

201208018A

(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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮田 敏行

平成25(2013)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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮田 敏行

平成25(2013)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. 静脈血栓症モデルを用いたプロテイン S-K196E 変異マウスの解析 . . . . .               | 11 |
| 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)                             |    |
| 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)                             |    |
| 田嶋 優子 (独立行政法人 国立循環器病研究センター 分子病態部)                             |    |
| 2. 脳虚血再灌流モデル及び皮膚創傷モデルを用いたプラスミノゲン-A622T 変異マウスの<br>解析 . . . . . | 15 |
| 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)                             |    |
| 田嶋 優子 (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 . . . . . 19

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 21

(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（オッズ比：3.74-8.56）、本変異は約 55 名に 1 名の頻度で認められ（アレル頻度：0.0089）、約 1 万人がホモ接合体であると報告した。また、私達は、日本人には線溶因子プラスミノーゲンの活性の低下を伴う 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) が血栓症のリスクとして報告されている。FVL 変異は白人種の 2-15%に見られ、静脈血栓症に対するオッズ比は 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これらの変異の位置づけを明確にするとともに、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。

前年度までに、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、これら遺伝子改変マウスの血栓能を明らかにする研究を開始した。この際、白人種に見られる凝固第 V 因子 R504Q 変異を持つマウス（FV R504Q 変異マウス）と比較検討することで、白人と日本人の血栓能の違いを明らかにする手法を取ることにした。

研究 2 年次である今年度は、プロテインS-K196E 変異マウスの静脈血栓症状を白人型血栓症モデルである FV R504Q 変異マウスと比較検証した。肺塞栓モデル実験では、プロテインS-K196E 変異マウスは、FV R504Q 変異マウスと同様に、野生型マウスに比べ、肺血管の閉塞が進行し、高い死亡率を示した。また、深部静脈血栓モデル実験においても、プロテインS-K196E 変異マウスおよび FV R504Q 変異マウスは、野生型マウスに比べて重篤な症状を呈したことから、プロテインS-K196E 変異が静脈血栓症の重症化の原因となることが明確になった。以上の結果から、プロテインS-K196E 変異マウスは、日本人の静脈血栓症克服に向けた研究を進める上で、優れたモデル動物であることを明らかにした。一方、プラスミノーゲン-A622T 変異マウスを用いて、局所脳虚血再灌流後の脳梗塞形成、および創傷治癒過程に対する本変異の影響を解析した。その結果、プラスミノーゲン-A622T マウスには脳梗塞巣拡大や創傷治癒遅延は見られなかったため、プラスミノーゲンの A620T 変異は日本人におけるこれらの疾患の増悪要因とはならないと考えられた。

以上のように、本年度の研究は計画通りに進捗した。最終年度は、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。

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

太古の人類では、怪我などによる出血は生命にとって脅威であったことは難くない。太古の人類は全身に傷を負い、出血を防ぐ血栓形成機構の発達は有利であったと思われる。その名残として、血栓傾向を示す遺伝子変異が人類に残されていると考えられるが、怪我の少ない現代社会に生きる人類にとっては、血栓傾向を示す遺伝子変異は、血管内血栓、すなわち心筋梗塞や脳梗塞、静脈血栓症のリスクと考えられる。

血栓症のリスクとなる血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天性異常症は、変異の頻度により、極めて頻度が低いまれな変異 (very rare mutation) と、低頻度の変異 (low frequency mutation) に分けることができる。極めて頻度が低いまれな変異として、静脈血栓塞栓症患者の遺伝的リスクとして確立しているアンチトロンビン欠損症、プロテイン C 欠損症、プロテイン S 欠損症が知られている。低頻度の変異としては、白人種に見られる凝固第 V 因子 Leiden (FVL) 変異 (R506Q 変異, Arg506Gln 変異) とプロトロンビン G20210A 変異、および日本人に見られるプロテイン S K196E 変異がある。静脈血栓塞栓症患者の遺伝的リスクとしての低頻度の変異には、人種間に違いが見られ、それぞれの人種を対象にした研究が重要である。

プロテイン S は、2つの作用により凝固反応を制御する。1つ目は活性化プロテイン C (APC) のコファクター活性であり、2つ目は組織因子経路インヒビター (TFPI) のコファクター活性である。プロテイン S は、抗凝固プロテアーゼである APC が活性化第 V 因子および活性化第 VIII 因子を分解する際のコファクターとして働き、APC のプロテアーゼ活性を促進することで、抗凝固能を発揮する。また、プロテイン S は、TFPI による Xa 因子の阻害を促進する働きをもち、抗凝固能を発揮する。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。

私達は、厚生労働省難治性疾患克服研究事業「血液凝固異常症に関する調査研究班」を通して、プロテイン S の機能低下を伴う K196E 変異が静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであることを同定した。静脈血栓塞栓症に対して、オッズ比 3.7-8.6 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。

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

在することを報告し、一般住民を対象とした検討でアレル頻度 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。本変異は日本人を含めた東アジア人にも見られる。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、組織プラスミノーゲン活性化因子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、本変異のヘテロ接合体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れと考えられる。また、変異ホモ接合体の血栓症との関連については報告がない。

白人では、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 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、小児や若年者での脳梗塞との関連が報告されている。ヒト第 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 FeCl<sub>3</sub> 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であると考えられる。

すでに述べたように、静脈血栓塞栓症の発症リスク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。これらの人種特異的な血栓性遺伝子変異の研究は、それぞれの人種の血栓症の理解を高める。また、これらの人種特異的な血栓性遺伝子変異は、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。

白人種に見られる FVL 変異を保有するモデルマウスは既に確立され解析されているが、日本人に見られるプロテイン S -K196E 変異、および

日本人を含めた東アジア人に見られるプラスミノゲン A620T 変異を有するマウスは未だ作製されていない。

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、日本人に特異的な血栓性遺伝子変異がどのように血栓症に関与するか明らかにすることを目的とする。すなわち、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。また、本研究は変異保有者の血栓症発症の最適な予防・治療法を開発するための疾患モデルの確立につながる。本研究では、日本人に特有な血栓性遺伝子変異(プロテイン S-K196E 変異、プラスミノゲン A610T 変異)と白人種に特有な血栓性遺伝子変異(FVL 変異)をマウス個体レベルで比較検討することにより、人種間の血栓能の違いを明らかに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、1年目は、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、プラスミノゲン-A622T 変異マウスの血液学的解析を行い、2年目は肺塞栓モデル、深部静脈モデル、局所脳虚血再灌流モデルなどの血栓評価系を用いた *in vivo* 血栓形成能の評価を行った。次いで、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。

ここに2年次の研究結果を記載する。

## B. 研究方法

### 使用動物

野生型マウス (C57BL/6J)、プロテイン S-K196E 変異 (c. 586A>G) ヘテロ接合体マウス (自ら作製)、プロテイン S-K196E 変異ホモ接合体マウス (自ら作製)、プロテイン S 遺伝子欠損ヘテロ接合体マウス (自ら作製)、プラスミノゲン-A622T 変異 (c. 1864G>A) ホモ接合体マウス (自ら作製) および凝固第 V 因子-R504Q 変異ホモ接合体マウス (Jackson 研究所から購入) の合計 6 系統を解析対象とした。本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し、遺伝的背景がそろったマウスで実験を行った。

### 組織因子投与およびポリリン酸を投与による肺塞栓モデル

マウスに外因系凝固を活性化する組織因子あるいは、内在性の内因系凝固促進物質である長鎖無機ポリリン酸を下大静脈から投与することで肺塞栓を惹起し、呼吸停止までの時間を 20 分間測定して生存率をもとめた。また、呼吸停止 2 分後に右心室から Evans blue を注入し、肺全体の染色像から肺血管閉塞スコア (0 = 閉塞無し~4 = 完全閉塞の 5 段階) を判定した。

### 通電による深部静脈血栓モデル

マウス下大静脈にステンレス電極を挿入して 200 $\mu$ A・10 分間通電した。電極の電気分解の結果生じるフリーラジカルにより、血管内皮細胞が活性化し、血栓形成が誘発される。生じる血栓が最大となる処置 2 日後に血栓重量および末梢血血小板数を測定した。

### 三血管閉塞による一過性局所脳虚血再灌流モデル

イソフルレン麻酔下、マウスの頭蓋骨にドリルで孔を開け、左中大脳動脈 M1 末端部を電気焼灼して閉塞した。両側総頸動脈を血管クリップで一過性に閉塞することで三血管閉塞により左中大脳動脈支配領域に局所虚血を誘導し、15 分後にクリップを外して再灌流させた。虚血負荷 24 時間後に神経学的スコアの判定を行った後、脳を摘出してトリフェニルテトラゾリウムクロライドによる生細胞染色を用いて脳梗塞巣体積、浮腫率を判定した。

### 皮膚創傷モデル

トリプロモエタノール麻酔下、マウス背部を剃毛し、生検トレパンを用いて直径 5 mm の皮膚全層欠損創を一匹あたり 4 ヶ所作製した。各創部の面積を経日的に 2 週間測定し、治癒過程の進行度に違いが見られるか解析した。

### (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。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 変異マウス、プロテイン S 遺伝子欠損マウスおよび FVL ホモ変異マウスの肺塞栓モデル

組織因子投与により急性肺塞栓誘発後の生存率 (N = 17) は、野生型マウスで 88.2%、プ

ロテインS-K196E ヘテロ変異マウスで47.1%、ホモ変異マウスで35.3%、プロテインSヘテロ遺伝子欠損マウスで35.3%、FVLホモ変異マウスで23.5%であり、4種類の遺伝子変異マウスで野生型マウスに比べて低下した。

同様に長鎖無機ポリリン酸投与後の生存率(N=16)も野生型マウス(81.3%)に比べて、プロテインS-K196Eヘテロ変異マウス(37.5%)、ホモ変異マウス(25%)、プロテインSヘテロ遺伝子欠損マウス(31.3%)、FVLホモ変異マウス(18.8%)で低下した。4種類の遺伝子改変マウスは、いずれも肺血管閉塞スコアが野生型マウスに比べて上昇しており、肺塞栓症状が重症化していた。

#### プロテインS-K196E変異マウス、プロテインS遺伝子欠損マウスおよびFVLホモ変異マウスの静脈血栓モデル

深部静脈血栓症モデル実験(N=12)においても、遺伝子変異マウスでは野生型に比べて、下大静脈障害後に形成される血栓重量が増加し、消耗性と考えられる血小板減少が亢進したことから、プロテインS-K196E変異はFVL変異と同様に、マウス静脈系血栓症の増悪要因となることが確認された。

#### プラスミノージェン-A622Tホモ変異マウスの三血管閉塞による一過性局所脳虚血再灌流モデル

局所脳虚血再灌流実験において、虚血負荷24時間後の脳梗塞巣体積(平均値±標準偏差, N=10)は、野生型マウスで $28.8 \pm 5.8 \text{ mm}^3$ 、プラスミノージェン-A622Tホモ変異マウスで $30.5 \pm 7.1 \text{ mm}^3$ であり、両群間に有意差は認められなかった。脳浮腫率および神経学的スコアも群間で違いがなかったことから、プラスミノージェン-A620T変異は脳梗塞の増悪要因ではないと考えられた。

#### プラスミノージェン-A622Tホモ変異マウスの皮膚創傷モデル

皮膚創傷モデル実験において、作製した皮膚創傷は野生型マウス、プラスミノージェン-A622Tホモ変異マウスとともに12~14日でほぼ完全に修復された。創面積の経日変化にも、両群間で違いは無く、プラスミノージェン-A620T変異は創傷治癒遅延の原因とはならないと考えられた。

## D. 考察

一年次の研究から、1)プロテインS-K196Eヘテロ変異マウスおよびホモ変異マウスは正常に誕生し、繁殖能力も正常に維持されている、2)プロテインS遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死でありヘテロ体は正常に誕生し成育する、3)プロテインS-K196Eヘテロ変異マウス、ホモ変異マウス、プロテインS遺伝子ヘテロ欠損マウスのプロテインS活性は、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た測定では、いずれも野生型マウスに比べて低下が認められた。4)なかでも、プロテインS遺伝子ヘテロ欠損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、5)3種類のプロテインS遺伝子組換えマウスのいずれにおいても、三血管閉塞法による局所脳虚血再灌流障害モデルでは、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、6)プラスミノージェン-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、7)プラスミノージェン抗原量は、野生型マウスとプラスミノージェン-A622T変異マウスで違いはみられなかったが、プラスミノージェン活性は、プラスミノージェン-A622T変異マウスで低下が認められ、ホモ変異マウスの活性は野生型マウスの約22%まで低下していた、8)FVL変異マウスでは三血管閉塞法による脳梗塞巣の体積は、野生型マウスの梗塞巣より有意に大きく、ホモ変異マウスは虚血後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、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。

本年度は、プロテインS遺伝子改変マウスでは、1)肺塞栓モデル、2)静脈血栓モデル、を用いて血栓能の解析を行った。

3種類の静脈血栓症モデル、すなわち、1)組織因子投与による急性肺塞栓モデル、2)ポリリン酸投与による急性肺塞栓モデル、3)通電による内皮障害を通じた静脈血栓モデルでは、いずれのプロテインS遺伝子改変マウス(K196E変異マウスおよび遺伝子欠損マウス)でも、FVLホモ変異マウスと同様に、野生型マウスに比べて著明な静脈血栓形成亢進が認められた。この結果は、プロテインS-K196E変異が静脈血栓症の遺伝的リスクとなるヒトでの研究を支持するものであった。

一方、前年度に行った局所脳虚血再灌流モデル実験では、プロテインS-K196E変異マウスおよびプロテインS遺伝子ヘテロ欠損マウスに



症状の悪化は見られなかった。これまで、プロテイン S-K196E 変異と脳梗塞との関連を示す報告はなく、プロテイン S-K196E 変異マウスはヒトで明らかとなっている研究と矛盾しない表現型を呈しており、日本人の血栓傾向の特徴を反映したモデル動物であると考えられた。

プラスミノゲン-A622T 変異マウスでは、1) 局所脳虚血再灌流モデル、2) 皮膚創傷モデル、を用いて解析を行った。

プラスミノゲン-A622T 変異マウスは、血漿プラスミノゲン活性が低下し、ホモ変異マウスの活性は 22%まで低下し、持続的に血栓溶解能が低下していた。しかし、局所脳虚血再灌流モデルを用いた検討では、プラスミノゲン-A622T ホモ変異マウスには脳梗塞巣の増大は見られず、プラスミノゲン-A620T 変異は脳梗塞を悪化させる遺伝的要因とはならないと推定された。急性期脳梗塞の治療薬として唯一承認されている組換え組織プラスミノゲン活性化因子は、プラスミノゲンの活性化を介して治療効果を発揮するため、プラスミノゲン-A620T 変異はこの治療効果の減弱あるいは出血副作用の軽減に寄与している可能性がある。今後、プラスミノゲン-A622T 変異マウスの脳梗塞における組織プラスミノゲン活性化因子投与の影響についても検討が重要と思われる。

1 年次の研究から、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示さないことが明らかとなった。これまでに、プラスミノゲン遺伝子欠損マウスが作製されている。この遺伝子欠損マウスは、成長遅延、寿命の短縮、生殖能の低下、脱腸などの異常が報告されるが、プラスミノゲン-A620T 変異マウスはこうした異常を示さず、本変異はこれらの異常の原因にはならないことが明らかとなった。約 20% 残存するプラスミノゲン活性が異常を出現させないと考えられた。また、この活性で胚発生および個体成育が正常に行えると考えられた。

プラスミノゲンの活性化は血栓溶解だけでなく、細胞外マトリックスの分解を介した組織の再構築にも寄与しており、プラスミノゲン遺伝子ホモ欠損マウスでは、皮膚創傷治癒の著しい遅延が認められる。しかし、プラスミノゲン-A622T ホモ変異マウスには皮膚創傷治癒遅延は認められなかった。残存する約 20% のプラスミノゲン活性が創傷修復には十分であることを示しており、本変異は組織再構築の異常にはつなが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 変異マウスが日本人型血栓症の適切なモデル動物であることが明らかとなった。今後、日本人の静脈血栓症に対する抗血栓薬の薬効評価を動物個体レベルで進めることが可能になった。プラスミノゲン-A622T ホモ変異ホモマウスに脳梗塞の増悪および創傷治癒の悪化は見られないことが判明した。本変異は血栓症の Modifier として作用することが考えられるので、二重変異マウスなどを用いてこれを検証していきたい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Miyata T: Guest editorial: current understanding of thrombosis and hemostasis—from bench to bedside. *Int J Hematol*, 95(4), 331-332, 2012.

Kita T, Banno F, Yanamoto H, Nakajo Y, Iihara K, Miyata T: Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost*, 10(7), 1453-1455, 2012.

Sato T, Sako Y, Sho M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Nishitoh H, Okiyoneda T, Kokame K, Kaneko M, Taura M, Miyata M, Chosa K, Koga T, Morino-Koga S, Wada I, Kai H: STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol Cell*, 47(1), 99-110, 2012.

Miyata T, Fan X: A second hit for TMA. *Blood*, 120(6), 1152-1154, 2012.

Yokoyama K, Kojima T, Sakata Y, Kawasaki T, Tsuji H, Miyata T, Okamoto S, Murata M: A survey of the clinical course and management of Japanese patients deficient in natural anticoagulants. *Clin Appl Thromb Hemost*, 18(5), 506-513, 2012.

Shin Y, Akiyama M, Kokame K, Soejima K, Miyata T: Binding of von Willebrand factor

cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin(ogen). J Biochem, 152(3), 251-258, 2012.

Fujioka M, Nakano T, Hayakawa K, Irie K, Akitake Y, Sakamoto Y, Mishima K, Muroi C, Yonekawa Y, Banno F, Kokame K, Miyata T, Nishio K, Okuchi K, Iwasaki K, Fujiwara M, Siesjö BK: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. Neurol Sci, 33(5), 1107-1115, 2012.

Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M: ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. Thromb Haemost, 108(6), 1236-1238, 2012.

Morioka M, Matsumoto M, Saito M, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y: The first bout of TTP triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nonparous female with Upshaw-Schulman syndrome. Blood Transfusion, In press.

田中智貴、神吉秀明、山本晴子、豊田一則、宮田敏行、長東一行「脳卒中診療医における観血的処置時の抗血栓薬の休養に関する多施設アンケート調査結果」脳卒中、第34巻、第3号、147-155頁、2012年

宮田敏行「遺伝子多型と抗凝固・抗血小板薬」Modern Physician 第32巻、第6号、749-752頁、2012年

宮田敏行「血栓性素因の成因と病態」第35回シスメックス学術セミナー要旨、5-17頁、2012年

宮田敏行、松本雅則「von Willebrand 因子とADAMTS13」内科、第110巻、第1号、87-90頁、2012年

宮田敏行、長東一行「抗血栓薬に対する遺伝子多型の影響」月刊薬事、第54巻、第7号、71-75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、第53巻、第7号、672-679頁(2012.7) 小亀浩市、宮田敏行「小胞体ストレスと循環器疾患」生体の科学、第63巻、第5号、390-391頁、2012年

小亀浩市「重度高ホモシステイン血症マウスは血栓傾向を示さないというパラドックス」日本血栓止血学会誌、第23巻、第4号、416頁、2012年

秋山正志、平井秀憲、宮田敏行「プラスミノゲンの立体構造」日本血栓止血学会誌、第23巻、第5号、516-519頁、2012年

宮田敏行、樋口由佳「血栓の病理と病態」Vascular Lab、第9巻、第6号、70-73頁、2012年

杉本充彦、土井政明、松井英人、宮田敏行「マウス急性心筋梗塞モデルにおけるADAMTS13の心筋保護作用」日本血栓止血学会誌、第23巻、第6号、590-593頁、2012年

西村 仁、平井秀憲、宮田敏行「凝固 XI 因子の構造と機能」日本血栓止血学会誌、第23巻、第6号、594-598頁、2012年

宮田敏行、松本雅則「ADAMTS13 と von Willebrand 因子」カレントセラピー、第31巻、第3号、94頁、2013年

宮田敏行、小亀浩市、小久保喜弘「先天性ADAMTS13欠損症」臨床検査、印刷中

## 2. 学会発表

吉田瑤子、藤村吉博、松本雅則、早川正樹、芦田明、沢田勇吾、服部元史、服部益治、Xinping FAN、宮田敏行、「本邦における非定型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の患者登録と解析状況」、第115回日本小児科学会学術集会、2012年4月20-22日、福岡市

Akira Ashida, Yoko Yoshida, Xinping Fan, Masanori Matsumoto, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Strategy and algorithm for diagnosis of typical/atypical hemolytic uremic syndrome, 日韓小児腎セミナー, May 12, 2012, Tokyo.

宮田敏行、「血栓性素因の成因と病態」、凝固・血小板研究の新展開 血栓症制圧に向けて、第

35 回シスメックス学術セミナー、2012 年 6 月 2 日、神戸市

長束一行、宮田茂樹、嘉田晃子、内山真一郎、長尾毅彦、山本晴子、宮田敏行、「クロピドグレル抵抗性における遺伝子多型の臨床的意義に関する研究(Cognac study)の経過報告(第1報)」、第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月7日-9日、東京都

宮田茂樹、長束一行、嘉田晃子、宮田敏行、「アスピリン単独治療中の患者群におけるり応力下血小板血栓形成能の評価とその臨床的意義」、第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月7日-9日、東京都

宮田敏行、宮田茂樹、嘉田晃子、川村淳、中川原譲二、古井英介、滝内伸、埴本勝司、苅尾七臣、内山真一郎、斉藤こずえ、長尾毅彦、北川一夫、細見直永、田中啓治、海北幸一、片山泰郎、鑑谷武雄、中根博、和田英夫、服部晃、木村和美、一色高明、西川政勝、山脇健盛、米本直裕、岡田浩美、小川久雄、峰松一夫、長束一行、「プロギア研究：アスピリン投与患者を対象にした心血管系疾患再発の遺伝的背景」、第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月7日-9日、東京都

Xinping Fan, Shigenori Honda, Toshiyuki Miyata, Yoko Yoshida, Masaki Hayakawa, Masanori Matsumoto, Fumihiko Nakamura, Ryousuke Hiwa, Yugo Sawada, Yoshihiro Fujimura, “Establishment of a comprehensive approach to genetic analysis in patients with aHUS” 第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月7日-9日、東京都

阪田敏幸、榛沢和彦、岡本章、光黒真菜、品田恭子、中島孝、佐野道孝、宮田敏行、「凝固法によるプロテインC欠損症スクリーニングの重要性について」、第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月7日-9日、東京都

吉田瑤子、藤村吉博、松本雅則、早川正樹、範新萍、宮田敏行、「本邦における atypical HUS (aHUS) の患者登録と病態解析の状況」、第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月7日-9日、東京都

M Doi, M Sugimoto, H Matsui, M Shima, Y Takeda,

Y Saito, K Nishio, F Banno, K Kokame, T Miyata, “Functional analysis of ADAMTD13 in mouse model of myocardial infarction”, ESC Congress 2012, August 25-29, 2012, Munich, Germany

範新萍、本田繁則、宮田敏行、吉田瑤子、沢田勇吾、服部元史、日和良介、中村文彦、藤丸季可、岩田直之、上村治、松隈英治、会沢佳昭、原田浩、石川英二、和田英夫、松本雅則、芦田明、南学正臣、藤村吉博、「日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者10名の遺伝子解析」、第49回補体シンポジウム、2012年8月24-25日、大阪市

藤村吉博、吉田瑤子、松本雅則、範新萍、本田繁則、宮田敏行、「本邦でのaHUS患者の diagnostic pathwayと登録状況」、ミニシンポジウム、抗補体薬と疾患、可能性と問題点、第49回補体シンポジウム、2012年8月24-25日、大阪市

原田 浩、吉田瑤子、松本雅則、會澤佳昭、萍範新、宮田敏行、藤村吉博、「D-HUSを原疾患とする生体腎移植への適応精査の必要性-補体調節因子の測定を行った1症例の経験」、第48回日本移植学会総会、2012年9月20-22日、名古屋

宮田敏行、「抗血小板薬と遺伝子多型」、シンポジウム6、抗血小板剤の使用戦略、第15回日本栓子検出と治療学会 Embolus2012、2012年10月6日、豊中市

範新萍、本田繁則、宮田敏行、吉田瑤子、松本雅則、藤村吉博、沢田勇吾、服部元史、久永修一、日和良介、中村文彦、藤丸季可、岩田直之、上村治、松隈英治、芦田明、南学正臣、「非定型溶血性尿毒症症候群を発症した日本人5例の遺伝子解析、Genetic analysis of five Japanese patients with aHUS」、第74回日本血液学会学術集会、2012年10月19-21日、京都

坂野史明、喜多俊行、柳本広二、小亀浩市、宮田敏行、「プロテインS徳島(K196E)変異がマウスの肺塞栓症および虚血性脳梗塞に及ぼす影響」、第74回日本血液学会学術集会、2012年10月19-21日、京都市

宮田敏行、「日本人の静脈血栓症と非典型溶血

性尿毒症症候群の遺伝的背景」、京都大学医学部小泉昭夫研究室セミナー、2012年11月2日、京都市

宮田敏行、「血栓形成の分子機構」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、シンポジウム：血液適合性バイオマテリアル、2012年11月27日、仙台市

宮田敏行、「血栓形成の分子機構とその破綻、ADAMTS13 によるフォンビルブランド因子切断と血栓性血小板減少性紫斑病」、東北大学第14回細胞認識応答学セミナー、2012年11月27日、仙台市

宮田敏行、範新萍、吉田瑤子、本田繁則、松本雅則、沢田勇吾、服部元史、久永修一、日和良介、中村文彦、友森麻衣子、宮河真一郎、藤丸季可、山田浩、澤井俊宏、池田勇八、岩田直之、上村治、松隈英治、会沢佳昭、原田浩、和田英夫、石川英二、芦田明、南学正臣、藤村吉博、「非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝的背景」、第85回日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡市

井本(山本)ひとみ、宮田敏行、小亀浩市、「脳と心臓に特異的に発現する細胞内タンパク質 NDRG4は、Na/K-ATPase  $\alpha$ 3 subunitに結合する」Cytoplasmic protein NDRG4 interacts with Na/K-ATPase  $\alpha$ 3 subunit、第85回日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡市

坂野史明、喜多俊行、柳本広二、小亀浩市、宮田敏行、「日本人の遺伝的血栓性リスクを有するモデルマウスの作製と解析」、第85回日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡市

庄美里、佐藤卓史、西頭英起、小亀浩市、金子雅幸、和田郁夫、Mary Ann Suico、首藤剛、甲斐広文、「変異トランスサイレチンの翻訳後 N 型糖鎖修飾における制御因子の探索」、第85回日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡市

Xinping Fan, Yoko Yoshida, Toshiyuki Miyata, Shigenori Honda, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome, December 8-11, 2012. ASH meeting (Atlanta)

Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata and Mitsuhiko Sugimoto, Protective role of ADAMTS13 for myocardium in mouse model of experimental myocardial infarction, December 8-11, 2012. ASH meeting (Atlanta)

Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata and Mitsuhiko Sugimoto, ADAMTS13 Improving the Cell Engraftment Efficacy in Mouse Model of Bone Marrow Transplantation, December 8-11, 2012. ASH meeting (Atlanta)

宮田敏行、「aHUS の遺伝子解析」、第7回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム 2013 VWD/TTP 部会、2013年1月12日、東京都

小亀浩市「ADAMTS13 の基準値と遺伝子多型」第7回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム 2013、2013年1月12日、東京都

芦田明、吉田瑤子、範新萍、松本雅則、服部元史、宮田敏行、藤村吉博、「Atypical HUS における補体制御異常症診断システムの構築」、第46回日本臨床腎移植学会、2013年1月30日-2月1日、東京都

Toshiyuki Miyata, Current situation of TMA in Japan, aHUS genetic tests, 3<sup>rd</sup> Japan aHUS Advisory Board Meeting, February 9, 2013, Tokyo

Toshiyuki Miyata, Thrombophilia and venous thromboembolism, Sysmex Scientific Seminar, March 2<sup>nd</sup>, 2013, Taipei, Taiwan

宮田敏行、「血栓性細小血管障害症の分子機構」、TTM フォーラム、2013年3月9日、東京都

岡田卓也、大崎正登、岡本章、宮田敏行、峰松一夫、豊田一則、「抗トロンビン活性測定キットを用いた推定ダビガトラン血漿中濃度と aPTT との相関」、第38回日本脳卒中学会総会、

2013年3月21日-23日、東京都

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

(別添4)

## II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

静脈血栓症モデルを用いたプロテイン S-K196E 変異マウスの解析

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  
研究協力者 田嶋優子 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 変異マウスを作製し、その血栓形成能を解析することで、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、プロテイン S-K196E 変異マウスの静脈血栓症状を白人型血栓症モデルである凝固第 V 因子-R504Q 変異マウスと比較検証した。肺塞栓モデル実験の結果、プロテイン S-K196E 変異マウスでは、凝固第 V 因子-R504Q 変異マウスと同様に、野生型マウスに比べて肺血管の閉塞が進行し、高い死亡率を示した。また、深部静脈血栓モデル実験においても、プロテイン S-K196E 変異マウス、凝固第 V 因子-R504Q 変異マウスは野生型マウスに比べて重篤な症状を呈したことから、プロテイン S-K196E 変異が静脈血栓症重症化の原因となることが明確になった。プロテイン S-K196E 変異マウスは日本人の静脈血栓症克服に向けた研究を進める上で優れたモデル動物であることが確認できた。

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、プロテイン S 遺伝子を K196E 変異型に置換したノックインマウスおよびプロテイン S を欠損したマウスを樹立し、日本人の血栓症に最適な予防・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。前年度に、C57BL/6J マウスの遺伝的背景をもつプロテイン S-K196E 変異ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウス、プロテイン S ヘテロ欠損マウス（ホモ欠損マウスは胎生致死）を樹立し、一過性局所脳虚血モデルを用いた解析を行った。本年度は、プロテ

イン S-K196E 変異と静脈血栓症との因果関係を明確にするため、2 種類の肺塞栓誘発モデルおよび、深部静脈血栓症モデルを用いた解析を行い、その症状を白人型血栓症モデルである凝固第 V 因子-Leiden (R504Q) 変異マウスと比較検証した。

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。

使用動物

野生型マウス、プロテイン S-K196E 変異ヘテロ接合体マウス、プロテイン S-K196E 変異ホモ接合体マウス、プロテイン S 欠損ヘテロ接合体マウスおよび凝固第 V 因子-R504Q 変異ホモ接合体マウスの合計 5 系統を解析対象とした。

肺塞栓モデル

マウスに外因系凝固を活性化する組織因子あるいは、内在性の内因系凝固促進物質である長鎖無機ポリリン酸を下大静脈から投与することで肺塞栓を惹起し、呼吸停止までの時間を 20 分間測定して生存率をもとめた。また、呼吸停止 2 分後に右心室から Evans blue を注入し、肺全体の染色像から肺血管閉塞スコア（0 = 閉塞無し～4 = 完全閉塞の 5 段階）を判

定した。

#### 深部静脈血栓モデル

マウス下大静脈にステンレス電極を挿入して 200 $\mu$ A・10 分間通電した。電極の電気分解の結果生じるフリーラジカルにより、血管内皮細胞が活性化し、血栓形成が誘発される。生じる血栓が最大となる処置 2 日後に血栓重量および末梢血血小板数を測定した。

(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

組織因子投与により急性肺塞栓誘発後の生存率 (N = 17) は、野生型マウスで 88.2%、プロテイン S-K196E ヘテロ変異マウスで 47.1%、ホモ変異マウスで 35.3%、プロテイン S ヘテロ欠損マウスで 35.3%、凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウスで 23.5%であり、4 種類の遺伝子変異マウスで野生型マウスに比べて低下した。

同様に長鎖無機ポリリン酸投与後の生存率 (N = 16) も野生型マウス (81.3%) に比べて、プロテイン S-K196E ヘテロ変異マウス (37.5%)、ホモ変異マウス (25%)、プロテイン S ヘテロ欠損マウス (31.3%)、凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウス (18.8%) で低下した。4 種類の遺伝子変異マウスでは、いずれも肺血管閉塞スコアが野生型マウスに比べて上昇しており、肺塞栓症状が重症化していた。

深部静脈血栓症モデル実験 (N = 12) においても、遺伝子変異マウスでは野生型に比べて、下大静脈障害後に形成される血栓重量が増加し、消耗性と考えられる血小板減少が亢進したことから、プロテイン S-K196E 変異は凝固第 V 因子-R504Q と同様に、マウス静脈系血栓症の増悪要因となることが確認された。

#### D. 考察

3 種類の静脈血栓症モデルを用いた検討の結果、プロテイン S-K196E 変異マウスでは、プロテイン S ヘテロ欠損マウス、凝固第 V 因子-R504Q 変異マウスと同様に、野生型マウスに比べて著明な静脈血栓形成亢進が認められた。この結果は、ヒト観察研究の結果に合致しており、プロテイン S-K196E 変異保有者での静脈血栓症リスク上昇が、変異に起因することが確認できた。一方、前年度に行った局所脳虚血再灌流モデル実験では、凝固第 V 因

子-R504Q マウスでのみ野生型マウスに比して脳梗塞巣の拡大が認められ、プロテイン S-K196E マウスやプロテイン S ヘテロ欠損マウスに症状の悪化は見られなかった。凝固第 V 因子-Leiden 変異は白人の若年性脳梗塞のリスク要因として報告されているが、プロテイン S-K196E 変異と脳梗塞との関連を示す報告はない。プロテイン S-K196E マウスはこれと矛盾しない表現型を呈しており、日本人の血栓傾向の特徴を反映したモデル動物であると考えられる。

#### E. 結論

本研究により、プロテイン S-K196E 変異マウスが日本人型血栓症の適切なモデル動物であることが明らかとなった。今後、日本人の静脈血栓症に対する抗血栓薬の薬効評価を動物個体レベルで進めることが可能になった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Xinghua Hou, Yuko Tashima, Pamela Stanley: Galactose differentially modulates lunatic and manic fringe effects on Delta1-induced NOTCH signaling. *J Biol Chem*, 287(1), 474-483, 2012.

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.

Yuka Eura, Hiroji Yanamoto, Yuji Arai, Tomohiko Okuda, Toshiyuki Miyata, 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*, 7(3), e34298, 2012.

Kaoru Orihashi, Hiromasa Tojo, Katsuya Okawa, Yuko Tashima, Takashi Morita, Gen Kondoh: Mammalian carboxylesterase (CES)



releases GPI-anchored proteins from the cell surface upon lipid raft fluidization. *Biol Chem*, 393(3), 169-176, 2012.

Takashi Sato, Yasuhiro Sako, Misato Sho, Mamiko Momohara, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Hideki Nishitoh, Tsukasa Okiyoneda, Koichi Kokame, Masayuki Kaneko, Manabu Taura, Masanori Miyata, Keisuke Chosa, Tomoaki Koga, Saori Morino-Koga, Ikuo Wada, Hirofumi Kai: STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol Cell*, 47(1), 99-110, 2012.

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Hiroji Yanamoto, Yukako Nakajo, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata: Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost*, 10(7), 1453-1455, 2012.

Yongchol Shin, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Toshiyuki Miyata: Binding of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin(ogen). *J Biochem*, 152(3), 251-258, 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*, 33(5), 1107-1115, 2012.

Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: ADAMTS13 safeguards

the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 108(6), 1236-1238, 2012.

Masanobu Morioka, Masanori Matsumoto, Makoto Saito, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: The first bout of TTP triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nonparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfusion*, In press.

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* 53(7), 672-679, 2012.

小亀浩市, 宮田敏行: 小胞体ストレスと循環器疾患. *生体の科学* 63(5), 390-391, 2012.

小亀浩市: 重度高ホモシステイン血症マウスは血栓傾向を示さないというパラドックス. *日本血栓止血学会誌* 23(4), 416, 2012.

宮田敏行, 小亀浩市, 小久保喜弘: 先天性ADAMTS13欠損症. *臨床検査*, 印刷中.

## 2. 学会発表

坂野史明, 喜多俊行, 柳本広二, 小亀浩市, 宮田敏行: プロテイン S 徳島 (K196E) 変異がマウスの肺塞栓症および虚血性脳梗塞に及ぼす影響. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都市, 2012 年 10 月 19-21 日.

Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: Protective role of ADAMTS13 for myocardium in mouse model of experimental myocardial infarction. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, USA, December 8-11, 2012.

Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiro Sugimoto: ADAMTS13 improving the cell engraftment

efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, USA, December 8-11, 2012.

田嶋優子, Pamela Stanley: Detection of O-GlcNAc on cell surface glycoproteins. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012 年 12 月 14-16 日.

山本(井本)ひとみ, 宮田敏行, 小亀浩市: 脳と心臓に特異的に発現する細胞内タンパク質 NDRG4 は  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 3$  サブユニットに結合する. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012 年 12 月 14-16 日.

庄美里, 佐藤卓史, 西頭英起, 小亀浩市, 金子雅幸, 和田郁夫, Mary Ann Suico, 首藤剛, 甲斐広文: 変異トランスサイレチンの翻訳後 N 型糖鎖修飾における制御因子の探索. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012 年 12 月 14-16 日.

坂野史明, 喜多俊行, 柳本広二, 小亀浩市, 宮田敏行: 日本人の遺伝的血栓性リスクを有するモデルマウスの作製と解析. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012 年 12 月 14-16 日.

小亀浩市: ADAMTS13 の基準値と遺伝子多型. 第 7 回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム, 東京, 2013 年 1 月 12 日.

#### 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

脳虚血再灌流モデル及び皮膚創傷モデルを用いたプラスミノゲン-A622T 変異マウスの解析

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 田嶋優子 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性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。本変異は日本人を含む東アジア人に特異的であり、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らかにすることを目的としている。前年度にプラスミノゲン-A622T 変異マウスを樹立し、変異マウスでは血漿中の線溶活性が低下することを確認した。本年度は、樹立した変異マウスを用いて、局所脳虚血再灌流後の脳梗塞形成および、創傷治癒過程に対する本変異の影響を解析した。その結果、プラスミノゲン-A622T マウスに脳梗塞巣拡大や創傷治癒遅延は見られなかったため、プラスミノゲンの A620T 変異は日本人におけるこれらの疾患の増悪要因とはならないと考えられた。

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性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ゲンの A620T 変異（マウスでは A622T 変異）が広く存在し、我々が一般住民を対象に行っ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た。

プラスミノゲンは、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、組織型プラスミノゲン活性化因子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 変異はプラスミノゲン活性を著減させるため、変異保有者では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引き起こると考えられる。

本研究ではジーンターゲットングにより、プラスミノゲン遺伝子を A622T 変異型に置換したマウスを作製し、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。

前年度に、C57BL/6J マウスの遺伝的背景を持つプラスミノゲン-A622T 変異ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスを樹立し、これらのマウスでは血漿線溶活性が低下することを確認した。本年度は、A622T 変異によるプラスミノゲン活性低下が脳梗塞および組織修復に及ぼす影響を調べるため、一過性局所脳虚血再灌流モデルおよび皮膚創傷モデルを用いた解析を行った。

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。

使用動物

野生型 C57BL/6J マウスおよび C57BL/6J 遺伝的背景のプラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスを解析対象とした。

一過性局所脳虚血再灌流モデル

イソフルレン麻酔下、マウスの頭蓋骨にドリルで孔を開け、左中大脳動脈 M1 末端部を電気焼灼して閉塞した。両側総頸動脈を血管クリップで一過性に閉塞することで、左中大脳動脈支配領域に局所虚血を誘導し、15 分後にクリップ

を外して再灌流させた。虚血負荷 24 時間後に神経学的スコアの判定を行った後、脳を摘出してトリフェニルテトラゾリウムクロライドによる生細胞染色を用いて脳梗塞巣体積、浮腫率を判定した。

#### 皮膚創傷モデル

トリプロモエタノール麻酔下、マウス背部を剃毛し、生検トレパンを用いて直径 5 mm の皮膚全層欠損創を一匹あたり 4ヶ所作製した。各創部の面積を経日的に 2 週間測定し、治癒過程の進行度に違いが見られるか解析した。

(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

局所脳虚血再灌流実験において、虚血負荷 24 時間後の脳梗塞巣体積 (平均値±標準偏差, N = 10) は、野生型マウスで  $28.8 \pm 5.8 \text{ mm}^3$ 、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで  $30.5 \pm 7.1 \text{ mm}^3$  であり、両群間に有意差は認められなかった。脳浮腫率および神経学的スコアも群間で違いが無かったことから、プラスミノゲン-A620T 変異は脳梗塞の増悪要因ではないと考えられた。

皮膚創傷モデル実験において、作製した皮膚創は野生型マウス、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで共に 12~14 日でほぼ完全に修復された。創面積の経日変化にも、両群間で違いは無く、プラスミノゲン-A620T 変異は創傷治癒遅延の原因とはならないと考えられた。

#### D. 考察

プラスミノゲン-A622T 変異マウスでは、血漿プラスミノゲン活性低下が認められ、ホモ接合体マウスの活性は野生型マウスの  $22.0 \pm 2.2\%$  (平均値±標準偏差, N = 5) となり、持続的に血栓溶解能が低下した状態にある。しかし、局所脳虚血再灌流モデルを用いた検討では、プラスミノゲン-A622T 変異マウスに野生型マウスと比べて症状の悪化は見られなかった。日本人を含むアジア人に広く分布するプラスミノゲン-A620T 変異は脳梗塞を悪化させる遺伝的要因とはならないと推定される。急性期脳梗塞の治療薬として唯一承認されている組換え体組織プラスミノゲン活性化因子は、プラスミノゲン活性化を介して治療効果を発揮するため、プラスミノゲン-A620T 変異はこの治療効果の減弱あるいは出血副作用の軽

減に寄与している可能性がある。今後、プラスミノゲン-A622T マウスの脳梗塞における組換え体組織プラスミノゲン活性化因子投与の影響についても検討が必要と思われる。

プラスミノゲンの活性化は血栓溶解だけでなく、細胞外マトリックスの分解を介した組織の再構築にも寄与しており、プラスミノゲンホモ欠損マウスでは、皮膚創傷治癒の著しい遅延が認められる。しかし、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスに同様の皮膚創傷治癒遅延は認められなかったことから、プラスミノゲン-A620T 変異体は創傷修復に必要な活性を残存しており、本変異は組織再構築異常にはつながらないと推定された。

#### E. 結論

プラスミノゲン-A622T 変異マウスに脳梗塞症状および創傷治癒の悪化は見られないことが判明した。今後、静脈血栓症をはじめとする他の血栓性疾患に対する本変異の直接的あるいは Modifier 作用の検証が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Xinghua Hou, Yuko Tashima, Pamela Stanley: Galactose differentially modulates lunatic and manic fringe effects on Delta1-induced NOTCH signaling. *J Biol Chem*, 287(1), 474-483, 2012.

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.

Kaoru Orihashi, Hiromasa Tojo, Katsuya Okawa, Yuko Tashima, Takashi Morita, Gen Kondoh: Mammalian carboxylesterase (CES) releases GPI-anchored proteins from the cell surface upon lipid raft fluidization. *Biol Chem*, 393(3), 169-176, 2012.

Toshiyuki Kita, Fumiaki Banno, Hiroji Yanamoto, Yukako Nakajo, Koji Iihara,