

**血栓性素因の調査研究：
プロトロンビン Arg596 ミスセンス変異解析による新たな血栓性素因検索**

研究分担者 小嶋 哲人 名古屋大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

プロトロンビン遺伝子 (*F2*) のミスセンス変異・Yukuhashi 変異 (c.1787G>T, p.Arg596Leu) は、その変異型プロトロンビン由来のトロンビンがアンチトロンビン (AT) による不活化に抵抗性を示し、長時間トロンビン活性が残存する血栓性素因・AT レジスタンス (ATR) を呈する。また、この変異型トロンビンはトロンボモジュリン (TM) レジスタンス (TMR) も示す。本研究では、*F2* の Arg596 コドン (CGG) の一塩基置換により生ずる 596Leu (CTG) 以外のミスセンス変異 (596Gln (CAG)、596Trp (TGG)、596Gly (GGG)、596Pro (CCG)) の AT ならびに TM による抗凝固作用に及ぼす影響を評価した。その結果、596Pro 変異型 (分泌不全) を除いて全て AT 抵抗性と同時に TM 抵抗性も示したことから、これらの変異が生じた生体では AT・TM による生理的制御に抵抗する変異型トロンビンの活性が異常に持続するため、血栓症性素因となることが推測された。

A. 研究目的

静脈血栓塞栓症は様々な先天的 / 後天的リスクにより発症する多因性疾患で、従来欧米人に多く日本人には少ないとされてきたが、診断技術の向上や食生活の欧米化などにより日本人にも決して少なくないことが明らかにされている。遺伝性血栓症の原因として様々な凝固関連因子の遺伝子異常が同定されているが、いまだに原因不明な遺伝性血栓症がある。

我々は長らく原因不明であった遺伝性静脈血栓症家系において、通常は出血症状を示すプロトロンビン異常症で逆に血栓症の原因となる遺伝子変異を発見した。これはプロトロンビン遺伝子 (*F2*) のミスセンス変異 (c.1787G>T, p.Arg596Leu)・プロトロンビン Yukuhashi 変異で、変異型トロンビンがアンチトロンビン (AT) 抵抗性で、その活性が異常に持続するため血栓症の原因となる。ま

た、トロンビンと結合してその凝固活性を阻害する生理的凝固制御因子・トロンボモジュリン (TM) 対しても、変異型トロンビンは抵抗性を示すことを明らかになっている。

本研究では、*F2* での Arg596 コドン (CGG) の一塩基置換により生ずる 596Leu (CTG) 以外のミスセンス変異体 (596Gln (CAG)、596Trp (TGG)、596Gly (GGG)、596Pro (CCG)) が AT ならびに TM による抗凝固作用に及ぼす影響を評価した。

B. 研究方法

本研究では 596Gln、596Trp、596Gly、596Pro 変異型プロトロンビン発現ベクター (pCDNA) を作製、各変異型発現ベクターをヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に遺伝子導入し、G418 による薬剤選択により安定発現細胞株を得た。各細胞株の培養上清・細胞溶解液のウェスタンブロッティ

ング解析、ならびにビタミン K 含有無血清培地培養の上清から得られた組換え型プロトロンビンをプロトロンビン欠乏血漿に添加した擬似患者血漿を検体として、凝固一段法ならびに合成基質二段法にて各変異型プロトロンビンの凝固機能を解析した。また、各変異型プロトロンビン由来トロンビンの AT による不活性化解析と、各変異型トロンビンのトロンビン・アンチトロンビン複合体 (TAT) 形成能を評価した。また、各変異型プロトロンビンのトロンビンへの活性化相とトロンビン不活化相を評価するため、トロンビン生成試験 (thrombin generation assay: TGA) を実施した。さらに、各変異型トロンビンのフィブリノゲン凝固活性の sTM による阻害解析、ならびに表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR) 解析を用いた各変異型トロンビンの sTM 結合量を評価するとともに、sTM 存在下での各変異型トロンビンの液相ならびにヒト血管内皮細胞由来培養細胞 (EAhy926 細胞: 血管内皮細胞 PC 受容体 (EPCR)+) 上での APC 産生能を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、細胞株を用いて発現させた組換え型プロトロンビンの *in vitro* 解析で、名古屋大学 大学院医学系研究科組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

Arg596 での野生型ならびに変異型組換え型プロトロンビン安定発現細胞株を樹立し、細胞溶解液ならびに培養上清のウェスタンブロッティング解析を行った結

果、596Gln、596Trp、596Gly 発現株では野生型と同等のプロトロンビン産生が確認された。596Pro では、細胞溶解液・培養上清ともにほとんど検出されなかったプロトロンビンが、プロテアソーム阻害剤存在下で培養すると細胞溶解液中に検出された。596Pro は培養上清にほとんど分泌されないため、以降の実験対象から除外した。Arg596 での各変異型プロトロンビンは様々な値の凝固活性を示したが、合成基質二段法での活性値は凝固一段法より一様に高値であった。

AT によるトロンビン不活性化解析では、野生型トロンビンが継時的に不活性化され AT 混和後 30 分で 15%程度まで不活性化されたのに対して、各変異型トロンビンは 30 分後でも 80%以上のトロンビン活性残存率が保持された。また、野生型トロンビンはヘパリン非存在下で TAT 形成量が継時的に上昇したが、各変異型トロンビンは AT 混和後 60 分でもほとんど TAT が形成されなかった。TGA では、トロンビン活性持続時間を示す Start tail が、Arg596 での各変異型プロトロンビンにおいて野生型の 2 倍以上に延長していた。

TM によるトロンビン活性阻害解析では、TM 濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のとき野生型トロンビン活性が 16%まで低下したのに対して各変異型トロンビン活性残存率は 37~54%に保持された。一方、SPR 解析における各変異型トロンビンの TM 結合量は、野生型のそれと比較して低値であった。SPR 解析により算出された各変異型トロンビンと TM との解離定数は、トロンビン活性阻害解析の結果を支持するものであった。EAhy926 細胞 (EPCR+) の存在下・非存在下ともに、野生型 / 各変異型トロンビンの APC 産生能の差は各変異型プロトロン

ピンの凝固比活性の差に比例していた。

D. 考察

本研究では、プロトロンピンの Arg596 コドンにおける一塩基置換により生ずるミスセンス変異体 (596Gln、596Trp、596Gly、596Pro 変異型プロトロンピン) の AT および TM による抗凝固作用に及ぼす影響を評価した。596Pro 変異型プロトロンピンは、安定発現細胞株の細胞内・培養上清中にほとんど検出されなかったが、プロテアソーム阻害剤処理により細胞溶解液にはプロトロンピンが出現したことから、596Pro 変異が生体内で生じた場合、変異型プロトロンピンは細胞内でプロテアソーム系にて分解され、血中に分泌されないことが示唆された。また、凝固機能測定ではすべての野生型 / 変異型プロトロンピンで合成基質二段法で凝固一段法より高い測定値を示し、これは凝固一段法の基質であるフィブリノゲン分子と比較して合成基質二段法で用いた発色性合成基質 S-2238 が非常に小さな分子であるため、野生型 / 変異型に関わらずトロンピンの活性中心に近づきやすいことが理由と考えられる。さらに、本研究の実験において 596Gln、596Trp、596Gly 変異型トロンピンは AT により不活化されにくく、同時に TM による活性阻害も受けにくいことが示されたことから、これらの遺伝子変異が人体に生じた場合、各変異型トロンピンが生理的制御機構に抵抗し、その活性を持続することにより血栓症を引き起こしやすくなることが推測された。

プロトロンピン Arg596 コドン(CGG)は一塩基置換のホットスポットである CpG 配列を含むが、CpG 配列ではシトシンが

チミンに置換し得ることが知られている。本研究で解析した 596Gln、596Trp は、この CpG 配列での一塩基置換により生ずるので、セルビア人家系で 596Gln 変異が、イタリア人家系で 596Trp 変異が発見され、いずれも家族性の静脈血栓塞栓症を発症したことが報告された。また、596Gln 変異は日本人静脈血栓塞栓症 2 家系でも同定されていることから、Arg596 ミスセンス変異は人種を問わず発生し、血栓症の原因となりうることが強く示唆された。

E. 結論

本研究では、プロトロンピン Arg596 コドンにおける一塩基置換にて生ずるミスセンス変異が AT および TM による抗凝固作用に及ぼす影響を評価した。本研究で解析したすべての Arg596 ミスセンス変異型プロトロンピン (596Gln、596Trp、596Gly) は、AT 抵抗性ならびに TM 抵抗性を示し、生体内では各変異型プロトロンピンの凝固能に依存して血栓症の引き起こしやすさにつながることを推察された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 村田萌、小嶋哲人：あらたな血栓性素因：アンチトロンピンレジスタンス医学のあゆみ 257(7), 753-757, 2016. May.14.
- 2) Nakamura Y, Ando Y, Takagi Y, Murata M, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Takagi A, Matsushita T, Shima M, Kojima T: Distinct X

- chromosomal rearrangements in four haemophilia B patients with entire *F9* deletion. *Haemophilia*. 2016 May;22(3): 433-9.
- 3) Kozuka T, Tamura S, Kawamura N, Nakata Y, Hasebe R, Makiyama A, Takagi Y, Murata M, Mizutani N, Takagi A, Kojima T: Progestin isoforms provide different levels of protein S expression in HepG2 cells. *Thromb Res*. 2016 Jul 16;145:40-45.
 - 4) Takagi Y, Murata M, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Tamura S, Takagi A, Matsushita T, Saito H, Kojima T: Missense mutations in the gene encoding prothrombin corresponding to Arg596 cause antithrombin resistance and thrombomodulin resistance. *Thromb Haemost*. 2016 Nov 30;116(6):1022-1031.
 - 5) Moriyasu F, Furuichi Y, Tanaka A, Takikawa H, Yoshida H, Sakaida I, Obara K, Hashizume M, Kage M, Ohfuji S, Kitano S, Kawasaki S, Kokubu S, Matsutani S, Eguchi S, Shiomi S, Kojima T, Maehara Y, Kuniyoshi Y: Diagnosis and treatment guidelines for aberrant portal hemodynamics. *Hepatol Res*. 2017 Jan 6. in press.
 - 6) Miljic P, Gvozdenov M, Takagi Y, Takagi A, Pruner I, Dragojevic M, Tomic B, Bodrozic J, Kojima T, Radojkovic D, Djordjevic V: Clinical and biochemical characterization of the Prothrombin Belgrade mutation in a large Serbian pedigree: new insights into antithrombin resistance mechanism. *J Thromb Haemost*. 2017 Jan 11. in press.
- ## 2. 学会発表
- 1) Takagi Y, Kawamura N, Makiyama A, Hashimoto E, Tamura S, Takagi A, Kojima T: Prothrombin missense mutations at 596Arg reduced the affinity of mutant thrombin to thrombomodulin controlled by Na⁺ concentration. XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (ISLH), Milano, Italy, 平成 28 年 5 月 12-14 日
 - 2) 河村奈美、榎山愛弓、橋本恵梨華、長谷部瞭、高木夕希、村田萌、田村彰吾、高木明、小川実加、兼松毅、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人: 血友病 A 症例における血液凝固第 VIII 因子の遺伝子解析 第 38 回日本血栓止血学会学術集会、奈良, 平成 28 年 6 月 16-18 日
 - 3) 高木夕希、河村奈美、榎山愛弓、橋本恵梨華、安藤裕実、加藤衣央、田村彰吾、高木明、小嶋哲人: 低フィブリノゲン血症 3 症例の遺伝子解析 第 38 回日本血栓止血学会学術集会、奈良, 平成 28 年 6 月 16-18 日
 - 4) 榎山愛弓、高木夕希、河村奈美、橋本恵梨華、田村彰吾、高木明、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人: 第 17 回日本検査血液検査血液学会学術集会、博多、平成 28 年 8 月 6-7 日
 - 5) HASHIMOTO E, TAKAGI Y, KAWAMURA N,

- MAKIYAMA A, SAKANE H, FUJIOKA A, TAMURA S, TAKAGI A, FUKUSHIMA Y, KANEKO M, KOJIMA T: A NOVEL LARGE DELETION FOUND IN A JAPANESE FAMILY WITH ANTITHROMBIN DEFICIENCY. The 9th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Taipei、平成 28 年 10 月 6-9 日
- 6) KAWAMURA N, MAKIYAMA A, TAKAGI Y, HASHIMOTO E, SAKANE H, FUJIOKA A, TAMURA S, TAKAGI A, SUZUKI N, MATSUSHITA T, KOJIMA T: Molecular basis of F8 gene abnormality in hemophilia A patients in Nagoya. The 9th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Taipei、平成 28 年 10 月 6-9 日
- 7) MAKIYAMA A, TAKAGI Y, KAWAMURA N, HASHIMOTO E, SAKANE H, FUJIOKA A, TAMURA S, TAKAGI A, KISHIMOTO M, SUZUKI N, MATSUSHITA T, KOJIMA T: GENETIC ANALYSIS OF PATIENTS WITH PROTEIN C DEFICIENCY. The 9th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Taipei、平成 28 年 10 月 6-9 日
- 8) Sakane H, Nakamura Y, Fujioka A, Hashimoto E, Makiyama A, Kawamura N, Suzuki S, Takagi Y, Tamura S, Takagi A, Ogawa M, Kanemetsu T, Kishimoto M, Suzuki N, Matsushita T, Kojima T: Diverse *F9* abnormalities including a large SVA retrotransposon insertion that cause hemophilia B. 第 78 回日本血液学会学術集会、横浜、平成 28 年 10 月 13-15 日
- 9) Tamura S, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y, Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, Satoh K, Takagi A, Kojima T: Novel periarteriolar stromal cells promote megakaryo/thrombopoiesis via CLEC-2/podoplanin binding. 第 78 回日本血液学会学術集会、横浜、平成 28 年 10 月 13-15 日
- 10) 高木夕希, 河村奈美, 槇山愛弓, 橋本恵梨華, 田村彰吾, 高木明, 小嶋哲人: プロトロンビン Arg596 ミスセンス変異がトロンビンのトロンボモジュリン結合能に及ぼす影響. 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 28 年 11 月 30 日-12 月 2 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。