

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860801

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたプラスミノゲン栃木変異と血栓症の検討

研究課題名(英文) Generation and characterization of homozygous plasminogen-Tochigi mutant mice bearing reduced fibrinolytic activity

研究代表者

田島 優子 (Tashima, Yuko)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10423104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本人の静脈血栓症患者に同定された線溶因子プラスミノゲン栃木変異(A620T変異)に相当するプラスミノゲン-A622T変異のホモ接合体マウスを用いて、本変異と血栓性リスクについて解析した。本変異マウスは、線溶能低下を引き起こしたが、皮膚創傷治癒過程の組織線溶能は低下しなかった。また、局所脳虚血再還流モデル実験、組織因子静注による急性肺塞栓誘発モデル実験及び電気刺激誘発深部静脈血栓症モデル実験では、本変異による動静脈内での血栓形成の亢進は認められなかった。日本人に高頻度に見られる本変異は、線溶能を低下させるが、単独の変異では動静脈血栓塞栓症の増悪要因とはならないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Plasminogen (Plg) is a precursor of a serine protease, plasmin to degrade fibrin fiber in blood clot. Plg-A620T mutation previously named as Plg-Tochigi was identified in Japanese patients with deep venous thrombosis. We investigated whether the homozygous Plg-A622T mutation corresponding to human Plg-Tochigi caused serious thrombosis in mice. Compared to wild-type mice, Plg-A620T mice showed the lower activity of plasmin, but did not affect wound healing unlike Plg-KO mice. Plg-Tochigi mutation did not significantly affect the severity of thrombogenesis under three different experimental thrombosis models: a middle cerebral artery occlusion model of ischemia-reperfusion injury, acute pulmonary embolism model by injection of recombinant human tissue factor via inferior vena cava, and inferior vena cava thrombosis model with electrolytic stimulation. In conclusion, homozygous Plg-Tochigi mutation showed reduced enzymatic activity of plasmin but did not cause severe thrombosis in mice.

研究分野：生化学

キーワード：プラスミノゲン 線溶 静脈血栓症 肺塞栓 プラスミノゲン栃木変異

1. 研究開始当初の背景

血栓は、血流の停滞や血管壁の損傷により、凝固因子の活性亢進と線溶因子の活性抑制とを伴って生み出され、フィブリン塊や血小板などから構成される。血管内に病的にできた血栓を除くには、凝固因子の活性抑制や線溶因子の働きが重要になる。血液中の線溶因子プラスミノゲンは、酵素プラスミンの前駆体で、血栓の主成分であるフィブリン塊の分解反応に必須である。プラスミノゲン栃木変異 (A620T 変異) を持つ静脈血栓症患者は、1978 年に自治医科大学の青木延雄先生、坂田洋一先生が世界に先駆けて報告した。その後、この患者から異常プラスミノゲンが精製されて、その酵素学的性状が明らかにされ、次いでアミノ酸変異が同定された。本異常症は、活性中心残基 His622 近傍の Ala620 が Thr に変異することで、プラスミン活性が著減し、プラスミノゲン活性の低下により静脈血栓症に繋がると考えられた。

プラスミノゲン栃木変異は、東アジア人に特異的に見つかるが、白人には見られない。日本人の約 25 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であり、全国で約 5 万人がホモ接合体であると推計される。ヘテロ接合体は、静脈血栓症発症と統計学的に有意な関連を示さないが、ホモ接合体に関しては不明である。本変異と血栓症との関連は解明されていないが、変異保有者では感染や外傷、手術等に引き続いて血栓症を発症する例があり、潜在的な血栓性リスクとなっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

プラスミノゲンは、約 90kDa の分泌型蛋白質で、肝臓で合成され、血液中に豊富に存在する。プラスミノゲンは、フィブリン分解反応を担う酵素プラスミンの前駆体である。プラスミノゲン栃木変異 (A620T 変異) はこの活性を著減させるため、変異保有者では血栓溶解能が持続的に低下する。本研究では、ヒト A620T 変異に相当する変異をもつプラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスの解析を通じて、プラスミノゲン栃木ホモ変異の性質を明らかにし、日本人の血栓性疾患におけるプラスミノゲン栃木変異 (A620T 変異) の位置づけを明確にすることを目的とした。

(1) 当研究室では、すでにプラスミノゲン栃木変異 (A620T 変異) に相当するプラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスを作製している。本変異マウスは、個体発生と成長過程に異常は観察されない。血漿プラスミノゲン活性は、野生型マウスと比べ、本変異ホモマウスでは約 25%まで低下している。さらに、本変異マウスの血栓性表現系を解析し、明らかにする。

(2) プラスミノゲン-A622T 変異と別の血栓

性遺伝子変異との二重変異マウスを作製し、プラスミノゲン栃木変異の血栓症状に対する相乗効果を調べる。プラスミノゲン-A622T 変異と凝固制御因子プロテイン S 徳島変異 (K196E) との二重変異マウスを作製し、プラスミノゲン栃木変異が血栓症状の修飾因子となるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

野生型 C57BL/6J マウスと、C57BL/6J の遺伝的背景をもつ、当研究室で作製したプラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスを解析に用いた。

(1) プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスの血液性状の解析

トリプロモエタノール麻酔下、マウスの心臓よりクエン酸採血した後、遠心分離で得られた血漿を測定に用いた。マウス血漿中のプラスミン活性は、血漿をヒトウロキナーゼと反応させてプラスミンに変換した後、基質と 37 で 20 分間反応させて測定した。変異型プラスミノゲンの分子量とウロキナーゼによるプラスミンへの変換反応の進行をウエスタンブロットで確認した。プラスミノゲン抗原量は、ELISA 法でも測定した。また、Total RNA を肝臓より抽出し、定量 RT-PCR 法により、プラスミノゲン mRNA 発現量を本変異マウスと野生型マウスとで比較した。

(2) 血漿フィブリン塊溶解活性の測定

マウス血漿とヒト組織型プラスミノゲンアクチベーターを室温で 30 分間反応させて、プラスミノゲンをプラスミンに変換した。続けて、トロンピンと塩化カルシウムを加えてフィブリン形成を開始させ、波長 405 nm の吸光度を 5 分ごとに測定した。吸光度は、最初に、不溶性フィブリン塊の形成により急上昇し、プラスミンによるフィブリン塊の分解が進むにつれてゆっくり低下した。本変異マウスの血漿と野生型マウスの血漿を用いて、波長 405 nm の吸光度の低下割合を比較した。また、この吸光度変化は、プラスミン阻害薬 α_2 -アンチプラスミンで阻害されたことから、プラスミン活性を検出していることを確認した。

(3) 急性肺塞栓誘発モデル実験による静脈血栓症の解析

トリプロモエタノール麻酔下、マウスの下大静脈に凝固反応を活性化する組織因子を直接投与し、肺塞栓を誘発した。約 20 分間マウスを観察して、呼吸停止までの時間を記録した。20 分後又は呼吸停止 2 分後に、右心室から Evans blue を注入して肺を染色した。肺血管の血栓のつまり具合は、肺染色の程度から、5 段階評価の肺血管閉塞スコアで判定した。スコア 0 を閉塞なし、スコア 4 を完全閉塞とした。このモデル実験では、急速に生じた血栓が血流に乗って即座に肺に到達す

るため、致命的な血栓症について検討できる。

(4) 電気刺激誘発深部静脈血栓症モデル 実験による血栓形成能の比較

トリプロモエタノール麻酔下、マウス下大静脈にステンレス製電極を挿入して 250 μ A で 15 分間通電した。電極の電気分解で生じるフリーラジカルが血管内皮細胞を活性化し、血栓形成が誘導される。電気刺激後、縫合して飼育を続けた。生じる血栓が最大となる処置後 2 日目に血栓重量および末梢血血小板数を測定した。また、血栓の退縮、溶解に対する本変異の影響を解析するため、処置後 7 日目のマウスについても同様の解析を行った。このモデル実験では、血流を止めず、かつ、処置後 1-2 日かけてゆっくりと血栓が形成されるため、実際のヒトの静脈血栓症状に近い状態を解析できる。

(5) 皮膚創傷治癒モデル実験による組織線溶解能の検討

プラスミノゲン欠損マウスでは、創傷治癒が遅延すると報告がある。イソフルアンの麻酔下、直径 5 mm の切り傷をマウスの背中につけた。治癒するまで 2 日おきに観察し、傷口の大きさを測定した。

(6) 凝固制御因子プロテイン S 徳島変異 (K196E) とプラスミノゲン-A622T 変異の二重変異マウスの解析

プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスと凝固制御因子のプロテイン S-徳島変異 (K196E) または欠損マウスを交配させ、二重変異マウスを作製した。プロテイン S の徳島変異は、プロテイン S の活性低下を引き起こす。プロテイン S 徳島変異は、主に日本人の患者で広く検出され、静脈血栓症の先天的リスク要因として同定されている。この二重変異マウスの血栓傾向を解析することで、日本人の血栓形成能に両変異が相加相乗的に関与しているか否かを検証した。

4. 研究成果

(1) プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスの血漿プラスミン活性は、野生型マウスのおよそ 8% にまで低下していた。プラスミノゲン抗原量は、ELISA 法では野生型マウスの約 50% に低下していたが、ウエスタンブロットでは、発現量に大きな差を検出しなかった。プラスミノゲン A622T 変異は、野生型と同様に、ヒトウロキナーゼによりプラスミンに変換されることをウエスタンブロットで、その分子量の変化により確認した。定量 RT-PCR 法で肝臓のプラスミノゲン mRNA 発現量を比較したところ、本変異マウスの mRNA 発現量は (n=10) は野生型マウス (n=10) の約 1.2 倍であった。以上より、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスでは、野生型マウスに比べて、顕著に活性が低下していることがわかった。

(2) 血漿フィブリン塊溶解活性は、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスの血漿 (8 匹の混合血漿) では、野生型マウス (8 匹の混合血漿) と比較して、フィブリン塊溶解時間が延長し、約二倍の時間を要した。プラスミノゲン-A622T 変異は、血漿フィブリン塊溶解活性を低下させた。

(3) 急性肺塞栓モデル実験では、組織因子投与後の生存率は、野生型マウス (n = 18) で 83%、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウス (n = 20) で 80% であった。肺血管閉塞スコアは、野生型マウスで 1.86 ± 1.47 、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 2.25 ± 1.60 であった。生存率も肺血管閉塞スコアも、両群間に有意差は見られなかった。したがって、プラスミノゲン栃木変異 (A620T 変異) は肺塞栓状態悪化の原因とはならないと考えられた。

(4) 電気刺激誘発深部静脈血栓症モデル実験において、処置後 2 日目の血栓重量 (平均値 \pm 標準偏差, n = 10) は、野生型マウスで 8.2 ± 5.4 g、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 10.0 ± 6.4 g であり、両群間に有意差は認められなかった。血小板減少の程度も両群間で差は検出されなかった。プラスミノゲン栃木変異 (A620T 変異) は、深部静脈血栓症の増悪要因ではないと考えられた。また、処置後 7 日目の血栓重量 (n=5) も野生型マウスで 5.4 ± 3.5 g、プラスミノゲン-A622T 変異ホモ接合体マウスで 5.4 ± 4.6 g と有意差は検出されなかった。プラスミノゲン-A622T 変異による血栓退縮の遅延も認められなかった。

(5) 皮膚創傷治癒モデル実験では、プラスミノゲン-A622T 変異マウスは、野生型マウスと同様に、傷口は 6 日目で約半分の大きさとなり、14 日目に完治した。プラスミノゲン-A622T 変異は、プラスミノゲン欠損マウスと異なり、皮膚創傷治癒を遅延しなかった。したがって、プラスミノゲン-A622T 変異は、プラスミンの組織線溶解能に影響しなかった。

(6) 凝固制御因子プロテイン S とプラスミノゲン-A622T 変異の二重変異マウスは、生殖能力は正常で、発育異常は認められなかった。この二重変異マウスを用いた急性肺塞栓モデル実験では、生存率も肺塞栓スコアも相加相乗効果は認められなかった。

(7) 結論

以上の結果から、プラスミノゲン-A622T 変異は、線溶解能低下をもたらすもの、プラスミノゲン-A622T 変異マウスに深部静脈血栓症、肺塞栓、脳梗塞症状および創傷治癒の悪化は見られないことから、プラスミノゲン栃木変異 (A620T 変異) はこれらの疾患の一

次的なリスクとはならないことが明らかとなった。今後、他の血栓性素因と本変異が重なった場合の症状修飾作用のより詳しい検証が必要である。

<引用文献>

Nobuo Aoki, Masaaki Moroi, Yoichi Sakata, Nobuhiko Yoshida, Michio Matsuda: Abnormal Plasminogen. The Journal of Clinical Investigation. 61(5), 1978. 1186-1195.

Yoichi Sakata, Nobuo Aoki: Molecular Abnormality of Plasminogen. The Journal of Biological Chemistry. 255(11), 1980. 5442-5447.

Toshiyuki Miyata, Sadaaki Iwanaga, Yoichi Sakata, Nobuo Aoki: Plasminogen Tochigi: Inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. Proceedings of the National Academy of Sciences. 79(20), 1982, 6132-6136.

Rina Kimura, Shigenori Honda, Tomio Kawasaki, Hajime Tsuji, Seiji Madoiwa, Yoichi Sakata, Tetsuhito Kojima, Mitsuru Murata, Kasuhiro Nishigami, Masaaki Chiku, Tokio Hayashi, Yoshihiro Kokubo, Akira Okayama, Hitonobu Tomoike, Yasuo Ikeda, Toshiyuki Miyata: Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. Blood. 107, 2006, 1737-1738.

Jose A. Diaz, Angela E. Hawley, Christine M. Alvarado, Alexandra M. Berguer, Nichole K. Baker, Shirley K. Wroblewski, Thomas W. Wakefield, Benedict R. Lucchesi, Daniel D. Myers, Jr: Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava: A novel mouse model. Thrombosis and Haemostasis. 104(2), 2010, 366-375.

John Romer, Thomas H. Bugge, Charles Pyke, Leif R. Lund, Matthew J. Flick, Jay L. Degen, Keld Dano: Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. Nature Medicine. 2(3), 1996, 287-292.

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 1 件)

Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Toshiyuki Miyata: Influence of ADAMTS13 deficiency on venous thrombosis in mice. Thrombosis and Haemostasis. 査

読あり. 114(1), 2015. in press

〔学会発表〕(計 7 件)

田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行: 日本人に高頻度に見られるプラスミノゲン栃木変異をもつ遺伝子改変マウスの血栓傾向の解析. 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 2014年8月8日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

田嶋優子, 坂野史明, 宮田敏行: ADAMTS13 遺伝子欠損マウスの静脈血栓塞栓症状の解析. 第36回日本血栓止血学会学術集会, 2014年5月29-31日, 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata: Generation and characterization of homozygous plasminogen-Tochigi mutant mice bearing reduced fibrinolytic activity. Gordon Research Conferences, Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, 2014年2月9-14日, Ventura (USA)

Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata: Generation and characterization of homozygous plasminogen-Tochigi mutant mice bearing reduced fibrinolytic activity. Gordon Research Seminar, Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, 2014年2月8-9日, Ventura (USA)

田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行: マウスプラスミノゲン栃木変異は血漿プラスミン活性を低下させるが血栓塞栓症の原因にはならない. 第86回日本生化学大会, 2013年9月13日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata: Generation and characterization of homozygous plasminogen-Tochigi mutant mice bearing reduced fibrinolytic activity. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2013年6月29日-7月4日, Amsterdam (Netherlands)

田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行: プラスミノゲン栃木変異ホモ接合体マウスの血栓傾向の解析. 第35回日本血栓止血学会学術集会, 山形国際ホテル(山形県山形市), 2013年5月30日-6月1日

〔図書〕(計 2 件)

田嶋優子, 木下タロウ. 金芳堂.
新・血栓止血学, 2 凝固反応, 2 部ショック・
敗血症と凝血・炎症系, 19. 凝固系と補体系
反応. 2015. 印刷中.

宮田敏行, 田嶋優子. 中山書店.
プリンシプル血液疾患の臨床, よくわかる
血栓・止血異常の診療, 第 1 章 血栓止血異
常症を理解するために, 凝固反応を理解す
る. 2014. 297(4-13).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田嶋 優子 (TASHIMA, Yuko)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号: 10423104

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: