



プロテイン C (PC) 欠乏症

山 本 晃 士*

Protein C Deficiency

Koji YAMAMOTO*

Key words : protein C, anticoagulant, thrombophilia, purpura fulminans, point mutation

はじめに

近年我が国においては、生活様式の欧米化とともに生活習慣病としての血栓性疾患の発症例が増加し、それに対する予防、早期診断、治療の重要性はますます高まってきている。なかでも50~60歳未満という比較的若年において発症した、四肢の深部静脈血栓症、肺梗塞、脳梗塞、心筋梗塞等を診た場合には、その反復性、家族歴などを詳細に検討し、先天的な血液抗凝固・線溶因子の欠乏症あるいは異常症でないかどうかを早期に診断することが、きわめて重要であると言えよう。ここ約10年の精力的な研究によって、プロテインC(以下PC)、プロテインS(以下PS)、アンチトロンビン、プラスミノーゲン等の欠乏症や分子異常症が先天性血栓性疾患として注目され、その病因、病態が明らかにされつつある。一方、第V因子の遺伝子異常であることが明らかとなった活性化プロテインC抵抗性(APC resistance)という病態¹⁾は、欧米における先天性血栓性素因の主要な部分を占めているが、我が国ではいまだ報告例がない。本稿では、先天性血栓傾向の中でもその病因が遺伝子レベル、分子細胞レベルでもっとも詳細

に検討されているPC欠乏症について、臨床病態、診断の進め方と治療、遺伝子解析の成果等を中心に述べる。

先天性PC欠乏症とは

PCは分子内に γ -カルボキシグルタミン酸(Gla)を有するビタミンK依存性のセリンプロテアーゼ前駆体で、おもに肝臓で一本鎖糖蛋白として合成されるが、腎臓や精巣においても産生され²⁾、尿中や精液中にも存在すると報告されている。血中では大部分が二本鎖分子として存在し、濃度は約4 $\mu\text{g/ml}$ である。PCは、血液凝固の過程で生成されたトロンビンと血管内皮細胞上のトロンボモジュリンとの複合体によって活性化されると、PSを補酵素として活性化第V、第VIII因子を選択的に不活化し、凝固カスケードにnegative feedbackをかける重要な抗凝固因子である。したがってPCの先天的な欠乏症や異常症では過凝固状態を呈することになり、四肢の深部静脈血栓症、肺梗塞、脳梗塞、腸管膜静脈血栓症など主として静脈系の血栓症を起こしてくる。先天性PC欠乏症は、タンパク量(抗原量)と生物学的活性値の両方が低

* 名古屋大学医学部第一内科 [〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65]

First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine [65 Tsurumai, Showa, Nagoya 466-8550, Japan.]

下する純粋な欠乏症 (Type I) と、抗原量は正常で生物学的活性値のみが低下する分子異常症 (Type II) とに分かれる。そのほとんど (約 95%) は、成人になってから血栓症を発症することが多いヘテロ接合体患者で、血中 PC 活性は 30~50% に低下している。欧米の報告では先天性 PC 欠乏症のヘテロ接合体者は一般人口の約 0.2~0.3% に認められるとされ^{3,4)}、健常人より 7 倍も血栓症のリスクが高いと言われている。しかしすべての PC 欠乏者 (ヘテロ接合体者) が血栓症に罹患するわけではないことから、血栓症の発症にはほかの危険因子 (感染、外傷、手術、高脂血症、妊娠、ストレスなど) も関与していると推測されている。我が国で行われた最近の調査では、1986 年から 1996 年までの 10 年間に心血管障害で入院した 26,800 人の患者のうち 43 人が PC 欠乏症と診断され (500~600 人に 1 人の頻度)⁵⁾、欧米での報告とほぼ一致している。また PC 欠乏症は心筋梗塞や脳梗塞を始めとする動脈血栓症のリスクファクターとしても重要であると指摘された。一方きわめて稀 (50~70 万人に 1 人) ではあるが、血中 PC 活性が 5% 以下に低下していることが多いホモ接合体者は、新生児期に電撃性紫斑病を発症して発見されることがある (後述)。

ごく最近、遺伝子工学的手法を用いて、先天性に PC を欠損した PC deficient mouse (PC^{-/-}) が作製された⁶⁾。PC^{-/-} マウスにおいては胎児の形成は正常に進むが、すべてが死産 (胎齢 17.5 日以降) あるいは出生後 24 時間以内に死亡し、脳、肝臓、腎臓、心臓などに血栓沈着が認められた。おそらく PC 抗凝固機構の破綻によりトロンビン産生の制御がきかなくなると DIC 様の病態を呈したと考えられ、ヒトのホモ接合体患者に見られる電撃性紫斑病と同様の症状を起こしたと思われる。以上より PC は、抗凝固蛋白の中でももっとも中心的な役割を担う anticoagulant であると言える。

先天性プロテイン C 欠乏症の診断

50~60 歳未満の比較的若年者において原因不明の (主として静脈) 血栓症を診た場合、まず内科的に糖尿病、高脂血症、自己免疫疾患 (ループス・アンチコアグラントの存在)、心房細動にともなう心房内血栓などの有無についての検討が必要である。四肢の静脈血栓症であれば血管外科に診察を依頼し、超音波や血管造影等の画像診断によって血栓性静脈炎、閉塞性動脈硬化症 (ASO) や Buerger 氏病など血管自体の病的変化に起因する血栓症をも鑑別しなければならない。その上でまず、先天性血栓傾向の中でも比較的頻度の高い PC, PS, アンチトロンビン, プラスミノゲン等の欠乏がないかどうか、各因子の活性および抗原値の測定を行う。この際、採血手技に問題がなく、採血後の検体処理も円滑に行われていることを確認することが大切である。また、これらの因子は主として肝臓で産生されるため、慢性肝炎や肝硬変などの肝障害時には血中濃度が低下する。患者があらかじめワーファリンなどの経口抗凝固薬を服用している場合にも、ビタミン K 依存性因子である PC の活性は低下する。経口抗凝固薬服用中の症例については、トロンボテスト値などの変動が小さく治療が安定している時期に、ほかのビタミン K 依存性因子 (第 II, VII, IX, X 因子, なかでも第 VII 因子) を同時に測定し、PC 抗原量との比により判断するほうがよい。ほかに原因がなく PC 活性が 50~60% 以下に低下している場合、患者は先天性の PC 欠乏症あるいは PC 分子異常症である可能性がある。その場合、家族内に血栓症の既往をもつ者がいないかどうか詳細な問診を行う。もし血栓症の家族歴がある場合にはその者はもちろん、採取可能な家族から血漿 5~10 cc および遺伝子抽出用のヘパリン加血 20 cc ほどを採血して PC 活性を測定し、欠乏症が遺伝性、先天性のものかどうかを判断する。先天性血栓性素因者の遺伝子診断および家系内診断は、ヘパリン加血から抽出した



図 1 電撃性紫斑病を発症した先天性 PC 欠乏症 (ホモ接合体) の患児 (生後 3 日)

本人および家族の遺伝子を使い、SSCP 法⁷⁾やダイレクトシーケンス法を用いて直接 PC 遺伝子異常を証明することにより、あるいは後述する PC 遺伝子多型の家系内伝播を証明することによって可能となる場合がある。

また上述したように、新生児期に四肢末端、大腿～下腿、臀部、腹部、陰囊等の紫斑や出血性壊死、さらには多発性微小血栓による多臓器不全をきたす電撃性紫斑病 (neonatal purpura fulminans)⁸⁾ という特殊な病態を診た場合には、先天性 PC 欠乏症のホモ接合体患者 (第 2 染色体上の PC 遺伝子 2 本ともに異常がある) である可能性があり、早期に診断、治療を行う必要がある。しかしこのような症例では DIC を合併していることが多く、確定診断には難渋する。最終的には遺伝子診断、家系内診断を待たねばならないことがある。われわれの教室で解析が行われた電撃性紫斑病の症例 (図 1) は、後述する protein C-Nagoya という PC 異常のホモ接合体患者であることがわかったが、遺伝子診断を待たずにヘパリンと活性化プロテイン C 製剤の投与により、重篤な皮膚壊死や臓器不全を回避できた⁹⁾。ただ、ホモ接合体症例はきわめてまれで、現在までに世界で 35 例の報告がある

のみである。新生児期に血栓症を発症せず、成人するまで無症状の症例もあり、われわれも 31 歳時に脳梗塞で発症したホモ接合体患者をその遺伝子異常とともに報告している¹⁰⁾。

先天性 PC 欠乏症の遺伝子診断

先天性 PC 欠乏症の病因としてもっとも詳細に調べられているのが、PC の遺伝子異常である。現在までに 300 以上の症例で遺伝子異常部位が同定されており¹¹⁾、データベースとしてまとめられているが (最新版は 1998 年 3 月のものでインターネットにて検索可能)、そのほとんどが点突然変異 (point mutation) である。そのうちの約 8 割が missense mutation であり、PC 遺伝子内の一塩基置換によってアミノ酸の置換が起こり、PC 蛋白の構造が変化して細胞からの分泌不全、あるいは分泌後の機能不全をきたしていると考えられる。我が国における 67 家系の PC 欠乏症患者での PC 遺伝子解析の結果、33 家系 (49%) で 139 Phe → Val, 169 Arg → Trp (protein C-Tochigi), 297 Val → Met, 364 Met → Ile, 8857 G 欠失 (protein C-Nagoya) という 5 種類の遺伝子異常のうちのいずれかが

認められ、日本人における PC 遺伝子異常のホットスポットであろうと報告された¹²⁾¹³⁾。この中の protein C-Nagoya¹⁴⁾ は、PC 遺伝子エクソン内の一塩基欠失によりフレームシフトが起こって C 末端に余分なアミノ酸が付加され、正常よりも分子量の大きい PC 蛋白が生成されるという非常にユニークな遺伝子異常である。この欠失部位 (8857 G=381 Gly のグアニン残基) は塩基配列上、欠失が起こりやすい部位であるだけでなく、PC 分子の立体構造から見ても substrate-binding pocket を形成する基質認識部位として重要な場所である。またこの遺伝子異常は、日本人の先天性 PC 欠乏症患者においてのみ 10 家系近い報告があるという点でも興味深い。われわれの教室では *in vitro* mutagenesis 法を用いてこの protein C-Nagoya 分子を培養細胞にて発現させ、PC 欠乏を起こす病因を分子細胞レベルで明らかにした。すなわち細胞内で合成された protein C-Nagoya 分子は GRP 78, GRP 94 などの分子シャペロンによりトラップされ、粗面小胞体からゴルジ体へ輸送される前に分解、消化されていることを実証した¹⁵⁾。

また PC 遺伝子内にはアミノ酸置換を引き起こさない (したがって産生される PC は正常である) ような一塩基置換部位 (遺伝子多型部位: sequence polymorphism) が 10 箇所ほど同定されている。代表的なものは 87 Arg: CGC-CGT; 98 Cys: TGC-TGT; 99 Ser: TCT-TCG; 156 Lys: AAA-AAG; 214 Asp: GAT-GAC; 294 Glu: GAG-GAA などである。これらの一塩基置換は健常人においても一定の確率で存在するため、各人の PC 遺伝子を mutagenic primer を用いた PCR にて増幅した後、特定の制限酵素で処理すると、その処理産物の断片長のパターンで各 PC 遺伝子の家系内伝播が証明される¹⁶⁾¹⁷⁾。いくつかの PC 遺伝子多型部位を組み合わせることで、先天性 PC 欠乏症での家系内診断がより正確に行える可能性がある。

先天性 PC 欠乏症の治療

先天性 PC 欠乏症による血栓症の治療としては、急性期にはヘパリン(点滴静注)、慢性期にはワーファリン、クマリンなどの経口抗凝固薬が使われる。この際に注意すべきなのは、これらの経口抗凝固薬はビタミン K 依存性凝固因子 (第 II, VII, IX, X 因子) のみならず、PC 自体の産生も低下させてしまうという点である。PC の血中半減期が 5~8 時間でプロトロンビンや第 IX, X 因子に比べて短いため、ワーファリン投与開始後 (あるいは増量後) 1~2 日の間に一過性の過凝固状態となり、微小血栓が生じて皮膚壊死 (warfarin induced skin necrosis) が起こることがある。この予防には、投与するワーファリンの量を少量から徐々に治療域へと増加させることが大切である。最近では先天性 PC 欠乏症に対して、それ自体が酵素活性をもった、血漿由来の活性化プロテイン C 製剤の投与も試みられ始めている¹⁸⁾。活性化プロテイン C は血中半減期が短く静脈内持続投与が必要ではあるが、より安全 (出血のリスクが低い) で強力な効果が期待できる。

文 献

- 1) Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, van de Ronde H, Reitsma PH: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* **369**: 64-67, 1994.
- 2) Yamamoto K, Loskutoff DJ: Extrahepatic expression and regulation of protein C in the mouse. *Am J Pathol* **153**: 547-555, 1998.
- 3) Miletich J, Sherman L, Broze G Jr: Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* **317**: 991-996, 1987.
- 4) Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM: Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* **73**: 87-93, 1995.
- 5) Sakata T, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T: Prevalence of protein C deficiency in patients with cardiovascular problems in Japan. *Thromb Haemost* **81**: 466-467, 1999.
- 6) Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, Chan JCY, Carmeliet P, Collen D, Castellino FJ: Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal con-

- sumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **102**: 1481-1488, 1988.
- 7) Miyata T, Sakata T, Zheng YZ, Tsukamoto H, Umeyama H, Uchiyama S, Ikusaka M, Yoshioka A, Imanaka Y, Fujimura H, Kambayashi J, Kato H: Genetic characterization of protein C deficiency in Japanese subjects using a rapid and nonradioactive method for single-strand conformational polymorphism analysis and a model building. *Thromb Haemost* **76**: 302-311, 1996.
 - 8) Seligsohn U, Berger A, Abend M, Rubin L, Attias D, Zivelin A, Rapaport SI: Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med* **310**: 559-562, 1984.
 - 9) Nakayama T, Matsushita T, Hidano H, Suzuki C, Hamaguchi M, Kojima T, Saito H: A case of purpura fulminans is caused by homozygous $\Delta 8857$ mutation (protein C-Nagoya) and successfully treated with activated protein C concentrate. *Br J Haematol* **110**: 727-730, 2000.
 - 10) Yamamoto K, Matsushita T, Sugiura I, Takamatsu J, Iwasaki E, Wada H, Deguchi K, Shirakawa S, Saito H: Homozygous protein C deficiency: identification of a novel missense mutation that causes impaired secretion of the mutant protein C. *J Lab Clin Med* **119**: 682-689, 1992.
 - 11) Reitsma PH: Protein C deficiency: summary of the 1995 database update. *Nucleic Acids Res* **24**: 157-159, 1996.
 - 12) Miyata T, Sakata T, Yasumuro Y, Okamura T, Katsumi A, Saito H, Abe T, Shirahata A, Sakai M, Kato H: Genetic analysis of protein C deficiency in nineteen Japanese families: Five recurrent defects can explain half of the deficiencies. *Thromb Res* **92**: 181-187, 1998.
 - 13) Sakata T, Kario K, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T: Studies on congenital protein C deficiency in Japanese: prevalence, genetic analysis, and relevance to the onset of arterial occlusive diseases. *Semin Thromb Hemost* **26**: 11-16, 2000.
 - 14) Yamamoto K, Tanimoto M, Emi N, Matsushita T, Takamatsu J, Saito H: Impaired secretion of the elongated mutant of protein C (Protein C-Nagoya): Molecular and cellular basis for hereditary protein C deficiency. *J Clin Invest* **90**: 2439-2446, 1992.
 - 15) Katsumi A, Senda T, Yamashita Y, Yamazaki T, Hamaguchi M, Kojima T, Kobayashi S, Saito H: Protein C Nagoya, an elongated mutant of protein C, is retained within the endoplasmic reticulum and is associated with GRP78 and GRP94. *Blood* **87**: 4164-4175, 1996.
 - 16) Yamamoto K, Tanimoto M, Matsushita T, Kagami K, Sugiura I, Hamaguchi M, Takamatsu J, Saito H: Genotype establishments for protein C deficiency by use of a DNA polymorphism in the gene. *Blood* **77**: 2633-2636, 1991.
 - 17) Yamamoto K, Takamatsu J, Saito H: Two novel sequence polymorphisms of the human protein C gene. *Nucleic Acids Res* **19**: 6973, 1991.
 - 18) Sugimoto M, Maruhashi Y, Kobayashi A, Narita N, Yoshioka A: Activated protein C concentrate: A new tool for the treatment of acute thromboembolism in patients with congenital protein C deficiency. *Thromb Haemost* **77**: 1223-1224, 1997.