

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16568

研究課題名（和文）血液凝固制御因子プロテインSおよびプロテインCの活性測定法の開発

研究課題名（英文）Development of new Protein S and Protein C activity assays

研究代表者

丸山 慶子（Maruyama, Keiko）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：30712624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、プロテインS(PS)およびプロテインC(PC)活性測定に適した凝固第V因子(FV)改変体を作製し、FV改変体を発現する安定発現細胞株を樹立した。精製PSおよび精製APCでの検討により、FV改変体を用いたPSおよびPC活性測定系を構築した。正常血漿と欠乏血漿の混合比調整で調製した模擬血漿検体を測定した結果、良好な結果を得ることができ、新たなPSおよびPC活性測定法を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性血栓性素因として、アンチトロンビン、PC、PSの欠損症があり、国の指定難病である。先天性血栓性素因のスクリーニング検査として、これらの抗原量および活性の測定は重要である。現在行われているPSおよびPC活性測定法は、凝固時間法もしくはトロンビンやAPCで分解される合成基質を用いた間接的な測定法であり、本研究で構築した方法は、PSおよびPCの働きを直接定量することで、より正確に測定できる可能性があり、欠損症の診断に有効である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We generated recombinant coagulation factor V (FV) mutant as a substrate for measuring protein S (PS) and protein C (PC) activities and established stable cell lines expressing the FV substrate. We established new PS activity assay and PC activity assay using the FV substrate. We measured samples prepared by adjusting the mixing ratio of normal and deficient plasma and successfully detected their activities.

研究分野：血栓止血学

キーワード：プロテインS プロテインC 血栓性素因

1. 研究開始当初の背景

先天性血栓性素因としてアンチトロンビン(AT)、プロテイン C(PC)、プロテイン S(PS)の欠損症がある。先天性血栓性素因のスクリーニング検査として、これらの抗原量および活性の測定が重要である。PCは血管内皮細胞PC受容体(EPCR)に結合し、トロンボモジュリン(TM)とトロンビンの複合体により活性化され、活性化PC(APC)になる。APCはPSを補酵素として、活性化第V因子(FVa)および活性化第VIII因子(FVIIIa)を不活性化し、凝固反応を阻止する(図1)。

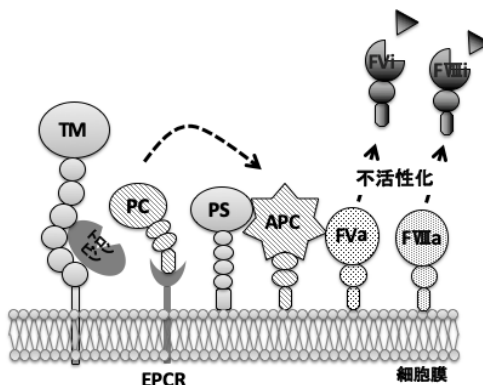


図1. PCとPSによる凝固制御

現在行われているPS活性測定法は2種類あり、被検血漿にPS欠乏血漿、APC、FVaを添加して活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)ないしプロトロンビン時間(PT)を用いた凝固時間の延長で評価する凝固時間法と、血漿中のPSをC4BPから解離し、トロンビンに対する合成基質を用いて測定する総PS活性測定法である。凝固時間法によるPS活性測定では、健常者群でも活性値の幅が大きく(正常プール血漿の活性を100%として48~128%)、日本人に多いII型欠損症の原因であるPS-K196E(Tokushima)変異保有者で活性が低下しない場合がある(Kimura et al, J Thromb Haemost 4:2010, 2006)。さらに、直接経口抗凝固薬(DOAC)の内服で偽高値になる。そのため、凝固時間法によるPS欠損症の診断には限界があることが指摘されており、欧米ではスクリーニング診断に活性測定は不適切とされている(Persson et al, Clin Lab 49:103, 2003)。PC活性測定法も2種類あり、蛇毒由来PC活性化剤により被検血漿中のPCを活性化後にPC欠乏血漿と混和しAPTTを測定する凝固時間法と、APCに対する合成基質を用いて測定する合成基質法である。凝固時間法ではDOACの内服により偽高値となる。合成基質法はDOACの影響は受けにくいですが、ワルファリン内服患者、あるいはGlaドメイン変異やK193del変異をもつ患者では偽高値となり、欠損症を見落とす可能性がある(門平 他, 血栓止血誌 30:14, 2019)。つまり、現在行われているPSおよびPC活性測定法は、凝固時間法もしくはトロンビンやAPCで分解される合成基質を用いた間接的な測定法であり、PSおよびPCの働きを直接定量化していない(図2)。

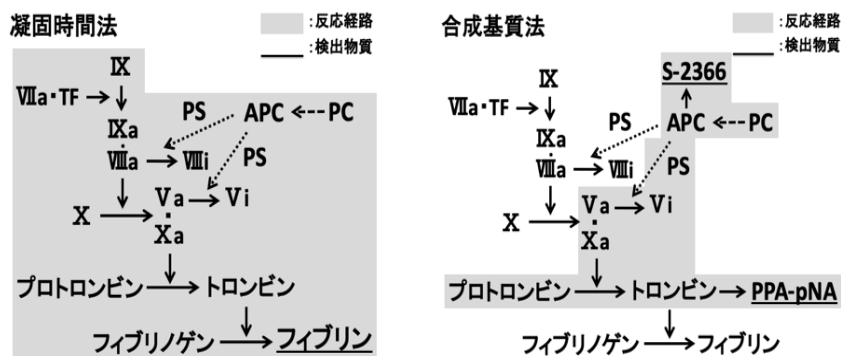


図2. PS、PC活性測定の現行法(凝固時間法、合成基質法)

2. 研究の目的

本研究では、PSおよびPCによるFVaの切断を直接定量し、PSおよびPC活性を算出する方法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

PSおよびPC活性測定に適したFV改変体を作製し、FV改変体を発現する安定発現細胞株を樹立した。樹立した細胞の培養上清より、FV改変体を精製した。FV改変体に精製APC、精製PS、リン脂質を37°Cで反応させた後、FV改変体の切断をウェスタンブロット法およびELISA法で定量した。市販の正常血漿と欠乏血漿の混合比調整で調製した模擬血漿検体を作成し、血漿検体、FV改変体、APC、PSおよびリン脂質を反応させ、FV改変体の切断を定量した。

4. 研究成果

(1) 精製PSおよび模擬血漿検体を用いたPS活性測定系の検討

FV改変体に一定濃度の精製APC、0~5 nMの精製PSおよびリン脂質を反応させ、FV改変体の切断を定量した結果、PS濃度依存的にFV改変体の切断が確認できた。さらに、正常血漿とPS

欠乏血漿で調整した模擬血漿検体を測定した結果、PS 活性依存的にシグナルの変化を確認できた(図3)。

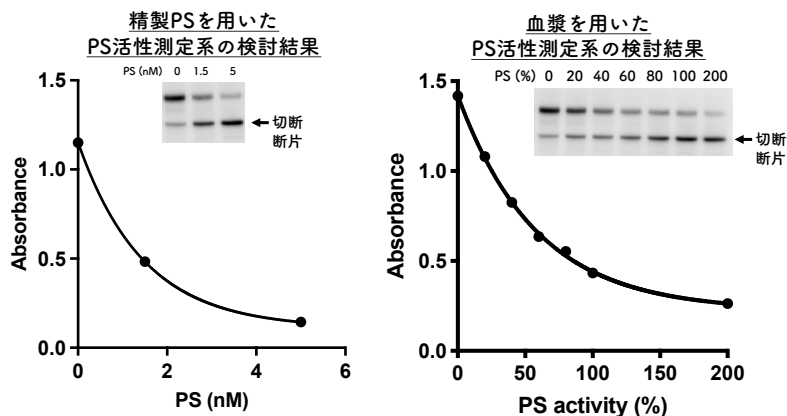


図3. PS 活性測定系の検討結果

(2) 精製 APC および模擬血漿検体を用いた PC 活性測定系の検討

FV 改変体に 0~4 nM の精製 APC、一定濃度の精製 PS およびリン脂質を反応させた結果、APC 濃度依存的に FV 改変体の切断を確認できた。さらに、正常血漿と PC 欠乏血漿で調整した模擬血漿に蛇毒由来 PC 活性化剤を添加して血漿中の PC を活性化後、FV 改変体を用いて活性を測定した結果、PC 活性依存的にシグナルの変化を確認できた(図4)。

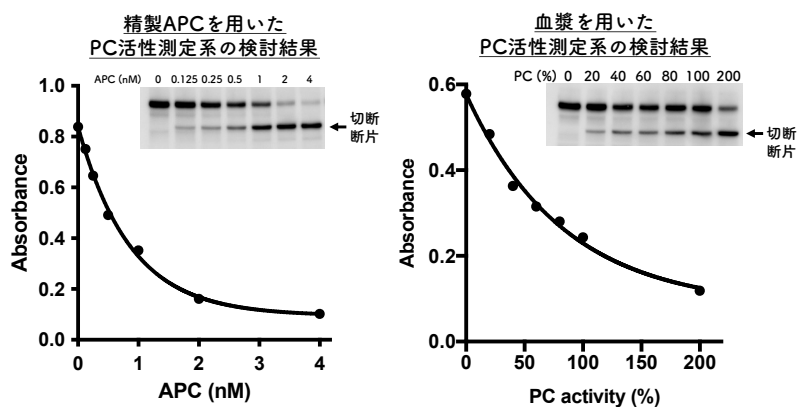


図4. PC 活性測定系の検討結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maruyama Keiko, Miyata Shigeki, Kokame Koichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Alpha HIT assay: A new assay for heparin induced thrombocytopenia antibody detection using Fc RIIa coated beads and Alpha technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 e12818 ~ e12818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rth2.12818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagaya Satomi, Maruyama Keiko, Watanabe Atsushi, Meguro-Horike Makiko, Imai Yuta, Hiroshima Yuki, Horike Shin-ichi, Kokame Koichi, Morishita Eriko	4. 巻 107
2. 論文標題 First report of inherited protein S deficiency caused by paternal <l>PROS1</l> mosaicism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 330 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2021.278527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Keiko, Kokame Koichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Estimating the frequencies of pathogenic variants of antithrombin, protein C, and protein S using a public database and expression experiments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 635 ~ 637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.32.635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Osada Makoto, Maruyama Keiko, Kokame Koichi, Denda Ryunosuke, Yamazaki Kohei, Kunieda Hisako, Hirao Maki, Madoiwa Seiji, Okumura Nobuo, Murata Mitsuru, Ikeda Yasuo, Watanabe Kentaro, Tsukada Yuiko, Kikuchi Takahide	4. 巻 5
2. 論文標題 A novel homozygous variant of the thrombomodulin gene causes a hereditary bleeding disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3830 ~ 3838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Keiko, Kokame Koichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Carrier frequencies of antithrombin, protein C, and protein S deficiency variants estimated using a public database and expression experiments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 179 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rth2.12456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 丸山慶子、小亀浩市
2. 発表標題 プロテイン S 遺伝子のイントロン 1 による遺伝子発現調節
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山慶子、宮田茂樹、小亀浩市
2. 発表標題 Fc R11a固相化ビーズとAlphaLISA技術を用いたHIT抗体検出法の開発
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maruyama Keiko, Kokame Koichi
2. 発表標題 Carrier frequencies of antithrombin-, protein C-, or protein S-deficient variants estimated using a public database and expression experiments
3. 学会等名 The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Osada, K. Maruyama, K. Kokame, R. Denda, K. Yamazaki, H. Kunieda, M. Hirao, S. Madoiwa, M. Murata, Y. Ikeda, Y. Tsukada, T. Kikuch.
2. 発表標題 A hereditary bleeding disorder caused by a novel homozygous mutation of thrombomodulin gene
3. 学会等名 The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山慶子、小亀浩市
2. 発表標題 公開データベースから抽出したアンチトロンビンおよびプロテインC変異の機能解析
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------