

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06004

研究課題名(和文)新規抗血栓薬の開発に向けた猫の先天性血液凝固第XII因子欠乏症の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology of congenital factor XII deficiency in cat for the development of novel antithrombotic therapy

研究代表者

丸山 治彦 (MARUYAMA, Haruhiko)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：60434106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：第XII因子(FXII)欠乏症の猫10例においてF12遺伝子解析を行った。その結果、本邦のFXII欠乏ではp.G544Aが最も高い頻度で認められることが明らかとなった。さらに、これまではFXII活性に影響を及ぼさないと考えられていた2種類の遺伝子変異がFXII活性の軽度低下に影響していることが示唆された。また新規遺伝子変異を1種同定した。

国内で最も発生頻度が高いp.G544A変異の迅速診断のために、リアルタイムPCR装置を用いたCycleave PCR法を確立した。そして、日本大学動物病院に来院した猫での本遺伝子変異の保有状況を検討した結果、対立遺伝子頻度は0.09であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

第XII因子(FXII)は血液凝固因子の1つであるが、その欠乏症では観血的処置などでも異常出血を呈さない。近年、医学領域ではFXIIが血栓形成や炎症を調整していることが明らかとなり、FXIIを阻害することで出血傾向を呈さない新規抗凝固薬のターゲットとして注目されている。先天性FXII欠乏症は猫では比較的良好に遭遇する疾患である。また、止血スクリーニング検査ではFXII欠乏症は血友病と同じ結果を呈することからその鑑別には遺伝子検査が有用であると考えられる。そのため、本研究で得られた猫のFXII欠乏症の病態解析としての遺伝子解析結果および迅速かつ簡便な遺伝子診断法の確立は、臨床獣医学の発展に寄与する。

研究成果の概要(英文)：F12 gene analysis was performed on 10 cats with factor XII (FXII) deficiency. As a result, it was clarified that p.G544A was most frequently observed in FXII deficiency in Japan. Furthermore, it was suggested that two types of gene mutations, which were previously thought to have no effect on FXII activity, affect a mild decrease in FXII activity. We also identified one novel gene mutation. A Cycleave PCR method using a real-time PCR device was established for the rapid diagnosis of the p. G544A mutation, which occurs most frequently in Japan. As a result of examining the state of possession of this gene mutation in cats visiting Nihon University Animal Hospital, the frequency of alleles was 0.09.

研究分野：獣医血液病学

キーワード：ネコ 第XII因子欠乏症

## 1. 研究開始当初の背景

血液凝固因子は文字通り血液を固める因子であることから、その欠乏症は出血傾向となり重篤な場合は失血死の原因になりうる。しかし、第 XII 因子 (Factor XII: FXII) は血液凝固因子の 1 つであるにもかかわらず、その欠乏症では手術や受傷時でも全く異常な出血を認めない。これまで FXII の生体内での止血凝固機構における役割は不明であった。医学において FXII は血栓形成や炎症を調整することが明らかとなった (Müller ら、2009、Cell)。現在、医学ならびに獣医学において使用されているヘパリン、ワルファリン、そしてこの数年で使用されるようになった新規経口抗凝固薬は、血液凝固の中心的役割を果たす第 X 因子やトロンピンを阻害することで抗凝固作用を得ているが、その一方で副作用として出血傾向を引き起こすことが大きな問題として挙げられる。そのため、医学では出血リスクを伴わない血栓治療法の開発が望まれている。また炎症は血液凝固を活性化し血栓の原因になるだけでなく、血管を障害するなど全身症状の重篤化を引き起こすことが知られている。以上のことから、FXII は血栓形成と炎症の抑制を目的とする治療ターゲットとして大きな注目を集めている (Danese ら、2016、Semin Thromb Hemost)。イヌやネコなどでも血栓性疾患や炎症性疾患は予後を大きく左右する要因であることから臨床上重要な疾患であり、人と同様により効果的で副作用がなく安全性の高い治療法の開発が望まれている。ネコにおける先天性 FXII 欠乏症の発生頻度は 2%と報告されており、日常的によく遭遇する。そこで、比較的高い頻度で遭遇する先天性 FXII 欠乏症の猫を対象として分子病態や臨床像を解明することは、より効果的で安全性の高い抗 FXII 薬の迅速な開発を行う上で非常に有益である。また、*F12* 遺伝子変異の同定は遺伝子診断の礎となるが、ネコでは十分な変異同定はなされていない。

## 2. 研究の目的

ネコだけでなくヒトやイヌにおける血栓性疾患や炎症性疾患に対してより高い効果を有しつつ副作用のない治療法の開発、そしてさらに、ネコにおける FXII 欠乏症の遺伝子検査の確立が望まれている。そのための基盤研究として FXII 欠乏症の猫の *F12* 遺伝子変異の同定 (研究 1)、FXII 因子活性に影響を及ぼすと考えられた遺伝子変異の組換え FXII 蛋白の発現解析 (研究 2)、そしてネコの本疾患で最も高い頻度で認められる遺伝子変異 (c.1631G>C) の迅速遺伝子診断の確立およびそれをういた疫学的調査 (研究 3) を本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### 研究 1

- 対象動物：2017 年 4 月から 2019 年 9 月までの間に本学動物病院に来院、または当研究室へ血液凝固因子活性の測定依頼があった猫において、FXII 活性値 (FXII:C) が < 50%、他の内因系因子 (第 XI、  
因子) 活性が 50% 以上、そして基礎疾患を有さない症例を先天性 FXII 欠乏症とし遺伝子解析に供した。
- 遺伝子変異の同定：被験猫の末梢血液から DNA 精製キットにより抽出したゲノム DNA を鋳型に、*F12* 遺伝子の全 14 個の Exon 領域を PCR 法にて 5 つのフラグメントとして増幅した。増幅産物をダイレクトシーケンスすることで塩基配列を決定した。得られた塩基配列を野生型配列 (NCBI accession No. NM\_001168212) と比較し変異を同定した。

## 研究 2

- 発現プラスミドベクターの構築:既に当研究室で構築した健常ネコ FXII 発現ベクター(FXII wild pcDNA3.1V5/His)を鋳型に、PCR 法にて 3 種 (p.F141L、p.V573I、p.Q407K) の発現ベクター構築を試みた。
- 蛋白発現:構築された変異発現プラスミドはリポフェクトアミン 3000 (サーモフィッシャー)を用いて HEK293 細胞の形質転換に用いた。トランスフェクト 48 時間後に培養上清と細胞分画をそれぞれ回収した。
- ウェスタンブロット:回収した培養上清と細胞分画は、SDS-PAGE 電気泳動後、メンブランに転写し、HRP 標識抗 V5 抗体と反応させた。野生型と変異型のバンドのシグナル強度を比較した。

## 研究 3

- FXII サイクリングプローブ検出系 (Cycleave PCR 法) の対照猫ゲノム DNA:既にシーケンスによって F12 遺伝子変異の有無が明らかとなっている計 23 検体 (野生型:7 検体, ホモ型変異:12 検体, ヘテロ型変異:4 検体)。
- サイクリングプローブ検出系 (Cycleave PCR 法) による対照猫 DNA 増幅条件: Cycleave PCR Reaction Mix(タカラバイオ)を反応試薬として用いた。プライマー/プローブの設計にはタカラバイオ社 CycleavePCR Assay Designer (SNPs) を使用した。リアルタイム PCR 装置 (Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*, タカラバイオ) で、上記ネコゲノム DNA を用い、増幅条件を決定した (95 30 秒 1 サイクル、95 5 秒、55 10 秒、72 20 秒、45 サイクル。蛍光検出:72 時点)。
- 被検猫 DNA 検体:本学動物病院に来院 (2018 年 5 月-2019 年 4 月) し、APTT 測定を実施した種々の疾患に罹患したネコ 167 例を対象とした。これら症例から血液凝固検査のために得たクエン酸ナトリウム添加血漿分離後細胞画分から抽出したゲノム DNA を (NucleoSpin Blood QuickPure: タカラバイオ) を被験猫 DNA 検体に用いた (計 167 検体)。

## 4. 研究成果

### 研究 1

内因系凝固因子の活性を測定した 33 例中 10 例が先天性 FXII 欠乏症と診断され、遺伝子解析の対象となった。FXII 欠乏症 10 例全てで一つ以上の変異が認められた。p.G544A においてホモ接合体は 6 例、ヘテロ接合体は 2 例であった。一方、p.L441CfsX119 のホモ接合体を有するものは p.G544A をホモ接合体で持つ 1 例のみで、p.L441CfsX119 のヘテロ接合体を有する個体は認められなかった。これら既報の変異を一方でもホモ接合体で持つ個体の FXII:C は 20% 未満であった。p.L441CfsX119 もしくは p.G544A をホモ接合体で持たない 4 例において、既報の Exon6 の p.F141L、Exon14 の p.V573I、そして新規の変異である Exon10 の p.Q407K を認めた。p.F141L と p.Q407K が共にホモ接合体の 1 例では、FXII:C は 20.8% であった。p.F141L と p.G544A が共にヘテロ接合体の 2 例では、FXII:C は 11.7% と 41.1% であった。p.F141L がホモ接合体、p.V573I がヘテロ接合体の 1 例の FXII:C は 40.4% であった。これら結果より、国内の FXII 欠乏症の猫において p.G544A が最も頻度の高い変異であるのに対し、p.L441CfsX119 は稀な変異であることが示唆された。また、新規遺伝子変異として p.Q407K を検出した。p.F141L、p.Q407K、p.V573I は、それぞれの組み合わせパターンにより FXII 活性が異なっていたことから、これらの変異の FXII 活性への影響が

示唆された。

## 研究 2

3 種の変異のうち、発現ベクターが構築できたものは p.F141L および p.V573I の 2 種であり、p.Q407K の構築には至らなかった。また、組換えタンパクの発現が確認できたのは、p.V573I のみであった。この p.V573I の培養上清および細胞分画における FXII 組換えタンパクの発現量は、野生型のそれと比較して大きな差異は認められなかった（図 1）。したがって、p.V573I の FXII 活性への影響は、発現量の変化によるものではなく、機能異常によるものであると推察された。今後はこの組換え変異タンパクの FXII 活性を検討する必要があると考えられた。さらに、残りの 2 種の変異についても検討を継続する。

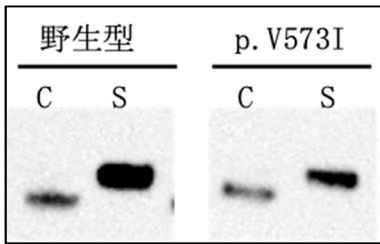


図 1. 組換えタンパク発現の比較. C:細胞分画、S:細胞上清.

## 研究 3

サイクリングプローブ検出系による FXII 変異 (c.1631G>C) 検出では、設定した PCR 条件にて野生型では FAM のみ、ホモ変異型では ROX のみ、ヘテロ変異型では FAM 及び ROX の両方をそれぞれ認められた（図 2）。すなわち、野生型、ホモ変異型、ヘテロ変異型で各特異的な蛍光反応を示した。したがって、ネコ FXII の c.1631G>C の変異における簡便、迅速、かつ特異的な検出法が確立された。さらに、本サイクリングプローブ法による c.1631G>C 変異検出では、被験猫 167 例中 27 例 (16.2%) に変異を検出した (ホモ変異 3 例 (1.8%)、ヘテロ変異 24 例 (14.3%))。本変異の対立遺伝子頻度は、0.09 であった。

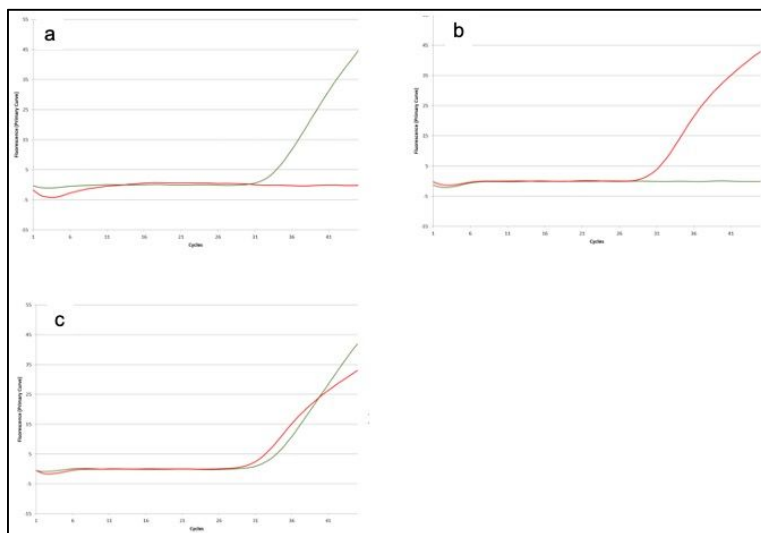


図 2. 蛍光曲線. a) 野生型でのみ FAM を検出. b) ホモ変異型でのみ ROX を検出. c) ヘテロ型では FAM と ROX の両方を検出.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯田尚人, 丸山治彦, 加納 壘, 鎌田 寛.
2. 発表標題 猫の先天性第XII因子欠乏症における遺伝子変異の調査
3. 学会等名 日本獣医臨床病理学会2019年大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------