

自己評価報告書

平成23年5月12日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20390278

研究課題名(和文) 抗血栓性因子の機能低下による血栓症発症の解明とその成果に基づく予防戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of prognosis for thrombotic diseases caused by antithrombotic dysfunction

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・分子病態部・部長

研究者番号：90183970

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：血栓症、凝固、血小板、遺伝子、マウスモデル

1. 研究計画の概要

血栓症は、凝固制御因子や血小板凝集抑制因子の機能低下がリスクとなる。私達は、血管内皮細胞が示すプロテインC抗凝固機構を構成する凝固制御因子プロテインS のK196E変異が、静脈血栓症の遺伝的リスクであることを報告した。一方、血小板凝集抑制因子の機能低下がリスクとなる血栓症として、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)がある。本疾患は、ADAMTS13の活性著減による超巨大フォンビルブランド因子(VWF)マルチマーの蓄積が原因となる。本研究では、血栓症発症におけるプロテインS K196E変異、およびTTPとその類縁疾患におけるADAMTS13に関して、基盤的研究および臨床研究を進め、日本人の血栓症発症のリスクを評価し、その成果に基づいて予防戦略を確立することを目的とする。

本研究で、私たちはプロテインS K196E変異を有するノックインマウスおよびプロテインS遺伝子ノックアウトマウスを作製した。また、妊娠出産時に静脈血栓症を発症した患者を対象に、プロテインS、プロテインC、アンチトロンビンの活性と遺伝子を解析し、プロテインS遺伝子変異が多いこと、K196E変異が素因となる例があることを明らかにした。

2. 研究の進捗状況

(1)プロテインS K196E変異を有するノックインマウスおよびプロテインS遺伝子ノックアウトマウスの作製に成功した。常法にしたがい、遺伝子ターゲティングベクターを作製し、それを用いてノックインマウスとノックアウトマウスを作製した。得られたノックインマウスはホモ接合体も出生し正常に成長したが、ノックアウトマウスのホモ接

合体は産まれず致死であった。プロテインS K196Eは日本人(東アジア人)に見られる遺伝子変異であり、これらの遺伝子改変マウスの表現型を解析することは、日本人の血栓症の理解に貢献するものと確信する。

(2)妊娠出産時に静脈血栓症を発症した18症例を収集し、遺伝子解析を行った。その結果、4名にプロテインS遺伝子変異を、1名にプロテインC遺伝子変異を同定した。なかでも2名はプロテインS K196E変異を保有していた。アンチトロンビン遺伝子には変異を見いださなかった。変異保有5名はいずれも妊娠初期に静脈血栓症を発症していた。これらの結果から、日本人妊婦の静脈血栓症には、プロテインS遺伝子変異保有者が多いことが判明した。また、遺伝子変異保有者は妊娠初期に静脈血栓症を発症することが判明した。凝固制御因子に遺伝子変異が見られると、妊娠時のプロテインS活性の低下による凝固亢進状態と重なり、妊娠初期に静脈血栓症が発症すると考えられた。

(3)TTP発症を修飾する因子の研究は、ADAMTS13に結合するLys-plasminogenの研究を進めている。両者の結合はin vitroで確認できている。血漿中での確認を進めている。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

「研究の進捗状況」で示した3つの項目の研究を進めている。なかでも、プロテインS遺伝子のK196E変異ノックインマウスと遺伝子欠損マウスの作製に成功したことが、本研究の最も大きな成果である。K196E変異は日本人の55人に1人が保有する活性低下を伴う変異であるため、この変異を保有するマウスの易血栓性の検討は、日本人の血栓症の

基盤的なデータを提供する。本変異は白人種には見られない。

4. 今後の研究の推進方策

プロテインS遺伝子のK196E変異ノックインマウスとプロテインS遺伝子欠損マウスに関して、バッククロスし遺伝背景を揃える作業が終了した。今後は、遺伝子改変マウスの活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、プロトロンビン時間 (PT)、活性型プロテインC (APC) 添加APTTを測定することにより遺伝子改変マウスの血液凝固能の性状を調べ、更に3血管閉塞法による脳虚血・再還流モデルや腹部大静脈結紮静脈血栓誘発モデルを用いて、マウス個体の易血栓性を検討する。また、周産期領域での血栓性疾患を対象に、プロテインS, プロテインC, アンチトロンビンの遺伝子異常を調べ、静脈血栓症以外の血栓性疾患におけるこれらの因子の寄与を検討する。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 31 件)

- ① M. Fujioka, K. Hayakawa, K. Mishima, A. Kunizawa, K. Irie, S. Higuchi, T. Nakano, C. Muroi, H. Fukushima, M. Sugimoto, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, M. Fujiwara, K. Okuchi, K. Nishio: ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood*, 115, 1650-1653, 2010. 査読有
- ② M. Akiyama, S. Takeda, K. Kokame, J. Takagi, T. Miyata: Crystal structures of the non-catalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 19274-19279, 2009. 査読有
- ③ S. Honda, H. Shirokane-Ikejima, S. Tadokoro, Y. Maeda, T. Kinoshita, Y. Tomiyama, T. Miyata: Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood*, 113, 5304-5313, 2009. 査読有
- ④ F. Banno, AK. Chauhan, K. Kokame, J. Yang, S. Miyata, DD. Wagner, T. Miyata: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood*, 113, 5323-5329, 2009. 査読有

[学会発表] (計 62 件)

- ① Toshiyuki MIYATA et al. Binding of ADAMTS13 with Lys-plasminogen. Invited Hot Topic Speaker, Gordon Research Conference, Hemostasis 2008. June 29-July 4, 2008, Waterville Valley Resort, USA

[図書] (計 29 件)

- ① 宮田敏行「血液凝固・線溶の制御因子と血栓形成」脈管専門医のための臨床脈管学、日本脈管学会 編、メディカルトリビューン、33-34 頁 (2010)
- ② 宮田敏行、水口 純、坂野史明「遺伝子改変血栓症モデル」疾患モデルの作製と利用-循環器疾患、北 徹・堀内久徳・柳田素子・猪原匡史・冨本秀和・並河 徹 編集、株式会社エル・アイ・シー、226-233 頁 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
なし