

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22869

研究課題名(和文)異常プロトロンビンのトロンボモジュリン抵抗性による血栓症発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of thrombosis caused by abnormal prothrombin with thrombomodulin resistance

研究代表者

長屋 聡美(NAGAYA, Satomi)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：00882309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性プロトロンビン異常症のうち、無症状や血栓傾向を呈した変異を有するリコンビナントプロトロンビンを作製し、凝固活性(凝固時間法・合成基質法)および血栓傾向の指標であるアンチトロンビン抵抗性(ATR)を評価した。ATRを示すと報告されているR596LおよびE509AでATRを検出でき、アッセイ系を確認した。申請者らが同定した無症候性の異常プロトロンビンでは、R431Hは軽度のATR、M380TはほとんどATRを示さなかった。ATRの詳細な検討を継続し、トロンボモジュリン抵抗性(TMR)の検出を進め、M380TとR431Hの複合ヘテロ接合体が無症状となった機序を解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、異常プロトロンビンのアンチトロンビン抵抗性(ATR)に加え、トロンボモジュリン抵抗性(TMR)による血栓傾向に着目した。申請者らが同定した複合ヘテロ接合体症例は出血も血栓も呈さない無症候性であり、そのメカニズムの解明を試みた。M380TおよびR431Hは凝固活性の低下(出血傾向)、アンチトロンビン抵抗性(ATR)は軽度～なし(血栓傾向軽度)と発端者は出血症状を呈しうる結果であり、TMRまたはプロテインCとの結合障害など、ATR以外の血栓傾向を有している可能性が示唆された。これらを解明することで新たな血栓性素因の発見や新規治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recombinant prothrombin with asymptomatic or thrombophilic mutations among congenital prothrombin abnormalities was produced and evaluated for coagulation activity (clotting time method and chromogenic method) and antithrombin resistance (ATR), an indicator of thrombophilia. ATR was detected in R596L and E509A, which have already been reported to show ATR, and the assay system was confirmed. In the asymptomatic abnormal prothrombin identified by the applicants, R431H had a mild ATR and M380T showed little ATR. We will continue to evaluate ATR using Biacore, detect thrombomodulin resistance (TMR), and elucidate the mechanism by which compound heterozygotes of M380T and R431H become asymptomatic.

研究分野：病態検査学

キーワード：異常プロトロンビン 血栓傾向 アンチトロンビン抵抗性 トロンボモジュリン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

血液凝固因子トロンビンの前駆体であるプロトロンビンに遺伝子変異を有する先天性プロトロンビン異常症は、凝固機能が低下することによる出血症状だけではなく、無症状や血栓症を発症する例が存在し、トロンビンの出血性作用と血栓性作用が明らかとなっている (1)。トロンビンによる抗凝固作用には、トロンボモジュリンと結合することにより抗凝固因子のプロテイン C を活性化する経路と、アンチトロンビンと結合することによりトロンビン活性が不活化される経路の 2 経路存在する。異常プロトロンビンとアンチトロンビンとの結合障害 (antithrombin resistance; ATR) による血栓症が報告されてから、*in vitro* における ATR の病態解明 (2) や ATR 検出法の確立 (3) などの研究が進められている。

申請者らは、以前解析した先天性プロトロンビン異常症において p.Arg431His 変異を同定し (4)、この 431 番目のアルギニンはトロンボモジュリンと直接結合するアミノ酸であることから、トロンボモジュリンとの結合が障害されている可能性を考えた。また、この患者はプロトロンビン遺伝子上にもう一つ別の変異を同時に有する複合ヘテロ接合体であったにも関わらず臨床的には無症状であり、申請者はこの異常プロトロンビンが有する“凝固機能低下による出血傾向”と“抗凝固機能低下による血栓傾向”とが組み合わさった結果、無症状となった可能性があるかと推測した。以上のことより、トロンボモジュリン結合障害 (thrombomodulin resistance: TMR) 型異常プロトロンビンは血栓症の原因となりうるのではないかと考えた。申請者は、先天性プロトロンビン異常症の中には、ATR だけでは説明がつかない表現型を示す症例が存在していると考え、TMR の病態解明の必要性を見出したが、TMR の血栓症発症機序に関する研究は未だ十分ではない。

## 2. 研究の目的

### 1) 精製リコンビナント異常プロトロンビンの凝固活性評価 (凝固時間法・合成基質法)

精製リコンビナント異常プロトロンビンを用いて、フィブリン形成までの凝固活性を評価する凝固時間法および、トロンビン特異的な合成基質を用いた合成基質法での凝固活性の評価を行う。

### 2) 精製リコンビナント異常プロトロンビンのアンチトロンビン抵抗性 (ATR) 評価

現時点で報告されている異常プロトロンビンの血栓性素因である ATR のアッセイ系を確立し、作製した異常プロトロンビンの ATR を評価する。

### 3) トロンボモジュリン結合障害 (TMR) の評価

分子間相互作用装置 Biacore を用いたトロンボモジュリンとの直接的な結合親和性を評価する。

## 3. 研究の方法

プロトロンビンの C 末端に 10×His タグを付加した His タグプロトロンビン発現ベクターを作製し、ヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) を用いた His タグリコンビナントプロトロンビン安定発現細胞株の作製を行った。作製した細胞株は、野生型 (WT)、ATR を示すと既に報告されている R596L、さらに ATR や TMR を示すと予測された 3 種類の変異型プロトロンビン (M380T、R431H、E509A)、出血傾向を示すことが明らかとなっている G362R である。それぞれの細胞株の培養上清を回収し、Ni-NTA を用いた His タグ精製およびパリウム吸着を行ない、CBB 染色に

で高純度のリコンビナントプロトロンピンを精製できていることを確認し、実験に用いた。

- 1) 凝固時間法による活性測定は、オーレンペロナル緩衝液を用いてサンプルを希釈し、血液凝固第II因子欠乏血漿およびプロトロンピン試薬を用いて測定した。合成基質法による活性測定は、サンプル中のプロトロンピンを FVa、FXa、CaCl<sub>2</sub> でトロンピンに活性化し、 $\alpha$ -トロンピン特異的蛍光合成基質でのアミド分解活性を測定した。
- 2) 上記の合成基質法の評価と同様にサンプル中のプロトロンピンをトロンピンに活性化したのち、様々な濃度の AT を添加し、AT と結合して TAT を形成していない残存トロンピン活性を測定した。
- 3) センサーチップにリコンビナント異常トロンピンを固相化し、Buffer で希釈したトロンボモジュリンを流路に流して、K<sub>D</sub> (結合親和性) や kd (解離速度定数) などの評価を行った。

#### 4. 研究成果

- 1) 凝固時間法による活性測定では、WT は血漿由来ヒトプロトロンピンと同等の活性を有し、WT を 100% とすると、5 つの変異体はそれぞれ、G362R: 24.3%、M380T: 8.2%、R431H: 40.9%、E509A: 43.1%、R596L: 37.2% と有意に低下していた ( $p < 0.0001$ , 図 1-a)。合成基質法による活性測定では蛍光基質を用いたトロンピン生成アッセ

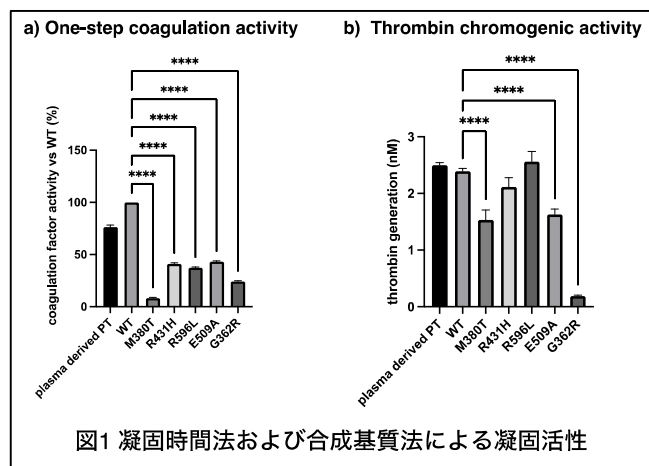


図1 凝固時間法および合成基質法による凝固活性

イを確立し、WT では 2.4nM と血漿由来ヒトプロトロンピン (2.5nM) と同等の活性を有していることを確認した。また、5 つの変異体では、出血傾向を示す G362R は 0.2nM と著明に低下し ( $p < 0.0001$ )、M380T と E509A もそれぞれ 1.5nM、1.6nM と有意に低値を示した ( $p < 0.0001$ )。一方で R431H および R596L はそれぞれ 2.1nM、2.6nM と WT と同等であった (図 1-b)。

- 2) これまではトロンピン特異的基質である S-2238 を用いていたが、より高感度に検出するために蛍光基質を用いて残存トロンピン活性を検出する ATR アッセイを確立した。添加する AT の濃度を 0~5200nM まで変化させ、残存トロンピン活性を測定した。既に ATR を示すと報告されている R596L は AT 0nM: 2.2nM、AT 5600nM: 1.9nM と AT 濃度を上げて TAT が形成されずトロンピンが残存していることが確認できた。野生型では AT 0nM: 2.1nM、AT 5600nM: 0.7nM と AT 濃度依存的に残存トロンピン活性が低下した。M380T は野生型と R596L の中間程度、R431H は野生型と同等、E509A は R596L と同等の ATR を呈した。G362R は AT の有無に関わらずトロンピン活性が低いため検出不能であった。
- 3) 分子間相互作用装置 Biacore を用いて、トロンピンとトロンボモジュリンとの結合親和性評価を行ったが、培養上清を精製していく過程で使用する Buffer の塩濃度の影響で野生型であっても結合力が弱くなり、正しい評価を実施することができなかった。現在、精製時に使用する Buffer 条件を変更して評価を行っている。

- 1) Girolami A, et al. Congenital prothrombin defects: they are not only associated with bleeding but also with thrombosis: a new classification is needed. *Hematology*. 2018;23(2):105-110.
- 2) Girolami A, et al. The Dysprothrombinemias due to Arg596 Mutations: A Conundrum With No Bleeding Tendency and Venous Thrombosis due to Antithrombin Resistance. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019. doi: 10.1177/1076029619841701.
- 3) Tamura S, et al. In vitro exploration of latent prothrombin mutants conveying antithrombin resistance. *Thromb Res*. 2017. doi: 10.1016/j.thromres.2017.09.020.
- 4) Morihista E, et al. Prothrombin Himi: a compound heterozygote for two dysfunctional prothrombin molecules (Met-337-->Thr and Arg-388-->His). *Blood*. 1992;80(9):2275-80.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagaya S, Maruyama K, Watanabe A, Meguro-Horike M, Imai Y, Hiroshima Y, Horike SI, Kokame K, Morishita E.	4. 巻 107
2. 論文標題 First report of inherited protein S deficiency caused by paternal PROS1 mosaicism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 330 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.62951	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Nagaya S, Terakami T, Hayashi K, Furusho H, Fujino N, Kato T, Asakura H, Morishita E.	4. 巻 28
2. 論文標題 Effect on Plasma Protein S Activity in Patients Receiving the Factor Xa Inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.62951	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Kanosue K, Nagaya S, Morishita E, Yamanishi M, Imashuku S.	4. 巻 5
2. 論文標題 Protein C Gene Mutation in an Older Adult Patient with Clostridium perfringens Septicemia-Related Visceral Vein Thrombosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 TH Open	6. 最初と最後の頁 e171 ~ e173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0041-1728664	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukushima T, Shimomura Y, Nagaya S, Morishita E, Kawakami O.	4. 巻 13
2. 論文標題 A Case of Treatment With Dabigatran for Cerebral Venous Thrombosis Caused by Hereditary Protein C Deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e15473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7759/cureus.15473	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Nagaya S, Araiso Y, Yamaguchi K, Omote Y, Matsui A, Asakura H, Morishita E	4. 巻 51
2. 論文標題 Evaluation of Optimal Sample Processing Conditions for Accurate Measurement of Protein S Activity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Clin Lab Sci	6. 最初と最後の頁 3-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長屋聡美, 木村英晴, 堀内久徳, 浦野哲盟, 森下英理子
2. 発表標題 COVID-19関連凝固異常
3. 学会等名 第16回日本血栓止血学会学術集会標準化委員会シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 森下英理子, 長屋聡美, 渡邊淳, 目黒牧子, 堀家慎一, 朝倉英策
2. 発表標題 世界初の父性モザイクに起因した遺伝性プロテインS欠乏
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 山口孝一, 長屋聡美, 川村雅英, 松下周平, 森広太郎, 佐藤正一, 辻口博聖, 原章規, 中村裕之, 森下英理子
2. 発表標題 可溶性C-type Lectin-like receptor-2(sCLEC-2)の臨床的有用性の検討
3. 学会等名 第22回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 長屋聡美, 丸山慶子, 渡邊淳, 目黒牧子, 廣島由紀, 堀家慎一, 小亀浩市, 朝倉英策, 森下英理子
2. 発表標題 父性モザイク 遺伝性プロテインS欠乏症の1家系
3. 学会等名 第39回日本血液学会北陸地方会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 牧田友香, 丸山慶子, 小亀浩市, 宇塚裕紀, 目黒牧子, 荒磯裕平, 長屋聡美, 森広太郎, 今井湧太, 大森健聖, 山口孝一, 堀家慎一, 森下英理子
2. 発表標題 プロテインS欠乏症患者で新規に同定されたPROS1バリエーションの機能解析
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 大森健聖, 長屋聡美, 目黒牧子, 荒磯裕平, 森広太郎, 今井湧太, 富樫朋貴, 牧田友香, 堀家慎一, 千葉智哉, 三浦晃子, 朝倉英策, 森下英理子
2. 発表標題 遺伝性プロテインC欠乏症2症例に同定した2つの遺伝子変異蛋白の機能解析
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 今井湧太, 長屋聡美, 目黒牧子, 山口孝一, 森広太郎, 富樫朋貴, 大森健聖, 牧田友香, 岩田吉生, 堀家慎一, 朝倉英策, 森下英理子
2. 発表標題 de novo変異が疑われた遺伝性アンチトロンピン欠乏症1症例に同定した新規遺伝子バリエーション
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 長屋聡美, 森下英理子
2. 発表標題 先天性プロテインS欠乏症およびプロテインS活性測定に影響する要因の検討
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会臨床検査シンポジウム
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 長屋聡美, 山口孝一, 富樫朋貴, 荒磯裕平, 森広太郎, 花村美帆, 今井裕太, 關谷暁子, 朝倉英策, 森下英理子
2. 発表標題 プロテインS活性測定に影響する要因の検討
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 山口孝一, 長屋聡美, 森広太郎, 富樫朋貴, 今井湧太, 門平靖子, 林朋恵, 朝倉英策, 森下英理子
2. 発表標題 抗リン脂質抗体症候群における可溶性C-type lectin-type receptor (sCLEC2)の検討
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 今井湧太, 目黒牧子, 荒磯裕平, 森広太郎, 富樫朋貴, 山口孝一, 長屋聡美, 佐藤英一, 北川直毅, 堀家慎一, 朝倉英策, 森下英理子
2. 発表標題 遺伝性アンチトロンピン欠乏症2症例に同定した2つの新規遺伝子変異
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年



1. 発表者名 森下英理子, 森広太郎, 丸山慶子, 小亀浩市, 長屋聡美, 今井湧太, 富樫朋貴, 大森健聖, 牧田友香, 山口孝一, 目黒牧子, 廣島由紀, 堀家慎一, 朝倉英策, 渡邊淳
2. 発表標題 性腺モザイクが原因と考えられる遺伝性プロテインS欠乏症の一家系
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 富樫朋貴, 長屋聡美, 森広太郎, 山口孝一, 今井湧太, 目黒牧子, 堀家慎一, 錦井秀和, 長谷川雄一, 森下英理子
2. 発表標題 新規フレームシフト変異を含め、複数の遺伝子変異が認められた先天性第VII因子欠乏症
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 森広太郎, 目黒牧子, 藤木俊寛, 今井湧太, 富樫朋貴, 大森健聖, 牧田友香, 長屋聡美, 山口孝一, 森下英理子
2. 発表標題 新規一塩基置換型変異を認めた先天性第XII因子欠乏症の1例
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 牧田友香, 丸山慶子, 小亀浩市, 宇塚裕紀, 助川真純, 目黒牧子, 荒磯裕平, 森広太郎, 大森健聖, 山口孝一, 長屋聡美, 堀家慎一, 森下英理子
2. 発表標題 新規の遺伝子変異が認められた先天性プロテインS欠乏症2症例
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 大森健聖, 牧田友香, 富樫朋貴, 今井湧太, 目黒牧子, 堀家慎一, 荒磯裕平, 森広太郎, 山口孝一, 孝一, 長屋聡美, 千葉智也, 三浦晃子, 石川亜貴, 森下英理子
2. 発表標題 プロテインC欠乏症4症例に同定された4つの新規遺伝子変異
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 今井湧太, 目黒牧子, 荒磯裕平, 長屋聡美, 山口孝一, 森広太郎, 富樫朋貴, 長森勇多, 堀家慎一, 森下英理子
2. 発表標題 遺伝性アンチトロンピン欠乏症1症例に同定した新規遺伝子変異
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 山口孝一, 花村美帆, 牧田友香, 森広太郎, 長屋聡美, 森下英理子
2. 発表標題 可溶性血漿CLEC2の測定における検体安定性の検討
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------