロトロンビン遺伝子下流非翻訳領域の一塩基置換分子 prothrombin G20210A であり (Poort SR et al.: *Blood* 88, 3698-3703, 1996 他) 欧米白人における静脈血栓症患者の大半はこれらの血栓性素因の保因者であることが判明している。それ故に、欧米では静脈血栓塞栓症の予防治療対策が進んでいる。一方、日本人や中国人の血栓性素因は、欧米白人と全く異なり、**プロテイン S 活性低下に起因する APC 凝固制御系活性低下**が血栓性素因であることが我々の研究などで明らかになった (Kinoshita S et al.: *Clin Biochem* 38, 908-915, 2005 他)。

我が国における 2000 年の静脈血栓塞栓症の年間発症数は約 4,000 名、2006 年では 30,000 名弱という報告があり、この 6 年間で 8 倍弱に増加している。この急増の原因は、生活習慣の欧米化などが原因の一つと思われる。また、震災や自然災害で避難所生活を強いられている人々の間にも好発するため注意が必要である (Ueda S et al.: *Tohoku J Exp Med* 227, 199-202, 2012) **胎児死亡、胎児発育不全などの妊娠合併症でもプロテイン S 異常**

分子保因者では発症頻度が高くなっていることが明らかになってきた。プロテイン S 分子異常と血栓症発症要因に関する研究は、日本人における **血栓症の発症予防・治療に非常に有用で緊急の課題**であると考えている。

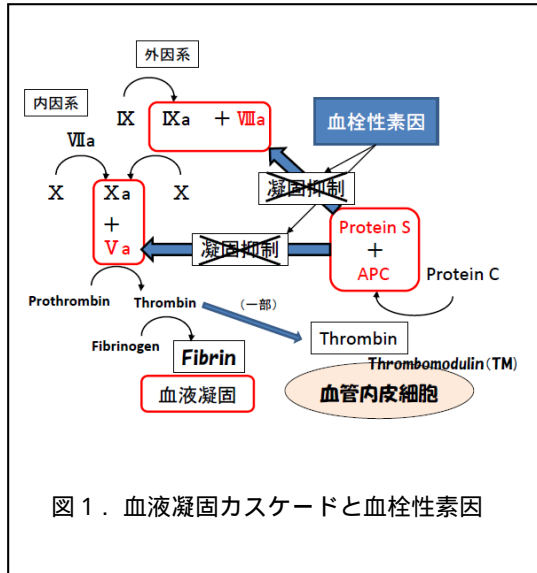


図1. 血液凝固カスケードと血栓性素因

2. 研究の目的

日本人の血栓性素因はプロテイン S 活性低下であり、それが原因で過剰凝血が起こり静脈血栓塞栓症を発症する。したがって、プロテイン S 活性をスクリーニングすることは、**日本人にとって重要な血栓症の予防・治療対策**になると考えられる。その手段としては、プロテイン S 分子の遺伝子検査やプロテイン S 活性測定が考えられる。

現在市販されているプロテイン S の検査試薬は欧米からの輸入品で、健常人血漿に含まれる凝固因子や凝固制御因子を利用した凝固時間測定法であり、健常人プール血漿に対する相対値(%表示)で表され絶対量(μg/mL)の定量はできない。この手法はプロテイン S 異常症の少ない欧米では臨床的に問題ないが、我が国におけるプロテイン S 異常症のスクリーニングには不適である。また、遺伝子検査はインフォームドコンセント等の理由から血栓症発症前の患者に行うことは難しく、多検体の検査にも向いているとは言い難い。すなわち、現時点でスクリーニングに適した **プロテイン S の比活性定量測定系は存在していない**と言える。

このような状況を鑑み、本申請研究期間で

は、(1) プロテイン S 活性、プロテイン S 蛋白量ならびにプロテイン S 分子比活性の定量測定系を開発・確立し、そのツールを用いて相当数の健常人・血栓症患者のプロテイン S 比活性を測定する。(2) プロテイン S 活性低下症例についてプロテイン S 分子異常の有無を遺伝子検査で確認し、(3) そのうえで、プロテイン S 分子異常と血栓症発症との関係について大規模な調査研究を行い、**日本人における血栓性素因を明確にすること**を目標、目的とする。

3. 研究の方法

欧米白人の“血栓症体質 (= 血栓性素因)”は 20 年以上も前に明らかになり、それに基づいた血栓症予防体制が確立している。しかしながら、発症が少ないと考えられていた日本でもかなりの頻度で発症していることが判明し、しかも、日本人の血栓症体質は欧米白人とは明確に異なる。現在、市販されている測定試薬は欧米からの輸入品である。欧米から輸入のプロテイン S の臨床検査試薬は正確度・精密度は非常に悪い。今回、我々が開発しているプロテイン S 測定法は、正確度・精密度が非常に優れており、プロテイン S 絶対量 ($\mu\text{g/mL}$) 測定ができる**世界で唯一の測定法**となる。プロテイン S 異常分子の保因者が多い我が国では精度高く絶対量の測定可能な測定法の開発は必須であり、研究用レベルで開発ができた測定系を一般の人々が利用できるよう、汎用自動分析機用に改良する。

また、上述の目標を達成するために、本研究では大まかに下記の 2 つのテーマにより研究を行う。

バイオアッセイ系ではなく、合成基質を用いたプロテイン S の定量測定系の確立。具体的には、プロテイン S 活性の定量測定系、プロテイン S 蛋白量の定量測定系、ならびにプロテイン S 分子比活性の測定系を自動機器分析用に確立する。

完成したプロテイン S 定量測定系を用いて、大規模に健常人ならびに静脈血栓塞栓症患者検体のプロテイン S 活性測定を行い、プロテイン S 分子異常が、静脈血栓塞栓症発症

の危険因子であるか否かを確定する。

4. 研究成果

1) ラテックス凝集法による総プロテイン S 蛋白量定量測定系の確立

総プロテイン S 蛋白定量法はモノクロナル抗体を用いた 2 試薬系のラテックス凝集法で行った。本試薬は、試薬中に含まれる C4bBP により、検体中のプロテイン S をすべて C4bBP 結合型に転換する段階 (R1 試薬) と、抗プロテイン S - C4bBP 複合体抗体感作ラテックス粒子による凝集反応 (R2 試薬) の 2 段階で構成され、抗体によるラテックスの凝集を 700nm の吸光度上昇で測定し、非常に相関の良い直線関係が得られた。

2) 比色法による総プロテイン S 活性測定系の確立

トロンビン発色試薬 (S-2238) を用いた検体希釈後 3 試薬系の比色法を用い、上記プロテイン S 蛋白定量法および、プロテイン S 活性測定系の確立を行った。なお、本研究テーマにおいては、株式会社シノテスト (東京都) 津田友秀氏の協力を得た。

上記 2 つのテーマにおいて、いずれも良い結果が得られた。これらのツールを組み合わせ、プロテイン S の比活性測定法を開発できた。比活性法では、タンパク質の発現量にかかわらず、正確なプロテイン S の活性評価ができるため、臨床現場において非常に有用な検査ツールとなることが期待される。

さらに、本法による臨床検体での確認、精密度の決定、および活性と蛋白量測定結果から、プロテイン S 分子比活性計算が自動的にできるプログラムを作成した。さらに、健常人検体を用いて、蛋白量、活性、比活性について、それぞれの基準範囲を決定することができた (表、図 2)。活性測定試薬の一部に保存期間の問題があるが、基本的には自動分析装置 (Hitachi 7080) においてプロテイン S の比活性を自動分析できる試薬系ができたと考えている。

同時に、関係協力機関より収集した血栓症患者の検体中のプロテイン S 比活性を前述の

測定法により測定し、血栓症患者におけるプロテインS/プロテインC機能低下症の頻度を算出する。活性低下を呈する患者の一部については、同意の下プロテインSの遺伝子検査を行った。本テーマにおいては、長崎市立市民病院検査部・九州大学病院産科、ならびに愛育病院産婦人科に協力を得て検体を収集した。現在データを解析中であるが、おおむね活性低下と遺伝子変異の相関が得られている。

表 総プロテインSの基準範囲

検体 (健康人)	数	総プロテインS活性 (IU/mL)		総プロテインS蛋白量 (IU/mL)		プロテインS比活性 (活性/蛋白量)	
		平均	基準範囲 ^{a)}	平均	基準範囲 ^{a)}	平均	基準範囲 ^{a)}
総(男女)	194	1.06	0.76 - 1.36	1.04	0.76 - 1.32	1.02	0.86 - 1.18
男	115	1.10	0.82 - 1.38 ^{b)}	1.08	0.80 - 1.36 ^{b)}	1.01	0.87 - 1.15
女	79	1.00	0.70 - 1.30 ^{b)}	0.98	0.70 - 1.26 ^{b)}	1.02	0.86 - 1.18

a) 平均 ± 2SD. SD, standard deviation

b) 総プロテインS活性において男女間の統計的有意差が認められた ($p < 0.001$)

c) 総プロテインS蛋白量において男女間の統計的有意差が認められた ($p < 0.001$)

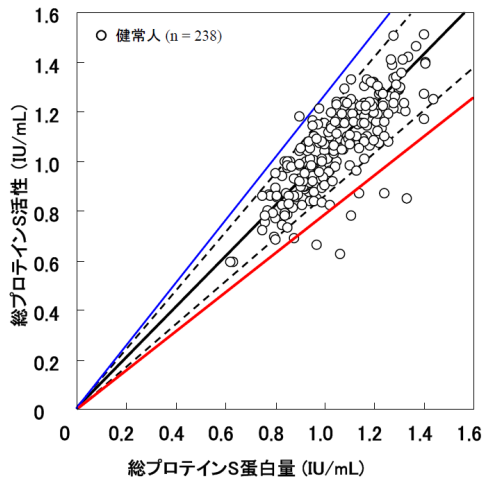


図2. プロテインS比活性と遺伝子異常

また、最終年度にあたる平成27年度は、我々が開発したプロテインS比活性測定法を用いて各種臨床検体の測定を行い、比活性異常と遺伝子異常の関連性、疾患との関連性を調査するとともに、経口抗凝固剤であるダビガトラン服用によるプロテインS比活性変動の *in vitro* 解析を行った。

その結果、血栓症を発症し、かつプロテインS比活性が低下している検体のうち、リン脂質抗体症候群など原因が明らかな症例を除くとほぼ100%の確率でプロテインS遺伝子に何らかの変異が見つかった。このことから、我々が開発したプロテインS比活性測定法は非常に有用な検査法であることが証明された。また、日本人における血栓性素因の一つとして、

APC (Activated Protein C) 複合体の関与、特にプロテインS変異が関わっていることが明らかとなった。現在、国内の協力機関(九州大学病院産婦人科、熊本中央病院、北海道大学病院外科他)にて種々の状態にある患者のプロテインS比活性を測定し、さらなる検証を行っている最中である。

一方、トロンビン直接阻害剤であるダビガトランは、血漿検体中に存在することによってプロテインS比活性に影響を与えないことも分かった。本結果については、現在論文作成中である。

さらに、血栓症の専門医が多く集う学会である日本血栓止血学会の年次学術集会において、「プロテインS研究会シンポジウム(第4回、第5回)」を開催し、プロテインSに興味のある各地の医師等と協力して静脈血栓塞栓症に関する研修と啓蒙を図った。

今回開発したプロテインS比活性測定法は、研究期間である平成27年に保険適用となり、実用化された。これにより、全国の病院でプロテインS比活性を測定(オーダー)することが可能となり、今後の日本人の血栓症発症予防に大きな寄与ができると考えている。

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)

Hamasaki N, Kuma H, Tsuda H; "Dysfunction of the Activated Protein C (APC) anticoagulant system and Thrombophilia in Asia" **Ann Lab Med** 33 (1): 8-13, 2013 (査読有)
DOI: 10.3343/alm.2013.33.1.8

Kondo Y, Ishitsuka Y, Kadowaki D, Fukumoto Y, Miyamoto Y, Irikura M, Hirata S, Sato K, Maruyama T, Hamasaki N, Irie T; "Phosphoenolpyruvate, a glycolytic intermediate, as a cytoprotectant and antioxidant in ex-vivo cold-preserved mouse liver: a potential application for organ preservation" **J Pharm Pharmacol** 65 (3): 390-401, 2013 (査読有)
DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01602

Tang L, Jian X-R, Hamasaki N, Guo T, Wang H-F, Lu X, Wang Q-Y, Hu Y; "Molecular basis of protein S deficiency

in China" *Am J Hematology* 88 (10): 899-905, 2013 (査読有)
DOI: 0.1002/ajh.23525

Kuma H, Nagashima R, Hatae H, Tsuda T, Hamasaki N: "Beneficial effect of EPA (20:5 n-3 PUFA) on preventing venous thromboembolism: a rat tail thrombosis model experiment" *Thromb Res.* 131 (1): 107-108, 2013 (査読有)
DOI: 10.1016/j.thromres.2012.09.014

濱崎直孝: "国際的な標準化活動とJSCC" 臨床検査 58: 150-155, 2014 (査読有)

Arakawa T, Kobayashi-Yugiri T, Alguel Y, Iwanari H, Hatae H, Iwata M, Abe Y, Hino T, Ikeda-Suno C, Kuma H, Kang D, Murata T, Hamakubo T, Cameron D. A, Kobayashi T, Hamasaki N, Iwata S: "Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3" *Science* 350: 680-684, 2015 (査読有)
DOI: 10.1126/science.aaa4335

Irie R, Suzuki M, Yamamoto M, Takano N, Suga Y, Hori M, Kamagata K, Takayama M, Yoshida M, Sato S, Hamasaki N, Oishi H, Aoki S: "Assessing Blood Flow in an Intracranial Stent: A Feasibility Study of MR Angiography Using a Silent Scan after Stent-Assisted Coil Embolization for Anterior Circulation Aneurysms" *AJNR Am J Neuroradiol* 36 (5): 967-970, 2015 (査読有)

濱崎直孝: "プロテイン S 比活性測定: 易血栓状態予知マーカー" 臨床病理 63: 1412-1418, 2015 (査読有)

Shinohara K, Hamasaki N, Takagi Y, Yatomi Y, Kikuchi H, Hosogaya S, Kawai Y, Miyachi H, Kaneko K, Miyajima Y, Matsumoto H, Yamamoto Y, Iwagami M, Osawa S, Umeda M, Koide H, Yoshimura D, Kato H: "Multianalyte Conventional Reference Material (MacRM): A Useful Tool for Nationwide Standardization of Laboratory Measurements for Medical Care-A Model Study in Japan" *Clinical Chemistry* 62: 392-406, 2016 (査読有)
DOI: 10.1373/clinchem.2015245621

[学会発表] (計 5 件)

濱崎直孝: "静脈血栓塞栓症の予防対策としての新しい検査法" 第 27 回日本臨

床検査自動化学会春季セミナー (特別講演): 2013 年 4 月

Higashijima A, Mizunoe S, Nakahara K, Kuma H, Hatae H, Hamasaki N: "Beneficial effect of phosphatidylethanolamine on preventing venous thromboembolism: A rat tail thrombosis model experiment" IFCC EuroMedLab 2013, 2013 年 5 月

波多江日成子、隈博幸、濱崎直孝: "血栓モデルラットを用いた不飽和脂肪酸の血栓症予防効果の検討" 第 35 回日本血栓止血学会学術集会: 2013 年 5 月

濱崎直孝: "APC 凝固制御異常と血栓性素因" 第 36 回日本血栓止血学会プロテイン S 研究会シンポジウム: 2014 年 5 月 (シンポジウム講演)

濱崎直孝: "静脈血栓塞栓症発症危険要因の定量分析" 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム: 2015 年 8 月 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

濱崎直孝、上平憲: "医療の羅針盤 臨床検査を語る" 長崎文献社、2014、125 頁

[その他]

ホームページ等

(長崎国際大学薬学部臨床検査学 HP)

<http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/cc1m/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱崎直孝 (HAMASAKI, Naotaka)
長崎国際大学・薬学部・客員教授
研究者番号: 00091265

(2) 研究分担者

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

波多江日成子 (HATAE, Hinako)
長崎国際大学・薬学部・助教
研究者番号: 00551582

(4) 研究協力者

津田友秀 (TSUDA, Tomohide)