



【日本血栓止血学会サイト お役立ちリンク集】

日本血栓止血学会サイトに掲載しているおすすめコンテンツのリンクをご紹介します。

- ・ [診療ガイドライン](#)
- ・ [研修医のお役立ち論文コンテンツ](#)
- ・ [用語集](#)
- ・ [1\) 血栓止血の臨床-研修のために【第2版】（前編）](#)
2018年29巻6号 p. 537-764, 2018.
 - ・ オーバービュー 1編
 - ・ 検査 14編
 - ・ 血小板・血管の異常による出血性疾患 12編
 - ・ 凝固・線溶系異常による出血性疾患 17編
 - ・ 出血性疾患の治療（血液製剤など） 8編
- ・ [2\) 血栓止血の臨床-研修のために【第2版】（後編）](#)
2019年30巻1号 p. 3-247, 2019.
 - ・ 血栓性疾患 17編
 - ・ 血栓性疾患の治療薬 13編
 - ・ 血小板減少を伴う血栓性疾患 18編

本編は次ページより掲載しております。

ビタミンK依存性タンパク質プロテインS —機能と病態との関連—

津田博子*

Vitamin K-dependent protein S: Function and etiological significance

Hiroko TSUDA

要約: ビタミンK依存性タンパク質 protein S(PS)は、主に肝細胞で産生されるが血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、巨核球なども産生する。血漿中PS濃度は約320 nMで、約60%は補体系制御因子C4b-binding protein(C4BP)と複合体を形成し、約40%が遊離型として存在する。血液凝固反応が開始すると、PSは陰性に荷電したリン脂質膜に結合してactivated protein C(APC)によるFVaとFVIIIaの失活化を促進するが、遊離型PSのみがAPC cofactor活性を示す。われわれは、系統的な血栓性素因診断から明らかになったPS活性低下の重要性を発端として、様々な観点からPSについて研究を続けてきた。まず、PS Tokushima(PS p.Lys196Glu)がII型PS欠乏症を呈するPS遺伝子多型であり、健常人の約50人に1人が変異アレル保有者で、深部静脈血栓症の相対リスクを約4倍上昇させることを明らかにした。動物細胞を用いた発現実験や血小板から抽出したPS mRNAの解析により、血栓症患者に同定したPS TokushimaなどのPS遺伝子変異について、PS活性低下の分子機序の解明を試みた。凝固法によるPS活性測定はPS-C4BP複合体解離などの変動要因が大きいことから、その影響を除外した合成基質法による総PS活性測定法とLatex凝集反応による総PS抗原量測定法を開発し、高い精度でPS Tokushima変異保持者を同定できることを確認した。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共同研究により、PS Tokushimaは日本人のみに、PC p.Lys193delは日本人、韓国人、漢民族に、PC p.Arg189Trpは漢民族、マレー人に高頻度に同定されたが、いずれもハンガリー人、ブラジル人には同定されなかったことから、モンゴロイドがコーカソイドから分かれた後にこれらの遺伝子変異が出現した可能性が示唆された。2017年に「特発性血栓症(遺伝性血栓性素因によるものに限る.)」が指定難病(No.327)に認定され、PS欠乏症、antithrombin欠乏症、protein C欠乏症により血栓症を発症し重篤な機能障害を来した患者への医療費助成が開始している。さらに、1)肝細胞におけるPS遺伝子の発現調節:転写因子Sp1およびHNF3の同定、resveratrolやgenisteinなどの植物エストロゲンによる発現抑制、2)PSおよびPS類似タンパク質のGas 6によるTAM受容体の活性化、3)血中PS抗原量の正の予測因子としてのapo C-IIの同定、などを明らかにしてきた。PSはAPC cofactorとして発見されたため血液凝固制御因子として主に解析されてきたが、TFPIαのcofactorとしての機能やTAM受容体のリガンドとしての炎症、免疫、腫瘍増殖制御など多様な機能が注目されており、PS研究のさらなる発展が期待される。

Key words: protein S, C4BP, APC cofactor, congenital thrombophilia

*責任者連絡先:
中村学園大学栄養科学部栄養科学科
〒814-0198 福岡県福岡市城南区別府 5-7-1
Tel: 092-851-2531, Fax: 092-841-7762
E-mail: tsuda@nakamura-u.ac.jp

1. はじめに

血管が損傷すると血液凝固反応が始動し加速的に大量のトロンビンが生成され、血小板が活性化されるとともにフィブリンが形成されて止血する。この血液凝固反応が適切に制御されないと、血管内で血液が凝固し血栓が形成されることになる。血液凝固制御系としては、1) antithrombin(AT) や heparin cofactor II(HCII) などの Serpin 型プロテアーゼインヒビターによるトロンビン(FIIa), 活性化X因子(FXa) などの活性化凝固因子の阻害, 2) ビタミン K 依存性セリンプロテアーゼの activated protein C(APC) とその cofactor のビタミン K 依存性タンパク質 protein S (PS) による活性化 V 因子(FVa) と活性化VIII因子(FVIIIa) の失活化, 3) Kunitz 型プロテアーゼインヒビターの組織因子経路阻害因子(tissue factor pathway inhibitor: TFPI) による凝固反応初期の制御が同定されている¹⁻³⁾。欧米白人を対象とした病態解析から、これらの血液凝固制御因子の遺伝的機能低下が深部静脈血栓症(deep vein thrombosis: DVT) や肺塞栓症(pulmonary embolism: PE) などの静脈血栓塞栓症(venous thromboembolism: VTE) の若年性発症の要因となることが明らかにされてきた。現在までに遺伝性血栓性素因となる多数の AT, PC, PS 遺伝子変異が報告されているが、いずれも不完全浸透の常染色体優性遺伝形式で伝達される。一方、TFPI の遺伝的機能低下による VTE 家系は今のところ報告されていない³⁾。本稿では、系統的な血栓性素因診断から明らかになった PS 活性低下の重要性を発端として、われわれが取り組んできた PS 欠乏症の病態解析, PS 活性測定系の変動要因解決への取り組み, 指定難病「特発性血栓症(遺伝性血栓性素因によるものに限る.)」, 最後に PS の新たな機能について概説する。

2. プロテイン S 欠乏症の病態解析

系統的に検査を組み合わせて視点を定めて病態解析を行うことは、診断困難な疾患の病因解明に有用である。われわれは、1993年に九州大学病院検査部に「血栓性素因診断システム」を構築し、血栓症の系統的病因解析を実施してきた。対象疾患は VTE

をはじめとする静脈系血栓症だけでなく、動脈系血栓症、習慣性流産、炎症性腸疾患なども含め、検査項目としては AT (heparin cofactor), PC (凝固法), PS (凝固法), HCII, plasminogen, fibrinogen の活性と lupus anticoagulants とした。異常が同定された場合はさらに、それぞれの抗原量, AT (progressive) 活性, PC 活性(合成基質法), C4b-binding protein (C4BP) 抗原量を測定し, AT, PC, PS, plasminogen については、エクソン領域を中心に塩基配列を決定し遺伝子変異部位の同定を試みた。1999年に報告した対象者 115名の解析結果では、PS 活性低下症例が最も多く 23名(20%)を占め、その約半数(11名)は静脈系血栓症だったが、動脈系血栓症 7名、炎症性腸疾患 3名などでも低下しており、血栓症発症における PS 活性低下の重要性を見出した(表 1)⁴⁾。2005年に報告した DVT 症例 85名の解析では、PS 活性低下が 40名(47%)を占め、19名に PS 遺伝子(*PROSI*)変異(ミスセンス変異 15名、ナンセンス変異 2名、スプライス部位変異 2名)を同定した⁵⁾。ミスセンス変異のうち 5名が、PS Tokushima (PS p.Lys196Glu, K155E:成熟タンパク質の変異部位)^{6,7)} のヘテロ接合体 4名とホモ接合体 1名であった。そこで、健常人 304名について検討した結果、PS Tokushima が遺伝子多型(変異アレル保有者:健常人の 1.6%, rs121918474)であり、DVT の相対リスクを 3.7 倍上昇させることを明らかにした⁵⁾。

PS は主に肝細胞で産生されるが、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、巨核球、骨芽細胞なども産生する。分子量 77 kDa (635 アミノ酸) で、NH₂ 末端から γ -carboxyglutamic acid (Gla) ドメイン、トロンビン感受性部位、4 個の epidermal growth factor (EGF) ドメイン、2 個のラミニン G (LG) サブユニットが連続する sex hormone-binding globulin (*SHBG*) 様ドメインからなる(図 1A)。PS 遺伝子(*PROSI*) は染色体 3q11.1 に存在するが、セントロメアを挟んで 3p11.1 に偽遺伝子(*PROSP*) が存在する。血漿中 PS 濃度は約 320 nM (25 μ g/mL) で、約 60% は補体系制御因子の C4BP と複合体を形成し、約 40% が遊離型として存在する(図 1B)。血漿中 C4BP 濃度は約 250 nM で約 80% は α 鎖 7 個と β 鎖 1 個が S-S 結合した構造(α 7 β 1) だが、その他に α 鎖 7 個のみ(α 7 β 0)、 α 鎖 6 個と β 鎖 1 個(α 6 β 1) のアイソフォームが存在

表1 Clinical manifestations and aberrant factors in 115 thrombosis patients

Type of thrombosis	Patients examined	Patients with decreased activity of						Patients with LA
		AT III	PC	PS	Plasminogen	Fibrinogen	HC II	
<i>Venous thrombosis</i>								
DVT	9		1	3				
DVT with PE	9			4				1
PE	8	1			1			
DVT with mesenteric venous thr.	1			1				
DVT with portal vein thr.	1		1	1				
Cerebral venous thr.	2			1				
Retinal vein thr.	1							
Superficial thrombophlebitis	7			1				
<i>Arterial thrombosis</i>								
Acute arterial occlusion	3	1		1				
Chronic arterial occlusion	8			1				3
Cerebral infarction	20	1		2	1			5
Moyamoya disease	19		4	2	1			
Myocardial infarction or angina	5			1				
Retinal artery thr.	3							
<i>Small vessel thrombosis</i>								
Habitual abortion	1							
Crohn's disease	9			1				
Ulcerative colitis	4			2	1			
Vasculitis syndrome	1							1
Pulmonary hypertension	4			2				
Total	115	3	6	23	4	0	0	10

AT III = antithrombin III; PC = protein C; PS = protein S; HC II = heparin cofactor II; LA = lupus anticoagulants; DVT = deep vein thrombosis; PE = pulmonary embolism; thr. = thrombosis.

(文献4より引用)

する⁸⁾。Ca²⁺存在下ではPSはSHBG様ドメインを介してβ鎖に強い親和性(Kd:0.1 nM)で結合するため⁹⁾、C4BPβ+に結合できなかったPSが遊離型となる¹⁰⁾。血液凝固反応が開始すると遊離型PSはGlaドメインを介して陰性に荷電したリン脂質膜に結合しAPC cofactorとして血液凝固を制御するが、PS-C4BP複合体はAPC cofactor活性を失う。先天性PS欠乏症は、PS活性、総PS抗原量(遊離型PSとPS-C4BP複合体の総和)がともに低下したI型、PS活性のみが低下し遊離型PS抗原量と総PS抗原量は正常のII型、PS活性と遊離型PS抗原量が低下し総PS抗原量は正常のIII型の3種に分類されるが、同じ遺伝子型の表現型としてI型とIII型が出現することが示されている¹¹⁾。原因の一つとして加齢にともなうPSとC4BPβ+の血中濃度上昇が考えられている¹²⁾。

PS活性低下の機序を明らかにするため、先天性PS欠乏症症例に同定した4種のPROSIミスセンス変異[G54R, K155E(PS Tokushima), T589I, Y595C)]について、変異分子をHEK293細胞に発現させて機能解析を行った¹³⁾。PS Tokushima分子は細胞内分解と分泌に異常を認めないが、分泌された変

異分子のAPC cofactor活性は野生型PS分子の約60%に低下し、C4BP添加によって活性が阻害された。この結果は、PS Tokushimaのホモ接合体がII型欠乏症(PS活性:35%, 遊離型PS抗原量:78%, 総PS抗原量:94%)であったこととよく一致し、第2EGFドメインに存在するLys155-Lys156の重要性を示唆している。I型欠乏症症例に同定したY595C変異(p.Tyr636Cys)分子は、細胞内分解が亢進して細胞外に分泌されなかったが、小胞体に蓄積されてB鎖のマンノーストリミングによりMan₈GlcNAc₂を形成し、主にプロテアゾームによるERAD(endoplasmic reticulum-associated degradation)により分解されることを明らかにした¹⁴⁾。SHBG様ドメインのCOOH末端側に位置するTyr595は種を超えて保存されており、Cysへの変異により大きな構造異常を来した可能性が示唆される。一方、トロンビン感受性部位に存在するG54RとSHBG様ドメインに存在するT589Iについては、細胞内分解と分泌、APC cofactor活性、C4BPによる阻害のいずれにも異常を認めなかった。PSは巨核球でも産生されることから、血小板から抽出したPS mRNAの解析により、I型PS欠乏症の3症例で、イントロン1, 12, 13

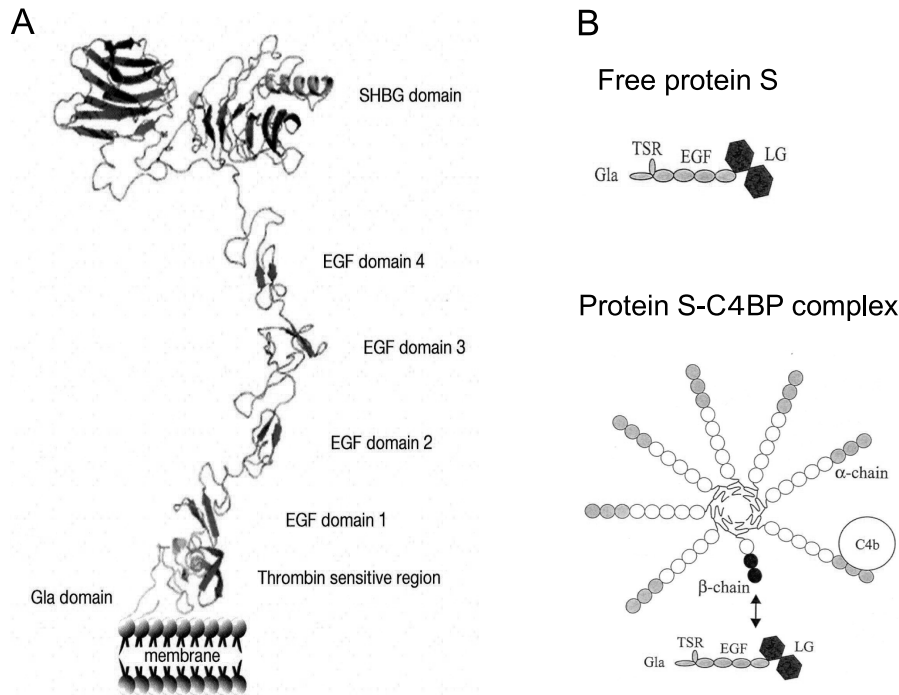


図1 ヒトプロテイン S の 3 次元構造と血中存在様式

(A) PS の 3 次元構造 (九州大学大学院薬学研究院蛋白質創薬分野 阿部義人先生作成, 一部改変)

(B) 血漿中の遊離型 PS と PS-C4BP 複合体 (文献 8 より改変)

にそれぞれスプライス部位変異を同定し、スプライス異常が PS 活性低下の原因であることを明らかにした¹⁵⁻¹⁷⁾。

3. II 型プロテイン S 欠乏症診断系の開発

日本人の 50 人に 1 人は PS Tokushima 変異アレル保有者で、PS 活性のみが低下し遊離型 PS 抗原量と総 PS 抗原量は正常の II 型 PS 欠乏症であることから、スクリーニング診断には精密な活性測定系が必要である。PS 活性は一般に PS 欠乏血漿に APC ないし PC 活性化剤 (Protac) を添加し、患者血漿の APC cofactor 活性を APTT ないし PT を用いた凝固時間の延長で評価する凝固法が用いられている。しかし、多くの変動要因のため欧米では PS 欠乏症のスクリーニング診断には不適切とされている^{18,19)}。また、遊離型 PS 抗原量測定系で、クエン酸加血漿などの Ca^{2+} 非存在下では測定温度が 37°C になると PS-C4BP 複合体が容易に解離し偽高値を呈することが明らかになった^{20,21)}。そこで、患者血漿を高倍

率で希釈し、フォスファチジルセリンを含むリポゾームを添加することにより PS-C4BP 複合体を解離させた後、PS の APC cofactor 活性を、残存 FVa による prothrombinase 複合体の FIIa 生成反応として合成基質を用いて評価する総 PS 活性測定法を開発した²²⁾。さらに、患者血漿に過剰量の C4BP を添加してすべて PS-C4BP 複合体とし、モノクローナル抗 PS 抗体を用いた Latex 凝集反応による総 PS 抗原量測定法を開発した²²⁾。この総 PS 測定系を用いて、PS 比活性 (総 PS 活性 / 総 PS 抗原量) を求めることにより、従来の凝固法による PS 活性測定と遊離型 PS 抗原量測定に比べて高い精度で PS Tokushima 変異保持者を同定できることを確認した (図 2) (Noguchi, et al. submitted)。総 PS 活性測定法は凝固法と異なり、直接経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulants: DOACs) の影響を受けないことから DOACs 内服中でも評価可能である²³⁾。血中 PS 活性は、男性に比べて女性で低く、閉経前女性は閉経後女性に比べて低く、妊娠・産褥期、エストロゲンを含む経口避妊薬内服時にはさらに低値となる²⁴⁻²⁶⁾。したがって、

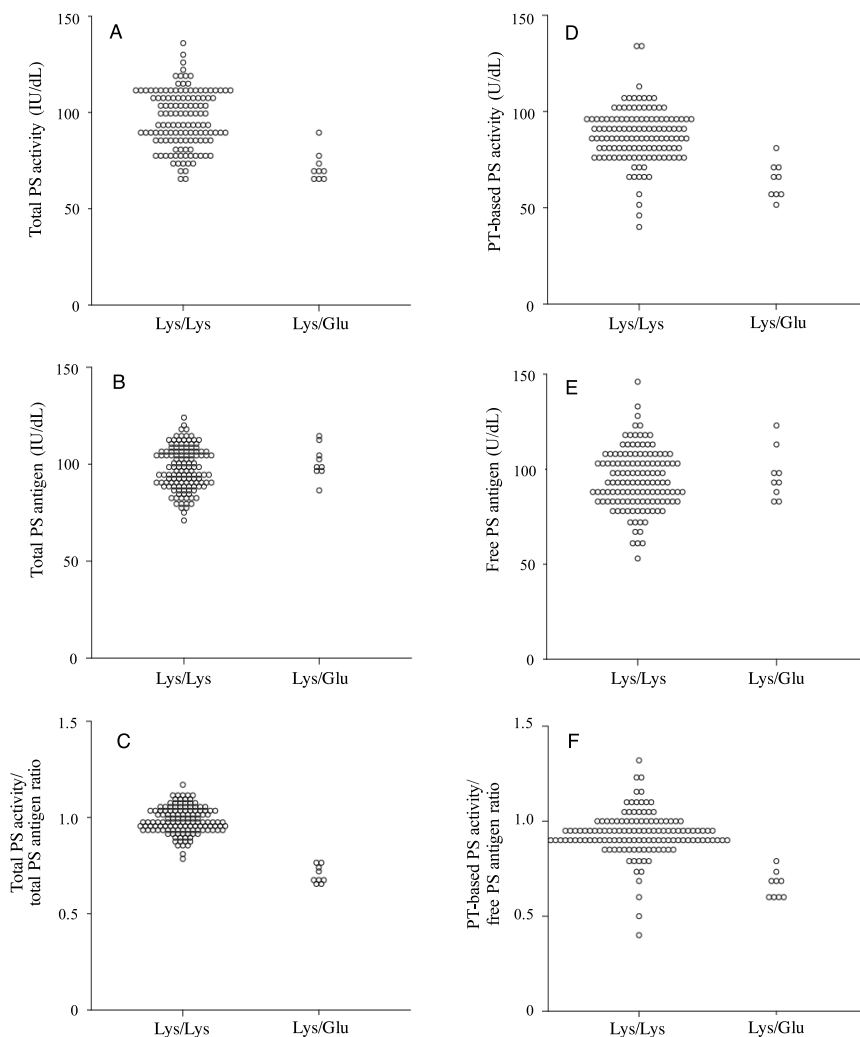


図2 PS Tokushima 遺伝子多型の野生型ホモ接合体(Lys/Lys, n=130)およびヘテロ接合体(Lys/Glu, n=9)の比較 (A)総PS活性, (B)総PS抗原量, (C)PS比活性(総PS活性/総PS抗原量比), (D)凝固法によるPS活性, (E)遊離型PS抗原量, (F)凝固法によるPS活性/遊離型PS抗原量比の分布

PS Tokushima 変異アレルを保有する日本人若年女性では血栓傾向が特に問題となるため, PS 比活性を評価し, 血栓症発症を未然に防止することが望まれる。

4. 遺伝性血栓性素因の人種差

近年, 遺伝性血栓性素因に人種差が存在することが明らかになってきた^{2,27)}。1993年に Dahlbäck らが発見した APC 抵抗性(APC resistance)による血栓性素因²⁸⁾は, 欧米白人の一般集団の 10~15%に存在する第 V 因子遺伝子多型(FV Leiden, p.Arg534Gln,

rs6025)であり, ヘテロ接合体では DVT のリスクが約 6 倍上昇する¹⁾。また, プロトロンビン遺伝子多型(FII G20210A, g.25313G>A, rs1799963)が欧米白人の一般集団の 1~4%に存在し, ヘテロ接合体では DVT のリスクが約 3 倍上昇する²⁹⁾。しかし, これらの遺伝子多型は, 日本人などのモンゴロイド(アジア人, オーストラロイド), ネグロイド(黒人)には同定されていない^{30,31)}。一方, PS Tokushima 変異は米国白人³²⁾, 中国人や韓国人³³⁾には同定されていない。また, II 型 PC 欠乏症を呈する PC 遺伝子変異の p.Arg189Trp (rs146922325)^{34,35)} と p.Lys193del (rs199469469)³⁶⁾は, ヘテロ接合体が中国人一般集

団にそれぞれ 0.9%, 2.4% に存在し, VTE のリスクを 5~7 倍, 3 倍上昇させる。われわれは日本人の VTE 家系と健常者に p.Lys193del 変異を同定したが⁵⁾, 東アジア人以外の人種については検討されていない。

そこで, 国際血栓止血学会 Scientific and Standardization Committee の Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee のプロジェクトとして, PS Tokushima, PC p.Arg189Trp, PC p.Lys193del の人種差について国際学術調査を実施した。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共同で, 各国から提供された健常者計 1,074 名および VTE 症例計 1,789 名について遺伝子変異の有無を解析した。その結果, PS Tokushima は日本人のみ, PC p.Lys193del は日本人, 韓国人とシンガポールの漢民族に同定された。PC p.Arg189Trp はシンガポールの漢民族およびマレー人に高頻度に同定されたが, 日本人, 韓国人には同定されなかった。一方, いずれの遺伝子変異もハンガリー人(欧米白人), ブラジル人(欧米白人と黒人の混血)には同定されなかった(in preparation)。したがって, FV Leiden³⁷⁾ や FII G20210A³⁸⁾ が人類の進化の過程でモンゴロイドとコーカソイドが分かれた後にコーカソイドに出現したのと同様に, これらの遺伝子変異がコーカソイドと分かれた後にモンゴロイドに出現し, PS Tokushima は日本人が日本列島に定着した後に出現した可能性が高い。しかし, 創始者効果(founder effect)については詳細なハプロタイプ解析が必要である。

5. 指定難病「特発性血栓症(遺伝性血栓性素因によるものに限る。)」

PS 欠乏症, AT 欠乏症, PC 欠乏症などの遺伝性血栓性素因では若年性に血栓症を発症し, 再発を繰り返して重篤な機能障害を来すことが多いことから, 厚生労働省難治性疾患政策研究事業研究班「血液凝固異常症等に関する研究」の「特発性血栓症」サブグループの一員として指定難病認定に取り組んだ。2017 年 4 月に「特発性血栓症(遺伝性血栓性素因によるものに限る。)(指定難病327)」として認定され, 医療費助成が開始している。「特発性血栓症」の診断基準は, A. 症状, B. 検査所見, C. 鑑別診断, D. 遺

伝学的検査, E. 遺伝性を示唆する所見からなり, 診断のカテゴリーで Definite, Probable に該当する場合に認定される。検査所見では, 血漿中の AT, PC, PS 活性のいずれかが, 成人の基準値の下限値未満であること(18 歳未満の場合は年齢別下限値)となっている。検査所見は症状とともに必須項目であり, 正確で標準化された測定方法の確立が求められる。しかし, いずれの活性測定においても, 凝固法, 合成基質法など複数の測定法が用いられているが, 測定法によって検出する分子異常が異なり, 基準値も異なることから, 施設間での測定結果の比較は困難である。また, 遺伝性血栓性素因の遺伝学的検査は保険収載されておらず, 研究室レベルで解析されているのが現状である。今後, 指定難病認定と医療費助成の普及に向けて, 血漿検査や遺伝学的検査の標準化と診療体制の構築が喫緊の課題である。

6. プロテイン S 発現調節およびプロテイン S の新たな機能

PS は主に肝細胞で発現することから, 株化肝細胞 HepG2 における *PROS1* の発現調節について検討した。*PROS1* のプロモーター領域を含む DNA 断片(-6,183~+294)を用いた解析により, 転写開始点の 5' 隣接領域への Sp1 および HNF3(FOXA2)の結合が肝細胞特異的な遺伝子発現に重要であることを明らかにした³⁹⁾。その後, de Wolf らは転写開始点近傍に存在する複数の Sp1 および Sp2 結合部位が HepG2 における PS の構成的発現に重要であると報告している⁴⁰⁾。

近年, 植物に含まれる微量成分が機能性食品(サプリメント)として気軽に服用されるようになってきている。赤ワインに含まれるポリフェノールの resveratrol や大豆イソフラボンの genistein は分子構造が 17β-estradiol に類似しエストロゲン受容体(estrogen receptors: ERα, ERβ)に結合することから, 植物エストロゲンと呼ばれている。妊娠・産褥期や経口避妊薬内服時など血中エストロゲン濃度上昇に伴い血中 PS 濃度は著しく低下し, VTE などの血栓症発症のリスクが高まる。そこで, HepG2 細胞の PS 発現に対する植物エストロゲンの影響を検討したところ, resveratrol, その水酸化物の piceatannol, genis-

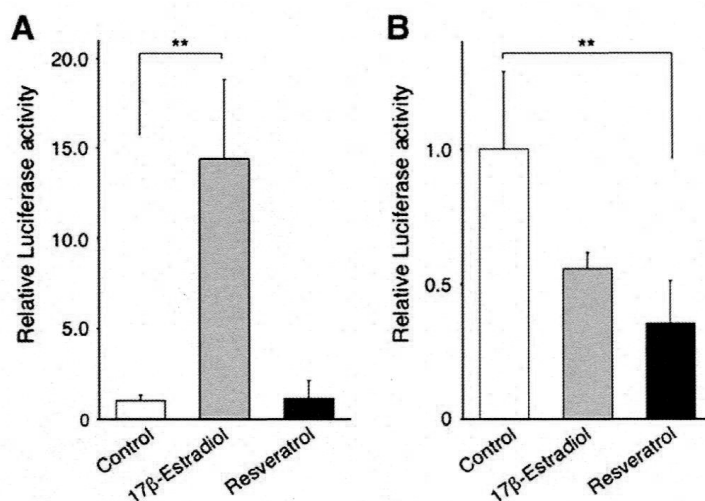


図3 一過性にER α を発現させたHepG2に対する17 β -estradiol, resveratrolの影響。(A)ER transactivation, (B)PS遺伝子転写活性への影響。** $p < 0.01$ vs. control (文献41より引用)

teinが濃度、時間依存的にPS発現を抑制した⁴¹⁾。PROSIのプロモーター領域を含むDNA断片を用いたリポーターアッセイでは、resveratrolはPROSIの転写を有意に抑制したが、ER α 遺伝子(ESR1)の転写には影響を与えなかった(図3)。厚労省は乳がん発症や再発のリスクの観点から大豆イソフラボンの過剰摂取への注意を喚起しているが、血栓症発症リスクの観点からもresveratrolも含めた植物エストロゲンの過剰摂取への注意喚起が望まれる。

PSは肝細胞や血管内皮細胞だけでなく、血管平滑筋細胞、骨芽細胞、T細胞、樹状細胞なども産生することから、血液凝固制御以外の機能を有することが推定される。1995年にPSおよびPS類似ビタミンK依存性タンパク質growth-arrest-specific 6(Gas 6)が、受容体型チロシンキナーゼ(receptor tyrosine kinases: RTK)サブファミリーのTAM受容体(Tyro3, Axl, Mer)のリガンドであることが明らかになった⁴²⁾。TAM receptorは細胞の増殖と分化、アポトーシス、免疫応答など様々な生理機能を制御する。PSノックアウトマウス(PROSI^{-/-})は激しい血栓形成と出血により胎生致死だが、ヘテロ接合体(PROSI^{+/-})および血管平滑筋細胞特異的PSノックアウトマウスでは血管形成障害を認め、TAM受容体シグナル欠損の関与が示唆されている⁴³⁾。しかし、PSとTAM受容体との結合は種特異的であ

り⁴⁴⁾、われわれはヒトPSがGas 6と異なり、ヒトTyro3(Sky)に結合せず、Tyro3のチロシンリン酸化も誘導できないことを明らかにした⁴⁵⁾。PSが生理的なTAM受容体のリガンドであるかについては未解決であるが、PSが炎症、免疫、腫瘍増殖の制御などに関与することが示唆される。

血中PS濃度の関連因子を明らかにする目的で、心血管病を発症しておらずPS Tokushima変異アレル保有者を含まない日本人中年肥満女性(62名)および若年非肥満女性(160名)について横断研究を実施した⁴⁶⁾。中年肥満女性の約半数は脂質異常症に罹患しており、血中総PS抗原量はエストラジオールと負に、中性脂肪、LDLコレステロール、apoB, apoC-II, apoC-IIIなどと正に相関したが、HDLコレステロール、apoA-Iとは相関しなかった。重回帰分析の結果、総PS抗原量の正の予測因子としてPC, apoC-II, fibrinogenが選択され($R^2 = 0.519$)、遊離型PS抗原量ではapoC-IIのみが選択された($R^2 = 0.123$)。若年非肥満女性においても、総PS抗原量の予測因子としてapoC-IIが選択されたが、遊離型PS抗原量では選択されなかった。ApoC-IIはVLDLやキロミクロンなどのtriglyceridesを多く含むリポタンパク質に存在し、lipoprotein lipaseのco-factorとしてtriglyceridesの加水分解を促進する。血中PS濃度がapoC-IIと強く関連することから、

脂質代謝, リポタンパク質代謝への PS の関与が示唆される。

7. おわりに

1993年に構築した「血栓性素因診断システム」による系統的病因解析から, PS 活性低下の重要性を見出したことを発端として, 様々な観点からビタミン K 依存性タンパク質 PS について研究を続けてきた。PS は APC cofactor として発見されたため血液凝固制御因子として主に解析されてきたが, 近年その多様な機能が注目されている。特に, TAM 受容体のリガンドとして炎症, 免疫, 腫瘍増殖の制御などに関与することが示唆されている。「血栓性素因診断システム」の解析でも血中 PS 低下が静脈系血栓症だけでなく, Moyamoya 病や炎症性腸疾患などにも多く認められたこと, 日本人中年肥満女性の血中 PS 濃度が triglycerides 分解を制御する apoC-II と強く関連したことについてはそのメカニズムを解明できていないが, PS の新たな機能に発展するかもしれない。PS は TFPI α の cofactor としても血液凝固を制御するが, 血中 TFPI の約 80% は C 末側が失われた分子で主に LDL/VLDL に結合しているがその機能は不明である。今後の PS 研究のさらなる発展が期待される。

謝辞

本研究は, 九州大学病院検査部, 同大学院医学系臨床分子医学講座, 中村学園大学栄養科学部, 同大学院栄養科学研究科において, 多くの研究者の皆様との共同研究の研究成果をまとめたものです。ここにお名前をあげて, 深謝申し上げます。

濱崎直孝, 康東天, 木下幸子をはじめ九州大学病院検査部臨床検査技師の皆様, Björn Dahlbäck, 帯刀秀樹, 阿部義人, 徳永文稔, 小出武比古, 長光博史, 水野健作, 大橋一正, 大中佳三, 高柳涼一, 村田満, 小嶋哲人, 森下英理子, 宮田敏行, 小林隆夫, 大賀正一, Doyeun Oh, Zsuzsanna Bereczky, Lai Heng Lee, Luci Dusse, Maria Carvalho, 林辰也, 家子正裕, 津田友英, 金秀日, 吉村一, 隈博幸, 中野修治をはじめ中村学園大学健康増進センター研究員

の皆様, 中園栄里, 能口健太, 宮崎(廣戸)美絵, 田所佳奈, 大塚有希子, 植田麻衣子, その他大学院生, 研究生の皆様(敬称略)

著者の利益相反(COI)の開示:

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Dahlbäck B: Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* **112**: 19–27, 2008.
- 2) Hamasaki N, Kuma H, Tsuda H: Activated protein C anticoagulant system dysfunction and thrombophilia in Asia. *Ann Lab Med* **33**: 8–13, 2013.
- 3) Maroney SA, Mast AE: New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost* **13** (Suppl 1): S200–207, 2015.
- 4) Tsuda H, Hattori S, Tanabe S, Iida H, Nakahara M, Nishioka S, Fujise M, Kinoshita S, Okubo K, Hamasaki N: Screening for aetiology of thrombophilia: a high prevalence of protein S abnormality. *Ann Clin Biochem* **36** (Pt 4): 423–432, 1999.
- 5) 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.
- 6) Shigekiyo T, Uno Y, Kawachi S, Saito S, Hondo H, Nishioka J, Hayashi T, Suzuki K: Protein S Tokushima: an abnormal protein S found in a Japanese family with thrombosis. *Thromb Haemost* **70**: 244–246, 1993.
- 7) Yamazaki T, Sugiura I, Matsushita T, Kojima T, Kagami K, Takamatsu J, Saito H: A phenotypically neutral dimorphism of protein S: the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res* **70**: 395–403, 1993.
- 8) Dahlbäck B: C4b-binding protein: a forgotten factor in thrombosis and hemostasis. *Semin Thromb Hemost* **37**: 355–361, 2011.
- 9) He X, Shen L, Malmberg AC, Smith KJ, Dahlbäck B, Linse S: Binding site for C4b-binding protein in vitamin K-dependent protein S fully contained in carboxy-terminal laminin-G-type repeats. A study using recombinant factor IX-protein S chimeras and surface plasmon resonance. *Biochemistry* **36**: 3745–3754, 1997.
- 10) Griffin JH, Gruber A, Fernández JA: Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood* **79**: 3203–3211, 1992.
- 11) Zöller B, García de Frutos P, Dahlbäck B: Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* **85**: 3524–3531, 1995.
- 12) Simmonds RE, Zöller B, Ireland H, Thompson E, de Frutos PG, Dahlbäck B, Lane DA: Genetic and phenotypic analysis

- of a large (122-member) protein S-deficient kindred provides an explanation for the familial coexistence of type I and type III plasma phenotypes. *Blood* **89**: 4364–4370, 1997.
- 13) 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.
 - 14) Tsuda H, Tokunaga F, Nagamitsu H, Koide T: Characterization of endoplasmic reticulum-associated degradation of a protein S mutant identified in a family of quantitative protein S deficiency. *Thromb Res* **117**: 323–331, 2006.
 - 15) 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.
 - 16) 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**: 387–393, 2001.
 - 17) 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**: 187–196, 2001.
 - 18) Persson KE, Dahlbäck B, Hillarp A: Diagnosing protein S deficiency: analytical considerations. *Clin Lab* **49**: 103–110, 2003.
 - 19) Marlar RA, Gausman JN, Engel JW: Validation of hemostasis and coagulation assays: recommendations and guidelines. *Semin Thromb Hemost* **40**: 186–194, 2014.
 - 20) Persson KE, Hillarp A, Dahlbäck B: Analytical considerations for free protein S assays in protein S deficiency. *Thromb Haemost* **86**: 1144–1147, 2001.
 - 21) Tsuda T, Tsuda H, Yoshimura H, Hamasaki N: Dynamic equilibrium between protein S and C4b binding protein is important for accurate determination of free protein S antigen. *Clin Chem Lab Med* **40**: 563–567, 2002.
 - 22) Tsuda T, Jin X, Tsuda H, Ieko M, Morishita E, Adachi T, Hamasaki N: New quantitative total protein S-assay system for diagnosing protein S type II deficiency: clinical application of the screening system for protein S type II deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* **23**: 56–63, 2012.
 - 23) Kuma H, Matsuda R, Nakashima A, Motoyama K, Takazaki S, Hatae H, Jin X, Tsuda T, Tsuda H, Hamasaki N: Protein S-specific activity assay system is not affected by direct oral anticoagulants. *Thromb Res* **168**: 60–62, 2018.
 - 24) Comp PC, Thurnau GR, Welsh J, Esmon CT: Functional and immunologic protein S levels are decreased during pregnancy. *Blood* **68**: 881–885, 1986.
 - 25) Malm J, Laurell M, Dahlbäck B: Changes in the plasma levels of vitamin K-dependent proteins C and S and of C4b-binding protein during pregnancy and oral contraception. *Br J Haematol* **68**: 437–443, 1988.
 - 26) Henkens CM, Bom VJ, Van der Schaaf W, Pelsma PM, Sibinga CT, de Kam PJ, van der Meer J: Plasma levels of protein S, protein C, and factor X: effects of sex, hormonal state and age. *Thromb Haemost* **74**: 1271–1275, 1995.
 - 27) Roberts LN, Patel RK, Arya R: Venous thromboembolism and ethnicity. *Br J Haematol* **146**: 369–383, 2009.
 - 28) Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1004–1008, 1993.
 - 29) Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM: A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* **88**: 3698–3703, 1996.
 - 30) Seligsohn U, Lubetsky A: Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* **344**: 1222–1231, 2001.
 - 31) Margaglione M, Grandone E: Population genetics of venous thromboembolism. A narrative review. *Thromb Haemost* **105**: 221–231, 2011.
 - 32) Pecheniuk NM, Elias DJ, Xu X, Griffin JH: Failure to validate association of gene polymorphisms in EPCR, PAR-1, FSAP and protein S Tokushima with venous thromboembolism among Californians of European ancestry. *Thromb Haemost* **99**: 453–455, 2008.
 - 33) Yin T, Miyata T: Dysfunction of protein C anticoagulant system, main genetic risk factor for venous thromboembolism in northeast Asians. *J Thromb Thrombolysis* **37**: 56–65, 2014.
 - 34) Tsay W, Shen MC: R147W mutation of PROC gene is common in venous thrombotic patients in Taiwanese Chinese. *Am J Hematol* **76**: 8–13, 2004.
 - 35) Tang L, Guo T, Yang R, Mei H, Wang H, Lu X, Yu J, Wang Q, Hu Y: Genetic background analysis of protein C deficiency demonstrates a recurrent mutation associated with venous thrombosis in Chinese population. *PLoS ONE* **7**: e35773, 2012.
 - 36) Tang L, Lu X, Yu JM, Wang QY, Yang R, Guo T, Mei H, Hu Y: PROC c.574_576del polymorphism: a common genetic risk factor for venous thrombosis in the Chinese population. *J Thromb Haemost* **10**: 2019–2026, 2012.
 - 37) Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conard J, Brenner B, Eldor A, Seligsohn U: A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* **89**: 397–402, 1997.
 - 38) Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C, Horellou MH, Seligsohn U: A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood* **92**: 1119–1124, 1998.
 - 39) Tatewaki H, Tsuda H, Kanaji T, Yokoyama K, Hamasaki N: Characterization of the human protein S gene promoter: a possible role of transcription factors Sp1 and HNF3 in liver. *Thromb Haemost* **90**: 1029–1039, 2003.
 - 40) de Wolf CJ, Cupers RM, Bertina RM, Vos HL: The constitutive expression of anticoagulant protein S is regulated through multiple binding sites for Sp1 and Sp3 transcription factors in the protein S gene promoter. *J Biol Chem* **281**: 17635–17643,

- 2006.
- 41) Hiroto Y, Tadokoro K, Tsuda T, Nakazono E, Ohnaka K, Takayanagi R, Hamasaki N, Tsuda H: Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine, down-regulates protein S expression in HepG2 cells. *Thromb Res* **127**: e1–7, 2011.
 - 42) van der Meer JH, van der Poll T, van't Veer C: TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood* **123**: 2460–2469, 2014.
 - 43) Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G: Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest* **119**: 2942–2953, 2009.
 - 44) Hafizi S, Dahlbäck B: Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J* **273**: 5231–5244, 2006.
 - 45) Ohashi K, Nagata K, Toshima J, Nakano T, Arita H, Tsuda H, Suzuki K, Mizuno K: Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* **270**: 22681–22684, 1995.
 - 46) Otsuka Y, Ueda M, Nakazono E, Tsuda T, Jin X, Noguchi K, Sata S, Miyazaki H, Abe S, Imai K, Iwamoto M, Masuda T, Moriguchi R, Nakano S, 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* **29**: 39–47, 2018.