

令和元年6月10日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08967

研究課題名(和文) アンチトロンビン抵抗性検出における抗血栓薬治療の影響を回避する新規検出法の開発

研究課題名(英文) Development of a new detection method in antithrombin resistance to avoid the effect of antithrombotic drug treatment

研究代表者

高木 明 (TAKAGI, AKIRA)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・客員研究者

研究者番号：30135371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HEK293細胞を用いてアンチトロンビン抵抗性を示す変異型プロトロンビンおよび変異型血液凝固第X因子のリコンビナントタンパクを作製する場合は、中程度に発現するクローンの方がG1a化の効率がよく実験の材料として優れていた。アンチトロンビン抵抗性検出において、検体血漿中のヘパリン類はプロトロンビン、FXの活性化相への影響は小さかったが、不活化相においては不活化を促進した。これらの影響は検体血漿希釈液にポリブレンを添加することで回避できた。低分子の活性中心に直接作用する抗血栓薬は、活性化相への影響は小さかったが、不活化相においては不活化を阻害しアンチトロンビン抵抗性と類似の結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

凝固因子の先天性分子異常(1アミノ酸置換)が凝固因子の機能不全による出血傾向ではなく、不活化不全により血栓症の原因になるアンチトロンビン抵抗性を示すことを報告した2012年以来、アンチトロンビン抵抗性検出法を開発・改良してきた。しかし、血栓症を発症した患者は血栓症の原因を究明する前に抗血栓薬が投与されることも多く、検査結果の解釈を困難にしていた。今回ヘパリン類の抗血栓薬の影響を回避するアンチトロンビン抵抗性検出法に改良することができた。低分子の活性中心に直接作用するタイプの抗血栓薬はアンチトロンビン抵抗性を示すことは判明したが回避法は開発できなかった。

研究成果の概要(英文)：In the case of producing a recombinant to antithrombin resistant prothrombin and a recombinant protein of mutant blood coagulation factor X using HEK 293 cells, it was found that high-expression clones were insufficient in gamma carboxylation. The moderately expressing clones were more efficient for the formation of G1a and were superior as the experimental materials. In antithrombin resistance detection, heparins in the sample plasma had a small effect on the activation phase of prothrombin and FX, but promoted inactivation in the inactivation phase. These effects could be avoided by adding polybrene to the sample plasma dilution. The small molecule antithrombotic agents that acted directly on the active center had a small effect on the activation phase, but inhibited the inactivation in the inactivation phase, resulting in similar results to antithrombin resistance.

研究分野：病態検査学

キーワード：アンチトロンビン抵抗性 抗血栓薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

深部静脈血栓・肺塞栓症(静脈血栓塞栓症)は、日本人には少ないと考えられてきたが、近年日本人にも決して少なくないことが明らかとなった。また、静脈血栓塞栓症が加齢に伴い増加することも超高齢化社会を迎えるにあたり、その発症リスクの判定は重要な課題となっている。静脈血栓塞栓症発症には、遺伝的要因の存在が知られている。日本人における遺伝的要因としては、アンチトロンビン(AT)、プロテイン C、プロテイン S などの凝固制御因子の欠損症が知られている。我々も静脈血栓塞栓症の原因と考えられる遺伝子変異を多数報告してきた。しかし、我々の全国的共同研究の結果においても、欧米人の報告においても約 2/3 の症例において原因遺伝子の同定には至っていない。

我々は原因が不明であった静脈血栓症家系に、静脈血栓症の原因となるプロトロンビン遺伝子異常を発見し、その家族性静脈血栓症の本態がアンチトロンビン抵抗性を示す異常トロンビンを生ずるプロトロンビン遺伝子異常症(c.1787G>T, p.R596L)であり、不活化抵抗性が静脈血栓症の原因となることを世界で初めて報告した(New Engl J Med 2012)。

しかし、現行の血液凝固検査法では、不活化抵抗性を検出できない。不活化動態の解析法の開発と実地臨床検査において利用するための最適化が必要であると考え、検体血漿由来のプロトロンビンを至適条件下に活性化し生じたトロンビンをアンチトロンビン単独あるいはヘパリンと共に添加し、不活化後の残存トロンビン活性を測定するアンチトロンビン抵抗性検出法を考案し 2010 年に特許出願し、2015 年 10 月特許登録された。(特許第 5818299 号)

近年、作用機序の異なる抗血栓薬が種々開発され臨床応用が進んできた。それら抗凝固薬のターゲット分子はトロンビン/プロトロンビンあるいはプロトロンビン活性化酵素・活性型凝固第 X 因子(FXa)/FX である。古くから使われているワルファリンはプロトロンビンの生合成に必要なビタミン K の拮抗薬で、 γ -カルボキシグルタミン酸化を阻害するのでプロトロンビン前駆体(PIVKA-II)のままとすることで抗凝固作用を発揮し、PIVKA-II 共存した血漿検体となる。ヘパリン類(未分画ヘパリン、低分子量ヘパリン、ペンタサッカライド、ヘパラン硫酸)は AT と複合体を形成することにより AT を即時型の抗トロンビン、抗 FXa とするがその強度は、ヘパリン類の分子量によって異なり、プロトロンビン活性化相あるいは残存トロンビン検出相で阻害的に働くと考えられる。活性中心に直接作用する経口抗凝血薬(DOAC)のうちトロンビン阻害薬はアンチトロンビン抵抗性検出系において残存トロンビン活性を減少させる誤差要因となり得る。また、FXa 阻害薬はプロトロンビン活性化相に阻害的に働くことが懸念される。血栓症を発症した患者においては発症原因の追求の前に、血栓症の重症化を防ぐ目的で抗血栓薬が使用されることが多く、抗血栓療法下での解析を余儀なくされる。これら抗血栓薬のアンチトロンビン抵抗性検出系に及ぼす影響を詳細に検討し、その影響を回避する方法を考案することは重要であると考えた。

また、近年抗血栓薬の標的凝固因子として着目されている凝固第 Xa 因子もトロンビンと同様に生理的凝固阻止因子・アンチトロンビンにより制御されている。また、ヘパリンやヘパラン硫酸などのヘパリン類はアンチトロンビンと相互作用の示す抗血栓作用の強さが抗凝固第 Xa 因子作用と抗トロンビン作用の間で異なっている事も知られている。アンチトロンビンの反応速度を速めるヘパリン類似の作用を持つ抗血栓薬、活性中心に直接作用する新規抗血栓薬が次々に開発されている状況を踏まえて、凝固第 Xa 因子のアンチトロンビン不活化動態解析法開発も必要と考えた。しかし、研究の遂行に必要なリコンビナント凝固第 X 因子は作製が難しく、比活性が低いことが知られている。翻訳後のゴルジ装置でのプロセッシングが不十分であることが予想され、プロセッシング蛋白・Furin を共発現することで、この問題を解決し十分な比活性を持った FX 安定発現細胞株を樹立することが、研究遂行に必要であった。

2. 研究の目的

静脈血栓塞栓症の新規遺伝的リスクとして、凝固因子・プロトロンビンから活性化したトロンビンが凝固活性は有するが、トロンビンの生理的制御因子・アンチトロンビン(AT)に抵抗性を示すことを発見し、新規血栓症リスクの検査法としてトロンビン不活化動態解析法を考案した。また、トロンビンと同様に AT により生理的不活化を受ける凝固第 Xa 因子(FXa)にも着目し、FXa・AT レジスタンスの新規検出法も考案した。近年の高齢化などにより血栓症発症予防に関する関心が高まり、抗血栓薬が様々に開発されるに至った。新規抗血栓薬の作用ターゲットがトロンビン、FXa であるため多くの血液凝固検査は実施できなくなった。本研究では、抗血栓療法を受けている患者血漿でも実施可能なアンチトロンビン抵抗性トロンビン検出検査法およびアンチトロンビン抵抗性 FXa 検出検査法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

クローニングしたヒトプロトロンビン(野性型)の全長 cDNA を鋳型にアンチトロンビン結合部位を中心に種々の変異を導入する。野生型・変異型発現ベクターを作製し培養細胞株を用いて比活性の高いプロトロンビンを合成・分離精製する。また、凝固第 X 因子(野性型)の全長 cDNA およびプロセッシング蛋白・Furin の cDNA をヒト肝臓由来 cDNA ライブラリーよりクローニングし、各発現ベクターを構築して培養細胞株に同時に遺伝子導入し比活性の高い凝固 X 因子発現細胞株を樹立する。凝固第 Xa 因子のアンチトロンビン不活性化抵抗性を検出する解析法を考案設定する。健常人血漿、人工的に構成した疑似患者血漿モデルを作製し臨床

検体血漿を想定した抗血栓薬の影響を回避した検出系への最適化を実施し、トロンビンおよび凝固第 Xa 因子不活性化抵抗性を検出する解析法を考案設定する。静脈血栓塞栓症患者のうち原因遺伝子変異が同定できない患者を中心に新規に考案したトロンビンおよび凝固第 Xa 因子不活性化抵抗性検査を実施し、我々が提案した活性型凝固因子が分子異常のため不活化に抵抗することが血栓症の原因となる新規疾患概念に基づく臨床検査法の有用性を検討する。

4. 研究成果

アンチトロンビン抵抗性凝固第 Xa 因子を検出する測定系に高感度第 Xa 因子特異的発色性合成基質 (S-2765) を用い、検体血漿濃度を高くしてより高感度な検出系の開発を目指したが、生成した第 Xa 因子により検体中に含まれるプロトロンビンからトロンビンを生成し、トロンビンが S-2765 を水解し残存第 Xa 因子測定において大きな正誤差となることが判明したが検体希釈液中に合成抗トロンビン薬・アルガトロバンを添加することで正確な残存第 Xa 因子が測定できるようになった。

アンチトロンビン抵抗性検出において、ビタミン K 拮抗剤による抗血栓療法 (ワルファリン服用) は弱いアンチトロンビン抵抗性を示したが Gla 化が不十分なプロトロンビンおよび凝固第 X 因子の活性化が正常なプロトロンビンおよび凝固第 X 因子よりも長時間を要することが主な原因であることが判明し、最大活性が得られる活性化時間とすることでアンチトロンビン抵抗性検出への影響はほぼ回避できた。ヘパリン類 (未分画ヘパリン、低分子量ヘパリン、フォンダパリヌクス) はプロトロンビンおよび凝固第 X 因子の活性化相には影響を認めなかったが、アンチトロンビンによる不活化相では分子サイズの大きなヘパリン類ほど強い不活化反応の増強が認められたが、検体血漿希釈液にポリブレンを添加することで、アンチトロンビン抵抗性検出系への影響を回避できた。活性中心に直接作用する抗凝固薬 (DOAC、抗トロンビン薬: ダビガトラン、抗 FXa 薬: リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン) はアンチトロンビン抵抗性検出において、いずれもアンチトロンビン抵抗性を示し、その影響は回避できなかった。開発中の各 DOAC 中和薬の効果に期待したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. 高木明、田村彰吾、小嶋哲人: アンチトロンビン抵抗性の診断 -検査法を中心に- 日本検査血液学会誌 査読なし 19 巻 2018 年 393~400

2. Tamura S, Suga Y, Tanamura M, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Hottori Y, Kakihara M, Suzuki S, Takagi A, Kojima T.: Optimisation of antithrombin resistance assay as a practical clinical laboratory test: Development of prothrombin activator using factors Xa/Va and automation of assay. International Journal of Laboratory Hematology 査読あり 40 巻 2018 年 312~319 doi: 10.1111/ijlh.12786. Epub 2018 Feb 13.

3. Yoshida R, Seki S, Hasegawa J, Koyama T, Yamazaki K, Takagi A, Kojima T, Yoshimura M.: Familial pulmonary thromboembolism with a prothrombin mutation and antithrombin resistance Journal of Cardiology Cases 査読あり 17 巻 2018 年 197~199 doi: 10.1016/j.jccase.2018.02.001.

4. Tamura S, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Suzuki S, Katsumi A, Takagi A, Kojima T. : In vitro exploration of latent prothrombin mutants conveying antithrombin resistance Thrombosis Research 査読あり 159 巻 2017 年 33~38 doi:10.1016/j.thromres.2017.09.020.

5. 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 the antithrombin resistance mechanism. J Thromb Haemost. 査読あり 15 巻 2017 年 670~677 doi: 10.1111/jth.13618.

6. 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 査読あり 116 巻 2016 年 1022~1031 doi:10.1160/TH16-03-0223

7. 小嶋哲人、高木明、村田萌、高木夕希 : 新たな血栓性素因 : アンチトロンビンレジスタンス 日本産婦人科・新生児血液学会誌 査読なし 25 巻 2016 年 66~77

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1.高木明、田村彰吾、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性の診断 -検査法を中心に- 第 19 回日本検査血液学会学術集会シンポジウム 1 特発性血栓症 2018 年
- 2.Shogo Tamura, Moe Murata-Kawakami, Yuki Takagi, Sachiko Suzuki, Akira Katsumi, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima : Many of the prothrombin mutations in the sodium-binding region cause an antithrombin- resistance phenotype 第 40 回日本血栓止血学会学術集会学術推進委員会シンポジウム 2018 年
- 3.田村彰吾、高木 明、藤岡亮也、服部有那、垣原美紗樹、鈴木幸子、高木夕希、小嶋哲人： 血漿検体測定を目指したアンチトロンビン抵抗性凝固第 X 因子検出法の構築 第 19 回日本検査血液学会学術集会 2018 年
- 4.高木夕希、鈴木幸子、河村奈美、榎山愛弓、坂根寛人、橋本恵梨華、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性はトロンビン生成試験(TGA)により検出可能か 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 2017 年
- 5.藤岡亮也、中田悠紀子、坂根寛人、橋本恵梨華、河村奈美、榎山愛弓、鈴木幸子、高木夕希、田村彰吾、高木明、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性凝固第 Xa 因子検出法の開発 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 2017 年
- 6.Yuki Takagi, Sachiko Suzuki, Nami Kawamura Ayumi Makiyama, Hiroto Sakane, Erika Hashimoto, Akiya Fujioka, Shogo Tamura, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima : Thrombin generation assay CANNOT identify antithrombin resistance during anticoagulant therapy XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2017 年
- 7.高木夕希、河村奈美、榎山愛弓、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 2016 年
- 8.Yuki Takagi, Nami Kawamura, Ayumi Makiyama, Erika Hashimoto, Shogo Tamura, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima : 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 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小嶋哲人

ローマ字氏名：Kojima Tetsuhito

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院 医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40161913

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。