

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790923

研究課題名（和文）日本人の遺伝的易血栓性に関わる点変異ノックインマウスの樹立と解析

研究課題名（英文）Generation and characterization of knock-in mice carrying the point mutations associated with thrombosis in Japanese

研究代表者

坂野 史明（BANNO FUMIAKI）

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：00373514

研究成果の概要（和文）：日本人には凝固制御因子プロテイン S（PS）の K196E 変異が約 55 人に 1 人の頻度で存在し、静脈血栓症の遺伝的リスクとなっている。また、線溶因子プラスミノゲン（PLG）の A620T 変異（マウスでは A622T）も日本人の約 25 人に 1 人の頻度で認められ、潜在的な血栓性リスクとなっている可能性がある。本研究では、これらの変異の影響を個体レベルで解析するため、PS-K196E 変異および、PLG-A622T 変異のノックインマウスを樹立した。肺塞栓誘発モデルを用いた解析の結果、PS-K196E マウスでは肺血管閉塞が亢進し、野生型マウスに比べて高い死亡率を示したことから、PS-K196E 変異が肺塞栓症等の静脈血栓症の増悪要因となることが明らかとなった。動脈血栓症への PS-K196E 変異の影響を調べるため、中大脳動脈閉塞による脳虚血再灌流実験を行った結果、白人型血栓症モデルである凝固第 V 因子-Leiden マウスとは異なり、PS-K196E マウスの脳梗塞症状は野生型マウスと差は見られなかった。凝固第 V 因子-Leiden 変異は白人の若年性脳梗塞リスクとして報告されているが、PS-K196E 変異と脳梗塞との関連を示す報告はない。PS-K196E マウスはこれと矛盾しない表現型を呈しており、日本人型血栓症の特徴や治療応答性を解析するための良いモデル動物になると考えられる。一方、PLG-A622T マウスでは、肺塞栓、脳梗塞症状ともに悪化は認められなかったことから、少なくとも本変異単独ではこれらの血栓症の原因とはならないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The K196E mutation in protein S (PS) is found in one of 55 Japanese and is a genetic risk factor for vein thrombosis in Japanese. The A620T mutation in plasminogen (PLG) is found in one of 25 Japanese and causes decreased fibrinolytic activity. In this study, we generated PS-K196E and PLG-A622T (corresponding to human PLG-A620T) knock-in mice for investigating effects of these mutations *in vivo*. Following the induction of pulmonary embolism, PS-K196E mice showed increased degree of lung vascular occlusion and decreased survival compared with wild-type mice. These results support a direct causal relationship between the PS-K196E mutation and increased susceptibility to venous thromboembolism. To examine effects of the mutation on arterial ischemic diseases, temporary cerebral ischemia was applied in mice. Mice with the factor V-Leiden mutation, the common thrombotic risk in Caucasian, showed larger infarction and lower survival than wild-type mice. In contrast, cerebral infarction in PS-K196E mice was not aggravated. Consistent with these findings, the FV-Leiden mutation has been reported as a risk factor for early-onset ischemic stroke, whereas there are no epidemiological data to suggest significant association between the PS-K196E mutation and stroke. The PS-K196E mice represent a suitable animal model to uncover genetic characteristics of thrombosis in Japanese. The PLG-A622T mutation in mice had little

effect on the severity of pulmonary embolism and cerebral infarction, suggesting that the PLG-A620T mutation does not cause thrombosis by itself.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：プロテイン S、プラスミノゲン、ノックインマウス、遺伝子変異、日本人の血栓症、血液凝固、線溶

#### 1. 研究開始当初の背景

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天性異常は血栓症のリスクとなるが、原因となる遺伝子変異は人種間で大きく異なる。白人では凝固第 V 因子 (FV) R506Q 変異 (マウスでは R504Q 変異) が血栓症の遺伝的背景となっており、変異を保有するモデルマウスも確立されているが、この変異は日本人には存在しない。当研究室では、日本人静脈血栓症患者の遺伝的背景として凝固制御因子プロテイン S (PS) の K196E 変異を同定した。静脈血栓症発症に対してオッズ比 3.7~8.6 を示す。本変異は日本人の約 55 人に 1 人に認められ、約 1 万人がホモ接合体であると推計される。PS は活性化プロテイン C (APC) の補酵素として、活性化 FV および活性化 VIII 因子の分解、不活性化を促進する。K196E 変異は、この不活性化を低下させるため、凝固亢進傾向をもたらすと考えられる。

また、日本人には線溶因子プラスミノゲン (PLG) の A620T 変異 (マウスでは A622T 変異) も広く存在し、当研究室にて一般住民を対象に行った検討でもアレル頻度 2% (約 25 人に 1 人がヘテロ接合体) と高頻度に認められた。全国で約 5 万人がホモ接合体であると推計される。PLG はフィブリン分解反応の鍵となる酵素プラスミンの前駆体であり、組織型やウロキナーゼ型 PLG 活性化因子により、プラスミンに変換され、血栓を溶解する。A620T 変異はプラスミン活性を著減させるため、変異保有者では血栓溶解能が低下する。現在まで、本変異と血栓症との関連は示され

ておらず、一次的なリスクとはならないと予想されるが、変異保有者は感染や外傷、手術等に引き続いて血栓症を発症する例があり、血栓形成を助長する要因が重なった場合には、血栓症が引き起こる可能性がある。

PS-K196E 変異および PLG-A620T 変異は、日本人に特有かつ高頻度な血栓性遺伝子変異であり、白人には見られない。このため、本邦で独自に両変異の影響を確立する必要が高いと考えた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、PS-K196E 変異および PLG-A622T 変異をもつ遺伝子改変マウスを作製し、日本人の血栓症の遺伝的特徴、特に欧米との違いを明確化し、これらのマウスを日本人に適した選択的抗血栓療法を開発する上での動物モデルとして確立することを目的とした。このため、肺塞栓 (静脈血栓症) モデルおよび脳虚血再灌流 (動脈血栓症) モデルを用いて PS-K196E および PLG-A622T マウスの応答を白人型血栓症モデルである FV-R504Q マウスと比較解析した。

#### 3. 研究の方法

##### (1) 遺伝子改変マウスの作製

*Pros1* 遺伝子のエキソン 6 に一塩基置換 c.586A>G を導入したターゲティングベクターを用いて PS-K196E 変異マウスを、*Pros1* 遺伝子のエキソン 3 を欠失させるベクターを用いて PS 欠損マウスを、*Plg* 遺伝子のエキソン

15に一塩基置換 c. 1864G>A を導入したベクターを用いて PLG-A622T 変異マウスを、それぞれ作製した。FV-R504Q 変異マウスはジャクソン研究所から購入した。

動物実験は国立循環器病研究センター動物実験委員会の承認を得て実施した。

#### (2) 血漿 PS 抗原量・PS 補酵素活性測定

野生型マウス、PS-K196E 変異ヘテロ接合体 (PS<sup>+/-</sup>) マウス、ホモ接合体 (PS<sup>E/E</sup>) マウス、PS 欠損ヘテロ接合体 (PS<sup>+/-</sup>) マウスから全採血後、1000×g、10 分間遠心分離して血漿を回収した。血漿 PS 抗原量は、抗ヒト PS ポリクローナル抗体を用いた ELISA により測定した。また、マウス血漿に組換え体マウス APC を添加して 37°C、1 分間反応後、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬を加えて凝固時間を測定し、APC 添加による凝固時間延長を指標に PS 補酵素活性を算出した。

#### (3) 血漿 PLG 抗原量・PLG 活性測定

野生型マウスおよび PLG-A622T 変異ホモ接合体 (PLG<sup>T/T</sup>) マウス血漿の PLG 抗原量を Mouse Plasminogen Total Antigen EIA Kit (Oxford Biomedical Research) を用いて測定した。また、血漿に 0.1N 塩酸を加えて酸性化後、等量の 0.1N NaOH で中和した。この血漿にヒトウロキナーゼを添加して PLG をプラスミンに活性化した後、合成基質 (S-2403) 切断活性を血漿 PLG 活性として測定した。

#### (4) 組織因子誘発 (N=17) およびポリリン酸誘発 (N=16) 肺塞栓モデル

マウスに外因系凝固を活性化する組織因子あるいは、内在性の内因系凝固促進物質である長鎖無機ポリリン酸を下大静脈から投与することで肺塞栓を誘発し、呼吸停止までの時間を 20 分間測定して生存率を調べた。また、呼吸停止 2 分後 (生存個体は肺塞栓誘発 20 分後) に右心室から青色色素 Evans blue を注入し、肺全体の染色像から 5 段階の肺血管閉塞スコアを判定した。

#### (5) 局所脳虚血再灌流モデル (N=10-12)

イソフルレン麻酔下、マウスの頭蓋骨にドリルで穴を開け、左中脳動脈 M1 末端部を電気焼灼して閉塞した。両側総頸動脈を血管クリップで一過性に閉塞することで、左中大

脳動脈支配領域に局所虚血を誘導し、15 分後にクリップを外して再灌流させた。虚血負荷 24 時間後に神経学的スコアの判定を行った後、脳を摘出してトリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) による生細胞染色を用いて脳梗塞単体積、浮腫率を判定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PS-K196E 変異マウス・PS 欠損マウス

PS-K196E 変異マウスは PS<sup>+/-</sup>、PS<sup>E/E</sup> マウス共に正常に誕生し、繁殖能力も維持していた。少なくとも通常の SPF 飼育条件下では、野生型マウスと見かけ上の差異は見られなかった。一方、PS 欠損のホモ接合体マウスは既報と同様に胎生致死であり、PS<sup>+/-</sup>マウスのみ正常に誕生した。

##### ① 血漿 PS 抗原量・PS 補酵素活性

血漿 PS 抗原量は、PS<sup>+/-</sup>マウスでは野生型マウスの約 50% に低下していたが、PS<sup>+/-</sup>および PS<sup>E/E</sup> マウスの抗原量は正常であった。ヒトと同様にマウスにおいても PS-K196E 変異は PS 発現量には影響せず、正常に分泌されると考えられる。一方、血漿 PS 補酵素活性は 3 系統の PS 遺伝子改変マウスでいずれも野生型マウスに比べて低下した。PS<sup>+/-</sup>マウスの活性は抗原量と同様に野生型マウスの約 50% であった。PS<sup>E/E</sup> マウスでは野生型マウスの約 60%、PS<sup>+/-</sup>マウスでは約 80% に低下しており、PS-K196E 変異体では補酵素活性が部分的に損なわれることが明らかとなった。

##### ② 組織因子およびポリリン酸誘発肺塞栓モデル

組織因子投与および無機ポリリン酸投与により、肺塞栓を誘発後の生存率は、PS<sup>+/-</sup>、PS<sup>E/E</sup>、PS<sup>+/-</sup>マウスで、FV-R504Q 変異ホモ接合体 (FV<sup>Q/Q</sup>) マウスと同様に、野生型マウスに比べて低下した。これら 4 系統の遺伝子変異マウスでは、肺血管閉塞スコアも野生型マウスに比べて上昇しており、肺塞栓症状の重症化が認められた。以上の結果から、PS-K196E 変異は PS ヘテロ欠損や FV-R504Q 変異と同様に、マウス静脈血栓症の増悪要因となることが明らかとなった。

##### ③ 局所脳虚血再灌流モデル

三血管閉塞法による局所脳虚血再灌流障害モデル実験の結果、虚血負荷 24 時間後の脳梗塞単体積は、PS<sup>+E</sup>、PS<sup>E/E</sup> および PS<sup>+/-</sup> マウスの何れにおいても野生型マウスと違いは認められなかった。脳浮腫率および神経学的スコアも 3 系統の PS 遺伝子改変マウスと野生型マウスで違いは無かった。一方、同じ脳虚血再灌流障害モデルを用いて FV-R504Q 変異マウスを解析した場合、FV<sup>Q/Q</sup> マウスだけでなくヘテロ接合体マウスでも、野生型マウスと比べて著明な脳梗塞症状の悪化が認められた。FV-R506Q 変異は白人の若年性脳梗塞のリスク要因として報告されているが、PS-K196E 変異と脳梗塞との関連を示す報告はない。PS-K196E マウスはこれと矛盾しない表現型を呈しており、日本人型血栓症の治療応答性を解析するための優れた動物モデルであることが確認できた。

## (2) PLG-A622T 変異マウス

PLG-A622T マウスはヘテロ、ホモ接合体ともに正常に出生し、発育や生殖能力にも異常は見られなかった。

### ① 血漿 PLG 抗原量・PLG 活性

血漿 PLG 抗原量は、PLG<sup>T/T</sup> マウスで野生型マウスの約 50% に低下した。また、PLG<sup>T/T</sup> マウスの血漿 PLG 活性は、野生型マウスの約 8% に低下しており、PLG-A622T 変異が著明な線溶活性低下をもたらすことが明らかとなった。PLG 欠損マウスでは、成長遅延や寿命の短縮、生殖能の低下などの異常が報告されているが、PLG<sup>T/T</sup> マウスにこうした異常は見られなかったことから、本変異による線溶活性低下は胚発生および個体の成育上の問題とはならないと考えられた。

### ② 肺塞栓誘発モデルおよび局所脳虚血再灌流モデル

肺塞栓誘発モデル実験の結果、PS-K196E 変異マウスとは異なり、PLG<sup>T/T</sup> マウスの症状には野生型マウスとの差違は見られなかった。局所脳虚血再灌流後の脳梗塞症状も PLG<sup>T/T</sup> マウスで悪化は認められなかったことから、PLG-A620T 変異はこれらの血栓症の主病因とはならないと考えられる。しかし、他の血栓性素因と PLG-A620T 変異が重なることで症状を修飾する可能性が残っており、事実、本変

異と PS-K196E を有する重症静脈血栓症患者が存在する(未発表データ)。今後、PLG-A622T と PS-K196E の二重変異マウスの解析などを通じて、PLG-A622T 変異が PS-K196E 変異による血栓傾向を助長するか否か確認する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M, ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction, *Thromb Haemost*, 査読有, 108, 1236-1238, 2012 (DOI: 10.1160/TH12-09-0674) .
- ② Fujioka M, Nakano T, Hayakawa K, Irie K, Akitake Y, Sakamoto Y, Mishima K, Muroi C, Yonekawa Y, Banno F, Kokame K, Miyata T, Nishio K, Okuchi K, Iwasaki K, Fujiwara M, Siesjö BK, ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury, *Neurol Sci*, 査読有, 33, 1107-1115, 2012 (DOI: 10.1007/s10072-011-0913-9) .
- ③ 宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 坂野史明, 中山大輔, 武田壮一, ADAMTS13 研究の最先端, *臨床血液*, 査読有, 53, 672-679, 2012 (DOI: 10.11406/rinketsu.53.672) .
- ④ Kita T, Banno F, Yanamoto H, Nakajo Y, Iihara K, Miyata T, Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation, *J Thromb Haemost*, 査読有, 10, 1453-1455, 2012 (DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04776.x) .
- ⑤ Banno F, Nojiri T, Matsumoto S, Kamide K, Miyata T, RGS2 deficiency in mice does not affect platelet thrombus formation at sites of vascular injury, *J Thromb Haemost*, 査読有, 10, 309-311, 2012 (DOI:

- 10.1111/j.1538-7836.2011.04575.x) .
- ⑥ Rybaltowski M, Suzuki Y, Mogami H, Chlebinska I, Brzoska T, Tanaka A, Banno F, Miyata T, Urano T, In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall, *Pflugers Archiv*, 査読有, 461, 623-633, 2011 (DOI: 10.1007/s00424-011-0958-x) .
- ⑦ Matsumoto S, Kamide K, Banno F, Inoue N, Mochizuki N, Kawano Y, Miyata T, Impact of RGS2 deficiency on therapeutic effect of telmisartan in angiotensin II-induced aortic aneurysm, *Hypertens Res*, 査読有, 33, 1244-1249, 2011 (DOI: 10.1038/hr.2010.184) .
- ⑧ 浦野哲盟, 鈴木優子, 最上秀夫, 坂野史明, GFP 強発現 ADAMTS13 遺伝子欠損マウスの生体内イメージング解析, 血栓と循環, 査読無, 18, 92-95, 2010 (<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ailksjkb/2010/001802/001&name=0092-0095j>) .
- ⑨ 坂野史明, 小亀浩市, ADAMTS13 の C 末端ドメイン欠損マウス, 血栓と循環, 査読無, 18, 4-7, 2010 (<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ailksjkb/2010/001801/001&name=0004-0007j>) .
- ⑩ Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, Kunizawa A, Irie K, Higuchi S, Nakano T, Muroi C, Fukushima H, Sugimoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujiwara M, Okuchi K, Nishio K, ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: A possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating post-ischemic hypoperfusion, *Blood*, 査読有, 115, 1650-1653, 2010 (DOI: 10.1182/blood-2009-06-230110) .
- ⑪ Banno F, Chauhan AK, Miyata T, The function of ADAMTS13 in thrombogenesis in vivo: insights from mutant mice, *Int J Hematol*, 査読有, 91, 30-35, 2010 (DOI: 10.1007/s12185-009-0477-0) .

[学会発表] (計 14 件)

- ① 坂野史明, 喜多俊行, 柳本広二, 小亀浩

市, 宮田敏行, 日本人の遺伝的血栓性リスクを有するモデルマウスの作製と解析, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, 2012 年 12 月 16 日.

- ② Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M, Protective role of ADAMTS13 for myocardium in mouse model of experimental myocardial infarction, 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Georgia World Congress Center, USA, 2012 年 12 月 9 日.
- ③ Matsui H, Doi M, Matsunari Y, Takeda M, Nishio K, Shima M, Soejima K, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M, ADAMTS13 improving the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation, 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Georgia World Congress Center, USA, 2012 年 12 月 8 日.
- ④ 坂野史明, 喜多俊行, 柳本広二, 小亀浩市, 宮田敏行, プロテイン S 徳島 (K196E) 変異がマウスの肺塞栓症および虚血性脳梗塞に及ぼす影響, 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都国際会館, 2012 年 10 月 20 日.
- ⑤ 宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志, 武田壮一, 坂野史明, ADAMTS13 研究の最先端, シンポジウム 6, 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋国際会議場, 2011 年 10 月 15 日.
- ⑥ 喜多俊行, 坂野史明, 中城有香子, 柳本広二, 飯原弘二, 宮田敏行, 血液凝固第 V 因子 Leiden 変異マウスの虚血性脳梗塞に対する脆弱性, 第 84 回日本生化学会大会, 京都国際会館, 2011 年 9 月 24 日.
- ⑦ Kita T, Banno F, Nakajo Y, Yanamoto H, Iihara K, Miyata T, Factor V Leiden mice are vulnerable for ischemic stroke, The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIII Congress, Kyoto International Conference Center, 28 July 2011.
- ⑧ Banno F, Kita T, Yanamoto H, Kokame K, Iihara K, Miyata T, Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S, The

International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIII Congress, Kyoto International Conference Center, 27 July 2011.

- ⑨ Banno F, Nojiri T, Matsumoto S, Kamide K, Mochizuki N, Miyata T, A lack of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in mice does not affect thrombus formation at sites of vascular injury, The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIII Congress, Kyoto International Conference Center, 27 July 2011.
- ⑩ Brzoska T, Rybaltowski M, Suzuki Y, Mogami H, Chlebinska I, Tanaka A, Banno F, Miyata T, Urano T, Imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals, The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIII Congress, Kyoto International Conference Center, 26 July 2011.
- ⑪ Banno F, Genetic mouse models for evaluating pathophysiological roles of ADAMTS13, 57th Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto International Conference Center, 23 July 2011.
- ⑫ 坂野史明, 野尻卓宏, 松本幸子, 神出計, 望月直樹, 宮田敏行, 血流下血栓形成における regulator of G protein signaling 2 (RGS2) の生理的意義, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 10 日.
- ⑬ Matsumoto S, Kamide K, Banno F, Inoue N, Mochizuki N, Kawano Y, Miyata T, The Impact of RGS2 deficiency on the therapeutic effect of telmisartan in angiotensin II-induced vascular remodeling, The 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Vancouver Convention Centre, Canada, 29 September 2010.
- ⑭ 坂野史明, 野尻卓宏, 松本幸子, 神出計, 宮田敏行, Rgs2 欠損マウスの血小板血栓形成能の解析, 第 33 回日本血栓止血学会

学術集会, 城山観光ホテル, 2010 年 4 月 24 日.

[図書] (計 1 件)

- ① 宮田敏行, 水口純, 坂野史明, 遺伝子改変血栓症モデル, 北徹, 堀内久徳, 柳田素子, 猪原匡史, 富本秀和, 並河徹編 疾患モデルの作製と利用-循環器疾患, エル・アイ・シー, 226-233, 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂野 史明 (BANNO FUMIAKI)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員  
研究者番号 : 00373514

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし