

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15663

研究課題名(和文) トロンボモジュリン結合障害型異常プロトロンビンによる血栓形成機構の分子学的解析

研究課題名(英文) Molecular biological analysis of the mechanism of thrombus formation by impaired thrombomodulin binding of abnormal prothrombin

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天性プロトロンビン (PT)異常症家系において同定された無症候性のPT Himi (M380TとR431Hの複合ヘテロ接合体)のリコンビナントPTを作製し、異常PTの分子特性を評価した。M380Tは凝固活性が著しく低下しており、ATRおよびトロンボモジュリン抵抗性 (TMR)を有している可能性が示された。一方で、R431Hは凝固活性の低下は中程度であり、ATRはなくTMRを有している可能性が明らかとなった。したがって、M380TおよびR431H変異に起因する出血傾向は、それらの異常PTが有するATRやTMRという易血栓性の性質によりバランスがとられて、発端者は無症候性になった可能性がある。

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 (PT)の易血栓性の性質であるアンチトロンビン抵抗性 (ATR) とトロンボモジュリン抵抗性 (TMR)に着目した。異常PTは出血性や血栓性など相反する性質を有し、どちらの性質に偏るかによって、患者の臨床症状も様々である。PTおよびその活性化タンパク質であるトロンビンは、凝固関連因子との様々な相互作用を介して、止血作用、抗凝固作用、線維素溶解などを調節している。PT Himiで同定されたM380TとR431Hの特性を詳しく解析することにより、新しい血栓性素因の発見や、現時点では原因不明とされる血栓症の診断につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Asymptomatic prothrombin (PT) Himi (compound heterozygotes of M380T and R431H) was identified in a family with congenital PT abnormalities. These recombinant PTs were generated and the molecular characteristics of the abnormal PTs were evaluated. M380T, with severely reduced coagulation activity, had ATR and TMR. R431H, with moderately decreased coagulation activity, had no ATR but had TMR. Thus, the bleeding tendency caused by the M380T and R431H mutations may have been balanced by the easily thrombogenic properties of ATR and TMR, making the proband asymptomatic.

研究分野：血栓止血学

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

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症例が存在し、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)。トロンビンの抗凝固作用には、トロンボモジュリンと結合することで抗凝固因子のプロテイン C を活性化し、その活性化プロテイン C が凝固反応を阻害する経路と、抗凝固因子のアンチトロンビンと結合することによりトロンビンの凝固活性自体が不活化される経路との 2 つが存在する。現在までに、遺伝子変異を有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に起因した血栓症 (2)に加え、近年、異常プロトロンビンとプロテイン C との結合障害による血栓症 (3) が報告された。

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 PT Himi [p.Mer380Thr (M380T)と p.Arg431His (R431H)の複合ヘテロ接合体] を同定している (4)。431Arg はトロンボモジュリンと直接結合するアミノ酸そのものであり、380Met もトロンビンの立体構造上トロンボモジュリンとの結合部位に近接していることから、M380T および R431H は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、通常 PT 異常症の複合ヘテロ接合体は出血を呈するが、PT Himi の発端者は M380T と R431H の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ったことから、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易血栓性の性質を有す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 やプロテイン C 結合障害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 型異常プロトロンビンの血栓形成メカニズムに関する研究は未だ十分ではない。

2. 研究の目的

M380T および R431H の TMR を含む易血栓性の性質を解析し、複合ヘテロ接合体患者が無症候性となったメカニズムを解明することを目的とした。

(1) 異常トロンビンのアンチトロンビン抵抗性 (ATR) の評価

ATR を評価するアッセイ系を確立し、M380T および R431H の ATR を解析する。

(2) 異常トロンビンのトロンボモジュリン結合障害 (TMR) の評価

TMR を解析する系を確立し、M380T および R431H の TMR を解析する。

(3) 異常トロンビンのプロテイン C 活性化能の評価

異常トロンビンがトロンボモジュリンと結合してプロテイン C を活性化し、生成される活性化プロテイン C 量を測定することで、異常トロンビンのプロテイン C 活性化障害を評価する。

3. 研究の方法

野生型 (WT) および M380T、R431H に加え、ATR を有すると報告されている Yukuhashi (R596L) をポジティブコントロールとして、これらの PT 遺伝子変異を導入した His タグ付き発現ベクターを作製した。発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、安定発現細胞株を樹立

後、培養上清の Ni-NTA アフィニティ精製とバリウム吸着にて高純度の精製リコンビナントプロトロンピン (rPT) を取得した。後述する(1)、(3)、(4)、(5)の実験では、精製した rPT を活性化第 X 因子、活性化第 V 因子、リン脂質、CaCl₂ からなる PT 活性化剤にてトロンピンに活性化させて実験に使用した。

(1) AT 添加残存トロンピン活性測定

37 にてトロンピンに AT を添加し、任意の時間反応させた後、発色合成基質 S-2238 を加え 405nm の吸光度を測定することにより残存トロンピン活性を算出した。反応時間 0 分時点の活性を 100% とし、反応時間による残存トロンピン活性の低下を解析した。

(2) ウェスタンブロットによるトロンピン-アンチトロンピン複合体 (TAT) 形成能評価

37 にて rPT に PT 活性化剤を加え 15 分間インキュベートし、トロンピンへと活性化させた。次に AT を添加し、10 分間インキュベートしてトロンピンと AT とを反応させて TAT を形成させた。その後反応を停止させ、ウェスタンブロットングにて TAT を検出し、シグナル強度を Image J にて解析して TAT 形成率を算出した。

(3) 表面プラズモン共鳴法 (SPR) による AT 親和性解析

トロンピンを His タグを介して NTA センサーチップに固相化し、AT との複合体形成による消失光角度の変化をレスポンスとして検出し、解離定数 (KD) を算出した。算出した KD からトロンピンと AT の親和性解析を行った。

(4) SPR による TM 親和性解析

トロンピンを His タグを介して NTA センサーチップに固相化し、TM との複合体形成による消失光角度の変化を検出し、解離定数 (KD) を算出した。算出した KD からトロンピンと TM の親和性解析を行った。

(5) TM 存在下でのトロンピンによる活性化プロテイン C 生成能評価

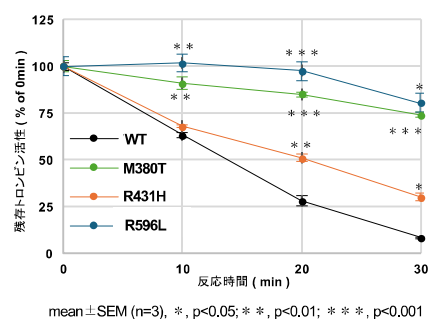
-TM を加えたトロンピンをプロテイン C に添加し、プロテイン C を活性化させ活性化プロテイン C (APC) を生成させ、任意の時間反応させた後、トロンピン不活剤の PPACK を加え反応を停止させた。発色合成基質 S-2366 を加え吸光度を測定し、濃度既知の APC を用いて作成した検量線から反応時間による APC 生成量を算出し、プロテイン C 活性化障害の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) AT 添加残存トロンピン活性測定 (図 1)

反応時間 30 分後の時点で WT が 9% に対し、R596L は 81% と著しい ATR を示しており ($p < 0.001$)、アッセイ系に問題がないことを確認した。M380T は反応時間 30 分後も残存トロンピン活性が 75% と有意に高値を示した ($p < 0.001$)。一方、R431H は反応時間 30 分後では 30% と WT と有意な差を認めたが ($p < 0.05$)、10 分後では有意差は認められなかった。

図1. AT添加残存トロンピン活性測定の結果



(2) ウェスタンブロットによる TAT 形成能評価 (図 2)

TAT およびトロンピンのバンドを Image J でバンド定量し、トロンピン全量のうち TAT を形成した割合を TAT 形成率 [TAT/(TAT+トロンピン)] として算出して比較した。WT の TAT 形成率が 96% に対し、ATR を示す R596L は 12% と著明に低値を示し ($p < 0.001$)、アッセイ系に問題が

ないことを確認した。M380T は 72% と TAT 形成率が WT に比べ有意に低下し ($p<0.001$)、R431H は 92% と WT と同等であった。

(3) 表面プラズモン共鳴法 (SPR) による異常トロンピンと AT の親和性解析

算出した解離定数 (KD) は WT が

0.61×10^{-7} M に対し、ATR を示す R596L では 8.66×10^{-7} M と有意に親和性低下を示し ($p<0.001$)、アッセイ系に問題がないことを確認した。R431H の KD は 0.79×10^{-7} M と WT と同等であったが、M380T では 2.66×10^{-7} M ($p<0.001$) と有意に親和性が低いことが明らかとなった。

(4) SPR による異常トロンピンと TM の親和性解析

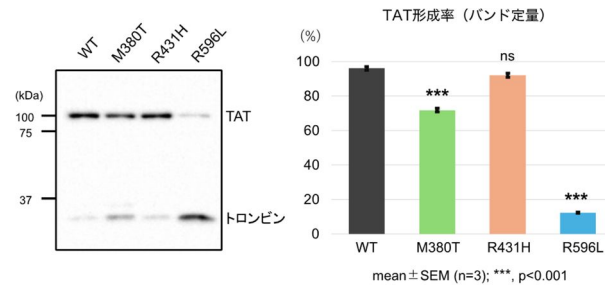
算出した解離定数 (KD) は WT が 1.11×10^{-5} M に対し、M380T および R431H では KD を算出できない程にレスポンスが低く、ほとんど TM と結合しない可能性が示唆された。装置故障による実験中断で $n=1$ のため、今後 n 数を増やして正確な測定結果を算出する。

(5) TM 存在下でのトロンピンによる活性化プロテイン C (APC) 生成能評価

30 分後の APC 生成量は、WT が 18.2 nM/nM thrombin に対し、M380T が 0.67 nM/nM thrombin ($p<0.05$)、R431H が 3.34 nM/nM thrombin ($p<0.05$) と活性化プロテイン C 生成量の著減が確認された。

以上の結果より、M380T は AT 添加残存トロンピン活性測定、ウエスタンブロットによる TAT 形成能評価、SPR による AT 親和性解析より中程度の ATR が示唆された。また、TM 存在下でのトロンピンによる活性化プロテイン C 生成試験、SPR による TM 親和性解析より TM との結合障害による重度のプロテイン C 活性化障害が示唆された。M380 は AT、TM との結合部位そのものではないにも関わらず結合障害があること、タンパク質高次構造上やや内部に位置していることから、変異によってトロンピンの構造そのものが大きく変化している可能性が考えられた。一方で、R431H は ATR を認めなかったが、TM 存在下でのトロンピンによる活性化プロテイン C 生成試験、SPR による TM 親和性解析より TM との結合障害による重度のプロテイン C 活性化障害が示唆された。また R431 は TM との結合部位そのものであり、変異によって TM との結合障害が起きていると推察された。以上のように、PTHimi の出血傾向は M380T、R431H それぞれの易血栓性によって緩和されており、奇跡的にバランスがとられ、無症候性であったと推察した。

図2. ウエスタンブロットによるTAT形成能解析の結果



<引用文献>

- 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) Yoshida R, *et al.*, Familial pulmonary thromboembolism with a prothrombin mutation and antithrombin resistance. *J Cardiol Cases*. 2018;17(6):197-199.
- 3) Wu X, *et al.*, prothrombin Arg541Trp mutation leads to defective PC (Protein C) pathway activation and constitutes a novel genetic risk factor for venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(2):483-494.

- 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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagaya Satomi, Togashi Tomoki, Akiyama Masaharu, Imai Yuta, Matsumoto Haruto, Moriya Haruka, Meguro-Horike Makik, Yasuda Ibuki, Kikuchi Yuika, Kuwajima Yamato, Horike Shin-ichi, Watanabe Atsushi, Morishita Eriko	4. 巻 229
2. 論文標題 Protein S deficiency caused by cryptic splicing due to the novel intron variant c.346+5G>C in PROS1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 26 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2023.06.020	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 -
1. 著者名 Imai Yuta, Nagaya Satomi, Araisu Yuhei, Meguro-Horike Makiko, Togashi Tomoki, Horike Shin-ichi, Kawasaki Hiroshi, Morishita Eriko	4. 巻 230
2. 論文標題 Functional analysis of two abnormal antithrombin proteins with different intracellular kinetics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 18 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2023.08.010	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 -
1. 著者名 Nagaya Satomi, Togashi Tomoki, Meguro-Horike Makiko, Matsumoto Haruto, Imai Yuta, Yamaguchi Koichi, Fujii Yoshinari, Moriya Haruka, Kikuchi Yuika, Yasuda Ibuki, Horike Shin-ichi, Morishita Eriko	4. 巻 233
2. 論文標題 Identification of two de novo variants causing inherited antithrombin deficiency by quantitative analysis of variant alleles	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 37 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2023.11.016	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 -
1. 著者名 Noiri Jun-ichi, Matsuzoe Hiroki, Nagaya Satomi, Nishio Ryo, Matsumoto Daisuke, Takaishi Hiroshi, Morishita Eriko	4. 巻 26
2. 論文標題 A case of venous thromboembolism caused by protein C deficiency due to a novel gene mutation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 360 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2022.07.012	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 -

1. 著者名 Imai Yuta, Nagaya Satomi, Araisu Yuhei, Meguro-Horike Makiko, Togashi Tomoki, Ohmori Kensho, Makita Yuka, Sato Eiichi, Yujiri Toshiaki, Nagamori Yuta, Horike Shin-ichi, Watanabe Atsushi, Morishita Eriko	4. 巻 117
2. 論文標題 Identification and functional analysis of three novel genetic variants resulting in premature termination codons in three unrelated patients with hereditary antithrombin deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 523 ~ 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03509-3	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 安田 芽生, Lopes Tiago J.S., Ferreira Marcos V., Alencar Brenno M., Rios Ricardo A., Rios Tatiane N., 長屋 聡美, 森下 英理子
2. 発表標題 コンピューター解析によって解明された血栓形成傾向に重要なプロテインC構造特性
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長屋 聡美, 山口 孝一, 松井 杏沙佳, 津田 友秀, 森下 英理子
2. 発表標題 細菌感染症に伴うDICにおけるPS切断による抗凝固能低下の可能性
3. 学会等名 第24回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 陽斗, 長屋 聡美, 目黒 牧子, 今井 湧太, 竹川 清太郎, 築田 怜奈, 西野 優那, 富樫 朋貴, 大森 健聖, 牧田 友香, 森屋 羽瑠雅, 奥野 隆祐, 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2症例に同定された新規遺伝子バリエーション
3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊池 結香, 牧田 友香, 長屋 聡美, 今井 湧太, 富樫 朋貴, 大森 健聖, 安田 芽生, 松本 陽斗, 森屋 羽瑠雅, 目黒 牧子, 堀家 慎一, 森下 英理子
2. 発表標題 新規に同定されたI型遺伝性アンチトロンビン欠乏症p.Cys32Trpの細胞内動態解析
3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田 芽生, 長屋 聡美, 大森 健聖, 富樫 朋貴, 今井 湧太, 森屋 羽瑠雅, 菊池 結香, 牧田 友香, 松本 陽斗, 目黒 牧子, 三浦 晃子, 堀家 慎一, 森下 英理子
2. 発表標題 プロテインC遺伝子における新規バリエーションp.Leu173Proおよびp.Val1241Leuの細胞内動態の解析
3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桑島 大和, 長屋 聡美, 大森 健聖, 今井 湧太, 富樫 朋貴, 牧田 友香, 松本 陽斗, 森屋 羽瑠雅, 安田 芽生, 菊池 結香, 神窪 勇一, 森下 英理子
2. 発表標題 出血傾向を呈する異常プロトロンビンSegoviaの機能解析
3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹川清太郎, 長屋聡美, 桑島大和, 今井湧太, 松本陽斗, 森屋羽瑠雅, 菊池結香, 安田芽生, 築田怜奈, 西野優那, 油井陸斗, 高村禅, 森下英理子
2. 発表標題 Prothrombin Himiのアンチトロンビン抵抗性および活性化プロテインC経路障害の解明
3. 学会等名 第47回北陸臨床病理集談会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桑島大和, 長屋聡美, 今井湧太, 松本陽斗, 森屋羽瑠雅, 菊池結香, 安田芽生, 竹川清太郎, 築田怜奈, 西野優那, 油井陸斗, 神窪勇一, 森下英理子
2. 発表標題 出血傾向を呈する異常プロトロンビンSegoviaの機能解析
3. 学会等名 第47回北陸臨床病理集談会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 築田怜奈, 長屋聡美, 松本陽斗, 今井湧太, 菊池結香, 安田芽生, 森屋羽瑠雅, 桑島大和, 竹川清太郎, 西野優那, 油井陸斗, 目黒牧子, 堀家慎一, 荒磯裕平, 森下英理子
2. 発表標題 先天性アンチトロンビン欠乏症患者に同定された新規バリエーションp. Tyr395Asnの分子病態解析
3. 学会等名 第47回北陸臨床病理集談会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 油井陸斗, 安田芽生, 長屋聡美, 今井湧太, 松本陽斗, 菊池結香, 森屋羽瑠雅, 桑島大和, 竹川清太郎, 築田怜奈, 西野優那, 目黒牧子, 堀家慎一, 森下英理子
2. 発表標題 遺伝性プロテインC欠乏症患者に同定された新規バリエーションc.302G>T, p.Cys101Pheの症例報告
3. 学会等名 第47回北陸臨床病理集談会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田芽生, 油井陸斗, 長屋聡美, 今井湧太, 松本陽斗, 菊池結香, 森屋羽瑠雅, 桑島大和, 竹川清太郎, 築田怜奈, 西野優那, 目黒牧子, 堀家慎一, 森下英理子
2. 発表標題 新規バリエーションp.Cys64*を有する遺伝性プロテインC欠乏症の一例
3. 学会等名 第47回北陸臨床病理集談会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長屋 聡美, 富樫 朋貴, 今井 湧太, 大森 健聖, 牧田 友香, 秋山 政晴, 目黒 牧子, 堀家 慎一, 渡邊 淳, 森下 英理子
2. 発表標題 新規スプライシング異常に起因した遺伝性プロテインS欠乏症患者の病態解析
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satomi Nagaya, Koichi Yamaguchi, Eriko Morishita
2. 発表標題 Effects of sample processing on antithrombin and protein C activity
3. 学会等名 International Society for Laboratory Hematology 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satomi Nagaya, Koichi Yamaguchi, Asaka Matsui, Tomohide Tsuda, Eriko Morishita
2. 発表標題 The potential of PS cleavage to regulate anticoagulant function in septic DIC
3. 学会等名 The 17th Cngress of Asian Society for Clinical Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takako Terakami, Satomi Nagaya, Yusuke Nakade, Hiroyasu Oe, Megumi Oshima, Mika Mori, Yoshio Saka, Toshihumi Gabata, Eriko Morishita
2. 発表標題 The effect of the factor Xa inhibitors on plasma protein S activity
3. 学会等名 The 17th Cngress of Asian Society for Clinical Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoki Togashi, Satomi Nagaya, Makiko Meguro-Horike, Yuta Imai, Yuka Makita, Kensho Omori, Shin-Ichi Horike, Eriko Morishita
2. 発表標題 Molecular characterization of a novel splicing mutation of the PROS1 gene causing inherited protein S deficiency
3. 学会等名 The 17th Cngress of Asian Society for Clinical Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------