

## 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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22659114

研究課題名（和文）

血液凝固制御因子レジスタンスを検出する新規検査法の開発

研究課題名（英文）

Development of new analytical method for antithrombin resistance

研究代表者

高木 明 (TAKAGI AKIRA)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・助教

研究者番号：30135371

研究成果の概要（和文）：

はじめに：我々は遺伝性血栓症患者におけるアンチトロンビン抵抗を示す異常プロトロンビン（p.Arg596Leu）を報告した。患者血漿由来トロンビンのアンチトロンビン抵抗性を検出するためのアンチトロンビンによるトロンビンの不活性化の動態を分析する新規の臨床検査法を考案した。材料および方法：プロトロンビンアクチベータ成分（リン脂質、塩化カルシウム、およびヘビ毒由来プロトロンビンアクチベータ）とのインキュベーション後、試料中のトロンビンをヘパリンの存在下あるいは非存在下で十分量のアンチトロンビンを用いて不活化した。続いて、HD-Phe-Pip-Arg-pNA を添加し、405nm における吸光度変化率（ $\Delta$ Abs/min）・残存トロンビン活性を測定した。結果および結論：アンチトロンビンおよびヘパリンを用いて5分間不活化した場合の残存トロンビン活性は、596Leu 変異型プロトロンビン（40%）では、野生型（0.5%）よりも高かった。アンチトロンビンのみで30分不活化した場合の残存トロンビン活性は、596Leu 変異型プロトロンビン（99%）では、野生型（20%）よりも高かった。本測定系は、596Leu 変異型プロトロンビンのアンチトロンビン抵抗性を検出することができた。リコンビナントプロトロンビンとプロトロンビン欠乏血漿より再構成した患者血漿モデルにおいてもアンチトロンビン抵抗性を検出できた。

ワルファリン服用 596Leu 変異型プロトロンビン患者血漿を用いた場合は、初期のトロンビン活性は低いが、健常人血漿と比較すると残存トロンビン活性率を比較することでアンチトロンビン抵抗性を検出できた。結論：アンチトロンビンを用いたトロンビンの不活性化の動態を解析することにより、血漿中のアンチトロンビン抵抗性を検出する臨床検査法を考案した。本測定系はワルファリン服用患者においても、アンチトロンビン抵抗性を検出できる。

研究成果の概要（英文）：

Introduction: We have reported a variant prothrombin (p.Arg596Leu) conveying antithrombin resistance in a patient with hereditary thrombosis. To detect antithrombin resistance in plasma, we devised a laboratory test analyzing kinetics of thrombin inactivation using antithrombin. Materials and Methods: After incubation with prothrombin activator components (phospholipids, CaCl<sub>2</sub>, and snake venom), samples were treated with excess antithrombin in the presence or absence of heparin for various time periods. Subsequently, H-D-Phe-Pip-Arg-p-nitoranilide was added and changes in absorbance/min ( $\Delta$ A/min) were measured at 405 nm. Results and Conclusions: After inactivation for 5 min using antithrombin and heparin, relative residual thrombin activity of recombinant mutant prothrombin (40%) was higher than that of wild type (0.5%). In addition, after 30 min without heparin, relative residual thrombin activity of recombinant mutant prothrombin (99%) was higher than that of wild-type (20%), indicating that this assay was able to detect

antithrombin resistance of the variant 596Leu prothrombin. For reconstituted plasmas with recombinant prothrombins, the assay with or without heparin showed that relative residual thrombin activity of mutant plasma was higher than that of wild-type plasma. For the warfarinized plasma containing 596Leu prothrombin, the assay with or without heparin demonstrated that final relative residual thrombin activity was high compared with that for normal pooled plasma, although its initial thrombin activity was low. In conclusion, we devised a laboratory test detecting antithrombin resistance in plasma by analyzing kinetics of thrombin inactivation using antithrombin. This assay may be useful to detect antithrombin resistance in plasma, even in warfarinized patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,800,000	300,000	3,100,000

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

1. 研究開始当初の背景

深部静脈血栓・肺塞栓症（静脈血栓塞栓症）は、日本人には少ないと考えられてきたが、近年日本人にも決して少なくないことが明らかとなった。また、静脈血栓塞栓症が加齢に伴い増加することも超高齢化社会を迎えるにあり、その発症リスクの判定は重要な課題となっている。

静脈血栓塞栓症発症には、遺伝的要因の存在が知られている。日本人における遺伝的要因としては、アンチトロンビン、プロテインC、プロテインSなどの凝固制御因子の欠損症が知られている。我々も静脈血栓塞栓症の原因と考えられる遺伝子変異を多数報告してきた。しかし、我々の全国的共同研究の結果（**Thromb Res** 2009）においても、欧米人の報告においても約 2/3 の症例において原因遺伝子の同定には至っていない。

一方、2009年7月に開催された国際血栓

止血学会において原因不明の血栓症家系において大規模なポジショナルクローニング法による原因遺伝子の絞り込みが行われた結果、プロトロンビン遺伝子が候補遺伝子として解析され、原因と考えられる変異が同定された。これを受け、原因が同定できなかった血栓症家系のプロトロンビン遺伝子を解析したところ、トロンビンの生理的阻害因子・アンチトロンビンとの結合部に変異を認め、阻害因子による制御を受けにくい変異体であることが予想された。現在の血液凝固因子測定法は、非活性な前駆体・プロトロンビンを全て活性化し、トロンビンの活性を測定するものであり、不活化動態を評価できない。不活化動態の解析法の開発と実地臨床検査において利用するための最適化が必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

静脈血栓塞栓症は原因が同定できない症例が約 70%を占める。静脈血栓塞栓症の新規の遺伝的リスクとして、凝固因子・プロトロンビンから活性化したトロンビン活性は正常と同じであるが、トロンビンの生理的阻害制御因子・アンチトロンビンとの反応性が低い変異プロトロンビンの存在が示唆された。しかし、アンチトロンビンの低下でなく、プロトロンビンの分子異常に起因するトロンビン不活化障害は、現在の臨床検査法では検出できない。本研究では、血栓症患者に検出された変異型プロトロンビンを分子生物学的・細胞生物学的手法を用いて合成し、変異型プロトロンビン分子の活性化法、検出法など基本的性状を解析した上で、患者血漿モデルを人工的に作成し、臨床検査法として実施可能な血液凝固制御因子レジスタンス測定法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

精製した野生型および変異型プロトロンビン（タグ付き）を用いて、生理的プロトロンアクチベータ（プロトロンビナーゼ複合体：活性型第X因子・第V因子・リン脂質・カルシウムイオン）、生理的プロトロンアクチベータと作用機序が類似する蛇毒由来プロトロンアクチベータ（*Oxyuranus scutellatus*）による測定系開発に向けたプロトロンビン活性化法について pH、イオン強度、第V因子・リン脂質の必要性および至適濃度、反応時間などのプロトロンビン活性化至適条件を検討設定する。トロンビン測定法としては、生理的なフィブリン凝固時間法および高感度・高精密度が期待できる発色性合成基質を用いた比色分析法について至適条件を検討設定する。

精製した野生型および変異型プロトロンビンを至適条件下に活性化して生成されたトロンビンにアンチトロンビン（ヘパリン存在下および非存在下）を加えて、経時的にトロンビンの不活化動態を解析する。

引き続き各測定条件の最適化を進める。最適化した条件を総合して、野生型および変異型プロトロンビンから生成されたトロンビンのアンチトロンビンによる不活化経過を比較できる測定系を最適化する。

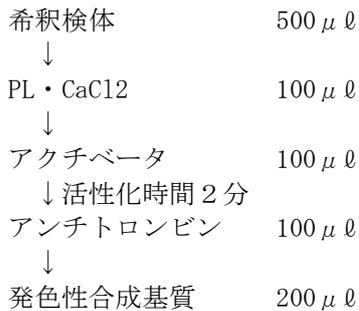
アンチトロンビンとの反応性が低い変異トロンビンの存在が示唆された血栓症患者に検出された変異型プロトロンビンを分子生物学的・細胞生物学的手法を用いて合成し、変異型プロトロンビン分子の活性化法、検出法など基本的性状を解析した。

ヒトプロトロンビン(野生型)の全長 cDNA をヒト肝臓由来 cDNA ライブラリーより PCR 増幅し、クローニングベクター pBluescript II KS+にクローニング後、塩基配列を確認した。クローニングした野生型ヒトプロトロンビン全長 cDNA を鋳型として変異導入 PCR 法を用いて変異型ヒトプロトロンビン全長 cDNA を作成した。さらに、野生型および変異型プロトロンビン cDNA を哺乳動物細胞用の発現ベクター pDNA3.1 および精製用の His タグ付き発現ベクター pcDNA3.1 myc-His に組み込んだ。

野生型および変異型プロトロンビン発現ベクターをヒト胎児由来培養細胞株 HEK293 に遺伝子導入後、G418 によりネオマイシン耐性および培養上清のウェスタンブロッティング解析により野生型および変異型プロトロンビン高発現 HEK293 細胞株を樹立した。

#### 4. 研究成果

健常人血漿および健常人血漿由来精製プロトロンビンを用いて、Oxyuranus scutellatus 蛇毒由来プロトロンアクチベータによるプロトロンビン活性化法についてpH、イオン強度、第V因子・リン脂質の必要性および至適濃度、反応時間などのプロトロンビン活性化至適条件を検討設定した。トロンビン測定法としては、高感度・高精密度が期待できる発色性合成基質を用いた比色分析法について至適条件を検討設定した。図1



直ちに405nmで吸光度変化率を測定する。

図1. トロンビン不活化動態解析法

野生型および変異型プロトロンビンを至適条件下に活性化して生成されたトロンビンにアンチトロンビン（ヘパリン存在下および非存在下）を加えて、経時的にトロンビンの不活化動態を解析する測定法を考案した。

リコンビナントプロトロンビンをサンプルに用いてヘパリン加アンチトロンビンで不活化動態を測定すると野生型プロトロンビンでは不活化1分でトロンビン活性残存率が2%、3分で0.8%、5分で0.5%であったのに対し、596Leuプロトロンビンではそれぞれ、68%、50%、40%となり、明確に不活化制御因子レジスタンスを検出できることが分かった。

アンチトロンビンのみで不活化した場合、野生型プロトロンビンでは不活化時間10分、20分、30分でのトロンビン活性残存率が53%、32%、18%であったのに対して596Leuプロトロンビンでは、ほとんど不活化されず30分後にも97%であった。明確に不活化制御因子レジスタンスを検出できることが分かった。

596Leuプロトロンビン患者血漿を用いた測定では、患者は静脈血栓症を発症しているためワルファリンを服用し、プロトロンビン活性が約20%に低下していたがトロンビン活性残存率を健常人と比較することで明確に不活化制御因子レジスタンスを検出できることが分かった。

#### 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] (計1件)

① Yuhri Miyawaki, Atsuo Suzuki, Junko Fujita, Asuka Maki, Eriko Okuyama, Moe Murata, Akira Takagi, Takashi Murate, Shinji Kunishima, Michio Sakata, Kohji Okamoto, Tadashi Matsushita, Tomoki Naoe, Hidehiko Saito, Tetsuhito Kojima, Thrombosis from a Prothrombin Mutation Conveying Antithrombin Resistance. The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE. 査読あり 366 巻 2012, 2390-2396

[学会発表] (計4件)

① 高木 明、宮脇由理、鈴木敦夫、藤田絢子、牧明日加、奥山恵理子、村田 萌、村手 隆、松下 正、小嶋哲人、アンチトロンビン抵抗性を検出するトロンビン不活化動態解析法の開発、12回日本検査血液学会学術集会、2011年、倉敷

② Miyawaki Y, Suzuki A, Fujimori Y, Fujita J, Maki A, Takagi A, Murate T, Sakata M, Okamoto K, Matsushita T, Kojima T, A novel prothrombin gene mutation leads to an at-resistant thrombin in a family with inherited thrombophilia, XXIIIth CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, 2011, KYOTO

③ 高木明、宮脇由理、鈴木敦夫、藤田絢子、牧明日加、奥山恵理子、村田萌、村手隆、松下正、小嶋哲人、アンチトロンビン抵抗性解析法とその評価、第58回日本臨床検査医学会学術集会、2011、岡山

④ 高木 明、宮脇由理、鈴木敦夫、藤田絢子、牧明日加、奥山恵理子、村田 萌、村手 隆、松下 正、小嶋哲人、静脈血栓塞栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性とそのスクリーニング検査法、第34回日本血栓止血学会学術集会、2012、東京

[図書] (計0件)

[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：名古屋大学  
種類：特許

番号：特願 2010-289686  
出願年月日：2010.12.27  
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：