

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461465

研究課題名(和文)凝固線溶系遺伝子変異マウスを用いた本邦血栓症の分子病態学的特徴の確立

研究課題名(英文) Analysis of molecular pathogenesis of thrombosis in Japanese using mice with genetic mutations in anticoagulation/fibrinolytic factors

研究代表者

坂野 史明 (Banno, Fumiaki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：00373514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：日本人にはプロテインS (PS) のK196E変異が約2%の頻度で存在し、静脈血栓塞栓症 (VTE) のリスクとなっている。プラスミノゲン (Plg) のA620T変異も約4%の頻度で見られる。本研究ではこれらの変異をもつマウスを用いて日本人のVTEの特徴を解析した。3種類のVTEモデルを用いて変異の影響を評価した結果、PS-K196EマウスではPS欠損マウスや白人型血栓モデル凝固V因子-R504Qマウスと同様に症状が重篤化したため、本変異が日本人のVTE増悪要因となることが明確になった。一方、Plg-A622TマウスのVTE症状は野生型マウスと同様であったため、本変異はリスクではないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The K196E mutation in protein S (PS) is a genetic risk factor for venous thromboembolism (VTE) with a prevalence of ~2% within the Japanese population. The A620T mutation in plasminogen (Plg), originally identified in a VTE patient, is present in ~4% of the Japanese population. We generated PS-K196E mice, PS-deficient mice and Plg-A622T mice. In this study, we analyzed their venous thrombotic states, comparing with mice carrying the factor V (FV) R504Q mutation, a genetic risk for VTE in Caucasians. A deep vein thrombosis model and two pulmonary embolism model experiments revealed that PS-K196E mice, PS-deficient mice and FV-R504Q mice were much more susceptible to VTE compared with wild-type mice, supporting a causal relationship between the PS-K196E mutation and VTE. However, experimental models of VTE showed largely similar phenotypes in Plg-A622T mice and wild-type mice. Hence, our results showed that the Plg-A620T mutation does not increase the risk of VTE.

研究分野：血栓止血学

キーワード：プロテインS プラスミノゲン ノックインマウス 遺伝子変異 日本人の血栓症

1. 研究開始当初の背景

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天的異常は血栓症のリスクとなるが、原因となる遺伝子変異は人種間で大きく異なる。白人では凝固第Ⅴ因子 (FV) Leiden 変異 (R506Q 変異, マウスでは R504Q) が血栓症の遺伝的リスクとなるが、この変異は日本人には存在しない。当研究室では、日本人の静脈血栓症患者を収集、解析し、その遺伝的背景として凝固制御因子プロテイン S (PS) の K196E 変異を同定した。本変異は日本人の約 55 人に 1 人に認められ、全国で約 1 万人がホモ接合体であると推計される。また、日本人には線溶因子プラスミノゲン (Plg) の活性を低下させる A620T 変異 (マウスでは A622T) も約 25 人に 1 人の頻度で認められ、約 5 万人がホモ接合体であると推計される。申請者は多くの日本人が持つこれらの遺伝子変異に着目し、PS-K196E 変異マウス、PS 欠損マウス、Plg-A622T 変異マウスを樹立した。

研究開始当初までに、これらの変異マウスの解析から、PS 変異マウスでは血漿中の PS 活性が、Plg-A622T マウスでは Plg 活性が、それぞれ低下することを確認していた。さらに、脳梗塞に及ぼす変異の影響を解析するため、局所脳虚血再灌流モデルによる検討を行った結果、いずれの変異マウスにおいても脳梗塞巣の拡大や神経症状の悪化は認められなかった。PS-K196E 変異および Plg-A620T 変異は日本人の脳梗塞の遺伝的背景とはならないと考えられ、実際これまでに両変異と脳梗塞との関連を示す報告はない。一方、並行して解析した FV-R504Q マウスでは、脳梗塞巣の著明な拡大が認められ、本変異が白人の脳梗塞リスクであることと一致する結果が得られた。これらの結果から、申請者が樹立したマウスは、日本人の血栓症の遺伝的特異性、とりわけ欧米との違いを解明する上で、良いモデル動物であると考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、静脈系血栓症を中心に日本人の血栓症における PS-K196E 変異および Plg-A620T 変異の分子病態学的意義を確立するため、静脈血栓誘発モデルを用いて PS-K196E 変異マウス、PS 欠損マウス、Plg-A622T 変異マウスの応答を白人型血栓症モデルである FV-R504Q 変異マウスと比較解析した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

野生型マウス、PS-K196E 変異マウス、PS 欠損ヘテロ接合体マウス、Plg-A622T 変異マウスおよび、FV-R504Q 変異マウスを解析対象とした。

動物実験は国立循環器病研究センター動物実験委員会の承認を得て実施した。

(2) 深部静脈血栓症モデル

マウス下大静脈にステンレス電極を挿入して 200 μ A・10 分間通電した。電極の電気分解の結果生じるフリーラジカルにより、血管内皮細胞が活性化し、血栓形成が誘発される。生じる血栓が最大となる処置 2 日目に採血して末梢血血小板数を測定後、実体顕微鏡下に下大静脈内血栓を取り出し、その重量を測定した。また、血漿中の凝固活性化マーカーとしてトロンビン-アンチトロンビン複合体濃度、炎症マーカーとしてインターロイキン-6 濃度を測定した。

(3) 肺塞栓モデル

マウスに外因系凝固を活性化する組織因子または内因系凝固を活性化する長鎖ポリリン酸を下大静脈から投与することで肺塞栓を惹起し、呼吸停止までの時間を 20 分間測定して生存率を調べた。また、呼吸停止 2 分後に右心室から Evans blue を注入し、肺全体の染色像から肺血管閉塞スコア (0 = 閉塞無し ~ 4 = 完全閉塞の 5 段階) を判定した。

(4) 肝臓 Plg mRNA の定量 RT-PCR 解析

マウス肝臓から RNA を抽出し、Plg mRNA の発現量を QuantiFast Probe RT-PCR kit (Qiagen) を用いた定量 RT-PCR により解析した。

(5) 血漿 Plg のウエスタンブロット解析

マウス血漿にヒトウロキナーゼ型 Plg アクティベーターを加えて Plg をプラスミンに変換前後のサンプルを SDS-PAGE で分離後、抗マウス Plg 抗体 (Assaypro) を用いたウエスタンブロットにより、Plg およびプラスミンを検出した。

(6) 血漿フィブリン塊溶解活性の測定

マウス血漿にヒト組織型 Plg アクティベーターを加えて Plg をプラスミンに活性化後、トロンビンと塩化カルシウムを添加してフィブリン形成を惹起し、波長 405 nm の吸光度変化を 5 分間隔でモニターした。吸光度はフ

ィブリン形成により一旦上昇するが、プラスミンによる分解で緩やかに低下する。この吸光度変化を元にフィブリン塊溶解活性を測定した。

(7) 皮膚創傷モデル

マウス背部を剃毛し、生検トレパンを用いて直径 5 mm の皮膚全層欠損創を一匹あたり 4 ヶ所作製した。各創部の面積を経日的に 2 週間測定し、治癒過程の進行度に違いが見られるか解析した。

(8) 二重変異マウスの作製

日本人に高頻度で認められる PS-K196E 変異と P1g-A620T 変異は相乗的に作用して病状を悪化させる可能性がある。そこで PS-K196E 変異マウスと P1g-A622T 変異マウスの交配により、二重変異マウスを作製した。

4. 研究成果

(1) 静脈血栓症（深部静脈血栓症および肺塞栓症）モデル

深部静脈血栓症モデルによる解析の結果、下大静脈に形成された血栓重量は野生型マウスに比べて、PS-K196E 変異マウス、PS 欠損マウス、FV-R504Q 変異マウスで増加した。これらのマウスでは消耗性と考えられる血小板減少も野生型マウスに比べて重篤化した。また、血漿トロンビン-アンチトロンビン複合体およびインターロイキン-6 濃度が野生型マウスに比べて上昇しており、凝固反応や炎症反応の活性化に伴って静脈血栓形成が亢進したと考えられた。一方、P1g-A622T 変異マウスでは深部静脈血栓誘発後の下大静脈内血栓重量や血小板減少は野生型と同等であり、P1g-A620T 変異は深部静脈血栓症の増悪要因ではないと考えられた。

肺塞栓モデルを用いた検討の結果、組織因子投与後の生存率は、PS-K196E 変異マウス、PS 欠損マウス、FV-R504Q 変異マウスで野生型マウスに比べて低下した。同様に、長鎖無機ポリリン酸投与後の生存率も野生型マウスに比べて、PS-K196E 変異マウス、PS 欠損マウス、FV-R504Q 変異マウスで低下した。これらのマウスでは、いずれも肺血管閉塞スコアが野生型マウスに比べて上昇しており、肺塞栓症状が重症化していた。以上の結果から、PS-K196E 変異は PS ヘテロ欠損や FV-R504Q 変異と同様に、マウス静脈血栓症の増悪要因となることが明らかとなった。一

方、P1g-A622T 変異マウスでは肺塞栓誘発後の生存率および肺血管閉塞スコアに野生型マウスと違いは認められなかった。したがって、PS-K196E 変異とは異なり、P1g-A620T 変異は静脈血栓症の増悪要因とはならないと考えられた。

(2) P1g mRNA 発現、ウエスタンブロット解析および血漿フィブリン塊溶解活性

以前の検討から、P1g-A622T 変異マウスでは、血漿 P1g 活性および抗原量が共に低下することがわかっていた。にもかかわらず、P1g-A622T 変異マウスに静脈血栓症状の悪化は見られなかった。そこで、本変異の P1g 産生および血栓溶解能への影響をさらに詳しく解析した。

P1g の主要産生器官である肝臓から RNA を抽出して定量 RT-PCR 解析を行った結果、P1g-A622T 変異マウスの P1g mRNA 発現量は野生型マウスに比べて微増していることがわかった。血漿のウエスタンブロット解析により、P1g-A622T 変異体タンパク質は野生型 P1g と同じ分子量を持ち、プラスミンへの変換にも異常は見られないことが明らかとなった。血漿フィブリン塊溶解活性を測定した結果、P1g-A622T 変異マウスでは、野生型マウスに比べて顕著な血栓溶解活性低下が認められた。これらの結果から、P1g-A622T 変異マウスでは、P1g の翻訳または分泌の異常とプラスミン活性低下が生じており、血漿 P1g の合成基質切断活性だけでなく、フィブリン溶解活性が低下していることが明らかとなった。

(3) 皮膚創傷モデル

P1g-A622T 変異マウスにおける P1g 活性低下が組織線溶および組織修復に影響を及ぼすかどうかを解析するため、P1g-A622T 変異マウスに皮膚全層欠損創を作製し、その治癒過程を追跡した結果、P1g-A622T 変異マウスの皮膚創は野生型マウスと同様に 12~14 日でほぼ完全に修復されることが判明した。創面積の経日変化にも、両群間で違いは無く、P1g-A620T 変異は創傷治癒遅延の原因とはならないと考えられた。

(4) 二重変異マウスの解析

PS-K196E 変異マウスと P1g-A622T 変異マウスの交配により二重変異マウスを作製した結果、両変異共にホモ接合体となったマウスも出生、発育可能なことが確認できた。

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6件)

- ① Banno F, Kita T, Fernández JA, Yanamoto H, Tashima Y, Kokame K, Griffin JH, Miyata T, Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying protein S K196E mutation, *Blood*, 査読有, 126, 2247-2253, 2015 (DOI: 10.1182/blood-2015-06-653162) .
- ② Tashima Y, Banno F, Akiyama M, Miyata T, Influence of ADAMTS13 deficiency on venous thrombosis in mice, *Thromb Haemost*, 査読有, 114, 206-207, 2015 (DOI: 10.1160/TH14-08-0656) .
- ③ 坂野史明, 宮田敏行, Introduce My Article, *臨床血液*, 査読有, 56, 2357-2358, 2015 (DOI: 10.11406/rinketsu.56.2357) .
- ④ 坂野史明, 特集 遺伝的素因による血栓症 7. 血栓症のモデルマウス, *血液フロンティア*, 査読無, 25, 73-79, 2015 (https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=29312) .
- ⑤ Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M, Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation, *Haematologica*, 査読有, 99, e211-e213, 2014 (DOI: 10.3324/haematol.2014.109512) .
- ⑥ 坂野史明, 宮田敏行, 藤岡政行, 杉本充彦, 遺伝子改変血栓モデル: ADAMTS13 遺伝子欠損マウスを中心に, *Thrombosis Medicine*, 査読無, 3, 132-139, 2013 (http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=961) .

[学会発表] (計24件)

- ① 坂野史明, 遺伝子改変血栓症モデルマウ

スを用いた深部静脈血栓症の病態解析と新規治療法の開発, 第56回日本脈管学会総会, バイエル循環器病研究助成第22回研究発表会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 2015年10月30日.

- ② 柏木浩和, 清水一亘, 國島伸治, 坂野史明, 加藤恒, 森川陽一郎, 田所誠司, 小亀浩市, 本田繁則, 宮田敏行, 金倉讓, 富山佳昭, α IIb β 3 活性化変異、 α IIb(R990W)KI マウスは巨大血小板減少症とともに血小板機能障害をきたす, 第37回日本血栓止血学会学術集会, 甲府市総合市民会館, 2015年5月22日.
- ③ Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima H, Banno F, Morikawa Y, Kato H, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y, GT-like phenotype with macrothrombocytopenia induced by α IIb β 3 activating mutation in mice, 第76回日本血液学会学術集会, 於: 大阪国際会議場, 2014年11月2日.
- ④ 坂野史明, Mouse models of venous thrombosis in Japanese, 第87回日本生化学会大会, シンポジウム 1S11p, 京都国際会館, 2014年10月15日.
- ⑤ 田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行, 日本人に高頻度に見られるプラスミノージェン栃木変異をもつ遺伝子改変マウスの血栓傾向の解析, 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 千里ライフサイエンスセンター, 2014年8月8日.
- ⑥ 清水一亘, 柏木浩和, 森川陽一郎, 加藤恒, 田所誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 本田繁則, 金倉讓, 宮田敏行, 富山佳昭, インテグリン α IIb β 3 活性化変異、 α IIb(R990W)ノックインマウスの解析, 第36回日本血栓止血学会学術集会, 大阪国際交流センター, 2014年5月31日.
- ⑦ 粕田承吾, 松井英人, 大野史郎, 西尾健治, 坂野史明, 秋山正志, 宮田敏行, 羽竹勝彦, 杉本充彦, マウス敗血症モデルによる von Willebrand 因子-ADAMTS13 軸の炎症制御機構, 第36回日本血栓止血学会学術集会, 大阪国際交流センター, 2014年5月31日.
- ⑧ 田嶋優子, 坂野史明, 宮田敏行, ADAMTS13 遺伝子欠損マウスの静脈血栓塞

- 栓症状の解析, 第 36 回日本血栓止血学会
学術集会, 大阪国際交流センター, 2014
年 5 月 31 日.
- ⑨ 坂野史明, 田嶋優子, 小亀浩市, 宮田敏
行, 深部静脈血栓症モデルを用いた日本
人の血栓症モデルマウスの解析, 第 36 回
日本血栓止血学会学術集会, 大阪国際交
流センター, 2014 年 5 月 31 日.
- ⑩ 坂野史明, 静脈血栓症の in vivo 解析,
第 36 回日本血栓止血学会学術集会, ワー
クショップ 2, 大阪国際交流センター,
2014 年 5 月 29 日.
- ⑪ Banno F, Tashima Y, Kita T, Matsuda
Y, Yanamoto H, Kokame K, Miyata T,
Analysis of mice carrying northeast
Asian-specific genetic mutations in
thrombosis, The 18th International
Vascular Biology Meeting 2014, みやこ
めっせ, 2014 年 4 月 15 日.
- ⑫ 坂野史明, モデルマウスを利用した日本
人の静脈血栓症の遺伝的特異性の解明,
第 39 回日本脳卒中学会総会, バイエル循
環器病研究助成第 20 回研究発表会, 大阪
国際会議場, 2014 年 3 月 14 日.
- ⑬ 坂野史明, 日本人の血栓性遺伝素因を持
つモデルマウスの樹立と解析, 第 8 回日
本血栓止血学会学術標準化委員会シンポ
ジウム, 野村コンファレンスプラザ日本
橋, 2014 年 2 月 22 日.
- ⑭ Tashima Y, Banno F, Kita T, Matsuda
Y, Yanamoto H, Miyata T, Generation
and characterization of homozygous
plasminogen-Tochigi mutant mice
bearing reduced fibrinolytic
activity, Gordon Research
Conferences, Plasminogen Activation &
Extracellular Proteolysis, Flash
Talks, Four Points Sheraton/Holiday
Inn Express, Ventura, USA, 2014 年 2 月
13 日.
- ⑮ Tashima Y, Banno F, Kita T, Matsuda
Y, Yanamoto H, Miyata T, Generation
and characterization of homozygous
plasminogen-Tochigi mutant mice
bearing reduced fibrinolytic
activity, Gordon Research Seminar,
Plasminogen Activation &
Extracellular Proteolysis, Molecular
Mechanisms of Extracellular
Proteolysis, Four Points
Sheraton/Holiday Inn Express,
Ventura, USA, 2014 年 2 月 8 日.
- ⑯ 田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰
幸, 柳本広二, 宮田敏行, マウスプラス
ミノゲン栃木変異は血漿プラスミン活
性を低下させるが血栓塞栓症の原因には
ならない, 第 86 回日本生化学会大会, パ
シフィコ横浜, 2013 年 9 月 13 日.
- ⑰ Matsui H, Doi M, Matsunari Y, Takeda
M, Nishio K, Shima M, Soejima K,
Banno F, Miyata T, Sugimoto M,
ADAMTS13 accelerates the cell
engraftment efficacy in mouse model
of bone marrow transplantation, The
International Society on Thrombosis
and Haemostasis XXIV Congress,
Amsterdam RAI, Amsterdam,
Netherlands, 2013 年 7 月 4 日.
- ⑱ Banno F, Kita T, Yanamoto H, Tashima
Y, Kokame K, Miyata T, Exacerbated
venous thromboembolism in mice with
the protein S Tokushima mutation, The
International Society on Thrombosis
and Haemostasis XXIV Congress,
Amsterdam RAI, Amsterdam,
Netherlands, 2013 年 7 月 2 日.
- ⑲ Tashima Y, Banno F, Kita T, Matsuda
Y, Yanamoto H, Miyata T, Generation
and characterization of homozygous
plasminogen-Tochigi mutant mice
bearing reduced fibrinolytic
activity, The International Society
on Thrombosis and Haemostasis XXIV
Congress, Amsterdam RAI, Amsterdam,
Netherlands, 2013 年 7 月 1 日.
- ⑳ Banno F, Genetic mouse models of
venous thrombosis for Japanese, 59th
Annual SSC Meeting of the
International Society on Thrombosis
and Haemostasis, Amsterdam RAI,
Amsterdam, Netherlands, 2013 年 6 月 29
日.
- 21 松井英人, 土井政明, 武田麻衣子, 松成
泰典, 西尾健治, 嶋緑倫, 副島見事, 粕
田承吾, 坂野史明, 宮田敏行, 杉本充彦,
マウス骨髄移植モデルにおける ADAMTS13
の移植ドナー細胞生着促進効果, 第 35 回
日本血栓止血学会学術集会, 山形国際ホ
テル, 2013 年 6 月 1 日.

- 22 土井政明, 松井英人, 竹田征治, 齋藤能彦, 武田麻衣子, 松成泰典, 西尾健治, 嶋緑倫, 坂野史明, 秋山正志, 小亀浩市, 宮田敏行, 杉本充彦, マウス急性心筋梗塞モデルにおける ADAMTS13 の心筋保護作用, 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形国際ホテル, 2013 年 6 月 1 日.
- 23 田嶋優子, 坂野史明, 喜多俊行, 松田泰幸, 柳本広二, 宮田敏行, プラスミノーゲン栃木変異ホモ接合体マウスの血栓傾向の解析, 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形国際ホテル, 2013 年 5 月 31 日.
- 24 Banno F, Kita T, Yanamoto H, Tashima Y, Kokame K, Miyata T, Generation of protein S-Tokushima mutant mice to provide an in vivo evaluation system for thrombosis in Japanese, 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, SPC シンポジウム 4, 山形国際ホテル, 2013 年 5 月 30 日.

[図書] (計 1 件)

- ① 宮田敏行, 坂野史明, 中外医学社, Annual Review 血液 2014, 血栓症と炎症におけるポリリン酸の役割, 216-223, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 史明 (BANNO FUMIAKI)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員
研究者番号: 00373514

(2) 研究分担者

秋山 正志 (AKIYAMA MASASHI)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号: 30298179

宮田 敏行 (MIYATA TOSHIYUKI)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・シニア研究員
研究者番号: 90183970

(3) 連携研究者

なし