

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及び肺塞栓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。前年度までにプラスミノゲン-A622T 変異マウスを樹立し、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。本年度は、肺塞栓誘発モデルおよび深部静脈血栓症モデルを用いて、本変異マウスの静脈血栓症症状を解析した。その結果、プラスミノゲン-A622T マウスの症状に野生型マウスとの差は見られなかった。日本人を含む東アジア人に高頻度に見られるプラスミノゲン-A620T 変異は線溶活性低下をもたらすものの、少なくとも単独では静脈血栓症を悪化させる要因とはならないと考えられた。プラスミノゲン-A622T マウスは（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

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リ頻度 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、手術等により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して、国内外の研究者に譲渡する。

前年度までに、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プラスミノゲン活性が低下することを確認した。また、脳梗塞および組織修復に及ぼす変異の影響を調べるため、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。本年度は、プラスミノゲン-A622T マウスの血漿フィブリン塊溶解活性低下を確認後、本変異がマウスの静脈血栓症に及ぼす影響を調べるため、下大静脈障害による深部静脈血栓症モデルおよび、組織因子投与による肺塞栓モデルを用いた解析を行った。

B. 研究方法

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。

### 血漿フィブリン塊溶解活性の測定

マウス血漿にヒト組織型プラスミノゲンアクチベーターを加えて室温、30 分間反応することによりプラスミノゲンをプラスミンに活性化後、トロンビンと塩化カルシウムを添加してフィブリン形成を惹起し、波長 405 nm の吸光度変化を 5 分間隔でモニターした。吸光度はフィブリン形成により一旦上昇するが、プラスミンによる分解で緩やかに低下する。この吸光度変化を元にフィブリン塊溶解活性を測定した。

### 深部静脈血栓症モデル

マウス下大静脈にステンレス電極を挿入して 250  $\mu$ A・15 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。また、血栓の退縮、溶解に対する変異の影響を解析するため、処置 7 日後のマウスについても同様の解析を行った。

### 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。

### (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

血漿フィブリン塊溶解活性を測定した結果、プラスミノゲン-A622T 変異マウスでは、野生型マウスに比べて顕著な活性低下が認められた。また、反応系に 2-プラスミンインヒビターを加えることで、吸光度の低下はほぼ完全に抑制されたことから、本測定にてプラスミン依存的なフィブリン溶解が起きていることを確

認した。これらの結果から、プラスミノゲン-A622T 変異マウスでは、血漿プラスミノゲンの合成基質切断活性 (初年度に測定済) だけでなく、フィブリン溶解活性が低下していることが確認できた。

深部静脈血栓症モデル実験において、処置 2 日後の血栓重量 (平均値  $\pm$  標準偏差, N = 10) は、野生型マウスで  $8.2 \pm 5.4$ g、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで  $10.0 \pm 6.4$ g であり、両群間に有意差は認められなかった。血小板減少の程度も群間で違いが無かったことから、プラスミノゲン-A620T 変異は深部静脈血栓症の増悪要因ではないと考えられた。また、処置 7 日後の血栓重量 (N = 5) も野生型マウスで  $5.4 \pm 3.5$ g、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで  $5.4 \pm 4.6$ g と群間に違いは無く、プラスミノゲン-A622T 変異による血栓退縮の遅延も見られなかった。

肺塞栓モデル実験において、組織因子投与後の生存率は野生型マウス (N = 18) で 83.3%、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウス (N = 20) で 80.0% であり、両群間に差は認められなかった。肺血管閉塞スコアも、野生型マウスで  $1.86 \pm 1.47$ 、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで  $2.25 \pm 1.60$  と、群間に有意差は見られなかった。したがって、プラスミノゲン-A620T 変異は肺塞栓症状悪化の原因とはならないと考えられた。

本研究で樹立したプラスミノゲン-A622T 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

プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスでは、血漿プラスミノゲン活性が野生型マウスの約 8% に低下しており、血漿フィブリン塊溶解活性も低下した。しかし、深部静脈血栓症モデルおよび肺塞栓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。前年度に行った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検討でも、プラスミノゲン-A622T 変異マウスに異常は認められなかったため、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 変異は少なくとも単独では、静脈血栓症、脳梗塞および創傷治癒を悪化させる遺伝的要因とはならないと推定される。本変異とプロテイン S -K196E

変異の両方を持つ重症静脈血栓症患者が見つかるため、プラスミノゲン-A620T 変異が他の血栓性素因と重なることで、血栓症状の修飾因子として働く可能性が残っている。引き続き、プラスミノゲン-A622T とプロテイン S-K196E の二重変異マウスを解析することでこの点を明らかにしていく必要がある。

#### E. 結論

プラスミノゲン-A622T 変異マウスを樹立し、本変異が線溶活性低下を引き起こすことを個体レベルで確認した。本変異マウスに深部静脈血栓症、肺塞栓、脳梗塞症状および創傷治癒の悪化は見られず、プラスミノゲン-A620T 変異はこれらの疾患の一次的なリスクとはならないことが明らかとなった。今後、他の血栓性素因と本変異が重なった場合の症状修飾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

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.

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.

##### 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: プラスミノゲン 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.

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.

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, Mitsuhiro 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.

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栃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.

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.

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