

201110025A

(別添1)

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

日本人に高頻度に見られる血栓性遺伝子変異をも
つ疾患モデルマウスの開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮田 敏行

平成24(2012)年3月

(別添1)

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

日本人に高頻度に見られる血栓性遺伝子変異
をもつ疾患モデルマウスの開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮田 敏行

平成24(2012)年3月

(別添2)

目 次

I. 総括研究報告書

- 日本人に高頻度に見られる血栓性遺伝子変異をもつ疾患モデルマウスの開発 1
宮田 敏行 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)

II. 分担研究報告書

1. プロテイン S-K196E 変異マウスに関する研究 9
小亀 浩市 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)
喜多 俊行 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)
2. プラスミノゲン-A622T 変異マウスに関する研究 14
坂野 史明 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)
喜多 俊行 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)
3. 凝固第 V 因子 Leiden 変異マウスに関する研究 17
宮田 敏行 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)
坂野 史明 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)
喜多 俊行 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 23

(別添3)

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

日本人に高頻度に見られる血栓性遺伝子変異をもつ疾患モデルマウスの開発

研究代表者 宮田敏行 国立循環器病研究センター分子病態部 部長

研究要旨

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天性異常は血栓症のリスクとなる。私達は、これまでに日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的背景としてプロテインS-K196E 変異を同定し、本変異は約55名に1名の頻度で認められ、約1万人がホモ接合体であると推計した。また、私達は、日本人には線溶因子プラスミノーゲンのA620T 変異（マウスではA622T 変異）が約25名に1名の頻度で認められ、約5万人がホモ接合体であると推計されることを示した。両変異は日本人に特異的であり、白人種には存在しない。白人種には凝固第V因子Leiden(FVL) 変異(R506Q 変異)が報告されている。本変異は白人種の約2-15%に見られ、静脈血栓症のオッズ比は2.7-7.6と報告されている。このように、静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクには人種差が見られることが明らかとなり、近年人種間の血栓リスクの違いが大変注目されている。本研究では、プロテインS-K196E 変異マウス、プロテインS 遺伝子欠損マウス、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスを作製し、日本人の血栓症における本変異の位置づけを明確にすると共に、最適な予防・治療法を開発するための疾患モデルとして確立することを目的としている。

今年度は、C57BL/6J の遺伝的背景をもつプロテインS-K196E 変異マウス、プロテインS 遺伝子欠損ヘテロ接合体マウス、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスの作製を完了し、白人種に見られるFVL 変異を持つマウス(FV R504Q 変異マウス)の血栓能と比較する研究を開始した。遺伝子改変マウスを解析した結果、プロテインSは正常な胚発生に必須の因子であるが、プロテインS-K196E 変異は胚発生に影響を与えないことを明らかにした。これらのマウスでは血漿プロテインS活性が低下しており、血栓症の動物モデルとして有用であることを示した。三血管閉塞法による脳虚血再灌流モデルを用いた検討では、プロテインS-K196E 変異マウスおよびプロテインS 遺伝子欠損ヘテロ接合体マウスは、脳梗塞巣の増大を認めず、K196E 変異は脳梗塞を悪化させる遺伝的要因にならないと考えられた。プラスミノーゲン-A622T 変異マウスはヘテロおよびホモ接合体ともに、正常に出生し、繁殖力も保持していた。本変異マウスでは、血漿プラスミノーゲン活性が低下していた。FVL 変異マウスに関して、ホモ体マウス、ヘテロ体マウス、野生型マウスに対し、脳虚血再灌流実験を行ったところ、ヘテロ体マウスとホモ体マウスは、野生型に比べ梗塞巣の増大を認めた。ホモ体マウスの脳虚血中の血流量は、ヘテロ体マウスおよび野生型マウスの血流量より明らかな低下を認めた。虚血再灌流後7日間のマウスの生存を調べたところ、ヘテロ体マウスとホモ体マウスは野生型マウスに比べ生存率が低かった。これらの結果から、FVL 変異マウスは脳虚血再灌流に脆弱であることが判明した。

本年度の研究は計画以上に進捗したので、次年度に予定していた脳虚血再灌流モデル実験を前倒しで進めることができた。次年度は、プロテインS-K196E 変異マウス、プロテインS 遺伝子欠損ヘテロ体マウス、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスを用いて、これらの遺伝子改変マウスの血栓能を、FVL 変異マウスと比較しつつ検討する予定である。

研究分担者 小亀浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 室長
研究分担者 坂野史明 国立循環器病研究センター分子病態部 研究員

A. 研究目的

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天的異常は血栓症のリスクとなるが、原因となる遺伝子変異は人種間で異なることが、私達の研究などから明らかとなってきた。白人種では凝固第V因子のR506Q変異が血栓症の遺伝的リスクとなることが広く知られており、変異を保有するモデルマウスが既に確立され解析されているが、本変異は日本人には存在しない。一方、日本人を対象にした私達の研究では、プロテインS-K196E変異が静脈血栓塞栓症のリスクになることが明らかとなった。また、日本人を含めた東アジア人には、プラスミノーゲンに活性低下を伴うA620T変異が認められる。これらの人種特異的血栓性遺伝子変異は、それぞれの人種の血栓症の理解、および血栓症の発症予防と治療に関連すると考えられるが、ヒトを対象とした研究には限界がある。そこで、本研究ではこれらの遺伝子変異をもつマウスを作製し、その血栓能を評価することにより、日本人血栓症の研究に参考となるデータを提示することを目的とする。

プロテインSは、凝固反応を制御する機能をもつ血漿糖タンパク質である。リン脂質膜上で活性化プロテインCと複合体を形成し、活性化第V因子および第VIII因子を分解することで、凝固能を抑制する機能を示す。プロテインSの機能が質的あるいは量的に低下すると、止血系のバランスは血栓形成傾向に傾く。私達は、静脈血栓症の遺伝的背景として、プロテインSの機能低下を伴うK196E変異を同定した。静脈血栓塞栓症の発症に対して、オッズ比4.7-5.6を示す。プロテインS-K196E変異は日本人約55人に1人の頻度で存在し、全国で約1万人の日本人がホモ接合体であると推定される。また、日本人には線溶因子プラスミノーゲンのA620T変異（マウスではA622T変異）が広く存在し、一般住民を対象とした検討でもアレル頻度2%（約25人に1人がヘテロ接合体）と高頻度に認められることを報告してきた。プラスミノーゲンは、フィブリン分解反応の鍵となる酵素プラスミンの前駆体であり、組織型プラスミノーゲンアクティベーターやウロキナーゼにより、プラスミンに変換され血栓を溶解する。A620T変異はプラスミノーゲン活性を著減させるため、変異保有者では持続的に血栓溶解能が低下する。現在まで、本変異と血栓症との関連は示されておらず、一次的なリスクとはならないと予想されるが、変異保有者は感染や外傷、手術等に引き続いて血栓症を発症する例があり、血栓形成を助長する要因が重なった場合には血栓

症が起こると考えられる。

白人には、凝固第V因子Leiden(FVL)変異(R506Q変異)が静脈血栓塞栓症のリスク因子として広く知られている。本変異は白人一般集団には2-15%の頻度で見られるが、日本人には見られず、人種特異的な血栓性遺伝子変異である。FVL変異の静脈血栓塞栓症に対するオッズ比は2.7-7.6であり、動脈閉塞症との関連も指摘され、小児や若年者の脳梗塞との関連が報告されている。ヒト凝固第V因子のR506残基はマウスではR504残基であり、これをGln残基に置換したFVL変異マウス(R504Q変異マウス)が作製されている。FVLホモ体マウスは新生児期に臓器に広範に自然発症する血栓を認め、一部のマウスは周産期に死亡する。また、ホモ体マウスは頸動脈の光惹起障害モデルや大脳動脈のFeCl₃障害モデルで、動脈血栓の亢進が報告されている。このように、白人種に見られる血栓性変異を有するFVL変異マウスは、血栓との関連が良く研究されているので、私達が作製した遺伝子改変マウスの性状を、FVL変異マウスと比較検討することは、人種間の血栓能の解明に重要だと考えられる。

本研究では、プロテインS-K196E変異マウス、プロテインS遺伝子欠損マウス、プラスミノーゲン-A622T変異マウスを作製し、これらの血栓形成能を野生型マウスおよびFVL変異マウスと比較検討することにより、日本人の血栓症における血栓性変異の位置づけを明確にすると共に、最適な予防・治療法を開発するための疾患モデルとして確立することを目的としている。本研究では、日本人に特有の血栓性遺伝子変異（プロテインS-K196E変異、プラスミノーゲンA610T変異）と白人種に特有の血栓性遺伝子変異（FVL変異）をマウス個体レベルで比較検討することとなり、人種間の血栓能の違いに関するデータも蓄積できると考えている。

具体的には、3年間の研究期間において、まず1年目に、作製したプロテインS-K196E変異保有マウス、プロテインS遺伝子欠損マウス、プラスミノーゲン-A622T変異マウスの血液学的解析を行い、2年目には局所脳虚血障害、組織因子投与、塩化鉄傷害などの血栓評価系を用いたin vivo血栓形成能を評価し、3年目に抗凝固薬や脳梗塞予防治療薬などの薬効を評価する予定である。これらの疾患モデルマウスは、独立行政法人医薬基盤研究所に登録・寄託することにより資源化を図る。

B. 研究方法

マウスプロテインS遺伝子のエキソン6に一

塩基置換 586A>G を入れることにより、Lys196Glu 変異を導入したターゲットベクターを構築し、常法に従ってプロテイン S-K196E 変異ノックインマウスを作製した。また、プロテイン S 遺伝子欠損マウスも、常法に従って作製した。プロテイン S 遺伝子欠損ホモ接合体マウスは胎性致死であった。これらの遺伝子改変マウスを、野生型 C57BL/6J 系統マウスに対して 10 世代の戻し交配を行った。次いで、野生型マウス、プロテイン S-K196E 変異ヘテロ体マウス、プロテイン S-K196E 変異ホモ体マウス、プロテイン S 遺伝子欠損ヘテロ体マウスの血液学的性状を分析し、群間の比較解析を行った。各群のマウスから血液を採取し、活性化部分トロンボプラスチン時間、プロテイン S 補酵素活性等を測定した。

マウスプラスミノゲン遺伝子のエクソン 15 に一塩基置換 1864G>A (Ala622Thr) を入れたターゲットベクターを構築し、常法に従って、プラスミノゲン-A622T 変異ノックインマウスを作製した。本遺伝子改変マウスは C57BL/6J 系統の ES 細胞から作製したので、戻し交配を行わずそのまま研究に使用した。野生型マウス、プラスミノゲン-A622T ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスから血漿を回収し、プラスミノゲン活性をウロキナーゼ添加後のプラスミン活性を指標に測定した。また、プラスミノゲン抗原量を ELISA 法により測定した。

FVL 変異マウスは Jackson 研究所から購入した。本変異マウスも C57BL/6J 遺伝背景である。したがって、この研究に使用する全てのマウスは C57BL/6J 系統の遺伝的背景に均一化されており、遺伝的背景がそろったマウスで、以降の実験を行った。

脳梗塞モデルは三血管閉塞法により行った。脳中大動脈閉塞は、左中大脳動脈を電気凝固し両側総頸動脈を 15 分間一過性に閉塞することで、中大脳動脈支配領域に局所虚血を生じさせた。虚血負荷の 24 時間後に脳を摘出し 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 染色を行い脳梗塞の体積を算出した。虚血 15 分間とその後の再灌流 30 分間の虚血ペナンプラ領域の脳血流を測定した。虚血後 7 日間のマウスの生存を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理面に配慮すべき研究に該当しない。なお、本研究は国立循環器病研究センター動物実験委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

プロテイン S-K196E 変異ヘテロ体マウスおよびホモ体マウスは正常に誕生し、繁殖能力も正常に維持されていた。少なくとも通常の飼育条件下では、野生型マウスと見かけ上の差異は見られなかった。一方、プロテイン S 遺伝子欠損ホモ体マウスは胎性致死であり、ヘテロ体は正常に誕生した。

野生型マウス、プロテイン S-K196E 変異ヘテロ体マウス、ホモ体マウス、プロテイン S 遺伝子欠損ヘテロ体マウスから採血し血漿成分を調製した。活性化プロテイン C 添加後の活性化部分トロンボプラスチン時間の延長を指標にしてプロテイン S 補酵素活性を測定した結果、3 種のプロテイン S 遺伝子組換えマウスにおいて、いずれも野生型マウスに比べて血漿プロテイン S 活性の低下が認められた。なかでも、プロテイン S 遺伝子欠損ヘテロ体マウスが最も顕著な変化を示し、プロテイン S 活性は野生型マウスの約 50% に低下していた。

これらの実験が順調に進んだので、2 年目の実験として計画していた三血管閉塞法による局所脳虚血再灌流障害モデルを用いた検討を行った。その結果、3 種のプロテイン S 遺伝子組換えマウスのいずれにおいても、野生型マウスに比べて、脳梗塞巣の拡大や神経症状の悪化等は認められなかった。

ターゲットベクターの導入により、プラスミノゲン-A622T 変異マウスを樹立した。得られたプラスミノゲン-A622T 変異マウスは、ヘテロ接合体およびホモ接合体ともに、正常に出生し、発育にも異常は認められなかった。また、雌雄とも生殖能力は正常であった。プラスミノゲン抗原量は、野生型マウスとプラスミノゲン-A622T 変異マウスで違いはみられなかったが、プラスミノゲン活性は、プラスミノゲン-A622T 変異マウスで低下が認められ、ホモ体マウスの活性は野生型マウスの約 25% まで低下していた。

FVL 変異マウスは三血管閉塞法による脳梗塞モデルで評価した。ヘテロ体マウスとホモ体マウスの脳虚血 24 時間後の梗塞巣の体積は、野生型マウスの梗塞巣より有意に大きかった。虚血時の脳血流量は、ホモ体マウスではヘテロ体や野生型より有意に低下していた。ホモ体マウスは虚血後 2 日目から死亡が観察され、7 日後には 7 匹中 5 匹が死亡した。ヘテロ体マウスは 4 日目から死亡が観察され、7 日後には 7 匹中 5 匹が死亡した。一方、野生型は 7 日目に 2 匹が死亡しただけであった。ヘテロ体マウスとホモ体マウスの 7 日目の生存率は、野生型マウスより有意に低下していた。

D. 考察

プロテイン S-K196E 変異マウス、プロテイン S 遺伝子欠損マウス、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスをそれぞれ作製することに成功した。作製したマウスの遺伝背景を、白人種に見られる血栓性遺伝子変異をもつマウスである FVL 変異マウスと同じ遺伝背景である C57BL/6J 系統マウスに整えた。これにより、日本人に見られる遺伝子変異と、白人種に見られる遺伝子変異の影響を、マウス個体レベルで比較検討することができるようになった。

プロテイン S 遺伝子欠損ホモ体マウスは致死であったが、それ以外のマウスは正常に成長し繁殖した。このことから、プロテイン S はマウスの正常な胚発生に必須の因子であるが、プロテイン S-K196E 変異はホモ体であっても胚発生に影響を与えないことが明らかになった。プロテイン S の抗凝固作用あるいはそれ以外の生物学的作用を考える上で興味深い。

プロテイン S-K196E 変異マウスおよびプロテイン S 遺伝子欠損マウスは、いずれも野生型マウスに比べて血漿プロテイン S 活性が低下していたことから、本研究で確立したマウスは、血栓症の動物モデルとして有用であることが示された。三血管閉塞法を用いた脳虚血再灌流モデルでは、プロテイン S-K196E 変異マウスは野生型マウスに比べて症状の悪化を示さなかった。この結果から、日本人に高頻度に見られるプロテイン S-K196E 変異は、脳梗塞を悪化させる遺伝的要因にならないと推定された。同じ手法を用いて FVL 変異マウスに脳虚血再灌流を起こさせると、FVL 変異マウスは脳梗塞巣が大きく高い死亡率につながった。これらの人種特異的な変異をもつマウスの実験結果は、大変重要であると考えた。

プラスミノーゲン-A622T 変異マウスは、少なくとも SPF 飼育環境下では正常に発育し、外見上明らかな異常は示さなかった。これまでに、プラスミノーゲン欠損マウスが作製されており。これらのマウスは、成長遅延や寿命の短縮、生殖能の低下、脱腸などの異常が報告されているが、プラスミノーゲン-A620T 変異はこうした異常の原因にはならないことが明らかとなった。また、本変異は胚発生および個体の成育には影響を与えないと考えられた。

プラスミノーゲン-A622T 変異マウスでは、ヘテロ体およびホモ体ともに、血漿プラスミノーゲン活性の有意な低下が認められ、ヒトと同様にマウスでも本変異は線溶活性低下を引き起こす事が明らかとなった。今後、脳梗塞モデルや静脈血栓モデル等の実験的血栓モデルを用

いて本変異マウスを解析することにより、プラスミノーゲン-A620T 変異が如何なる血栓症状と関わっているか解明できると考えられる。

FVL 変異ホモ体マウスは、ヘテロ体マウスや野生型マウスに比べ、虚血時の血流低下を示した。このことは、FVL 変異ホモ体マウスでは側副血管の発達が悪く、血管系の余量が乏しいことを示唆している。ホモ体マウスでは側副血管の一部が閉鎖している可能性を示唆している。また、FVL 変異ヘテロ体マウスとホモ体マウスの虚血再灌流後の脳梗塞巣は、野生型マウスより大きかった。一過性の脳虚血後の再灌流は血液脳関門の透過性の亢進など、多くの現象を誘導する。これらは脳虚血障害に関連した凝固系の活性化を引き起こし、虚血部位に血栓が形成されることで説明される。ヒト FVL 変異は小児および若年者の脳塞栓と関連を示すが、今回のマウスの実験結果はヒトで観察された脳梗塞との関連を説明するものである。

E. 結論

本研究で、プロテイン S-K196E 変異マウス、プロテイン S 遺伝子欠損マウス、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスを確立した。これらのマウスの個体レベルでの血栓能を検討することにより、日本人に比較的多くみられる血栓性遺伝子変異の血栓への影響を検討することが可能となった。また、これらのマウスの血栓能を FVL 変異マウスと比較検討することにより、血栓能の人種間の差異を検討できると考えられた。本変異マウスでは、日本人の血栓症における変異の影響を解析する上で、適切なモデル動物であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Hatori, T. Hirota, M. Iitsuka, N. Kurabayashi, S. Haraguchi, K. Kokame, R. Sato, A. Nakai, T. Miyata, K. Tsutsui, Y. Fukada: Light-dependent and circadian clock-regulated activation of SREBP, XBP1 and HSF pathways in the pineal gland. Proc Natl Acad Sci USA, 108(12), 4864-4869, 2011.

M. Rybaltowski, Y. Suzuki, H. Mogami, I. Chlebinska, T. Brzoska, A. Tanaka, F. Banno, T. Miyata, T. Urano: In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large

- von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall. *Pflugers Arch*, 461(6), 623-633, 2011.
- Y. Fujimura, M. Matsumoto, A. Isonishi, H. Yagi, K. Kokame, K. Soejima, M. Murata, T. Miyata: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on *ADAMTS13* gene analysis in Japan (review). *J Thromb Haemost*, 9 (Suppl. 1), 283-301, 2011.
- K. Kokame, T. Sakata, Y. Kokubo, T. Miyata: von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Thromb Haemost*, 9(7), 1426-1428, 2011.
- H. Yamamoto, K. Kokame, T. Okuda, Y. Nakajo, H. Yanamoto, T. Miyata: NDRG4 protein-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia. *J Biol Chem*, 286(29), 26158-26165, 2011.
- R. Neki, T. Fujita, K. Kokame, I. Nakanishi, M. Waguri, Y. Imayoshi, N. Suehara, T. Ikeda, T. Miyata: Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol*, 94(2), 150-155, 2011.
- K. Kokame, Y. Kokubo, T. Miyata: Polymorphisms and mutations of *ADAMTS13* in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost*, 9(8), 1654-1656, 2011.
- T. Yin, T. Miyata: Pharmacogenomics of clopidogrel: Evidence and perspectives (review). *Thromb Res*, 128(4), 307-316, 2011.
- T. Miyata, N. Hamasaki, H. Wada, T. Kojima: More on: racial differences in venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*, 10, 319-320, 2012.
- F. Banno, T. Nojiri, S. Matsumoto, K. Kamide, T. Miyata: RGS2 deficiency in mice does not affect platelet thrombus formation at sites of vascular injury. *J Thromb Haemost*, 10, 309-311, 2012.
- M. Fujioka, T. Nakano, K. Hayakawa, K. Irie, Y. Akitake, Y. Sakamoto, K. Mishima, C. Muroi, Y. Yonekawa, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, K. Nishio, K. Okuchi, K. Iwasaki, M. Fujiwara, BK. Siesjö: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, 2012, in press.
- Y. Eura, H. Yanamoto, Y. Arai, T. Okuda, T. Miyata, K. Kokame: Derlin-1 deficiency is embryonic lethal, Derlin-3 deficiency appears normal, and Herp deficiency is intolerant to glucose load and ischemia in mice. *PLoS ONE*, in press
- Y. Shono, C. Yokota, Y. Kuge, S. Kido, A. Harada, K. Kokame, H. Inoue, M. Hotta, K. Hirata, H. Saji, N. Tamaki, K. Minematsu: Gene expression associated with an enriched environment after transient focal ischemia. *Brain Res*, 1376, 60-65, 2011.
- K. Hirata, Y. Kuge, C. Yokota, A. Harada, K. Kokame, H. Inoue, H. Kawashima, H. Hanzawa, Y. Shono, H. Saji, K. Minematsu, N. Tamaki: Gene and protein analysis of brain derived neurotrophic factor expression in relation to neurological recovery induced by an enriched environment in a rat stroke model. *Neurosci Lett*, 495, 210-215, 2011.
- T. Marutani, T. Maeda, C. Tanabe, K. Zou, W. Araki, K. Kokame, M. Michikawa, H. Komano: ER-stress-inducible Herp, facilitates the degradation of immature nicastrin. *Biochim Biophys Acta*, 1810, 790-798, 2011.
- T. Takeichi, M. Takarada-Iemata, K. Hashida, H. Sudo, T. Okuda, K. Kokame, T. Hatano, M. Takanashi, S. Funabe, N. Hattori, O. Kitamura, Y. Kitao, O. Hori: The effect of *Ndr2* expression on astroglial activation. *Neurochem Int*, 59, 21-27, 2011.
- 宮田敏行、岡本 章、小久保喜弘「加齢とプロテインS」臨床検査、第55巻、第4号、407-409頁、2011年
- 宮田敏行「二次止血：凝固のメカニズム」カレ

ントセラピー、第29巻、第6号、12-15頁、2011年

宮田敏行、喜多俊行「DICと外因系凝固反応、マイクロパーティクル」医学のあゆみ、第238巻、第1号、5-9頁、2011年

宮田敏行、宮田茂樹、嘉田晃子、長束一行「アスピリンレジスタンス」循環器病研究の進歩、第32巻、第1号、43-53頁、2011年

宮田敏行、喜多俊行「VI. 凝固線溶系 3. 内因系凝固反応と血栓症」Annual Review 血液2012、高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉 譲・小島勢二 編集、中外医学社、236-244頁、2012年

宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、坂野史明、中山大輔、武田壮一：ADAMTS13研究の最先端。臨床血液、2012年、印刷中

小亀浩市：日本人のADAMTS13。日本血栓止血学会誌22、368-373、2011年

2. 学会発表

Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Hiroji Yanamoto, Tomohiko Okuda, Yukako Nakajo, Susumu Miyamoto, Toshiyuki Miyata, NDRG4-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia with the decreased level of BDNF in the cortex, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata, Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Fumiaki Banno, Takahiro Nojiri, Sachiko Matsumoto, Kei Kamide, Naoki Mochizuki, Toshiyuki Miyata, A lack of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in mice does not affect thrombus formation at sites of vascular injury, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Mariko Banno, Kei Kamide, Takeshi Horio,

Toshiyuki Miyata, Yuhei Kawano, Genetic polymorphisms of endothelin-related genes associated with risk of chronic kidney disease in Japanese hypertensives, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Shigenori Honda, Hiroko Shirotani-Ikejima, Yasuyuki Matsuda, Seiji Tadokoro, Yoshiaki Tomiyama, Toshiyuki Miyata, Role of ILK-PINCH-parvin complex in supporting functional expression of integrin, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Sachika Kameda, Toshiyuki Sakata, Yoshihiro Kokubo, Mana Mitsuguro, Akira Okamoto, Michitaka Sano, Toshiyuki Miyata. Association of platelet reactivity with lipid and PAI-1 levels in a Japanese general population, the Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata, Factor V Leiden mice are vulnerable for ischemic stroke, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Tomasz Brzoska, Miroslaw Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Tetsumei Urano, Imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Akira Okamoto, Toshiyuki Sakata, Yoshihiro Kokubo, Michitaka Sano, Toshiyuki Miyata, Age- and gender-related differences in PAI-1 antigen levels in a Japanese general population, the Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28・2011

Yoshihiro Kokubo, Toshiyuki Miyata, Toshiyuki Sakata, Akira Okamoto, Makoto Watanabe, Yuu Ono, Mariko Banno, Yoshihiro Miyamoto, The Association between Plasma Fibrinogen and Coronary Heart Disease in a Japanese Urban Cohort: The Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28 · 2011

Yasuyuki Matsuda, Shigenori Honda, and Toshiyuki Miyata, An RNAi screening to identify the molecules involved in integrin α IIb β 3 activation, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28 · 2011

Kokame Koichi, Kokubo Yoshihiro, Miyata Toshiyuki, Estimation of the number of individuals with a congenital ADAMTS13 deficiency in Japan, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28 · 2011

Kokame Koichi, Findings from ADAMTS13 activity assay. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28 · 2011.

Fumiaki Banno, Genetic mouse models for evaluating pathophysiological roles of ADAMTS13. 57th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28 · 2011.

井本（山本）ひとみ、小亀浩市、奥田智彦、中城有香子、柳本広二、宮田敏行、NDRG4 欠損マウスは、大脳皮質 BDNF 量の低下とともに、記憶学習能力の低下と局所脳虚血による梗塞巣の増大を示す、第9回血液・血管オルビス、2011年8月20-21日、東京都

中山大輔、秋山正志、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行、P475S型ADAMTS13の非触媒領域の立体構造決定、第16回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2011年8月26日-27日、吹田市

秋山正志、中山大輔、武田壮一、小亀浩市、高木淳一、宮田敏行、P475S型ADAMTS13タンパク

質の部分立体構造決定、第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、京都市

喜多俊行、坂野史明、中城有香子、柳本広二、飯原弘二、宮田敏行、血液凝固第V因子Leiden変異マウスの虚血性脳梗塞に対する脆弱性、第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、京都市

井本（山本）ひとみ、小亀浩市、奥田智彦、中城有香子、柳本広二、宮田敏行、NDRG4は大脳皮質中のBDNF量を正常に保ち、記憶学習能力の維持作用と虚血性脳卒中に対する脳保護作用を示す、第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、京都市

宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、武田壮一、坂野史明、ADAMTS13研究の最先端、シンポジウム6 血栓止血学・血管生物学の最近の進歩、第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14-16日、名古屋市

Yusuke Satoh, Takafumi Yokota, Hirokazu Tanaka, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Itaru Matsumura, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura: SATB1 induces early lymphocyte differentiation from primitive hematopoietic progenitors. 第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14-16日、名古屋市

Yoshihiro Fujimura, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Mitsuru Murata, Toshiyuki Miyata. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. 第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14-16日、名古屋市

宮田敏行、特別講演：日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的背景、第7回肺血栓塞栓症研究会、2011年11月1日、宇都宮市

Toshiyuki Miyata, Thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13, 3rd SIRIC-NCVC Joint Symposium, November 11, 2011, Seoul, Korea.

Toshiyuki Miyata, Phenotypes on Ndrng KO mice, Seminar at Research Institute National

Cancer Center, November 10, 2011, Goyang,
Korea.

宮田敏行、特別講演：血栓性血小板減少症と
ADAMTS13、第6回分子血管研究会、2011年12
月1日、東京都

樋口(江浦)由佳・宮田敏行・小亀浩市：ハイ
ドロダイナミクス法による *in vivo* 遺伝子導入を
用いた ERAD 基質の解析、第34回日本分子生物
学会年会、2011年12月13-16日、横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(別添4)

II. 分担研究報告書

プロテインS-K196E 変異マウスに関する研究

研究分担者 小亀浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 室長
研究分担者 坂野史明 国立循環器病研究センター分子病態部 研究員
研究協力者 喜多俊行 国立循環器病研究センター分子病態部 流動研究員

研究要旨

プロテインSは活性化プロテインCの補酵素として機能する血漿タンパク質であり、プロテインSの機能が低下すると血栓形成傾向になる。我々は、日本人の静脈血栓症の遺伝的背景としてプロテインS-K196E 変異を同定した。本研究では、プロテインS-K196E 変異マウスおよびプロテインS欠損マウスを作製し、それらの血栓形成能等を解析することで、抗血栓薬の評価や開発につながる知見を得ることを目的としている。今年度は、C57BL/6J 系統マウスと共通の遺伝的背景をもったプロテインS-K196E 変異マウスおよびプロテインS欠損ヘテロ接合体マウスの作製を完了し、プロテインSは正常な胚発生に必須の因子であるが、K196E 変異は胚発生に影響を与えないことを明確にした。さらに、これらのマウスでは血漿プロテインS活性が低下しており、血栓症の動物モデルとして有用であることを示した。脳虚血再灌流モデルを用いた検討では、プロテインS-K196E 変異マウスは症状の悪化を示さなかったため、K196E 変異は脳梗塞を悪化させる遺伝的要因にならないことが推定された。本研究により、プロテインS-K196E 変異あるいは部分欠損に伴ってプロテインS活性が低下した血栓症モデルマウスが確立され、今後、静脈血栓症の克服に向けた研究を動物個体レベルで進めることができるようになった。

A. 研究目的

プロテインSは、血液凝固制御系で機能する約 75 kDa の糖タンパク質である。リン脂質膜上で活性化プロテインCと複合体を形成し、活性化第V因子および第VIII因子を分解することで、血液の凝固活性を抑制する。プロテインSの機能が質的あるいは量的に低下すると、止血系のバランスは血栓形成傾向に傾く。

我々は、静脈血栓症の遺伝的背景として、プロテインSの機能低下を伴う K196E 変異を同定した。静脈血栓症の発症に対して、オッズ比 4.7-5.6 を示す。プロテインS-K196E 変異は日本人約 55 人に1人の頻度で存在し、全国で約1万人の日本人がホモ接合体であると推定される。

本研究では、K196E 変異を導入したプロテインSを保有するマウスおよびプロテインSを欠損したマウスを作製し、それらの血栓形成能を野生型マウスと比較検討する。3年間の研究期間において、まず1年目に、作製したプロテインS-K196E 変異保有マウスおよびプロテインS欠損マウスの血液学的解析を行い、2年目には局所脳虚血障害、組織因子投与、

塩化鉄傷害などの血栓評価系を用いた *in vivo* 血栓形成能を評価し、3年目に抗凝固薬や脳梗塞予防治療薬などの薬効を評価する予定で研究を進める。これらの疾患モデルマウスは、独立行政法人医薬基盤研究所に登録・寄託することにより資源化を図る。

B. 研究方法

プロテインS-K196E 変異およびプロテインS欠損をもたらす遺伝子組換えを導入したマウスの交配と繁殖を繰り返して、遺伝的背景が十分に均一化されたマウス集団を確立した。この作業は、血液学的性状や血栓形成能等に対するプロテインSの効果を正確に評価するために必須である。

プロテインS以外の遺伝的背景が均一となったマウス集団を用いて、野生型マウス群、プロテインS-K196E 変異保有ヘテロ接合体マウス群、プロテインS-K196E 変異保有ホモ接合体マウス群、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウス群を準備した。なお、プロテインS欠損ホモ接合体マウスは胎性致死と考えられるため、本研究の解析対象としなかった。

野生型を含めた、これら4群のマウスの血液学的性状を分析し、群間の比較解析を行った。各群のマウスから血液を採取し、マウス活性化プロテインC (John Griffin 博士から惠与) を添加した活性化部分トロンボプラスチン時間の延長によるプロテインS補酵素活性を測定し、プロテインSのK196E変異や部分欠損による活性低下を測定した。プロテインSは、活性化プロテインCの補酵素として機能する一方で、外因系凝固インヒビターの補酵素としての機能も合わせ持つことが報告されているため、両者に対するプロテインS補酵素活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理面に配慮すべき研究に該当しない。

C. 研究結果

遺伝子組換え技術によりプロテインS-K196E変異遺伝子あるいはプロテインS欠損遺伝子を導入したマウスを、野生型C57BL/6J系統マウスに対して10世代の戻し交配を行う作業が完了した。これにより、C57BL/6J系統マウスと共通の遺伝的背景のもとで、プロテインS変異および部分欠損の影響を解析できる環境が整備された。

C57BL/6J系統の遺伝的背景に均一化されたマウスにおいても、プロテインS-K196E変異遺伝子のヘテロ接合体およびホモ接合体は正常に誕生し、繁殖能力も正常に維持されていた。少なくとも通常の飼育条件下では、野生型マウスと見かけ上の差異は見られなかった。一方、プロテインS欠損のホモ接合体マウスは予想通り胎生致死であり、ヘテロ接合体は正常に誕生した。

野生型マウス群、プロテインS-K196E変異ヘテロ接合体マウス群、同変異ホモ接合体マウス群、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウス群の個体から血液を採取し、血漿成分を調製した。活性化プロテインC添加後の活性化部分トロンボプラスチン時間の延長を指標にしてプロテインS補酵素活性を測定した結果、3種類のプロテインS遺伝子組換えマウス群において、いずれも野生型マウス群に比べて血漿プロテインS活性の低下が認められた。なかでも、プロテインS欠損ヘテロ接合体マウスが最も顕著な変化を示し、プロテインS活性は野生型マウスの約50%に低下していた。

これらの実験が順調に進んだので、2年目の実験として計画していた三血管閉塞法による局所脳虚血再灌流障害モデルを用いた検討

を行った。その結果、3種類のプロテインS遺伝子組換えマウス群のいずれにおいても、野生型マウス群に比べて、脳梗塞巣の拡大や神経症状の悪化等は認められなかった。

D. 考察

遺伝的背景を均一化したマウス群を比較することにより、プロテインSはマウスの正常な胚発生に必須の因子であるが、K196E変異はホモ接合体であっても胚発生に影響を与えないことが明確になった。プロテインSの抗凝固作用あるいはそれ以外の生物学的作用を考える上で興味深い結果である。

3種類のプロテインS遺伝子組換えマウス群において、いずれも野生型マウス群に比べて血漿プロテインS活性の低下が認められたことから、本研究で確立したマウスは、血栓症の動物モデルとして有用であることが示された。

脳虚血再灌流モデルを用いた検討では、プロテインS-K196E変異マウス群は野生型マウス群に比べて症状の悪化を示さなかったため、日本人に高頻度に見られるK196E変異は、脳梗塞を悪化させる遺伝的要因にならないと推定された。

E. 結論

本研究により、プロテインS-K196E変異あるいは部分欠損に伴ってプロテインS活性が低下した血栓症モデルマウスが確立された。今後、静脈血栓症の克服に向けた研究を個体レベルで進めることができるようになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yuji Shono, Chiaki Yokota, Yuji Kuge, Shinsuke Kido, Akina Harada, Koichi Kokame, Hiroyasu Inoue, Mariko Hotta, Kenji Hirata, Hideo Saji, Nagara Tamaki, and Kazuo Minematsu: Gene expression associated with an enriched environment after transient focal ischemia. *Brain Res* 1376, 60-65 (2011)

Megumi Hatori, Tsuyoshi Hirota, Michiko Iitsuka, Nobuhiro Kurabayashi, Shogo Haraguchi, Koichi Kokame, Ryuichiro Sato, Akira Nakai, Toshiyuki Miyata, Kazuyoshi

Tsutsui, and Yoshitaka Fukada: Light-dependent and circadian clock-regulated activation of SREBP, XBP1 and HSF pathways in the pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 4864-4869 (2011)

Kenji Hirata, Yuji Kuge, Chiaki Yokota, Akina Harada, Koichi Kokame, Hiroyasu Inoue, Hidekazu Kawashima, Hiroko Hanzawa, Yuji Shono, Hideo Saji, Kazuo Minematsu, and Nagara Tamaki: Gene and protein analysis of brain derived neurotrophic factor expression in relation to neurological recovery induced by an enriched environment in a rat stroke model. *Neurosci Lett* 495, 210-215 (2011)

Koichi Kokame, Toshiyuki Sakata, Yoshihiro Kokubo, and Toshiyuki Miyata: von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population. *J Thromb. Haemost* 9, 1426-1428 (2011)

Toshihiro Marutani, Tomoji Maeda, Chiaki, Tanabe, Kun Zou, Wataru Araki, Koichi Kokame, Makoto Michikawa, and Hiroto Komano: ER-stress-inducible Herp, facilitates the degradation of immature nicastrin. *Biochim Biophys Acta* 1810, 790-798 (2011)

Yoshihiro Fujimura, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Hideo Yagi, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Mitsuru Murata, and Toshiyuki Miyata: Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost* 9 (Suppl 1), 283-301 (2011)

Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Tomohiko Okuda, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, and Toshiyuki Miyata: NDRG4 protein-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia. *J Biol Chem* 286, 26158-26165 (2011)

Koichi Kokame, Yoshihiro Kokubo, and

Toshiyuki Miyata: Polymorphisms and mutations of ADAMTS13 in Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost* 9, 1654-1656 (2011)

Toshiaki Takeichi, Mika Takarada-Iemata, Koji Hashida, Hirofumi Sudo, Tomohiko Okuda, Koichi Kokame, Taku Hatano, Masashi Takanashi, Sayaka Funabe, Nobutaka Hattori, Osamu Kitamura, Yasuko Kitao, and Osamu Hori: The effect of NdrG2 expression on astroglial activation. *Neurochem Int* 59, 21-27 (2011)

Reiko Neki, Tomio Fujita, Koichi Kokame, Isao Nakanishi, Masako Waguri, Yuzo Imayoshi, Noriyuki Suehara, Tomoaki Ikeda, and Toshiyuki Miyata: Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol* 94, 150-155 (2011)

Masayuki Fujioka, Takafumi Nakano, Kazuhide Hayakawa, Keiichi Irie, Yoshiharu Akitake, Yuya Sakamoto, Kenichi Mishima, Carl Muroi, Yasuhiro Yonekawa, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Kenji Nishio, Kazuo Okuchi, Katsunori Iwasaki, Michihiro Fujiwara, and Bo K. Siesjo: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, In press

Yuka Eura, Hiroji Yanamoto, Yuji Arai, Tomohiko Okuda, Toshiyuki Miyata, and Koichi Kokame: Derlin-1 deficiency is embryonic lethal, Derlin-3 deficiency appears normal, and Herp deficiency is intolerant to glucose load and ischemia in mice. *PLoS ONE*, In press

小亀浩市: 日本人のADAMTS13. *日本血栓止血学会誌* 22, 368-373 (2011)

宮田敏行, 喜多俊行: DIC と外因系凝固反応,

マイクロパーティクル. 医学のあゆみ 238, 5-9 (2011)

宮田敏行, 喜多俊行: 内因系凝固反応と血栓症. Annual Review 血液 2012 236-244 (2012)

宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 坂野史明, 中山大輔, 武田壮一: ADAMTS13 研究の最先端. 臨床血液, 印刷中

2. 学会発表

Koichi Kokame: Findings from ADAMTS13 activity assay. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Koichi Kokame, Yoshihiro Kokubo, and Toshiyuki Miyata: Estimation of the number of individuals with a congenital ADAMTS13 deficiency in Japan. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Tomohiko Okuda, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, and Toshiyuki Miyata: NDRG4-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia with the decreased level of BDNF in the cortex. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Koji Iihara, and Toshiyuki Miyata: Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Yukako Nakajo, Hiroji Yanamoto, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Factor V Leiden mice are vulnerable for ischemic stroke. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

井本(山本)ひとみ, 小亀浩市, 奥田智彦, 中城有香子, 柳本広二, 宮田敏行: NDRG4 欠損マウスは、大脳皮質 BDNF 量の低下とともに、記憶学習能力の低下と局所脳虚血による梗塞巣の増大を示す. 第9回血液・血管オルビス, 東京, 2011年8月

中山大輔, 秋山正志, 武田壮一, 小亀浩市, 高木淳一, 宮田敏行: P475S型ADAMTS13の非触媒領域の立体構造決定. 第16回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 豊中, 2011年8月

井本(山本)ひとみ, 小亀浩市, 奥田智彦, 中城有香子, 柳本広二, 宮田敏行: NDRG4は大脳皮質中のBDNF量を正常に保ち、記憶学習能力の維持作用と虚血性脳卒中に対する脳保護作用を示す. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011年9月

秋山正志, 中山大輔, 武田壮一, 小亀浩市, 高木淳一, 宮田敏行: P475S型ADAMTS13タンパク質の部分立体構造決定. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011年9月

喜多俊行, 坂野史明, 中城有香子, 柳本広二, 飯原弘二, 宮田敏行: 血液凝固第V因子Leiden変異マウスの虚血性脳梗塞に対する脆弱性. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011年9月

宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 武田壮一, 坂野史明 ADAMTS13 研究の最先端. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011年10月

Yusuke Satoh, Takafumi Yokota, Hirokazu Tanaka, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Itaru Matsumura, Kenji Oritani, and Yuzuru Kanakura: SATB1 induces early lymphocyte differentiation from primitive hematopoietic progenitors. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011年10月

Yoshihiro Fujimura, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Mitsuru Murata, and Toshiyuki Miyata. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011年10月

樋口(江浦)由佳・宮田敏行・小亀浩市: ハイ
ドロダイナミクス法による in vivo 遺伝子導
入を用いた ERAD 基質の解析. 第 34 回日本分
子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

プラスミノージェン-A622T 変異マウスに関する研究

研究分担者 坂野史明 国立循環器病研究センター分子病態部 研究員
研究協力者 喜多俊行 国立循環器病研究センター分子病態部 流動研究員

研究要旨

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天的異常は血栓症のリスクとなる。日本人には線溶因子プラスミノージェンの A620T 変異（マウスでは A622T 変異）が約 25 名に 1 名の頻度で認められ、約 5 万人がホモ接合体であると推計される。本変異は日本人に特異的であり、白人には存在しない。現在まで、本変異と血栓症との関連は示されていないが、変異保有者では持続的に線溶活性が低下するため、潜在的な血栓性リスクとなっている可能性がある。本研究では、プラスミノージェン-A622T 変異マウスを作製し、日本人の血栓症における本変異の位置づけを明確にすると共に、最適な予防・治療法を開発するための疾患モデルとして確立することを目的としている。本年度は、ジーンターゲティングにより、C57BL/6J マウス系統の遺伝的背景を持つプラスミノージェン-A622T 変異マウスの作製に成功した。得られた変異マウスはヘテロおよびホモ接合体ともに、正常に出生し、繁殖力も保持していた。本変異マウスでは、血漿プラスミノージェン活性が低下しており、今後、各血栓症におけるプラスミノージェン-A620T 変異の影響を個体レベルで解析することが可能となった。

A. 研究目的

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天的異常は血栓症のリスクとなるが、原因となる遺伝子変異は人種間で大きく異なる。白人種では凝固第 V 因子の R506Q 変異が血栓症の遺伝的リスクとなっており、変異を保有するモデルマウスも確立されているが、この変異は日本人には存在しない。日本人には線溶因子プラスミノージェンの A620T 変異（マウスでは A622T 変異）が広く存在し、一般住民を対象とした当研究室の検討でもアレル頻度 2%（約 25 人に 1 人がヘテロ接合体）と高頻度に認められた。

プラスミノージェンは、フィブリン分解反応の鍵となる酵素プラスミンの前駆体であり、組織型プラスミノージェンアクティベーターやウロキナーゼにより、プラスミンに変換され、血栓を溶解する。A620T 変異はプラスミノージェン活性を著減させるため、変異保有者では持続的に血栓溶解能が低下する。現在まで、本変異と血栓症との関連は示されておらず、一次的なリスクとはならないと予想されているが、変異保有者は感染や外傷、手術等に引き続いて血栓症を発症する例があり、血栓形成を助長する要因が重なった場合には血栓症が引き起こると考えられる。

本研究ではジーンターゲティングにより、プラスミノージェン-A622T 変異をもつマウスを作製し、日本人の血栓症における本変異の位置づ

けを明確にすると共に、最適な予防・治療法を開発するための疾患モデルとして確立することを目的としている。また、作製したマウスは（独）医薬基盤研究所に登録、寄託して、国内外の研究者に譲渡する。

B. 研究方法

本研究は国立循環器病研究センター動物実験委員会の承認を得て実施した。

マウスプラスミノージェン遺伝子のエキソン 15 に一塩基置換 1864G>A (Ala622Thr) を入れたターゲティングベクターを構築し、常法に従って、プラスミノージェン-A622T 変異ノックインマウスを作製した。

野生型マウス、プラスミノージェン-A622T ヘテロ接合体マウスおよびホモ接合体マウスから血漿を回収し、プラスミノージェン活性をウロキナーゼ添加後のプラスミン活性を指標に測定した。また、プラスミノージェン抗原量を ELISA 法により測定した。

C. 研究結果

ターゲティングベクターの導入により、計 3 ラインの相同組換え陽性 ES クローンを得ることに成功し、これらを用いてプラスミノージェン-A622T マウスを樹立した。ES 細胞スクリーニングのために導入した Neomycin 耐性遺伝子 (loxP 配列で挟まれている) は、Cre リコンビ

ナーゼを発現する C57BL/6J マウスとの交配により除去し、外来遺伝子挿入によるプラスミノゲン遺伝子発現への影響を排除した。

得られたプラスミノゲン-A622T マウスは、ヘテロおよびホモ接合体ともに、正常に出生し、発育にも異常は認められなかった。また、雌雄とも生殖能力は正常であった。血漿プラスミノゲン抗原量は、野生型マウスとプラスミノゲン-A622T マウスで違いはみられなかったが、血漿プラスミノゲン活性は、プラスミノゲン-A622T マウスで低下が認められ、ホモ接合体マウスの活性は野生型マウスの約 25%まで低下していた。

D. 考察

作製したプラスミノゲン-A622T 変異マウスは、少なくとも SPF 飼育環境下では正常に発育し、外見上明らかな異常は呈さなかった。プラスミノゲン欠損マウスでは、成長遅延や寿命の短縮、生殖能の低下、脱腸などの異常が報告されているが、プラスミノゲン-A622T 変異はこうした異常の原因にはならないことが明らかとなった。本変異は胚発生および個体の成育には影響を与えないと考えられる。

プラスミノゲン-A622T 変異マウスでは、ヘテロおよびホモ接合体ともに、血漿プラスミノゲン活性の有意な低下が認められ、ヒトと同様にマウスでも本変異は線溶活性低下を引き起こす事が明らかとなった。今後、脳梗塞モデルや静脈血栓モデル等の実験的血栓モデルを用いて本変異マウスを解析することにより、プラスミノゲン-A622T 変異が如何なる血栓症状と関わっているか解明できると考えられる。

E. 結論

プラスミノゲン-A622T マウスの作製に成功した。本変異マウスでは血漿プラスミノゲン活性が低下しており、日本人の血栓症における本変異の影響を解析する上で適切なモデル動物であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Tomasz Brzoska,

Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Tetsumei Urano: In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall. *Pflugers Arch*, 461(6), 623-633, 2011.

Fumiaki Banno, Takahiro Nojiri, Sachiko Matsumoto, Kei Kamide, Toshiyuki Miyata: RGS2 deficiency in mice does not affect platelet thrombus formation at sites of vascular injury. *J Thromb Haemost*, 10(2), 309-311, 2012.

Masayuki Fujioka, Takafumi Nakano, Kazuhide Hayakawa, Keiichi Irie, Yoshiharu Akitake, Yuya Sakamoto, Kenichi Mishima, Carl Muroi, Yasuhiro Yonekawa, Fumiaki Banno, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Kenji Nishio, Kazuo Okuchi, Katsunori Iwasaki, Michihiro Fujiwara, Bo K. Siesjö: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, 2012, in press.

宮田敏行, 喜多俊行: DIC と外因系凝固反応, マイクロパーティクル. *医学のあゆみ*, 238(1), 5-9, 2011.

宮田敏行, 喜多俊行: 内因系凝固反応と血栓症, *Annual Review 血液 2012*, 高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉譲・小島勢二 編集, 中外医学社, 236-244, 2012.

宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 坂野史明, 中山大輔, 武田壮一: ADAMTS13 研究の最先端. *臨床血液*, 2012, 印刷中.

2. 学会発表

Fumiaki Banno: Genetic mouse models for evaluating pathophysiological roles of ADAMTS13. 57th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July, 2011.

Tomasz Brzoska, Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata,