

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16082

研究課題名(和文) プロトロンビン変異体による血友病治療の可能性

研究課題名(英文) Prothrombin Mutants as a Potential Treatment for Hemophilia

研究代表者

鈴木 伸明 (Suzuki, Nobuaki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70637686

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)：アンチトロンビンレジスタンスの性質を示すプロトロンビン変異体(R593L)を発現するマウスはトロンビン生成能は低いものの、遅発性の血栓傾向を示した。この血栓傾向が止血能改善に寄与するかを評価するため、血液凝固第VIII因子が欠損した血友病Aマウス(出血傾向を呈する)と交配することにより、プロトロンビンR593Lを発現する血友病Aマウスを作製し、血友病Aマウスの止血能改善効果を評価したが改善効果は認められず、血栓傾向となることは必ずしも止血能改善に寄与しないということが判明し、現段階ではこの変異体の血友病治療への応用は効果に乏しいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、この領域での研究ではトロンビン生成の多寡をもって血栓傾向の評価がなされてきた。しかしながら、アンチトロンビンレジスタンスの性質を持つプロトロンビンR593Lでは血液学的解析では複数の実験系による評価でトロンビン生成能が低く、むしろ出血傾向が推測される結果であったが、生体レベルでの血栓形成能評価では遅発性の血栓傾向を呈した。このことは血液凝固異常の性質によっては血液検体を用いた解析では臨床的な評価をすることは困難であるということを示していると考えられる。このことは今後の血栓症研究において教訓となることである。

研究成果の概要(英文)：Mice expressing a prothrombin mutant (R593L), which shows antithrombin resistance properties, showed a delayed thrombotic tendency, although their thrombin generation capacity was low. To evaluate whether this thrombogenic tendency contributes to the improvement of hemostasis, we generated hemophilia A mice expressing prothrombin R593L by crossing hemophilia A mice lacking coagulation factor VIII (which show bleeding tendency) and evaluated the effect of improving hemostasis in hemophilia A mice. However, no improvement was observed, indicating that the thrombogenic tendency does not necessarily contribute to the improvement of hemostasis. Based on these results, the application of this mutant to the treatment of hemophilia is considered to be ineffective at this stage.

研究分野：血栓止血

キーワード：アンチトロンビンレジスタンス 血栓症 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 血友病治療においては血液凝固因子製剤による補充療法が治療の中心であるが、治療上の大きな問題として、血友病 A では製剤の半減期が 15-20 時間と短いこと。後天性血友病を含むインヒビター症例に対しては止血信頼性の高い製剤が不在であることが挙げられる。

(2) 我々のグループは血栓症を多発発症する家系を解析し、アンチトロンビン(AT)抵抗性となったプロトロンビン R596L、および R596Q バリエントを同定した。機能解析の結果、これらの変異体は高いトロンビン活性残存能を持つことが示された(Miyawaki Y et al. N Engl J Med 2012)。

プロトロンビンは血友病 A で欠損する血液凝固第 VIII 因子(FVIII)よりも半減期が長く、インヒビターの影響を受けないため、高いトロンビン生成能を持つプロトロンビンは血友病治療へ応用できる可能性があると考え、今回の研究を開始することとした。

2. 研究の目的

(1) AT 抵抗性を示すプロトロンビン R596L(マウスでは R593L)をノックインしたマウスを用いて、新規血友病治療への応用の可能性について検討する。

(2) プロトロンビン R593L 変異体の血栓傾向を生体モデルを用いて評価することにより、臨床的特性を明らかにする

3. 研究の方法

血友病 A マウス(FVIII ノックアウト)とプロトロンビン R593L マウスを交配することにより、プロトロンビン R593L を持つ血友病 A マウスを作製する。このマウスの止血能を評価することによりプロトロンビン R593L による止血能改善効果を評価する。

(1) 血液検体を用いた検討

血液検体を用いて、個体レベルでのプロトロンビン抗原量やプロトロンビン活性、AT レジスタンスの特性評価のほか、血漿を用いた凝固波形解析、トロンビン生成試験、全血を用いた Rotational Thromboelastmetry (ROTEM)を実施することにより、包括的な血液凝固能を評価する。

(2) 生体レベルでの検討

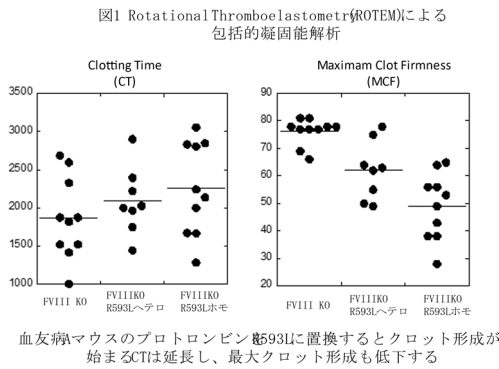
テイルカットによる出血時間評価(止血能評価)、下大静脈結紮による静脈血栓誘発モデル(血栓傾向評価)。

4. 研究成果

プロトロンビン R593L マウスであるが、血漿を用いた AT 添加の残存プロトロンビン活性の測定により、AT レジスタンスであることは確認されたが、R593L がヘテロ、ホモとなるにつれて、プロトロンビン抗原量が低下し、それと共に個体レベルでのプロトロンビン活性値が低下した。そして、トロンビン生成試験においても野生型マウスと比較して、その生成量は低下していた。おそらくはそのようなプロトロンビン R593L の特性のため、このバリエントを導入した血友病 A マウスの全血を用いた包括的凝固能解析、ROTEM の結果は血友病 A マウスの結果よりもクロット形成が悪く、むしろ出血傾向を予測させるものであった(図 1)。次に実際の止血能を評価するため、

テイルカットによる出血時間を評価したところ、止血能の改善は見られなかった(図2)。しかし

ながら、血液学的解析から予測されたような止血能悪化は見られなかったため、プロトロンビン R593L は何らかの血液凝固能亢進に関係する性質があると考え、プロトロンビン R593L の血栓形成能評価を行うこととした。この実験はマウスを開腹し、下大静脈を結紮したのち閉腹し、その後、時間を空けて再度開腹し、形成された血栓を重量評価するものである。その結果、野生型マウスでは時間が経過するにつれ、血栓量が減



少していくが、プロトロンビン R593L ホモマウスでは増加するという結果となった。この実験では強い血栓傾向を示す AT ノックアウト(KO)ヘテロマウスを比較対象として使用しているが、AT KOヘテロマウスは下大静脈結紮から 24 時間目から高い血栓形成を示し、それが持続したが、R593L ホモマウスでは経時的に血栓形成が増加していき、結紮後 72 時間後や 96 時間後では AT KO ヘテロマウスと同等量の血栓形成を示した(図 3)。このこと

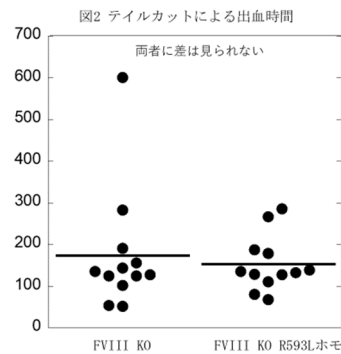
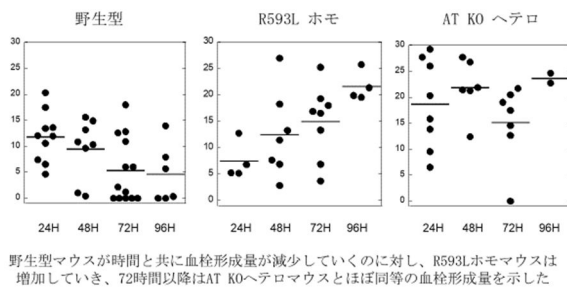


図3 下大静脈結紮モデルによる血栓形成能評価



からプロトロンビン R593L はトロンビン生成能が低く、血栓生成の開始は遅いものの、AT によるブレーキが利かないため、遅発性の血栓形成を呈することを特徴とすることが示唆された。血友病のような出血性疾患では出血時に即時に止血効果を示す治療薬が望ましく、プロトロンビン R593L のような遅発性に凝固能が亢進するような性質はあまり望ましくないと考えられ、結論的にはプロトロンビン R593L は現段階では血友病治療への応

用に適さないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鈴木伸明, 小嶋哲人	4. 巻 30
2. 論文標題 先天性血栓素因の診断と治療(2): APC レジスタンス/ライデン異常, アンチトロンピン抵抗性, 他	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 19~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.30.19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 鈴木伸明
2. 発表標題 プロトロンピンR593Lマウスの作製と解析
3. 学会等名 日本血栓止血学会
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
---------	---------