

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

深部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
研究協力者 井本ひとみ 国立循環器病研究センター分子病態部 非常勤研究員

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。今年度は前年度に引き続き、プロテイン S-K196E 変異マウスの深部静脈血栓症症状を解析した。電気分解による下大静脈内皮障害モデルを用いた解析の結果、プロテイン S-K196E 変異マウスでは、プロテイン S ヘテロ欠損マウスや凝固第 V 因子-R504Q 変異マウスと同様に、野生型マウスに比べて下大静脈障害後に形成される血栓重量が増加し、血小板減少、血漿凝固マーカーおよび炎症マーカー濃度の上昇も認められたことから、PS-K196E 変異が深部静脈血栓症の増悪要因となることが明らかとなった。プロテイン S-K196E 変異マウスを日本人型血栓症のモデル動物として（独）医薬基盤研究所メディカル・バイオリソース・データベースに登録した。

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 III 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。前年度までにプロテイン 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、局所脳虚血再灌流モデル、肺塞栓モデルを用いた解析

を完了した。本年度は、前年度から着手した深部静脈血栓症モデル実験を進め、プロテイン S-K196E 変異マウス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。また、プロテイン S-K196E 変異とプラスミノゲン-A622T 変異の二重変異マウスを作製した。

B. 研究方法

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。

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 μ 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 日目に採血して末梢血血小板数を測定後、実体顕微鏡下に下大静脈内血栓を取り出し、その重量を測定

した。また、血漿中の凝固活性化マーカーとしてトロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) 濃度、炎症マーカーとしてインターロイキン-6 (IL-6) 濃度を測定した。

二重変異マウスの作製

日本人に高頻度で認められるプロテイン S-K196E 変異とプラスミノゲン-A620T 変異は相乗的に作用して病状を悪化させる可能性がある。そこでプロテイン S-K196E 変異マウスとプラスミノゲン-A622T 変異マウスの交配により、二重変異マウスを作製した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立循環器病研究センター遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得て実施した。また、動物愛護の観点から、マウスに与える苦痛を最小限にするよう配慮して進めた。

C. 研究結果

深部静脈血栓症誘発後に形成された血栓重量 (平均値 ± 標準偏差, N = 12) は野生型マウス ($3.6 \pm 1.6\text{g}$) に比べて、プロテイン S-K196E ホモ変異マウス ($15.7 \pm 11.9\text{g}$)、プロテイン S ヘテロ欠損マウス ($15.9 \pm 10.2\text{g}$)、凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウス ($15.8 \pm 9.7\text{g}$) で増加した。これらのマウスでは消耗性と考えられる血小板減少 (プロテイン S-K196E ホモ変異マウス: 46.6 ± 31.8 、プロテイン S ヘテロ欠損マウス: 36.6 ± 35.0 、凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウス: $34.2 \pm 24.2 \times 10^4/\mu\text{L}$) も野生型マウス ($116.2 \pm 28.8 \times 10^4/\mu\text{L}$) に比べて重篤化した。プロテイン S-K196E ヘテロ変異マウスの血栓重量 ($8.1 \pm 6.8\text{g}$) は野生型マウスと有意差はみられなかったが、血小板数 ($76.3 \pm 33.6 \times 10^4/\mu\text{L}$) は減少した。プロテイン S-K196E ホモ変異マウス、プロテイン S ヘテロ欠損マウス、凝固第 V 因子-R504Q ホモ変異マウスでは、血漿 TAT および IL-6 濃度が野生型マウスに比べて上昇しており、凝固反応や炎症反応の活性化に伴って静脈血栓形成が亢進したと考えられた。

プロテイン S-K196E 変異マウスとプラスミノゲン-A622T 変異マウスの交配により二重変異マウスを作製した結果、両変異共にホモ接合体となったマウスも出生、発育可能なことが確認できた。

本研究で樹立したプロテイン S 変異マウス

を国内外の研究者に譲渡するため、(独)医薬基盤研究所メディカル・バイオリソース・データベースに登録した。

D. 考察

深部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。肺塞栓モデルでも同様の結果が得られており、これらの結果から、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、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であると考えられる。

プロテイン S-K196E 変異とプラスミノゲン-A622T 変異の二重変異マウスの獲得に成功したことから、今後変異の相乗効果を考慮した検討が可能になった。

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。プラスミノゲン-A622T との二重変異マウスの樹立も成功した。これらのマウスは日本人の静脈血栓症に対する抗血栓薬の評価や開発を進める基盤になると考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshiyuki Miyata, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura: ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan. *Hämostaseologie*, 33(2), 131-137, 2013.

Yusuke Satoh, Takafumi Yokota, Takao Sudo,

- Motonari Kondo, Anne Lai, Paul W. Kincade, Taku Kouro, Ryuji Iida, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoko Habuchi, Keiko Matsui, Hirokazu Tanaka, Itaru Matsumura, Kenji Oritani, Terumi Kohwi-Shigematsu, Yuzuru Kanakura: The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages. *Immunity*, 38(6), 1105-1115, 2013.
- Masashi Akiyama, Daisuke Nakayama, Soichi Takeda, Koichi Kokame, Junichi Takagi, Toshiyuki Miyata: Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS-13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism. *J Thromb Haemost*, 11(7), 1399-1406, 2013.
- Koki Mise, Yoshifumi Ubara, Masanori Matsumoto, Keiichi Sumida, Rikako Hiramatsu, Eiko Hasegawa, Masayuki Yamanouchi, Noriko Hayami, Tatsuya Suwabe, Junichi Hoshino, Naoki Sawa, Kenichi Ohashi, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Kenmei Takaichi: Long term follow up of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) on hemodialysis for 19 years: a case report. *BMC Nephrol*, 14(156), 5 pages, 2013.
- Shohei Shinozaki, Tsuyoshi Chiba, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Eiji Kaneko, Kentaro Shimokado: A Deficiency of Herp, an Endoplasmic Reticulum Stress Protein, Suppresses Atherosclerosis in ApoE Knockout Mice by Attenuating Inflammatory Responses. *PLoS One*, 8(10), e75249, 2013.
- Yoshie Takizawa, Yukiko Kosuge, Hiroyo Awaji, Emi Tamura, Ayako Takai, Takaaki Yanai, Reiko Yamamoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Rieko Nakata, Hiroyasu Inoue: Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), silent mating type information regulation 2 homologue 1 (SIRT1) and autophagy-related genes by repeated treatments with resveratrol in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Nutr*, 110(12), 2150-2155, 2013.
- Riccardo Bernasconi, Carmela Galli, Koichi Kokame, Maurizio Molinari: Autoadaptive ER-Associated Degradation Defines a Preemptive Unfolded Protein Response Pathway. *Mol Cell*, 52(6), 783-793, 2013.
- Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Hata: Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*, 40(1), 247-249, 2014.
- Masanobu Morioka, Masanori Matsumoto, Makoto Saito, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfus*, in press.
- Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, Koichi Kokame, Yaacov Barak, Yoel Sadovsky: EN-13-1425/NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology*, in press.
- Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiro Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata: Candidate Gene Analysis Using Genomic Quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 Large Deletions in Two Patients with Upshaw-Schulman Syndrome. *Mol Genet Genomic Med*, in press.
- 宮田敏行, 小亀浩市, 小久保喜弘: 先天性ADAMTS13欠損症. *臨床検査*, 57(5), 556-561, 2013.
- 坂野史明, 宮田敏行, 藤岡政行, 杉本充彦: 遺伝子改変血栓モデル: ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを中心に. *Thrombosis Medicine* 3(2), 216-223, 2013.

小亀浩市: ADAMTS13 と血栓性血小板減少性紫斑病. 循環器病研究の進歩, 34(1), 69-75, 2013.

宮田敏行, 坂野史明: 血栓症と炎症におけるポリリン酸の役割. Annual Review 血液 2014, 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, 132-139, 2014.

藤村吉博, 松本雅則, 石西綾美, 八木秀男, 小亀浩市, 宮田敏行: 血栓性血小板減少性紫斑病. 臨床血液, 55(1), 93-104, 2014.

小亀浩市, 樋口由佳: Upshaw-Schulman 症候群の ADAMTS13 遺伝子解析. 細胞, 46(2), 61-63, 2014.

2. 学会発表

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata: Generation of protein S-Tokushima mutant mice to provide an in vivo evaluation system for thrombosis in Japanese. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 SPC シンポジウム 4, 山形市, 2013 年 5 月.

田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行: プラスミノージェン栃木変異ホモ接合体マウスの血栓傾向の解析. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形市, 2013 年 5 月.

小亀浩市, 秋山正志, 宮田敏行: ADAMTS13 の正常な分泌にはシクロフィリン B によるプロリン残基異性化が必要である. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形市, 2013 年 5 月.

小堺貴司, 森山雅人, 布施一郎, 柴崎康彦, 増子正義, 瀧澤淳, 鳥羽 健, 吉田邦彦, 小亀浩市, 宮田敏行, 松本雅則, 藤村吉博, 曾根博仁: 妊娠を契機に診断された新規の遺伝子変異を伴う Upshaw-Schulman 症候群 (USS) の一例. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形市, 2013 年 5 月.

土井政明, 松井英人, 竹田征治, 斎藤能彦, 武田麻衣子, 松成泰典, 西尾健治, 嶋緑倫, 坂野史明, 秋山正志, 小亀浩市, 宮田敏行, 杉本充彦: マウス急性心筋梗塞モデルにおける ADAMTS13 の心筋保護作用. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形市, 2013 年 5 月.

松井英人, 土井政明, 武田麻衣子, 松成泰典, 西尾健治, 嶋 緑倫, 副島見事, 粕田承吾, 坂野史明, 宮田敏行, 杉本充彦: マウス骨髄移植モデルにおける ADAMTS13 の移植ドナー細胞生着促進効果. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形市, 2013 年 5 月.

Fumiaki Banno: Genetic mouse models of venous thrombosis for Japanese. 59th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, Netherlands, June 2013.

Koichi Kokame: Quantitative PCR-based analysis of ADAMTS13 genetic defects. The 59th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, Netherlands, June 2013.

Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiro Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, and Toshiyuki Miyata: Quantitative PCR assay demonstrated exon deletions of ADAMTS13 in two unrelated patients with Upshaw-Schulman syndrome. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata: Exacerbated venous thromboembolism in mice with the protein S Tokushima mutation. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata: Generation and characterization of homozygous plasminogen-Tochigi mutant mice bearing reduced fibrinolytic activity. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiko Sugimoto: ADAMTS13 accelerates the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIV Congress, Amsterdam, Netherlands, July 2013.

Yuko Tashima "Generation and Characterization of Homozygous Plasminogen-Tochigi Mutant Mice Bearing Reduced Fibrinolytic Activity, 15-min talk", Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, Gordon Research Seminar, Ventura, USA, February 2014.

Yuko Tashima, Flash talk, "Generation and Characterization of Homozygous Plasminogen-Tochigi Mutant Mice Bearing Reduced Fibrinolytic Activity" Gordon Research Conferences, Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, Ventura, CA, USA, February 2014.

樋口（江浦）由佳, 小亀浩市, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: 血栓性血小板減少性紫斑病患者の ADAMTS13 遺伝子に伏在していた変異の発見: ゲノム DNA を用いた定量 PCR 法の開発. 第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 豊中市, 2013 年 8 月.

樋口（江浦）由佳, 小亀浩市, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: 日本における先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子解析. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, 2013 年 9 月.

田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行: マウスプラスミノゲン析木変異は血漿プラスミン活性を低下させるが血栓塞栓症の原因にはならない. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, 2013 年 9 月.

Yoshihiro Fujimura, Yumi Yoshii, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Masaki Hayakawa, Yoko Yoshida, Hideo Yagi, Koichi Kokame, and Toshiyuki Miyata: A

long-term phenotype analysis of 51 patients with Upshaw-Schulman syndrome in Japan, with special references to pregnancy and renal failure that requires hemodialysis. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, USA, December 2013.

坂野史明: 日本人の血栓性遺伝素因を持つモデルマウスの樹立と解析. 第 8 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム, 東京都, 2014 年 2 月.

坂野史明: モデルマウスを利用した日本人の静脈血栓症の遺伝的特異性の解明. 第 39 回日本脳卒中学会総会, 大阪市, 2014 年 3 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