

平成28年度学位申請論文

**Missense mutations in the gene encoding prothrombin  
corresponding to Arg596 cause antithrombin resistance  
and thrombomodulin resistance**

(プロトロンビン Arg596 におけるミスセンス変異は  
アンチトロンビン抵抗性とトロンボモジュリン抵抗性を引き起こす)

名古屋大学大学院医学系研究科

医療技術学専攻

(指導:小嶋 哲人 教授)

高木 夕希

# 主論文の要約

## **Missense mutations in the gene encoding prothrombin corresponding to Arg596 cause antithrombin resistance and thrombomodulin resistance**

(プロトロンビン Arg596 におけるミスセンス変異は  
アンチトロンビン抵抗性とトロンボモジュリン抵抗性を引き起こす)

高木 夕希

### **【緒言】**

静脈血栓塞栓症は生理的抗凝固因子の欠損症・異常症などの先天的要因と、加齢、肥満、長期臥床、妊娠、悪性腫瘍などの後天的要因が重なり発症する複雑な多因子性疾患である。

アンチトロンビン (antithrombin: AT) は、生体内でトロンビンなどのセリンプロテアーゼと 1 対 1 で結合することでその凝固活性を抑制する重要な抗凝固因子である。2012 年に当研究室は、AT 抵抗性により血栓症の原因となり得るプロトロンビン遺伝子 (*F2*) のミスセンス変異、プロトロンビン Yukuhashi 変異(c.1787G>T, p.Arg596Leu) を報告した。本変異型プロトロンビンの活性型である変異型トロンビンは野生型トロンビンと比較して凝固活性がやや低下している一方で、AT との複合体形成能が大きく損なわれていた。

また、トロンビンはトロンボモジュリン (thrombomodulin: TM) と結合することで凝固活性を失い、さらにはプロテイン C (PC) を活性化して活性化 PC (activated PC: APC) を産生する抗凝固的なはたらきに転じることから、TM も生理的なトロンビンの制御に重要である。我々はこれまで、596Leu 変異型トロンビンが TM による凝固活性制御にも抵抗性を示すことを明らかにしてきた。

ゲノム遺伝子上の一塩基置換はヒト生体内で一定頻度に発生する。本研究では *F2* での Arg596 コドン (CGG) の一塩基置換により生じうる 596Leu (CTG) 以外のミスセンス変異体 (596Gln (CAG)、596Trp (TGG)、596Gly (GGG)、596Pro (CCG)) が AT あるいは TM による抗凝固作用に及ぼす影響を評価した。

## 【方法】

596Gln、596Trp、596Gly、596Pro 変異型プロトロンビン発現ベクターを作製し、各変異型発現ベクターをヒト胎児腎由来 HEK293 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入したのち、G418 による薬剤選択により安定発現細胞株を得た。各細胞株の培養上清・細胞溶解液のウェスタンブロッティング解析を行った。ビタミン K 含有無血清培地にて 24 時間培養して得られた培養上清を限外濾過にて濃縮後、ELISA により含まれるプロトロンビン量を定量し、各組換え型プロトロンビンをプロトロンビン欠乏血漿に添加した擬似患者血漿を検体として、凝固一段法ならびに合成基質二段法にて各変異型プロトロンビンの凝固機能を解析した。

各変異型プロトロンビン由来トロンビンの AT による不活化解析を実施した。十分に活性化した各トロンビン検体に AT を混和し、一定時間後に残存トロンビン活性を決定した。次に、各変異型トロンビンの TAT 形成能を評価した。十分に活性化した各トロンビン検体にヘパリン存在下／非存在下で AT を混和したのち、様々な時間で形成された TAT 量を ELISA により定量した。また、各変異型プロトロンビンのトロンビン活性化相とその不活化相を評価するため、トロンビン生成試験 (thrombin generation assay: TGA) を実施した。

各変異型プロトロンビン由来トロンビンの TM による不活化解析を行った。十分に活性化した各トロンビン検体に、組換え型可溶性 TM (sTM) を添加して 1 分後に精製ヒトフィブリノゲンを混和し、凝固時間法により残存トロンビン活性を測定した。次に、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR) 解析を用いて各変異型トロンビンの TM 結合量を評価した。

また、各変異型トロンビンの APC 産生能を評価した。十分に活性化した各トロンビン検体に sTM と精製ヒト PC を混和し、1 時間後に特異的発色性合成基質 S-2366 を添加して初速度法にて APC 活性を測定した。なお、活性測定直前にトロンビン阻害剤を添加し、残存トロンビン活性を完全に阻害した。さらに、血管内皮細胞 PC 受容体 (endothelial cell PC receptor: EPCR) 存在下での各変異型トロンビンの APC 産生能を評価した。すなわち、十分に活性化した各トロンビン検体と精製ヒト PC を、ヒト血管内皮細胞由来培養細胞 (EAhy926 細胞) の培養液中に添加し、3 時間後に培養液を回収し APC 活性を測定した。

## 【結果】

Arg596 変異型組換え型プロトロンビン安定発現細胞株を樹立し、細胞溶解液ならびに培養上清のウェスタンブロッティング解析を行った結果、596Gln、596Trp、596Gly 発現株では野生型と同等のプロトロンビン産生が確認された。596Pro では、細胞溶解液・培養上清ともにほとんど検出されなかったプロトロンビンが、プロテアソーム阻害剤存在下で培養すると細胞溶解液には検出された。596Pro は培養上清にほとんど分泌されないため、以降の実験対象から除外した。Arg596 での各変異型プロトロンビンは様々な値の凝固活性を示したが、合成基質二段法での活性値は凝固一段法より一様に高値であった。

AT によるトロンビン不活化解析では、野生型トロンビンが継時的に不活化され AT 混和後 30 分で 15%程度まで不活化されたのに対して、各変異型トロンビンは 30 分後でも 80%以上のトロンビン活性残存率が保持された。また、野生型トロンビンはヘパリン非存在下で TAT 形成量が継時的に上昇したが、各変異型トロンビンは AT 混和後 60 分でもほとんど TAT が形成されなかった。TGA では、トロンビン活性持続時間を示す Start tail が、Arg596 での各変異型プロトロンビンにおいて野生型の 2 倍以上延長していた。

TM によるトロンビン不活化解析では、TM 濃度 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のとき野生型トロンビン活性が 16%まで低下したのに対して各変異型トロンビン活性残存率は 37~54%に保持された。一方、SPR 解析における各変異型トロンビンの TM 結合量は、野生型のそれと比較して低値であった。SPR 解析により算出された各変異型トロンビンと TM との解離定数は、トロンビン不活化解析結果を支持するものであった。EPCR 存在下・非存在下ともに、野生型/各変異型トロンビンの APC 産生能の差は各変異型プロトロンビンの凝固比活性の差に比例していた。

## 【考察】

本研究では、プロトロンビンの Arg596 コドンにおける一塩基置換により生ずるミスセンス変異体 (596Gln、596Trp、596Gly、596Pro 変異型プロトロンビン) の AT および TM による抗凝固作用に及

ぼす影響を評価した。596Pro 変異型プロトロンビンは、安定発現細胞株の細胞内・培養上清中にほとんど検出されなかったが、プロテアソーム阻害剤処理により細胞溶解液にはプロトロンビンが出現したことから、596Pro 変異が生体内で生じた場合、変異型プロトロンビンは細胞内でプロテアソーム系にて分解され、血中に分泌されないことが示唆された。また、凝固機能測定ではすべての野生型／変異型プロトロンビンで合成基質二段法では凝固一段法より高い測定値を示したが、これは凝固一段法の基質であるフィブリノゲン分子と比較して合成基質二段法で用いた発色性合成基質 S-2238 は非常に小さな分子であるため、野生型／変異型に関わらずトロンビンの活性中心に近づきやすいことが理由と考えられる。さらに、本研究の実験において 596Gln、596Trp、596Gly 変異型トロンビンは AT により不活化されにくく、同時に TM にも不活化されにくいことが示されたことから、これらの遺伝子変異が生体内で生じた場合、各変異型トロンビンは生理的制御機構に抵抗し、そのトロンビン活性を持続して血栓症を引き起こしやすくなることが推測される。

プロトロンビン Arg596 コドン(CGG)は一塩基置換のホットスポットである CpG 配列を含むが、CpG 配列ではシトシンがチミンに置換し得ることが知られており、本研究で解析した 596Gln、596Trp はシトシンからチミンへの置換により生ずる。本研究の遂行中にセルビア人家系で 596Gln 変異が、イタリア人家系で 596Trp 変異が発見され、いずれも家族性の静脈血栓塞栓症を発症したことが報告され、すなわち、Arg596 ミスセンス変異は人種を問わず生じ、血栓症の原因となりうることが強く示唆された。

#### 【結語】

本研究では、プロトロンビン Arg596 コドンにおける一塩基置換にて生ずるミスセンス変異体が AT および TM による抗凝固作用に及ぼす影響を評価した。本研究で解析したすべての Arg596 ミスセンス変異型プロトロンビン(596Gln、596Trp、596Gly)は、AT 抵抗性ならびに TM 抵抗性を示した。生体内では、各変異型プロトロンビンの凝固能に依存して血栓症の引き起こしやすさにつながることが推察された。

**Abstract**

Antithrombin (AT) and thrombomodulin (TM) play important roles in the process of natural anticoagulation *in vivo*. Recently, we reported that the prothrombin Yukuhashi mutation (p.Arg596Leu) was associated with AT and TM resistance-related thrombophilia. To assess the AT and TM resistances associated with other missense mutations by single base substitution in the Arg596 codon, we generated recombinant variants (596Gln, 596Trp, 596Gly, and 596Pro) and investigated the effects on AT and TM anticoagulant functions. All variants except 596Pro were secreted in amounts comparable to that of the wild-type but exhibited variable procoagulant activities. After a 30-min inactivation by AT, the relative residual activity of wild-type thrombin decreased to  $15 \pm 4.0\%$ , in contrast to values of all variants were maintained at above 80%. The thrombin–AT complex formation, as determined by enzyme-linked immunosorbent assay, was reduced with all tested variants in the presence and absence of heparin. In the presence of soluble TM (sTM), the relative fibrinogen clotting activity of wild-type thrombin decreased to  $16 \pm 0.12\%$ , whereas that of tested variants was 37%–56%. In a surface plasmon resonance assay, missense Arg596 mutations reduced thrombin–TM affinity to an extent similar to the reduction of fibrinogen clotting inhibition. In the presence of sTM or cultured endothelial-like cells, APC generation was enhanced differently by variant thrombins in a thrombin–TM affinity-dependent manner. These data indicate that prothrombin Arg596 missense mutations lead to AT and TM resistance in the variant thrombins and suggest that prothrombin Arg596 is important for AT- and TM-mediated anticoagulation.