

## 先天性血栓性素因の分子病態解析

研究分担者：松下 正 名古屋大学医学部附属病院 教授

### 研究要旨

2020年度は特発性血栓症9症例の遺伝子解析を行った。AT欠乏症は2症例解析し、全てにSERPINC1の遺伝子変異を同定した。PC欠乏症は1症例を解析し、PROCに遺伝子変異を同定した。PS欠乏症は2症例解析し、1症例にPROS1の遺伝子変異を同定した。AT欠乏症に同定した遺伝子変異SERPINC1 c.652A>T p.Ile218Phe (AT I218F)は極めて強い血栓性素因であり、その分子病態について細胞強制発現系を用いた解析を進めた。臨床検査データおよび強制発現実験の結果から、AT I218Fの病態分類はtype II PEであることを明らかにした。今後、生化学的特性を含めてその分子病態を明らかにする。

#### A. 研究目的

先天性アンチトロンビン (AT) 欠乏症・異常症は常染色体優性遺伝疾患で、大部分はヘテロ接合体として認められる。患者の80~90%は、50~60歳までに血栓症を発症し、外傷、手術、妊娠、経口避妊薬の服用などをきっかけとすることが多い。抗原量低下によるAT欠乏症はType Iとして分類され、AT分子異常症はType IIに分類される。我々はこれまでに21例のAT欠乏症・異常症におけるAT遺伝子(SERPINC1)の遺伝子変異解析を行い、8つの新規変異を含む19のSERPINC1変異を同定した(Tamura S et al. Thromb Res. 2019)。今回、これらのSERPINC1変異の中でも血栓発症率が極めて高いミスセンス変異SERPINC1 c.652A>T p.Ile218Phe (AT I218F)について、AT強制発現系を用いた分子病態解析に着手したので、その途中経過を報告する。

#### B. 研究方法

AT I218Fが同定された家系の15名に対して血栓症既往歴の調査と遺伝子解析を行ったところ、AT I218F保有者6名(男性3名、女性3名)の全員に血栓症発症の既往を認めた。本変異保有者のAT活性値は32.4 ~ 51.6%、AT抗原量は51.1 ~ 71.0%であり、本変異の病型は暫定的にType II-PE (pleiotropic effect)と判断した。その分子病態を明らかにするために、本研究ではRecombinant AT I218F (rAT-I218F)発現ベクターをHEK293細胞に遺伝子導入し、ウェスタンブロットと免疫細胞化学染色で解析した。

#### C. 研究結果

rAT-I218F発現ベクターをHEK293細胞に遺伝子導入し、ウェスタンブロットで解析したところ、細胞溶解液と培養上清それぞれにrAT-I218Fを検出した。しか

し、培養上清中に検出される rAT-I218F のバンドは野生型 rAT (rAT-WT) と比較して中程度の減少を認めるとともに、細胞培養液では rAT-I218F のバンド増強が認められた。この結果より rAT-I218F の分泌障害が示唆されたため、免疫細胞化学染色法で rAT-I218F の細胞内局在を検討した。しかし、rAT-I218F について小胞体およびゴルジ体における異常な細胞内局在を認めなかった。

#### D. 考察

AT I218F は家系内での多発する血栓症が特徴的であり、極めて強い血栓性素因であると考えられる。強制発現系による細胞学的アプローチでは AT I218F の分泌障害が示唆されるものの、小胞体-ゴルジ体輸送における分子挙動の異常は認められなかった。Trans ゴルジ体から分泌小胞が形成されるエキソサイトーシスでの障害や、プロテアソーム系などによる産生された変異 AT の分解亢進などが考えられ、今後より詳細な細胞内挙動解析を行う予定である。一方、AT I218F の強い血栓発症性は分泌異常のみでは説明することが難しく、分泌異常とともにセリンプロテアーゼ阻害活性の異常を併せ持つような二面的分子病態が予想される。今後は上記の細胞内挙動解析とともに、AT I218F 分子の生化学特性解析を実施する。

#### E. 結論

血栓症発症家系に新規 SERPINC1 変異 AT I218F を同定し、その病態分類は type II PE であることを明らかにした。今後、生化学的特性を含めてその分子病態を明

らかにする。

#### F. 健康危険情報 該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yuri Hayakawa, Shogo Tamura, Nobuaki Suzuki, Koya Odaira, Mahiru Tokoro, Fumika Kawashima, Fumihiko Hayakawa, Akira Takagi, Akira Katsumi, Atsuo Suzuki, Shuichi Okamoto, Takeshi Kanematsu, Tadashi Matsushita, and Tetsuhito Kojima. 2021. "Essential role of a carboxyl-terminal  $\alpha$ -helix motif in the secretion of coagulation factor XI". *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 19(4): 920-930. DOI: 10.1111/jth.15242
- 2) Takeshi Kanematsu, Nobuaki Suzuki, Shogo Tamura, Atsuo Suzuki, Yuichi Ishikawa, Akira Katsumi, Hitoshi Kiyoi, Hidehiko Saito, Shinji Kunishima, Tetsuhito Kojima, Tadashi Matsushita. 2021. "Myh9 R702C is associated with erythroid abnormality with splenomegaly in mice". *Nagoya Journal of Medical Science*. 83. 75-86. doi:10.18999/nagjms.83.1.752.
- 3) Atsuo Suzuki, Nobuaki Suzuki, Takeshi Kanematsu, Shuichi Okamoto, Shogo Tamura, Ryosuke Kikuchi, Akira Katsumi, Hitoshi

Kiyoi, Tetsuhito Kojima, Tadashi Matsushita. 2020. "Impact of variation in reagent combinations for one-stage clotting assay on assay discrepancy in nonsevere haemophilia A". *International journal of laboratory hematology* August:1-8.

<https://doi.org/10.1111/ijlh.13335>

- 4) 鈴木敦夫, 鈴木伸明, 兼松毅, 岡本修一, 田村彰吾, 篠原翔, 新井信夫, 菊地良介, 安藤善孝, 小嶋哲人, 松下正. 2020. "血小板膜糖蛋白質 GPIb 変異体を用いた von Willebrand 因子活性測定試薬「INNOVANCE® VWF Ac」の基本性能評価". *日本血栓止血学会誌* 31(4): 409-419. <https://doi.org/10.2491/jjsth.31.409>
- 5) Tokoro M, Tamura S, Suzuki N, Kakihara M, Hattori Y, Odaira K, Suzuki S, Takagi A, Katsumi A, Hayakawa F, Okamoto S, Suzuki A, Kanematsu T, Matsushita T, Kojima T. 2020. "Aberrant X chromosomal rearrangement through multi-step template switching during sister chromatid formation in a patient with severe hemophilia A". *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 8(9): e1390. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1390>

## 2. 学会発表

- 1) 河島史華, 田村彰吾, 鈴木伸明, 大平晃也, 所真昼, 早川友梨, 早川文彦, 岡本修一, 兼松毅, 高木明, 松下正, 小嶋哲人. スプライシング異常を引き起こす血液凝固第 IX 因子遺伝子イントロン 1 内の深部大挿入変異. *日本血栓止血学会誌*. 31(2):219. 2020
- 2) 早川友梨, 田村彰吾, 鈴木伸明, 大平晃也, 所真昼, 河島史華, 早川文彦, 高木明, 鈴木敦夫, 岡本修一, 兼松毅, 松下正, 小嶋哲人. C 末端伸長変異型 Factor XI における分泌異常の解析. *日本血栓止血学会誌*. 31(2):220. 2020
- 3) 鈴木敦夫, 鈴木伸明, 兼松毅, 岡本修一, 田村彰吾, 安藤善孝, 清井仁, 松下正. 凝固一段法による第 VIII 因子活性測定における試薬の組み合わせに関する検討. *日本血栓止血学会誌*. 31(2):231. 2020
- 4) 鈴木伸明, 高橋伸典, 鈴木敦夫, 田村彰吾, 鈴木幸子, 服部郁那, 垣原美沙樹, 小嶋俊久, 小川実加, 兼松毅, 清井仁, 小嶋哲人, 石黒直樹, 松下正. 関節内出血を未発症であるにもかかわらず血友病性関節症を発症した症例の検討. *日本血栓止血学会誌*. 31(2):233. 2020
- 5) 兼松毅, 鈴木伸明, 岡本修一, 鈴木敦夫, 田村彰吾, 早川文彦, 小嶋哲人, 清井仁, 松下正. 当施設における新生児・乳幼児に対するエミシズマブの使用経験. *日本血栓止血学会誌*. 31(2):248. 2020
- 6) 所真昼, 田村彰吾, 鈴木伸明, 大平晃也, 河島史華, 早川友梨, 早川文彦,

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 岡本修一、兼松毅、勝見章、 <u>松下正</u> 、小嶋哲人. Template switching による F8 エクソン 15 欠失が認められた重症血友病 A 症例. 日本血栓止血学会誌. 31(2):265. 2020                                     | <b>H. 知的財産権の出願・登録状況</b> |
| 7) 岡本修一、鈴木伸明、兼松毅、鈴木敦夫、大平晃也、所真昼、早川友梨、田村彰吾、早川文彦、清井仁、小嶋哲人、 <u>松下正</u> . Endothelial colony forming cells (ECFCs)樹立法の標準化への試み. 日本血栓止血学会誌. 31(2):284. 2020 | 1. 特許取得<br>なし           |
|  | 2. 実用新案登録<br>なし         |
|  | 3. その他<br>なし            |