

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390250

研究課題名(和文)抗血栓性因子プロテインSとADAMTS13の研究を通じた血栓症と血管障害症の解明

研究課題名(英文)Thrombotic phenotypes of two antithrombotic factors, protein S and ADAMTS13

研究代表者

宮田 敏行(MIYATA, TOSHIYUKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：90183970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、プロテインS K196E(PS-K196E)変異特異的モノクローナル抗体を作製し、このモノクローナル抗体を用いてPS-K196E変異体の簡便な測定系を開発し、変異保有者の同定を行うシステムの開発に成功した。ADAMTS13遺伝子欠損マウスを用いて深部静脈血栓を検討したところ、遺伝子欠損マウスは野生型マウスより大きい血栓を示すことを明らかにした。TTP発症の類似疾患である非典型溶血性尿毒症症候群(atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS)患者の遺伝的背景を検討し、日本人aHUS患者に比較的広く見られる遺伝子変異を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We generated monoclonal antibodies to the protein S K196E mutant and developed a simple and reliable method for the identification of protein S K196E carriers. The novel method allowed identifying mutation carriers even under warfarin treatment or pregnancy. We found that ADAMTS13 deficiency promoted venous thrombus formation induced by the electrolytic stimulation in mouse model. We have performed the candidate gene analysis (C3, CFH, CFB, CFI, MCP, and THBD) in 46 patients with atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS. We identified C3 I1157T mutation in multiple aHUS families who are mainly localized in the Kansai area.

研究分野：血栓止血学

キーワード：静脈血栓症 凝固制御因子 ADAMTS13 血栓性血小板減少性紫斑病 フォンビルブランド因子 プロテインS

1. 研究開始当初の背景

プロテイン S は、活性化プロテイン C のコファクターとしての抗凝固作用に加え、細胞保護作用を示す多機能血漿タンパク質である。先天性プロテイン S 欠損症は静脈血栓塞栓症のリスクとして確立しているが、私達は日本人約 55 人に 1 人の割合でみられるプロテイン S K196E 変異が日本人の静脈血栓症の遺伝的リスク (オッズ比=4.72) であることを報告した (Kimura et al, Blood, 2006)。本変異は白人には存在しない。一方、動脈血栓症では、血小板凝集抑制因子の欠損症が血栓症の原因となる。血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は、先天性もしくは後天性にフォンビルブランド因子 (VWF) 切断酵素である ADAMTS13 の活性が著しく欠損し、血中に超巨大 VWF マルチマーが蓄積し、過度に血小板凝集が起こりやすい状態となり、微小血管内に血小板血栓が形成される病態である。TTP と非典型溶血性尿毒症症候群 (atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS) は臨床症状が似ているので、それらの鑑別診断は臨床で極めて重要であり、より精度の高い客観的な鑑別法が待たれている。

2. 研究の目的

本研究では、血栓症の遺伝的リスクであるプロテイン S K196E 変異体の簡便な測定系を開発する。欧米では、血栓性素因である factor V Leiden 変異が不育症の危険因子であると報告されている。日本人は factor V Leiden 変異を持たないが、PS K196E 変異を保有する。PS K196E 変異が不育症の危険因子であるかを検討する。血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は、ADAMTS13 の活性著減による超巨大フォンビルブランド因子 (VWF) マルチマーの血漿中の蓄積が原因で生じる。本研究では、ADAMTS13 欠損と静脈血栓症について、マウスモデルを用いて検討する。TTP 発症の類似疾患である aHUS との識別診断の基盤を確立するため、aHUS 患者の遺伝的背景を検討する。ADAMTS13 を構成するドメインの立体構造を明らかにする。本申請の目的は、私達がこれまで行ってきた抗血栓性因子、プロテイン S と ADAMTS13、の解析を進め、日本人の血栓症発症のメカニズムを解明し、それらを血栓症の予防・予知に資することにある。

3. 研究の方法

(1) プロテイン S K196E 変異体の研究

プロテイン S K196E 変異体の簡便な測定系の開発研究

プロテイン S K196E 変異体特異的単クローン抗体を作製し、これを用いて血漿中の変異体を定量する ELISA 系を構築した。高い親和性と特異性を持つ抗体ができやすい GANP マウスにヘモシアニンを共有結合した抗原ペプチド C¹⁸⁶KNGFVMLSNE¹⁹⁶ (下線で示す Glu 残基が変異部位) を 3 回免疫し、B 細胞を採取した。その後、ミエローマ細胞と融合させ、ハ

イブリドマを作製した。組み換えヒト PS 変異 EGF 様ドメイン 1-4 を HEK293S 細胞で発現精製し、これを用いて、1,672 クローンをスクリーニングし、変異 EGF 様ドメイン 1-4 に反応する 3 クローンを樹立した。このうち、変異型 PS に最も反応性が高いモノクローナル抗体を用いて、血中 PS-K196E 変異体を検出する ELISA を確立した。

不育症患者を対象としたプロテイン S K196E 変異の研究

私達は既に不育症患者に関して、プロテイン S、プロテイン C、アンチトロンビンの全エクソンの塩基再配列解析を行った。本研究では不育症と 3 種の凝固制御因子の遺伝子変異の関連を検討した。

(2) ADAMTS13 に関する研究

マウスモデルを用いた ADAMTS13 欠損と静脈血栓症の検討

私達が既に作製した ADAMTS13 欠損マウスに深部静脈血栓症モデルを応用し、野生型マウスとの血栓量を比較することにより ADAMTS13 欠損と静脈血栓の関連を検討した。深部静脈血栓症モデルとして、マウス下大静脈にステンレス電極を挿入通電し、電極の電気分解の結果生じるフリーラジカルにより、血管内皮細胞が活性化し、血栓形成が誘発されるモデルを用いた。生じる血栓が最大となる処置 2 日目に下大静脈内血栓を取り出し、その重量を測定した。

TTP 発症の類似疾患である aHUS 患者の遺伝的背景に関する検討

「奈良医大血栓性微小血管障害症 (TMA) コホート研究」での aHUS 診断は、日本の aHUS 診断基準にしたがって古典的 3 徴候 (溶血性貧血、血小板減少、腎障害) を示し、かつ ADAMTS13 活性著減の TTP と志賀毒素関連の HUS を除外したものであるが、最近発表された英国 aHUS 診断基準も参考にし、感染や移植に伴う二次性 TMA は除外した。欧米の研究では aHUS の約半数の症例に補体系の遺伝子変異が同定される。そこで、日本人 aHUS 患者の補体系因子 (C3, CFH, CB, CHI, MCP, TMBD) の遺伝子解析を行い、aHUS の遺伝的背景を明らかにした。

ADAMTS13 の結晶構造解析

ADAMTS13 の MDTCS 領域および ADAMTS13 の C 末端に位置する CUB ドメインの結晶構造解析を行うため、CHO 細胞を用いて組み換えタンパク質を大量に調製した。また、単クローン抗体の Fab 断片との複合体の結晶化を進めた。

4. 研究成果

(1) プロテイン S K196E 変異体の研究

プロテイン S K196E 変異体の簡便な測定系の開発研究

プロテイン S K196E 変異体の特異的に認識

する単クローン抗体を作製した。すなわち、単クローン抗体をスクリーニングし、野生型 Lys 残基を含むペプチドには反応しない変異 Glu 残基特異的単クローン抗体 3 種を見いだした。次いで、血漿中のプロテイン S K196E 変異体の簡便な測定系を確立するため、変異特異的単クローン抗体を用いたサンドイッチ ELISA 系を構築した。

この ELISA を用いて、遺伝型同定済みの 33 検体（非保有者 25 名、保有者 8 名）を測定した。非保有者の吸光度はすべて 0.1 未満であったが、変異保有者の吸光度は 0.3-1.0 と明らかに高い値を示し、全ての検体で変異を同定できた。ワルファリン加療中の変異保有者や妊娠中の変異保有者（各 1 人）も 0.3-0.4 の吸光度を示し、非保有者と明確に識別が可能であった。本測定法は、ワルファリンや妊娠などの付加的要因により正確な PS 活性値が得られないような場合でも K196E 変異保有の有無を診断可能であることが示された。また、わずか血漿 5 μ L で簡便に変異が同定でき、本邦における血栓症診療に大いに有用であると考えられた。本測定法の知的所有権を申請した。

不育症患者を対象としたプロテイン S K196E 変異の研究

私達は不育症患者 330 人のうち、6 人に PS K196E 変異を同定した。その頻度は 1.8%（6/330）であり、地域一般住民を対象に求められていた頻度（1.8%）と有意差を見いださなかった。不育症症例 330 人のうち 11 人（3.3%）に PS K196E 変異以外の AT、PS、PC のまれなミスセンス変異などを認めた。まれな変異は不育症症例の 3.3%にしか認めないため、不育症の主な原因とはなりにくいと考えた。

（2）ADAMTS13 に関する研究

マウスモデルを用いた ADAMTS13 欠損と静脈血栓症の検討

ADAMTS13 遺伝子欠損マウスに電気刺激誘発深部静脈血栓症モデルを応用したところ、野生型マウスに比べて、有意に大きい血栓を形成した。ADAMTS13 遺伝子欠損マウスに組み換え ADAMTS13 を静注したところ、野生型マウスの血栓量にまで減少した。ADAMTS13 遺伝子欠損マウスは、TTP だけでなく静脈血栓を形成しやすいことが明らかになった。

TTP 発症の類似疾患である aHUS 患者の遺伝的背景の検討

aHUS 患者 45 人の補体関連遺伝子（C3, CFH, CB, CHI, MCP, TMBD）の遺伝子解析を行った。その結果、C3-I1157T 変異が 19 人に同定され、欧米人での結果と大きく異なることが明らかになった。欧米人では 25%程度に見られる CFH 変異は 7%の患者にしか同定しなかった。

ADAMTS13 の結晶構造解析

ADAMTS13 の触媒ドメイン(M)を含む MDTSC 領域および ADAMTS13 の C 末端に位置する CUB ドメインを CHO 細胞を用いて発現させ精製し、結晶化条件を詳細に検討した。しかし、立体構造解析に適した回折データを得ることができる結晶はできなかった。単クローン抗体の Fab 断片との複合体も X 線回折に適した結晶を得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 3 件)

Tashima Y, Banno F, Akiyama M, Miyata T: Influence of ADAMTS13 deficiency on venous thrombosis in mice. *Thromb Haemost*, 2015 July issue, in press. 査読有.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855507>

Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirotani-Ikejima H, Uchida Y, Ohyama Y, Kokubo T, Fujimura Y: A Novel Quantitative Hemolytic Assay Coupled with Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis Enabled Early Diagnosis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Identified Unique Predisposing Mutations in Japan. *PLoS ONE*, 10(5), e0124655, 2015 May. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0124655.

Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Mol Genet Genomic Med*, 2(3), 240-244, 2014 May. 査読有.
DOI: 10.1002/mgg3.64

Akiyama M, Nakayama D, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T: Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS-13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism. *J Thromb Haemost*, 11(7), 1399-1406, 2013 July. 査読有.
DOI: 10.1111/jth.12279.

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*, 10(7), 1453-1455, 2012 July. 査読有.
DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04776.x.

〔学会発表〕(計 9 7 件)

Toshiyuki Miyata, “Thrombotic

thrombocytopenic purpura and ADAMTS13 ” ,
2014 Suzhou International Symposium on
Basic and Translational Vascular Research,
October 11-13, 2014, Suzhou, China

宮田敏行、内田裕美子、吉田瑤子、池島裕子、Fan Xinping、芦田明、和田英夫、大塚泰史、中村健治、石川智朗、八田和大、服部元史、久野正貴、才田謙、西尾健治、瀧本智仁、幡谷浩史、大原敦子、川村尚久、波多江健、松本雅則、加藤秀樹、南学正臣、藤村吉博、「日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者 41 人の遺伝子解析」第 51 回補体シンポジウム、2014 年 8 月 22-23 日、神戸常盤大学、兵庫県、神戸市

宮田敏行、プロテイン S 研究会シンポジウム、APC 凝固制御異常と血栓性素因、「プロテイン S 徳島は日本人に特有の変異なのか？」第 36 回日本血栓止血学会学術集会、2014 年 5 月 30 日、大阪国際交流センター、大阪府、大阪市

宮田敏行、シンポジウム「TTP と HUS (総会長シンポジウム) 」、「TTP/HUS の遺伝子解析」第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、2014 年 5 月 16 日、奈良県新公会堂、奈良県、奈良市

Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Symposium 2, Thrombosis, leukocytes and vascular cells, Registry of hereditary thrombotic microangiopathies in Japan, The 18th International Vascular Biology Meeting, April 14-17, 2014, 都メッセ、京都府、京都市

〔図書〕(計 3 件)

宮田敏行 他、中山書店、よくわかる血栓・止血異常の診療、2014、297 (4-13)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：プロテイン S K196E 変異検出法
発明者：宮田敏行、秋山正志、丸山慶子、森下英理子
権利者：国立循環器病研究センター、栄研化学株式会社、金沢大学
種類：特許
番号：特願 2014-194080
出願年月日：2014 年 9 月 24 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 敏行 (MIYATA TOSHIYUKI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・
研究所・部長
研究者番号：90183970

(2) 研究分担者

小亀 浩市 (KOKAME KOICHI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・
研究所・室長
研究者番号：40270730

秋山 正志 (AKIYAMA MASASHI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・
研究所・室長
研究者番号：30298179

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：