

凝固第 V 因子関連血栓症の凝血学的評価と血栓発症機序の基礎研究

野上恵嗣

奈良県立医科大学 小児科

【研究の背景】

深部静脈血栓症 (DVT) は致死経過や重篤な後遺症を呈することがしばしばあり、現在の重大な課題である。若年発症例では血栓性素因の検索が重要であり、抗凝固機能低下を呈するプロテイン C (PC)、プロテイン S (PS)、アンチトロンビン、トロンボモジュリンの各異常症、線溶能低下を呈するプラスミノゲン異常症、血小板活性化を呈する異常フィブリノゲン血症などがある。なかでも、PC 経路は抗凝固反応の制御機序の中核であり、活性型 PC (APC) が PS 存在下で活性化第 V 因子 (FVa) と活性化第 VIII 因子 (FVIIIa) の両者を不活化して抗凝固能を発揮する。PC 経路異常の一つに FV 異常症の FV_{Leiden} (R506Q 変異) があり、APC 抵抗性を有する。欧州を中心に FV_{Leiden} 保因者は 10% 以上存在しており、DVT 発症が多い。そのため診断として APC 抵抗性検査が確立されている。一方、本邦では FV 関連 APC 抵抗性患者の報告はないため、FV 関連 APC 抵抗性の認識やその検査法が全く普及していない。

最近我々は、広範囲の DVT 発症小児男子例を経験し、APC 抵抗性を示す新規 FV 異常症 (W1920R, FV_{Nara}) を初めて報告した (Nogami K et al. Blood 2014)。標準的 APC 抵抗性試験で著明な異常を示し、患者 FV 抗原 40%、FV 活性 10% と FV 凝固能低下も有していた。さらに FV_{Nara} (W1920R) は APC による FVa と FVIIIa 不活化機構がともに著しく阻害されており、この APC 抵抗性は FV_{Leiden} に比して強いことが判明した。類似する APC 抵抗性 FV 異常症が本邦でさらに 1 例報告されており、本邦でも血栓性素因として FV 関連血栓症が関与している可能性がある。

【目 的】

FV の有する抗凝固機能に焦点を当て、血栓症症例における本機能に関連した凝血学的検討および FV 関連血栓症の発症機序 (FVa-APC 結合機序を中心) の更なる解明を行うことを目的とする。

【方 法】

1) 深部静脈血栓症例の FV 抗凝固機能に関する凝血学的検討

① PC 経路異常のスクリーニング検査

PC 経路には PC、PS、FV、FVIII などが関与し、これらの異常を総合的に評価できる方法をすでに確立している。患者の内因性 PC が APC に活性化されることによりトロンビン生成および FXa 生成が抑制されるかを検討し、PC 経路異常を評価した。

② 包括的凝固測定を用いた APC 抵抗性試験

標準的 APC 抵抗性試験は血漿への APC 添加の有無で aPTT を測定した。

2) 先天性 FV 異常症の APC 抵抗性

本症例 (無症状) の凝血学的検討および APC 抵抗性について解析した。

3) FV 関連血栓症の分子生化学的研究: FVa-APC 結合機序の解明

FV_{Nara} (W1920R)-APC 結合

上記の結合実験を我々が既に確立している流動下分子間表面プラスモン共鳴法(BIACORE™)や固相下 ELISA 法を用いて結合親和性(K_d)を評価し、FV-W1920R と APC 結合能の低下を明らかにすることを試みた。

【結 果】

- 被検血漿を用いた凝血学的検討: 患者 26 名から採血した。血栓性疾患群 8 名、出血性疾患群 18 名であった。
 - ① PC 経路異常のスクリーニング検査: 血栓性疾患群ではトロンビン生成能は正常であったが PC 活性化刺激に対する感受性が低下していた。うち半数(4 例)で PC 経路異常を示したが、PC、PS および FV の各活性および抗原は正常であった。出血性疾患群の PC 経路機能は健常成人群と有意差を示さなかった。
 - ② APC 抵抗性試験: 全患者中の 4 例が異常値で APC 抵抗性 FV の可能性を示した。このうち 1 例は血栓性疾患群の脳梗塞既往小児例であり、①の検査も異常を示した。FV 活性低値から FV 分子異常症も疑われた。FV 低値を示したのはこの 1 例のみであり、FV_{Nara} 様な症例は、今回の検討症例群では見られなかった。なお、出血性疾患群の出血症状の重篤度と PC 経路異常ならびに APC 抵抗性の関連は認めなかった。
- 先天性 FV 異常症の凝血学的検討: 無症状の先天性 FV 異常症例(FV 活性<1.0 IU/dl、FV 抗原量 19 IU/dl)の凝固機能解析を実施した。患者血漿ではトロンビン生成能で lag time 延長を認めるも、トロンビン総生成量やトロンビン生成頂値が正常血漿より高値であり、凝固開始は遅れるが、一旦開始すると凝固亢進状態であることがわかった。APC 抵抗性は内因性 PC/PS 経路を反映する系であるため、本例はトロンビン生成が測定時間内の反応を検出しないため、測定できなかった。
- 遺伝子組換え FV を用いた FV_{Nara} (FV-W1920R) 蛋白解析: 遺伝子組換え FV と不活化 APC の結合実験を ELISA と表面プラズモン共鳴測定法を用いて実施した。いずれの手法においても FV-WT と不活化 APC の特異的結合を両結合実験で確認することができた。しかし、FV-WT と FV-W1920R の結合親和性の差の有無の同定には至らなかった。

【考 察】

FV の抗凝固機能とその障害の APC 抵抗性に関して、本邦小児および成人血栓性疾患における解析を試み、海外で活用されている PC 経路異常スクリーニング検査が本邦の血栓性疾患においても有用であったが、患者数の極めて少ないこともあり、APC 抵抗性 FV 患者は同定できなかった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の最終的な結果は、日本人血栓症患者において、FV の抗凝固機能低下が病態にどの程度関与しているかを示す臨床的に重要な意義を示す報告になると期待されるとともに、これらを基盤とした血栓症患者の診断および新規治療戦略の確立につながることが期待できる。したがって、本邦における本テーマの意義は大きく、今後、より大規模な FV 関連の調査を準備したい。

【参考・引用文献】

Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, Shima M. Novel FV mutation (W1920R, FV_{Nara}) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FV_{Leiden}. Blood. 123, 2420-8, 2014.