

令和元年5月21日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09834

研究課題名(和文)血栓性リスクとなるプロテインS K196E異常症に関する研究

研究課題名(英文)Studies on thrombotic risk of protein S K196E mutation

研究代表者

宮田 敏行(Miyata, Toshiyuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・非常勤研究員

研究者番号：90183970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PS K196E組換え体をCHO細胞で発現・精製し、その性質を検討した。PS K196E変異体は活性化プロテインCの補酵素活性が約40%低下していたが、組織因子経路インヒビターの補酵素活性は正常でありC4b結合蛋白質の結合も正常であった。脳静脈血栓を発症した患者にPS K196E変異を同定した。PS K196E変異は経口避妊薬内服患者394人中6人(1.5%)に同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達はプロテインS p.Lys196Glu (PS K196E) 変異は日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的リスク(性と年齢で調整したオッズ比4.72)であることを報告してきた。本変異はこれまで日本人にのみ見られ中国人や韓国人にも同定されていないので、本邦で研究を進める必要がある。PS K196E変異体は活性化プロテインCの補酵素活性が約40%低下するという今回の結果は、変異体保有者のPS抗凝固活性の低下を説明するものである。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that the mutation of protein S p.Lys196Glu (PS K196E) is a Japanese-specific genetic risk factor for venous thromboembolism. We expressed recombinant human protein S wild-type (PS-K) and K196E-mutant (PS-E) in CHO cells. PS-E had approximately 40% activated protein C cofactor activity compared with PS-K. The tissue factor pathway inhibitor cofactor activity of PS-E was equivalent to that of PS-K. The strengths of PS-E and PS-K binding to the beta-chain of C4b binding protein were comparable. Therefore, the PS K196E mutation increases the risk of venous thromboembolism because of reduced activated protein C cofactor activity. We identified a patient with cerebral venous thrombosis who had the PS K196E mutation. We identified 6 PS K196E carriers with combined oral contraceptive use.

研究分野：血栓止血学

キーワード：静脈血栓塞栓症 プロテインS 凝固制御因子 遺伝子変異 経口避妊薬 血栓性素因

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテイン S(PS)は、活性化プロテイン C(activated protein C, APC)および組織因子経路インヒビター(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)のコファクターとして働く抗凝固因子である。先天性 PS 欠損症は静脈血栓塞栓症(venous thromboembolism, VTE)の危険因子である。私達は VTE 患者を対象に関連解析を行い、PS K196E 変異(成熟 PS のアミノ酸番号を用いると PS K155E 変異、また PS 徳島変異とも呼ばれる)は、日本人の VTE の遺伝的リスク(性と年齢で調整したオッズ比 4.72)であることを報告した(Kimura et al, Blood, 2006)。本変異は 1993 年に名古屋大学および三重大学が報告した変異と同一であり、私達の報告は本変異の血栓症における重要性を再認識させることになった。これまで、PS K196E 変異体は APC コファクター活性が「ない」という報告と、48%の活性が「ある」という報告があり、PS K196E 変異による抗凝固活性低下のメカニズムは明らかになっていなかった。

私達のこれまでの一連の研究から、本遺伝子変異は日本人約 55 人に 1 人の頻度で存在し、全国で約 1 万人がホモ接合体であると推定された。ホモ接合体では抗凝固活性が 35-39%にまで低下するが、抗原量は正常であった。したがって、本症例は PS 異常症である。一般住民を対象にした研究では、本変異保有者の PS 抗凝固活性は、野生型保有者よりわずか 16%しか低下していなかった(Kimura et al, J Thromb Haemost, 2007)。VTE を発症した本変異保有者にはプロテイン C 遺伝子変異を持つ患者も見られ、2 つの凝固制御因子に遺伝子変異を持つことで VTE のリスクが高まる複数の例が見られた(Miyata et al, Thromb Res, 2009)。しかし、本変異は不育症のリスクにならなかった(Neki et al, Int J Hematol, 2013)。本変異は白人種には見られず、中国人と韓国人にも見られない。私達は PS K196E 変異マウスを作製した。本遺伝子改変マウスは明らかに高い血栓形成能を示した(Banno et al, Blood, 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、PS K196E 変異による抗凝固活性低下のメカニズムの解明を行う。先天性凝固制御因子欠乏症が低用量経口避妊薬内服でまれに見られる血栓症のリスクになるかどうかを検討する。これらの研究を通して、PS K196E 変異の VTE 発症への寄与や PS 欠乏症の疾患との関わりを明らかにし、日本人の血栓症発症の予防戦略の確立に資する。日本人に特有の血栓性変異であるため、本邦で研究を行う必要がある。

3. 研究の方法

血栓性素因としての PS K196E 変異の、より正確な VTE リスクの評価、および抗凝固活性低下のメカニズムを解明するため、組み換え PS K196E 変異体を CHO 細胞で発現・精製した。低用量経口避妊薬の重篤な副作用である VTE に、先天性凝固制御因子欠乏症が関わるかどうかを明らかにするため、経口避妊薬内服者を対象に血栓症発症を調査するとともに PS K196E 変異保因者の同定を行った。稀な部位に静脈血栓症を発症した患者を対象に PS K196E 変異の有無を調査した。

4. 研究成果

PS K196E 変異体の酵素学的性状を解析した。PS K196E 変異体は APC の補酵素活性が約 40%低下していたが、TFPI が第 Xa 因子を阻害する際の補酵素活性は正常であり、C4b binding protein の結合も正常であった。私達は以前 1,862 人の血漿 PS 抗凝固活性を測定し、34 人のヘテロ接合体を同定した。これらのヘテロ接合体の PS 抗凝固活性は野生型より平均 16%低下していた(Kimura et al, J Thromb Haemost, 2006)。PS K196E 変異体の抗凝固活性が約 40%低下することは、ヘテロ接合体は平均 16%の抗凝固活性の低下を示すことと良く一致した。脳静脈血栓を発症した患者 1 名に PS K196E 変異を同定した。

PS K196E 変異は新規の経口避妊薬内服予定者 394 人の中で 6 人(1.5%)に同定された。そのうち 335 名が内服後 4 週間フォローアップされ 3 名に血栓が見られたが、いずれも PS K196E 変異を保有していなかった。変異保有者数が少なかったため、PS K196E 変異が新規の経口避妊薬内服者の VTE のリスクを上げるかどうかは明らかにならなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Miyata T, Maruyama K, Banno F, Neki R: Thrombophilia in East Asian countries: are there any genetic differences in these countries? Review, Thromb J, 14 (Suppl 1):25, 2016. doi: 10.1186/s12959-016-0109-x

- (2) Maruyama K, Akiyama M, Miyata T, Kokame K. Protein S K196E mutation reduces its cofactor activity for APC but not for TFPI, *Res Pract Thromb Haemost*, 2(4), 751-756, 2018. doi: 10.1002/rth2.12152
- (3) Fujita K, Sonoda K, Miyata T, Ihara M, Toyoda K, Koga M, Early identification of protein S K196E mutation in a patient with cerebral venous thrombosis: a case report, *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 28(1), 232-233, 2019. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.09.040

〔学会発表〕（計4件）

- (1) Toshiyuki Miyata, “Thrombophilia in East Asian Countries. Are there any genetic differences in these countries?” The 9th Congress of the Asian-Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis, October 6 - 9, 2016, Taipei, Taiwan
- (2) Toshiyuki Miyata, “Differences in Prothrombotic States among Races/Regions”, Session 129: Antithrombotic Therapy Specific to Races/Regions (in the NOAC Era), an American Heart/American Stroke Association and Japan Stroke Society Joint Session, International Stroke Conference 2017, February 23, 2017, Houston, USA
- (3) Toshiyuki Miyata, State-of-the-Art Session, Session Title: Risk Factors of Venous Thromboembolism, Genetic Risk Factors of Venous Thromboembolism in Humans and Mice, XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 63rd Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, July 8 - 13, 2017, Berlin, Germany
- (4) 宮田敏行、プロテインS研究会シンポジウム「血液凝固制御因子プロテインS 最新の話 題」「組織因子経路インヒビターとプロテインSの最近の話題」、第40回日本血栓止血学会学術集会、2018年6月29日、札幌市、北海道

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉松 淳

ローマ字氏名：Yoshimatsu Jun

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：病院

職名：部長

研究者番号（8桁）：20221674

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：秋山 正志

ローマ字氏名：Akiyama Masashi

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：室長

研究者番号（8桁）：30298179

(3) 研究協力者

研究協力者氏名：丸山 慶子

ローマ字氏名：Maruyama Keiko

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：流動研究員

研究者番号（8桁）：30712624

(4)研究分担者

研究分担者氏名：小亀 浩市

ローマ字氏名：Kokame Koich

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：部長

研究者番号（8桁）：40270730

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、研究者個人に帰属されます。