

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590524

研究課題名（和文）

新規血栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性遺伝子変異の同定解析

研究課題名（英文）

Gene analysis of a novel thrombotic risk factor; antithrombin-resistance.

研究代表者

小嶋 哲人 (KOJIMA TETSUHITO)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・教授

研究者番号：40161913

## 研究成果の概要（和文）：

静脈血栓塞栓症の発症は、高齢化社会を迎え日本においても増加しており、その発症リスク因子の解明が重要な課題である。我々は、既知の血栓性素因の解析が進められたが、その原因特定に至らなかった遺伝性血栓症家系において新たにプロトロンビン遺伝子変異を同定した。この遺伝子変異は、トロンビンのアンチトロンビン結合部位でのミスセンス変異で、組換え変異型プロトロンビンの活性を調べたところ、本変異はプロトロンビンの凝固活性を軽度低下させるものの、活性化された変異型トロンビンは高度なアンチトロンビン抵抗性を示すことが明らかとなり、本症例の血栓症発症の要因であることが判明した。

## 研究成果の概要（英文）：

Venous thromboembolism is a multifactorial disease resulting from a complex interaction between circumstantial and genetic factors. In this study, we investigated possible causative gene defects in a large Japanese family with inherited thrombophilia, and found a novel missense mutation in the prothrombin gene resulting in a variant prothrombin. The mutation located at one of the antithrombin (AT) binding sites of thrombin molecule. We prepared wild-type and mutant recombinant prothrombins, and compared by prothrombin activation, AT-binding, and thrombin generation assays. In thrombin-antithrombin complex (TAT) formation, the mutant thrombin was impaired to form TAT. In thrombin generation assay of reconstituted prothrombin-deficient plasma with recombinant prothrombins, the mutant showed a decreased peak thrombin and an increased endogenous thrombin potential. We identified a novel *F2* mutation leading to the mutant AT-resistant thrombin, which could be a cause of the inherited thrombophilia in this family.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床血液学、静脈血栓塞栓症、先天性血栓性素因、遺伝子変異、アンチトロンビン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

深部静脈血栓症・肺塞栓症（静脈血栓塞栓症：VTE）は加齢とともに増加することが知られ、診断技術の進歩に伴い日本人にも決して少なくないことが明らかとなっている。とくに肺塞栓症はしばしば致命的な転帰を取るため、これら静脈血栓塞栓症の予知、予防、治療などの対策は急務である。

静脈血栓塞栓症は環境因子と遺伝因子からなる多因子疾患として知られている。また、生理的な凝固制御因子であるアンチトロンビン（AT）、プロテインC（PC）、プロテインS（PS）の欠乏は血栓症の発症リスクファクターとなることが知られている。我々は、これまでにこれら凝固制御因子の先天性欠損症が疑われた症例において、それぞれ原因となる遺伝子変異を解析し、さらに同定した変異分子の発現実験などを通して欠損症発症の分子病態解析を行ってきた。一方、静脈血栓塞栓症173名を対象とした全国的共同研究の解析結果では、約32%（55名）に原因と思われるAT、PC、PS遺伝子変異を同定したが、残り2/3以上の症例では原因同定に至っていない。欧米人においても、1980年代の解析では家族性血栓症患者でのAT、PC、PSの遺伝子異常の同定率は高々40%と報告され、1993年に新しい血栓性素因・活性化プロテインC（APC）抵抗性が提唱され、翌年その原因遺伝子変異FV Leiden（FV R506Q）が同定されたが、このFV Leiden変異は人種差があり日本人には認められていない。

こうした現在までの先天性血栓傾向の遺伝子変異解析研究の経過を踏まえ、今回我々は未だ原因の同定に至っていない日本人での遺伝性血栓症症例において、新たな血栓性素因・アンチトロンビン（AT）抵抗性の同定・病態解析を行い、その候補遺伝子の変異探索解析を行う着想に至った。

## 2. 研究の目的

深部静脈血栓症・肺塞栓症（静脈血栓塞栓症）の発症は、診断技術の進歩に伴い日本人にも決して少なくないことが明らかとなり、高齢化社会を迎えた日本においては加齢とともに増加するこの静脈血栓塞栓症の発症リスク因子の解明がきわめて重要な課題となっている。本研究は、新しい血栓性リスク概念・アンチトロンビン（AT）抵抗性を示す症例の病態解析を進め、AT抵抗性検出スクリーニング法の開発研究、ならびに未だリスク因子が明らかでない半数以上の静脈血栓塞栓症患者における候補遺伝子での血栓性リスク変異の同定解析を行い、静脈血栓塞栓症の予知、予防、治療に資す

ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

発端者は13歳女性。6歳時に右下肢深部静脈血栓症発症し某病院入院。当時の凝血的検査では、AT、PC、PS等を含めて特に異常を認めず、ウロキナーゼ等にて治療後、ワルファリンの内服にて治療されていたが、転居のため名古屋大学を紹介された。家族歴として、母親も深部静脈血栓症を発症しワルファリン治療中のほか、母方に多数の血栓症発症者がいる。

今回、名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとでインフォームドコンセントを得た後、患者とその母親の白血球よりゲノムDNAを抽出し、プロトロンビン遺伝子（F2）の全エクソンとイントロン境界領域および3'非翻訳領域について各領域をPCR増幅し、Direct Sequence法により塩基配列解析を行った。また、得られた変異情報より組換え型プロトロンビンの発現実験を行い、変異型と野生型とのAT結合能の違い、それぞれプロトロンビン欠乏血漿に添加した血漿を用いた組織因子惹起トロンビン生成能の差異を解析した。

### （倫理面への配慮）

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を尊重するとともに、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て解析した。

## 4. 研究成果

静脈血栓塞栓症（VTE）の発症は、診断技術の進歩に伴い日本人にも決して少なくないことが明らかとなり、日本においても高齢化社会を迎えた増加するVTEの発症リスク因子の解明が重要な課題である。VTEの発症要因として、現在まで様々な先天性血栓性素因の原因遺伝子変異が報告されてきたが、未だその原因遺伝子変異が不明な症例も多い。我々は、既知の血栓性素因（アンチトロンビン、プロテインC、プロテインSの各欠損症等）の解析が進められたが、その原因特定に至らなかった遺伝性血栓症家系において、新しいリスクファクターとしてプロトロンビン遺伝子変異を同定したNEJM誌（2012. 6. 21）に報告した。同定したプロトロンビン遺伝子変異は、活性化を受けた変異分子由来トロンビンにおいてアンチトロンビン結合部位でのミスセンス変異が予想され、この異常トロンビンはアンチトロンビンによる凝固制御が十分でない血栓性素因となることが予想された。組換え変異型プロトロンビンの活性を調べたところ、野生型に比べ凝固一段法では16

%,凝固二段法では29%とかなりの低下を認めたが、合成基質法では75%の活性を保有していた。この違いは凝固法基質のフィブリノゲンが合成基質に比べ巨大分子であることによるものと思われた。

一方、組換え変異型トロンピンは野生型に比べアンチトロンピン結合能が極度に低下

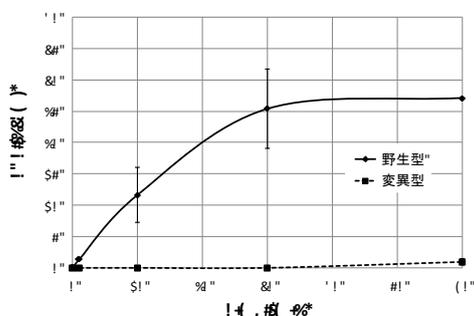


図 TAT 形成能 (実線:野生型、破線:変異型)

し(図)、トロンピン生成試験での総トロンピン生成量増大、トロンピン生成終了時間延長を認めた。すなわち、本変異はプロトロンピンの凝固活性を軽度低下させるものの、活性化された変異型トロンピンは高度なアンチトロンピン抵抗性を示すことが明らかとなり、本症例の血栓症発症の要因であることが判明した。また、血漿検体でのアンチトロンピン抵抗性のスクリーニング検査法を開発しており、新たな症例の同定検索を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文]

- 1) Suzuki A, Miyawaki Y, Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito H, Kojima T: Ribavirin-induced intracellular GTP depletion activates transcription elongation in coagulation factor VII gene expression. *Biochemical J.* 449(1): 231-239, 2013. 査読有
- 2) Fujita J, Miyawaki Y, Suzuki A, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Suzuki N, Matsushita T, Saito H, Kojima T: A possible mechanism for Inv22-related F8 large deletions in severe hemophilia a patients with high responding factor VIII inhibitors. *J Thromb Haemost.* 10(10), 2099-2107, 2012. 査読有
- 3) Matsushita T, Saito H, Kojima T: The author reply. *N Engl J Med.* 367, 1069-1070, 2012. 査読有
- 4) Yokoyama k, Kojima T, Sakata Y, Kawasaki T, Tsuji H, Miyata T, Okamoto S, Murata M: A survey of the clinical course and management of Japanese patients deficient in natural anticoagulants. *Clin Appl Thromb Hemost.* 18(5), 506-513, 2012. 査読有
- 5) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima K: Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med.* 366, 2390-2396, 2012. 査読有
- 6) Suzuki A, Nakashima D, Miyawaki Y, Fujita J, Maki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Teranishi M, Matsushita T, Saito H, Kojima T: A novel ENG mutation causing impaired co-translational processing of endoglin associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Thromb Res.* 129(5), e200-208, 2012. 査読有
- 7) Miyata T, Hamasaki N, Wada H, Kojima T: Venous thromboembolism and a race-specific genetic variation, protein S K196E, in Japanese. *J Thromb Haemost.* 2011 Dec 5. [Epub ahead of print]. 査読有
- 8) Saito H, Matsushita T, Kojima T: Historical perspective and future direction of coagulation research. *J Thromb Haemost. Suppl 1*: 352-63, 2011. 査読有
- 9) Iwaki T, Tanaka A, Miyawaki Y, Suzuki A, Kobayashi T, Takamatsu J, Matsushita T, Umemura K, Urano T, Kojima T, Terao T, Kanayama N: Life-threatening hemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete plasminogen activator inhibitor-1 deficiency in humans. *J Thromb Haemost.* 9(6): 1200-6, 2011. 査読有
- 10) Ikesue M, Matsui Y, Ohta D, Danzaki K, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5): 1066-74, 2011. 査読有
- 11) Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Morimoto J, Sato M, Tanaka S, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res.* 108(11): 1328-39, 2011. 査読有
- 12) A Suzuki, N Sanda, Y Miyawaki, Y Fujimori, T Yamada, A Takagi, T Murate, H Saito, T

- Kojima: Down-regulation of *PROS1* gene expression by 17 $\beta$ -estradiol via estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein140 and the corepressor-HDAC3 complex. *J. Biol. Chem.* 285(18): 13444-13453, 2010. 査読有
- 13) H Okada, S Kunishima, M Hamaguchi, A Takagi, K Yamamoto, J Takamatsu, T Matsushita, H Saito, T Kojima, T Yamazaki: A novel splice site mutation in intron C of *PROS1* leads to markedly reduced mutant mRNA level, absence of thrombin-sensitive region, and impaired secretion and cofactor activity of mutant protein S. *Thromb Res.* 125(5):e246-e250. 2010. 査読有
- 14) H Okada, Y Toyoda, A Takagi, H Saito, T Kojima, T Yamazaki: Activated protein C resistance in the Japanese population due to homozygosity for the factor V R2 haplotype. *Int J Hematol.* 91(3): 549-550, 2010. 査読有
- 15) Y Miyawaki, A Suzuki, Y Fujimori, A Takagi, T Murate, N Suzuki, A Katsumi, T Naoe, K Yamamoto, T Matsushita, J Takamatsu, T Kojima: Severe hemophilia A in a Japanese female caused by an F8-intron 22 inversion associated with skewed X chromosome inactivation. *Int J Hematol.* 92(2): 405-408, 2010. 査読有
- [学会発表] (計 40 件)
- 1) Okuyama E, Murata M, Suzuki A, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito T, Kojima T : (2P-0248) Up-regulation mechanisms of syndecan-4, a heparan sulfate proteoglycan, expression by TNF- $\alpha$  in human endothelial like EAhy926 cells. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、平成24年12月11-14日
- 2) Fujita J, Miyawaki Y, Suzuki A, Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Hosaka M, Takagi A, Murate T, Kajiura Y, Suzuki N, Matsushita T, Saito T, Kojima T : (O097) A Possible Mechanism for Inv22-related *F8* Large Deletions in Severe Hemophilia A Patients with High Responding Factor VIII Inhibitors. VIIth Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Melbourne, Australia. 平成 24 年 10 月 28-31 日
- 3) Murata M, Okuyama E, Suzuki A, Miyawaki Y, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Hosaka M, Takagi A, Murate T, Kishimoto, M, Suzuki N, Matsushita T, Saito T, Kojima T: (P122) Molecular Basis of Coagulation Factor IX Gene Abnormalities in 16 Japanese Hemophilia B Patients. VIIth Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Melbourne, Australia. 平成 24 年 10 月 28-31 日
- 4) Okuyama E, Murata M, Suzuki A, Miyawaki Y, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito T, Kojima T: (P159) NF-kappaB is essential for Syndecan-4 up-regulation by TNF-alpha in Vascular Endothelial-like EAhy926 Cells. VIIth Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Melbourne, Australia. 平成 24 年 10 月 28-31 日
- 5) Suzuki A, Miyawaki Y, Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito T, Kojima T: (OS-3-88) Immunosuppressant IMP dehydrogenase inhibitors up-regulated coagulation factor VII mRNA. 第 74 回日本血液学会学術集会、京都、平成 24 年 10 月 19-21 日
- 6) Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Miyawaki Y, Suzuki A, Takagi A, Murate T, Saito T, Kojima T : (PS-2-280) Molecular mechanisms of syndecan-4 upregulation by TNF- $\alpha$  in the endothelial-like EAhy926 cells 第 74 回日本血液学会学術集会、京都、平成 24 年 10 月 19-21 日
- 7) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujimori Y, Fujita J, Maki A, Takagi A, Murate T, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Kojima T: A NOVEL PROTHROMBIN GENE MUTATION LEADS TO AN AT-RESISTANT THROMBIN IN A FAMILY WITH INHERITED THROMBOPHILIA. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan. 平成 23 年 7 月 23-28 日
- 8) Fujita J, Suzuki A, Miyawaki Y, Maki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Suzuki N, Saito H, Kojima T: DISTINCT X-CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS WITH *F8*-INTRON22 INVERSION IN THREE UNRELATED JAPANESE SEVERE HEMOPHILIA A PATIENTS WITH HIGH TITER INHIBITOR. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan. 平成 23 年 7 月 23-28 日
- 9) Saito H, Matsushita T, Kojima T: Historical perspective and future direction of coagulation research. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan. 平成 23 年 7 月 23-28 日
- 10) 小嶋哲人: 教育講演: 基本シリーズ: 血栓・止血 血栓性素因の病因と病態 第 73 回

- 日本血液学会学術集会、名古屋、平成 23 年 10 月 14-16 日
- 11) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Kojima T: OS-3-120: Molecular basis of an AT-resistant variant thrombin found in a Japanese family with thrombophilia. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、平成 23 年 10 月 14-16 日
  - 12) Maki A, Fujita J, Okuyama E, Murata M, Miyawaki Y, Suzuki A, Takagi A, Murate T, Kojima T: PS-1-63: Thrombophilia and JAK2 V617F mutations in Japanese patients with Budd-Chiari syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、平成 23 年 10 月 14-16 日
  - 13) Fujita J, Miyawaki Y, Suzuki A, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Suzuki N, Saito H, Kojima T: PS-1-72: Unusual X-chromosomal rearrangements with *F8-int2* inversion in three severe hemophilia A patients. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、平成 23 年 10 月 14-16 日
  - 14) K Yokoyama, T Kojima, Y Sakata, T Kawasaki, H Tsuji, T Miyata, S Okamoto, M Murata: A survey of venous thromboembolism in Japanese patients with inherited anticoagulant deficiency. 第 72 回日本血液学会総会、横浜、平成 22 年 9 月 24-26 日
  - 15) A Suzuki, Y Miyawaki, J Fujita, A Maki, Y Fujimori, A Takagi, T Murate, M Teranishi, H Saito, T Kojima: A novel endoglin gene mutation associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia in a Japanese. 第 72 回日本血液学会総会、横浜、平成 22 年 9 月 24-26 日
  - 16) T Kojima: Genetic Disorders Related to Coagulopathy Prevalent in the Far East. 6th Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis (APSTH Bali 2010), Bali. 平成 22 年 10 月 13-16 日
  - 17) A Suzuki, Y Miyawaki, J Fujita, A Maki, Y Fujimori, A Takagi, T Murate, H Saito, T Kojima: Receptor interacting protein 140 (RIP140) mediated ER $\alpha$ -Sp1 and corepressor-HDAC3 complex association in 17 $\beta$ -estradiol dependent down-regulation of protein S. 第 33 回日本分子生物学会、神戸、平成 22 年 12 月 7-10 日

[図書] (計 11 件)

- 1) 小嶋哲人: 新規経口抗凝固薬の薬効モニタリング、「あなたも名医! 新しい経口抗凝固薬、どう使う」 後藤信哉: 編集 日

本医事新報社 東京 pp 149-152, 2012. 8. 25.

- 2) 小嶋哲人: フォンダパリヌクスの基礎循環器内科医のための Xa 阻害薬のすべて 小室一成: 監修 中村真潮、山下武志: 編集 メディカルレビュー社 東京 pp 147-151, 2012. 3. 20.
- 3) 小嶋哲人: 先天性凝固阻止因子欠乏症 (antithrombin, protein C, protein S 欠損症) わかりやすい血栓と止血の臨床 日本血栓止血学会編集 南江堂 東京 pp107-109, 2011. 6. 10.
- 4) 小嶋哲人: 抗凝固薬: ヘパリン (低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸を含む) 抗血栓薬の最前線 -基礎と臨床- 齋藤英彦編 医薬ジャーナル社 大阪 pp75-81, 2011. 3. 15.
- 5) 小嶋哲人: 血液疾患 最新の治療 2011-2013 直江知樹/小澤敬也/中尾眞二編 V. 出血・血栓性疾患 6. 先天性血栓傾向 南江堂 東京 pp271-274, 2010. 10. 1.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 凝固因子として作用する異常トロンビンのためのトロンビン不活化動態測定方法及び試験方法、並びに、ポリヌクレオチド

発明者: 高木 明、小嶋 哲人、松下 正

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: 2010-289686

出願年月日: 2010.12.27

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.met.nagoya-u.ac.jp/KENSAWEB/lab/o/blood/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 哲人 (KOJIMA TETSUHIITO)

名古屋大学大学院医学系研究科 (保健)・教授

研究者番号: 40161913

(2) 研究分担者

松下 正 (MATSUSHITA TADASHI)

名古屋大学医学部附属病院・教授

研究者番号: 30314008

(3) 研究分担者

高木 明 (TAKAGI AKIRA)  
名古屋大学大学院医学系研究科 (保健) ・  
助教  
研究者番号 : 30135371