

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

1) 2020 年度は特発性血栓症のうち特異な mutation である Leu17Pro の分子遺伝学的、細胞生物学的解析を行った【症例】32 歳女性。妊娠 36 週で右下肢深部静脈血栓発症。プロテイン S 活性 16%、プロテイン S トータル抗原量 49%であり、I 型プロテイン S 欠乏症と診断された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ところ、本変異 PS の細胞内分解は MG-132 反応性であり、その分解メカニズムはユビキチン-プロテアソーム系であることが示された。

2) また本会議において継続的に検討している AT resistance のノックインマウスを作成し、その向血栓性を明らかにした。

A. 研究目的

- 1) 先天性プロテイン S 欠乏症は、プロテイン S 遺伝子 (PROS1) の異常によりプロテイン S の量的ないしは質的異常をきたす血栓性疾患である。今回、プロテイン S 欠乏症患者に同定した PS シグナルペプチド内の既報ミスセンス変異について、強制発現系にてその分子病態解析を行った。
- 2) AT resistance は国内でわずかししか発生していないが家系内浸透度の高いプロトロンビンの mutation である。AT 抵抗性のプロトロンビンを持つノックインマウスを作成し、実験的血栓症における病態を解析する。

B. 研究方法

- 1) 【症例】32 歳女性。妊娠 36 週で右下肢深部静脈血栓発症。プロテイン S 活性 16%、プロテイン S トータル抗原量 49%であり、I 型プロテイン S 欠乏症と診断された。

【方法】患者末梢血白血球から抽出したゲノム DNA を用い、ダイレクトシーケンス法で PROS1 の全エクソン及びイントロンとの境界付近の塩基配列を解析した。野生型及び変異型 PS 発現ベクターを作製し、HEK293 細胞に遺伝子導入後、ウェスタンブロット (WB) でその発現を検討した。さらに変異プロテイン S 遺伝子導入細胞をプロテアソーム阻害剤 MG-132 で処理し、変異プロテイン S の細胞内輸送および分泌を検討した。

2) ノックインマウスの作成は既報により行った。下大静脈結紮マウスモデルを用いて、AT レジスタンスの性質を示す R593L マウスの血栓傾向の特徴と抗凝固療法に関する検討を行った。

C. 研究結果

- 1) 遺伝子解析により PROS1 c.50T>C (p.Leu17Pro) をヘテロ接合型にて同定した。強制発現では、プロテイン S Leu17Pro は細胞溶解液および培養上清

ともにほぼ検出されないレベルだった。一方、MG-132によるプロテアソーム阻害により、プロテイン S Leu17Pro は細胞内で明瞭に検出されたものの、細胞外への分泌は依然として認められなかった。

2) プロトロンビン R593L マウスは野生型マウスと比較して、強い血栓傾向を示した。このことからマウスにおいても、AT レジスタンスによる血栓傾向の性質を持つことが示された。

抗凝固療法薬に対する反応性に関しては、R593L マウスは AT レジスタンスではあるが、未分画ヘパリンが野生型マウス同様に有効であった。一方で、低分子量ヘパリンであるフォンダパリヌクスの抗血栓効果は野生型に比較して劣っているという結果であった。

D. 考察

1) プロテイン S Leu17Pro はシグナルペプチド内のミスセンス変異であり、本変異プロテイン S は翻訳後に細胞内で迅速な分解を受けると考えられた。本変異 PS の細胞内分解は MG-132 反応性であり、その分解メカニズムはユビキチン-プロテアソーム系であることが示された。

2) プロトロンビン R593L は AT レジスタンスであり、変異蛋白それ自体はヘパリンに対して抵抗性であるが、個体レベルでは変異プロトロンビン蛋白の発現量が少ないため、野生型マウスと比較して、ヘパリンの量が相対的に過量となり、効果的であったと考えられた。

E. 結論

1) PS p. Leu17Pro の細胞内分解は MG-132 反応性であり、その分解メカニズムはユビキチン-プロテアソーム系であることが示された。

2) プロトロンビン R593L マウスに対する抗凝固療法として、未分画ヘパリンによる抗トロンビン作用が個体レベルで有用であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamaguchi K, Yisireyili M, Goto S, Cheng XW, Nakayama T, Matsushita T, Niwa T, Murohara T, Takeshita K. Indoxyl Sulfate Activates NLRP3 Inflammasome to Induce Cardiac Contractile Dysfunction Accompanied by Myocardial Fibrosis and Hypertrophy. .Cardiovasc Toxicol. 2022 Apr;22(4):365-377. Epub 2022 Jan 28.

2) Odaira K, Kawashima F, Tamura S, Suzuki N, Tokoro M, Hayakawa Y, Suzuki A, Kanematsu T, Okamoto S, Takagi A, Katsumi A, Matsushita T, Shima M, Nogami K, Kojima T, Hayakawa F. F9 mRNA splicing aberration due to a deep Intronic structural variation in a patient with moderate hemophilia B. Thromb Res. 2022 Mar 15;213:91-96

3) Matsushita T, Suzuki N, Nagao A, Nagae C, Yamaguchi-Suita H, Kyogoku Y, Ioka A, Nogami K. AKATSUKI study: a prospective,

- multicentre, phase IV study evaluating the safety of emicizumab under and immediately after immune tolerance induction therapy in persons with congenital haemophilia A with factor VIII inhibitors. .BMJ Open. 2022 Mar 14;12(3):e057018.
- 4) Tamura S, Mukaide M, Katsuragi Y, Fujii W, Odaira K, Suzuki N, Tsukiji N, Okamoto S, Suzuki A, Kanematsu T, Katsumi A, Takagi A, Ikeda K, Ueyama J, Hirayama M, Suzuki-Inoue K, Matsushita T, Kojima T, Hayakawa F. Periosteum-derived podoplanin-expressing stromal cells regulate nascent vascularization during epiphyseal marrow development. J Biol Chem. 2022 Mar 15;101833.
 - 5) Shapiro AD, Angchaisuksiri P, Astermark J, Benson G, Castaman G, Eichler H, Jiménez-Yuste V, Kavakli K, Matsushita T, Poulsen LH, Wheeler AP, Young G, Zupancic-Salek S, Oldenburg J, Chowdary P. Long-term efficacy and safety of subcutaneous concizumab prophylaxis in hemophilia A and hemophilia A/B with inhibitors. .Blood Adv. 2022 Mar 15
 - 6) Okada K, Tamura S, Suzuki N, Odaira K, Mukaide M, Fujii W, Katsuragi Y, Suzuki A, Kanematsu T, Okamoto S, Suzuki N, Katsumi A, Matsushita T, Kojima T, Hayakawa F. Protein S-Leu17Pro disrupts the hydrophobicity of its signal peptide causing a proteasome-dependent degradation. Thromb Res. 2022 Feb;210:26-32.
 - 7) Ogiwara K, Taki M, Suzuki T, Takedani H, Matsushita T, Amano K, Matsumoto M, Nishio K, Shima M, Kasahara M, Nogami ssessment of global coagulation function under treatment with emicizumab concomitantly with bypassing agents in haemophilia A with inhibitor (UNEBI Study): multicentre open-label non-randomised clinical trial. K.BMJ Open. 2022 Feb 17;12(2):e056922.
 - 8) Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, Shinohara S, Kurono H, Arai N, Okamoto S, Suzuki N, Tamura S, Kikuchi R, Katsumi A, Kojima T, Matsushita T. Development and validation of a novel qualitative test for plasma fibrinogen utilizing clot waveform analysis. Sci Rep. 2022 Jan 21;12(1):434.
 - 9) Inukai Y, Imai N, Yamamoto K, Ito T, Ishizu Y, Honda T, Okamoto S, Kanematsu T, Suzuki N, Matsushita T, Ishigami M, Fujishiro M. The influence of hepatitis C virus eradication on hepatocarcinogenesis in patients with hemophiliaHCC after HCV eradication in hemophilia. Ann

- Hepatol. 2022 Jan-Feb;27(1):100545.
- 10) Jiménez-Yuste V, Rodríguez-Merchán EC, Matsushita T, Holme PA Concomitant use of bypassing agents with emicizumab for people with haemophilia A and inhibitors undergoing surgery. Haemophilia. 2021 Jul;27(4):519-530.
 - 11) Katsumi A, Abe A, Tamura S, Matsushita T. Anemia in older adults as a geriatric syndrome: A review. Geriatr Gerontol Int. 2021 Jul;21(7):549-554.
 - 12) Yamamoto T, Imai N, Yamamoto K, Ito T, Ishizu Y, Honda T, Okamoto S, Kanematsu T, Suzuki N, Matsushita T, Ishigami M, Fujishiro M. Tolerability of Molecular-targeted Agents for Hepatocellular Carcinoma Treatment in Haemophiliacs. Anticancer Res. 2021 May;41(5):2569-2573.
 - 13) Hayakawa Y, Tamura S, Suzuki N, Odaira K, Tokoro M, Kawashima F, Hayakawa F, Takagi A, Katsumi A, Suzuki A, Okamoto S, Kanematsu T, Matsushita T, Kojima T. Essential role of a carboxyl-terminal α -helix motif in the secretion of coagulation factor XI. J Thromb Haemost. 2021 Apr;19(4):920-930.
- 1) フィブリノゲンの質的異常を検出可能な新しい自動分析技術 凝固波形解析に基づくフィブリノゲン定性分析法のバリデーション. 鈴木敦夫, 篠原翔, 新井信夫, 安藤善孝, 松下正. 第 70 回日本医学検査学会 2021. 5. 15-6. 14 web
 - 2) 第 VIII 因子製剤の活性測定における試薬バリエーションを把握するための単施設研究. 鈴木敦夫, 鈴木伸明, 兼松毅, 岡本修一, 田村彰吾, 小嶋哲人, 松下正. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会 2021. 5. 29
 - 3) マウス血管結紮モデルによるアンチトロンビンレジスタンスの血栓形成解析. 鈴木伸明, 鈴木敦夫, 田村彰吾, 向出将人, 岡本修一, 兼松毅, 小嶋哲人, 松下正. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会 2021. 5. 29
 - 4) プロテイン S 欠乏症に同定したシグナルペプチド内変異プロテイン S の分子病態解析. 岡田健太郎, 田村彰吾, 鈴木伸明, 大平晃也, 早川友梨, 向出将人, 藤井渉, 桂木裕実, 兼松毅, 岡本修一, 鈴木敦夫, 松下正, 小嶋哲人, 早川文彦. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会 2021. 5. 29
 - 5) フィブリノゲン強制発現系の最適化に向けた基礎検討. 向出将人, 田村彰吾, 鈴木伸明, 大平晃也, 早川友梨, 岡田健太郎, 藤井渉, 桂木裕実, 鈴木敦夫, 兼松毅, 岡本修一, 松下正, 小嶋哲人, 早川文彦. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会 2021. 5. 28-30
 - 6) F8 Int22h-1 が関与する F8 大規模欠失挿入変異による重症血友病 A 症例.

2. 学会発表

- 大平晃也, 早川友梨, 田村彰吾, 鈴木伸明, 所真昼, 河島史華, 向出将人, 岡田健太郎, 桂木裕実, 藤井渉, 岡本修一, 兼松毅, 鈴木敦夫, 松下正, 小嶋哲人, 早川文彦. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会 2021.5.28-30
- 7)VWF G2752S 変異体の分子病態解析. 岡本修一, 大平晃也, 早川友梨, 河島史華, 田村彰吾, 鈴木伸明, 兼松毅, 鈴木敦夫, 早川文彦, 清井仁, 小嶋哲人, 松下正. 第 43 回日本血栓止血学会学術集会 2021.5.28-30
- 8)Spontaneous remission of autoimmune factor V deficiency (AIF5D) with high titer inhibitor (英語). 兼松毅, 鈴木伸明, 岡本修一, 尾崎司, 惣宇利正善, 鈴木敦夫, 田村彰吾, 早川文彦, 小嶋哲人, 清井仁, 一瀬白帝, 松下正. 83 回日本血液学会学術集会 2021.09
- 9)AKATSUKI Study: A Prospective, Multicenter, Phase IV Study to Evaluate the Safety of Emicizumab Under and Immediately After Immune Tolerance Induction (ITI) Therapy in Persons with Congenital Hemophilia A (PwHA) with Factor (F) VIII Inhibitors T. Matsushita, N. Suzuki, A. Nagao, C. Nagae, H. Yamaguchi-Suita, Y. Kyogoku, A. Ioka, K. Nogami, ISTH 2021 2021/7/17-21
- 10)p.G2752S Severely Affects Dimerization of von Willebrand Factor: An Analysis of Type 3 von Willebrand Disease. S. Okamoto, S. Tamura, N. Suzuki, K. Odaira, Y. Hayakawa, A. Suzuki, T. Kanematsu, F. Hayakawa, H. Kiyoi, T. Kojima, T. Matsushita. ISTH 2021. 2021/7/17-21
- 11)Evaluating the Effectiveness of Recombinant Factor VIII Fc Fusion Protein (rFVIII-Fc) in Adolescents and Children with Hemophilia A in the Real World in Japan: Interim Analysis of the Multicenter, Observational Fc Adolescent and Children Treatment Study (FACTs). M. Kobayashi, K. Nogami, Y.-D. Park, M. Shiraishi, M. Takatoku, T. Matsushita. ISTH 2021 2021.7.17-21.
- 12)A Critical Role of Carboxyl-Terminal Alpha-Helix in the Secretion of Coagulation Factor XI. Y. Hayakawa, S. Tamura, N. Suzuki, K. Odaira, M. Tokoro, F. Kawashima, F. Hayakawa, A. Takagi, A. Suzuki, S. Okamoto, T. Kanematsu, T. Matsushita, T. Kojima. ISTH 2021. 2021.7.17-21.
- 13)Impact of Combination of Factor VIII-Deficient Plasma and Activator in One-Stage Clotting Assay on Potency Testing of Factor VIII Products. A. Suzuki, N. Suzuki, T. Kanematsu, S. Okamoto, S. Tamura, T. Kojima, T. Matsushita. ISTH 2021. 2021.7.17-21.
- 14)Real-World Effectiveness

- Evaluation of the Recombinant Factor VIII Fc Fusion Protein in Adolescents and Children with Hemophilia A in Japan: “Fc Adolescent and Children Treatment” Study (FACTs) Part 1 Interim Analysis M. Kobayashi, T. Matsushita, K. Nogam, I. Usam, M. Shiraishi, M. Takatoku. ISTH 2021. 2021. 7. 17–21.
- 15) Long-Term Safety and Efficacy of Emicizumab for up to >5 Years in a Phase 1/2 Study in Patients with Severe Hemophilia A. M. Shima, A. Nagao, M. Taki, T. Matsushita, K. Oshida, K. Amano, S. Nagami, N. Okada, K. Nogami. ISTH 2021. 2021. 7. 17–21.
- 16) The Haemophilia A Patients whose FVIII: C by Chromogenic Substrate Assay were Higher than by One-Stage Substrate Assay Showed Risk of Development of Haemophilic Arthropathy Silently. N. Suzuki, N. Takahashi, A. Suzuki, S. Tamura, S. Suzuki, Y. Hattori, M. Kakihara, M. Ogawa, T. Kanematsu, T. Kojima, T. Kojima, H. Kiyoi, N. Ishiguro, T. Matsushita. ISTH 2021. 2021. 7. 17–21.
- 17) Low-Factor Consumption and Cost Effectiveness for Surgeries in Hemophilia B Patients with N9-GP. S. Okamoto, T. Matsushita, T. Kanematsu, A. Suzuki, S. Tamura, T. Kojima, N. Suzuki. ISTH 2021. 2021. 7. 17–21.
- 18) Investigation of a Significant Factor to Improve an Establishment of Endothelial Colony Forming Cell. S. Okamoto, N. Suzuki, T. Kanematsu, A. Suzuki, K. Odaira, M. Tokoro, Y. Hayakawa, S. Tamura, F. Hayakawa, H. Kiyoi, T. Kojima, T. Matsushita. ISTH 2021. 2021. 7. 17–21.
- 19) Genetic Study for Idiopathic Venous Thromboembolism in Japanese Using Short-Read and Long Read Sequencers: A Pilot Study of Japanese Group of Idiopathic Thromboembolism. A. Tsuji, A. Sekin, H. Wad, E. Morishita, Y. Ogihara, K. Nogami, T. Kojima, T. Matsushita, N. Yamada, T. Ogo, R. Neki, K. Kokame, S. Yasuda, T. Miyata ISTH 2021. 2021. 7. 17–21.
- 20) THE SAFETY AND EFFICACY OF N8-GP IN PREVIOUSLY UNTREATED PATIENTS (PUPS) WITH SEVERE HAEMOPHILIA A: INTERIM RESULTS FROM THE MAIN AND EXTENSION PHASES OF PATHFINDER6. Kenet G, Königs C, Dey S, Matsushita T, Holm Millner A, Sonnergren H, Young G, Male C. 11th BIC International Conference (Advances in Haemostasis and Bleeding Disorders) Venice, Italy, 2021. 9. 17–19.
- 21) A POST-HOC ANALYSIS OF TEMPORARILY DECREASED INCREMENTAL

- RECOVERY (IR) OBSERVED IN A SUBSET OF PREVIOUSLY UNTREATED PATIENTS (PUPS) WITH HAEMOPHILIA A TREATED WITH N8-GP. Male C, Königs C, Dey S, Matsushita T, Holm Millner A, Sonnergren H, Young G. 7, Kenet G. 11th BIC International Conference (Advances in Haemostasis and Bleeding Disorders) Venice, Italy, 2021. 9. 17-19.
- 22) 345 Surgeries and Diagnostic Procedures in Hemophilia Patients on Concizumab Prophylaxis: Results from the Phase 2 Explorer4 and Explorer5 Trials Allison P. Wheeler, Gary Benson, Hermann Eichler, Sidsel Marie T. nder, Katarina Cepo, Victor JimenezYuste, Kaan Kavakli, Lily LL Wong, and T Matsushita. ASH2021. 2021. 12. 12.
- 23) 1009 The Efficacy and Safety of Caplacizumab in Japanese Patients with Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (iTTP): An Open-Label, Phase 2/3 Study. Y Miyakawa, K Imada, S Ichikawa, H Uchiyama, Y Ueda, A Yonezawa, S Fujitani, H Handa, T Matsushita, H Asakura, K Nishio, K Suzuki, Y Hashimoto, S Ohshima, S Tahara, T Tanaka, and M Matsumoto. ASH2021. 2021. 12. 11.
- 24) DOSE OPTIMISATION AND RISK MITIGATION DURING CONCIZUMAB PROPHYLAXIS IN PATIENTS WITH HAEMOPHILIA A/B WITH AND WITHOUT INHIBITORS IN PHASE 3 CLINICAL TRIALS. P. Chowdary, H. Eichler, T. Matsushita, T. H. Rose, C. Ruzanski, S. Seremetis. EAHAD 2022 (virtual meeting) 2022. 2. 2-4.
- 25) SURGERIES AND DIAGNOSTIC PROCEDURES IN HAEMOPHILIA PATIENTS ON CONCIZUMAB PROPHYLAXIS IN PHASE 2 CLINICAL TRIALS. A. Wheeler, G. Benson, H. Eichler, S. M. Tønder, K. Cepo, V. Jimenez-Yuste, K. Kavakli, L. L. Wong, T. Matsushita. EAHAD 2022 (virtual meeting) 2022. 2. 2-4.
- 26) SECOND INTERIM ANALYSIS OF THE PHASE IV HEM-POWR STUDY EVALUATING THE REAL-WORLD EFFECTIVENESS AND SAFETY OF DAMOCTOCOG ALFA PEGOL IN PREVIOUSLY TREATED PATIENTS WITH HAEMOPHILIA A. M. T. Reding, M. T. Alvarez Román, M. Sanabria, G. Castaman, M. Janbain, T. Matsushita, K. Meijer, K. Schmidt, J. Oldenburg. EAHAD 2022 (virtual meeting) 2022. 2. 2-4.
- H. 知的財産権の出現・登録状況
1. 特許取得 該当なし
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 該当なし