

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15945

研究課題名（和文）フィブリノゲン蓄積病モデル細胞を用いたフィブリノゲン機能解析と蓄積動態の解明

研究課題名（英文）Analysis of fibrinogen function and storage kinetics using model cells of fibrinogen storage disease

研究代表者

新井 慎平（Arai, Shinpei）

信州大学・学術研究院保健学系・助教

研究者番号：70866053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：先天性フィブリノゲン(Fbg)低下症の一部の症例において、肝細胞の小胞体にFbgが蓄積することで肝細胞障害・肝硬変を発症するフィブリノゲン蓄積病（FSD）が報告されているが、その詳細な病態は解明されていない。本研究ではFSD型遺伝子変異を導入したモデル細胞を用いてFSDの病態解明を試みた。リコンビナントFbgの機能解析において、FSD型変異にフィブリン重合反応の異常を見出した。細胞内に蓄積したFbgと小胞体ストレス応答との関連性を示唆するデータは得られず、小胞体内のFbg蓄積は小胞体ストレスとは異なる機序の関与が疑われ、引き続き解析を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FSDの発症は先天性Fbg低下症患者において生命予後を左右する重大な合併症であり、その予防法・治療法の開発とそれに不可欠な病態メカニズムの解明は喫緊の課題である。本研究で、Fbgの重要なタンパク機能であるフィブリン重合反応において、FSD型変異Fbgにおける反応異常を明らかにした。FSDの病態解明に繋がる現象であるか、引き続き解析を予定している。

研究成果の概要（英文）：Fibrinogen storage disease(FSD), in which fibrinogen accumulates in the endoplasmic reticulum of hepatocytes and causes hepatocellular damage and cirrhosis, has been reported in some cases of congenital hypofibrinogenemia. However, the details of FSD have not been studied. In this study, we attempted to elucidate the pathogenesis of FSD using model cells transfected with FSD gene mutations. In functional analysis of recombinant fibrinogen, we found abnormal fibrin polymerization reactions in FSD mutants. Furthermore, we did not obtain data suggesting a relationship with the endoplasmic reticulum stress response, and suspected the involvement of different mechanism in the accumulation of fibrinogen. We plan to continue analysis of fibrinogen functions in FSD mutants.

研究分野：血栓止血学

キーワード：フィブリノゲン 先天性フィブリノゲン低下症 フィブリノゲン蓄積病 フィブリン重合反応 小胞体  
ストレス応答

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

フィブリノゲン(**fibrinogen**: **Fbg**)は血液凝固反応の最終段階でトロンビンの作用によってフィブリンとなる繊維状糖蛋白質で、健常人血漿中には **180-350mg/dL** 存在する。**Fbg** は A $\alpha$  鎖、B $\beta$  鎖、 $\gamma$  鎖の **3** 種のポリペプチド鎖から構成され、A $\alpha$ B $\beta$  $\gamma$  複合体を形成し、さらに **N** 末端領域で **S-S** 結合によって **2** 量体となり肝細胞から血液中へ分泌される。様々な要因で血中濃度は増減するが、臨床的血液学的には低濃度を示す病態の鑑別が重要視されている。

先天性 **Fbg** 異常症は **Fbg** をコードする **3** つの遺伝子(**FGA**、**FGB**、**FGG**)のいずれかの異常により起こる常染色体顕性または潜性遺伝形式の疾患である。本疾患の診断は、**Fbg** 活性値と抗原量による **4** つの表現型分類(欠損症、低下症、機能異常症、低下症+機能異常症)と、シークエンス解析による病因変異の同定によって行われる。(先天性 **Fbg** 異常症データベース <http://site.geht.org/base-de-donnees-fibrinogene/>)。

臨床症状の多くは **Fbg** の機能低下に伴う出血や血栓症であるが、近年、低下症の一部の症例でフィブリノゲン蓄積病(**Fibrinogen Storage Disease**; **FSD**)の発症が報告されている。**FSD** は、肝細胞小胞体に **Fbg** が蓄積することで肝細胞障害を惹き起こす合併症であり、遺伝子変異として **8** 種類( **$\gamma$ G284R**、**T314P**、**D316N**、**H340D**、**delG346-Q350**、**G366S**、**T371I**、**R375W**)が報告されており、いずれも  $\gamma$  鎖 **C** 末端側に限局した変異である。**10** 歳未満児での肝硬変の発症や死亡例も複数報告されており、先天性異常症の中でも特に致死的事から、**FSD** の病態解明とその先の治療薬・予防薬の開発は解決すべき重要な課題である。

申請者らは **FSD** の病態解明に取り組むために、**FSD** 型遺伝子変異を **CHO** 細胞ならびに **HuH-7** 細胞(ヒト肝細胞株)に導入し、小胞体に **Fbg** が蓄積する **FSD** モデル細胞を樹立した(**6** 種類)。それらの細胞には特徴的な封入体が形成され、**FSD** 変異に高率に認められる特異的な所見として報告した(**Arai S et al. 2017**)。2017年に **H340D** 変異、2020年に **T371I** 変異による **FSD** 発症例が報告されたが、いまだ **FSD** の発症機序については不明であるとともに、分子生物学的手法を用いた詳細な研究はほとんど行われていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

申請者の研究室で樹立した **FSD** モデル細胞を用いて、細胞外に分泌される **Fbg** と小胞体に蓄積する **Fbg** の詳細を解析することで、**FSD** 発症機序の解明を試みた。また、異常 **Fbg** の小胞体蓄積を抑制・解消する物質の候補としてケミカルシャペロンに着目し、それらの効果を検証して将来の治療薬の開発に繋げるような基礎データの取得を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) **H340D**、**T371I** 変異を有する細胞株の作製

2017年以降に報告された **H340D** と **T371I** の **2** 変異について、正常  $\gamma$  鎖配列を含むプラスミドを鋳型に **Mutagenesis Kit** (**Stratagene**) を用いて変異  $\gamma$  鎖プラスミドを作製・精製した。A $\alpha$ B $\beta$  鎖産生 **CHO** 細胞に変異  $\gamma$  鎖プラスミドをリン酸 **Ca** 共沈法による遺伝子導入を行い、安定発現細胞株を作製した。それらの細胞株の **Fbg** 合成能(**Western blotting**)、分泌能(**ELISA**)ならびに細胞内 **Fbg** 分布(蛍光抗体法)を樹立済みの **6** 種類の **FSD** 細胞モデルと比較した。

### (2) リコンビナント **Fbg** の機能解析

約半年間の長期培養を行い、培養上清中のリコンビナント **Fbg** を硫酸塩析と抗ヒト **Fbg** モノクローナル抗体(**LSI** メディエンス、**clone:IF-1**)を用いた **immuno-affinity** カラムクロマトにより精製した。精製した **Fbg** は **SDS-PAGE** で精製度合を確認し、トロンピンによるフィブリン重合反応(精製 **Fbg** **0.18 mg/mL**、トロンピン **0.05 U/mL**)を行った。

### (3) 小胞体局在 **Fbg** の回収と **Fbg** 結合タンパクの同定

小胞体局在性タンパク標識試薬(**ER-Protein Capture kit**)で標識後、細胞破砕液で細胞を溶解し、標識試薬に対するキャプチャー抗体とプロテイン **A** ビーズを用いて免疫沈降を行った。回収した溶液の **Fbg** 量を **SDS-PAGE** で確認し、分離後の各バンドを切り出し液体クロマトグラフィー質量分析計(**LC-MS**)の解析にて **Fbg** との結合タンパクの同定を行った。

### (4) ケミカルシャペロンの効果検証

ケミカルシャペロンは、小胞体ストレスを軽減する **4-PBA**・**TUDCA**、アミロイド様タンパクの凝集を抑制する **compound147** を選択した。**FSD** 細胞モデルにおけるそれらの効果を検証するために、ケミカルシャペロン添加後の細胞内封入体の陽性率と形態学的変化を蛍光抗体法で確認した。

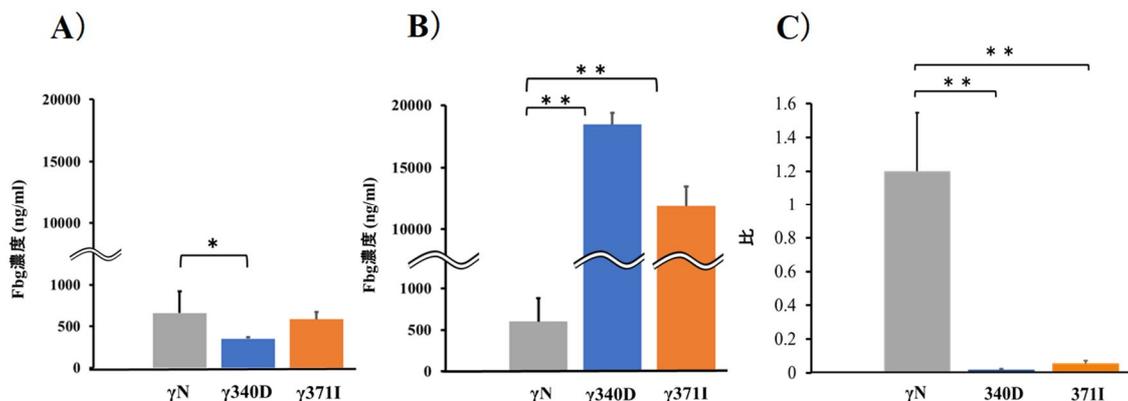
## 4. 研究成果

### (1) **H340D**、**T371I** 変異の **FSD** モデル細胞の樹立

遺伝子導入した細胞株において **Western blotting** で目的変異  $\gamma$  鎖の産生と細胞内での **Fbg** へ

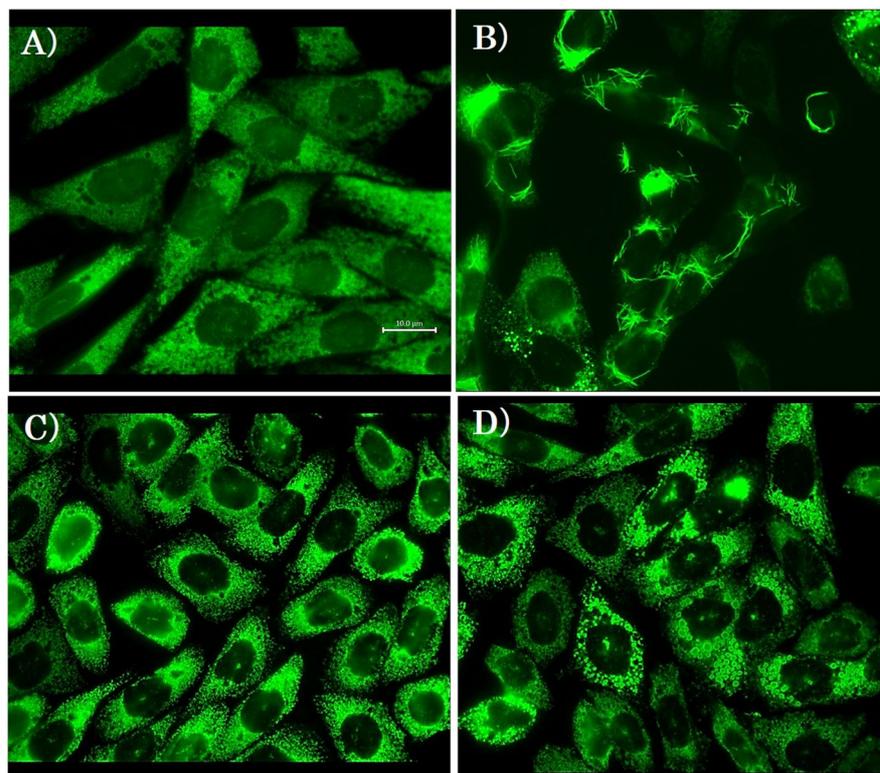
組み立てを確認した。培養上清ならびに細胞内 **Fbg** 濃度を **ELISA** で測定したところ、細胞内 **Fbg** 濃度が有意に高値を示した (図 1B)。培養上清と比較して細胞内 **Fbg** 濃度が高い (培養上清濃度/細胞内 **Fbg** 濃度比の低下、図 1C) という特徴は、先行研究で樹立した 6 種類の **FSD** モデル細胞の結果と合致していた。

細胞内 **Fbg** 分布を蛍光抗体法で確認したところ、一部の細胞で粗大顆粒状の封入体を認めたものの、 $\gamma$ 375W 細胞で観察されるような特徴的な繊維状封入体は認められなかった (図 2)。



**図 1 : ELISA による培養上清および細胞内 **Fbg** 濃度の測定**

$\gamma$ N (n=9)、 $\gamma$ 340D (n=12)、 $\gamma$ 371I (n=12) の細胞株における **Fbg** 濃度を平均値 + 標準偏差で示した。A) : 培養上清 **Fbg** 濃度、B) : 細胞内 **Fbg** 濃度、C) : 培養上清 **Fbg** 濃度/細胞内 **Fbg** 濃度比。\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$



**図 2 : 蛍光抗体法による細胞内 **Fbg** 分布**

**FITC** 標識抗ヒト **Fbg** 抗体 (**MBL**) を用いた蛍光抗体法を実施し、細胞内 **Fbg** 分布を確認した。A) :  $\gamma$ N、B) ;  $\gamma$ 375W、C) :  $\gamma$ 340D、D) :  $\gamma$ 371I の細胞株。Scale bar : 10  $\mu$ m

## (2) リコンビナント **Fbg** のフィブリン重合反応

解析対象とした変異は、1 例目に **FSD** として報告され症例数が多い **G284R** と、モデル細胞において培養上清中の **Fbg** 濃度が最も高値を示した **D316N** を選択した [以下の(3)、(4)の研究内容においても同じ変異を対象に研究を進めた]

長期培養中に回収した培養液からリコンビナント **Fbg** を精製し、トロンビン添加によるフィブリン重合反応を解析したところ、リコンビナント野生型 **Fbg** と比較して、**D316N** で軽度の重合異常を認めた。一方、**G284R** では重合反応がまったく観察されず、**FSD** 変異の種類によって機能異常の程度に差があることが判明した (図 3)。

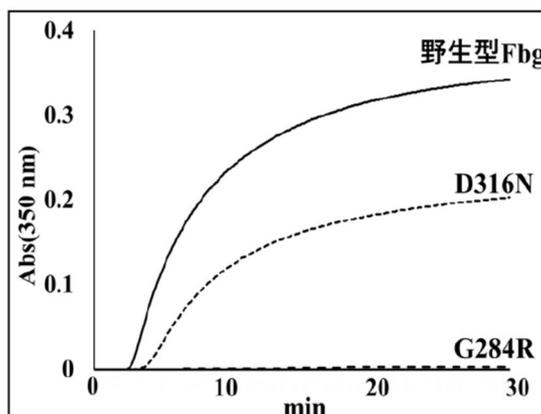


図 3：トロンビンによるフィブリン重合反応

## (3) 小胞体局在 **Fbg** と結合タンパクの解析

当初購入した試薬を用いて様々な条件下で小胞体に局在した **Fbg** の回収を試みたが、**MS** 解析に必要な分量を回収することが困難であったため、抗ヒト **Fbg** ポリクローナル抗体 (**DAKO**) に変更して解析を進めた。**MS** 分析にて **Fbg** の同定は行えたものの、小胞体ストレス応答に関連タンパクなど **FSD** 型変異 **Fbg** に結合しているタンパクを見出すことはできなかった。標識抗体を変更したことで小胞体局在以外の **Fbg** も回収サンプルに含まれている可能性が考えられ、解析に用いるサンプルの純度については引き続き検討の余地があると考えられた。

## (4) ケミカルシャペロンによる細胞変化

添加濃度や反応日数をいくつかのパターンで検討したものの、いずれのケミカルシャペロンにおいても封入体陽性率が低下するような変化は確認されず **Fbg** の小胞体蓄積の軽減を示唆するデータを得ることはできなかった。

興味深いことに、報告されている **FSD** 症例の表現型はいずれも **Fbg** 低下症 (**Fbg** 活性値と抗原量の値に乖離を示さない) であることから、**FSD** 型変異 **Fbg** には機能異常はないものと推測していたが、本研究において **G284R** と **D316N** で機能異常の存在が明らかとなった。一連の研究成果を踏まえて、**FSD** 型変異 **Fbg** の小胞体蓄積は小胞体ストレス応答やアミロイド凝集とは異なる機序が関与している可能性が考えられ、現時点では **FSD** 型変異 **Fbg** における機能異常の詳細を明らかにすることが病態解明への鍵であると考えている。引き続き未解析の変異についても機能解析を計画している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 水島大地, 水島大地, 多田裕樹, 多田裕樹, 新井慎平, 吉田正宏, 小林大太, 菊地信介, 東信良, 赤坂伸之	4. 巻 42巻
2. 論文標題 フィブリノゲン異常症を背景とした包括的高度慢性下肢虚血の治療経験	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 血管外科	6. 最初と最後の頁 61-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arai Shinpei, Kamijo Tomu, Hayashi Fumiaki, Shinohara Sho, Arai Nobuo, Sugano Mitsutoshi, Uehara Takeshi, Honda Takayuki, Okumura Nobuo	4. 巻 43
2. 論文標題 Screening method for congenital dysfibrinogenemia using clot waveform analysis with the Clauss method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Laboratory Hematology	6. 最初と最後の頁 281 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijlh.13358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamijo Tomu, Kaido Takahiro, Yoda Masahiro, Arai Shinpei, Yamauchi Kazuyoshi, Okumura Nobuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Recombinant Y278H Fibrinogen Showed Normal Secretion from CHO Cells, but a Corresponding Heterozygous Patient Showed Hypofibrinogenemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5218 ~ 5218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22105218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoda Masahiro, Kaido Takahiro, Kamijo Tomu, Taira Chiaki, Higuchi Yumiko, Arai Shinpei, Okumura Nobuo	4. 巻 114
2. 論文標題 Novel variant fibrinogen p.C352R produced hypodysfibrinogenemia leading to a bleeding episode and failure of infertility treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 325 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03174-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Shinpei, Kamijo Tomu, Kaido Takahiro, Yoda Masahiro, Shinohara Sho, Suzuki Takeshi, Arai Nobuo, Sugano Mitsutoshi, Uehara Takeshi, Okumura Nobuo	4. 巻 521
2. 論文標題 Automated screening procedure for the phenotypes of congenital fibrinogen disorders using novel parameters,  min1 c and Ac/ min1 c, obtained from clot waveform analysis using the Clauss method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 170 - 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2021.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaido Takahiro, Yoda Masahiro, Kamijo Tomu, Arai Shinpei, Yamauchi Kazuyoshi, Okumura Nobuo	4. 巻 114
2. 論文標題 A novel variant fibrinogen, A E11del, demonstrating the importance of A E11 residue in thrombin binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 591 - 598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03200-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上條途夢, 海藤貴大, 依田将宏, 平千明, 樋口由美子, 新井慎平, 竹澤由夏, 奥村伸生	4. 巻 10
2. 論文標題 28年間で解析した長野県内のフィブリノゲン異常症18家系28例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 長臨技会誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 新井慎平, 海藤貴大
2. 発表標題 His340Asp・ Thr371Ile変異を有するフィブリノゲン蓄積病モデル細胞の解析
3. 学会等名 第24回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅崎幹樹, 中村信元, 新井慎平, 漆原南実, 寺本継脩, 秦真公人, 井上雄介, 中尾隆之, 西岡安彦, 佐田政隆
2. 発表標題 新規変異B Cys76Pheを伴った低フィブリノゲン血症の1症例
3. 学会等名 第24回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 服部周生, 大下竜登, 新井慎平, 大谷ひかる, 市川友喜, 藤村哲士, 松田和之, 樋口由美子
2. 発表標題 フィブリノゲンによるマクロファージ分化誘導能評価系の構築
3. 学会等名 第70回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井慎平, 上條途夢, 海藤貴大
2. 発表標題 異常フィブリノゲンが創傷治癒に及ぼす影響の解析とその評価法の検討
3. 学会等名 第70回日本臨床検査医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井慎平
2. 発表標題 私のキャリアデザイン～臨床検査技師出身の教員として～
3. 学会等名 第47回長野県臨床検査学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinpei Arai, Tomu Kamijo, Takahiro Kaido, Sho Shinohara, Takeshi Suzuki, Nobuo Arai, Takeshi Uehara, Nobuo Okumura
2. 発表標題 Novel approach for the phenotypes of congenital fibrinogen disorders using alternative fibrinogen value,  min1 c, obtained from clot waveform analysis
3. 学会等名 The 17th Congress of Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (ASCPaLM) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新井 慎平, 竹澤 由夏, 上條 途夢, 海藤 貴大, 篠原 翔, 鈴木 健史, 新井 信夫, 上原 剛, 奥村 伸生
2. 発表標題 凝固波形解析パラメーター min1 から算出したフィブリノゲン値を用いた先天性フィブリノゲン異常症の検出
3. 学会等名 第22回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井 慎平, 上條 途夢, 海藤 貴大
2. 発表標題 先天性フィブリノゲン異常症の変異フィブリノゲンとアミロイド の結合性の検討
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 新井慎平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 臨床検査【検査血液学レッスン 検査結果の乖離をどう判断するか】(4章)凝固 フィブリノゲンの偽低値 IgA M蛋白血症	

1. 著者名 新井慎平、奥村伸生	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本血栓止血学会	5. 総ページ数 7
3. 書名 日本血栓止血学会誌【特集：凝固波形解析（CWA）のアップデート】凝固波形解析によるフィブリノゲン異常の検査診断	

〔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
---------	---------