

# 先天性プロテインC欠乏症家系におけるミスセンス変異 (Gly 282 Ser・Met 364 Ile) に起因する病態の解析

著者	油井 知雄
雑誌名	北海道医療大学歯学雑誌
巻	28
号	1
ページ	14-15
発行年	2009-06-30
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00006214/">http://id.nii.ac.jp/1145/00006214/</a>

## 〔学位論文〕

先天性プロテインC欠乏症家系におけるミスセンス変異  
(Gly282→Ser・Met364→Ile) に起因する病態の解析

油井 知雄

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系クラウンブリッジ・インプラント補綴学分野

Study on the pathogenesis in family with hereditary protein C deficiency caused  
by compound heterozygous missense mutations (Gly282→Ser・Met364→Ile)

Tomoo YUI

Division of Fixed Prosthodontics and Oral Implantology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

## 緒 言

ビタミンK依存性凝固制御因子のプロテインC (PC) は、血液凝固過程で生成されたトロンビンと血管内皮細胞上のトロンボモジュリンとの複合体により活性化PC (APC) となる。さらに、APCはプロテインSを補酵素として活性化第V因子および活性化第VIII因子を選択的に阻害することにより凝固を制御する。したがって、PCの欠乏は血液過凝固状態を誘発し、深部静脈血栓症 (DVT) や肺血栓塞栓症などの血栓症を発症する。本邦における先天性PC欠乏症の頻度は地域一般住民では0.13%と極めて稀であるが、DVT患者では6.48%と高頻度にみられる。このように先天性PC欠乏症は血栓症の発症要因として重要な位置を占める。先天性PC欠乏症の原因となるPC遺伝子変異は、近年の分子生物学的手法の飛躍的な進捗により世界で280以上、本邦でも50以上同定されているが、発現実験によりその病態が明らかにされた例は少ない。

## 対象および方法

本研究では出産時のDVTを契機に血液検査にてPC活性34% (正常範囲: 73-167%)、PC抗原量19% (正常範囲: 70-150%) と低下を認めた31歳女性の発端者とその家族にインフォームドコンセントを行い、PC遺伝子配列解析さらに病態解析を目的とした。

患者および家族の末梢血全血より genomic DNAを抽出

し、PC遺伝子のエクソン1～9およびエクソン/イントロン境界領域をPCRにて増幅し、ダイレクトシークエンスにて塩基配列を解析した。さらに制限酵素*MspAII* および*Sty I*によるPCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 解析を追加し、同定した変異部位を再確認した。また、変異PC蛋白の発現実験のため、cloning vectorに組み込まれた野生型PC cDNA全長を鋳型として、変異部位が中央に配置されるようにセンス鎖およびアンチセンス鎖に変異導入プライマーを設計し、変異導入を施行した。ダイレクトシークエンスにより変異導入を確認後に、変異後cDNAの全長を*Hind III-Xba I*にて切り出し、pcDNA3.1 (+) に再挿入して発現ベクターを構築した。BHK-21細胞株 (ハムスター腎細胞由来) に対してリポフェクション法にて野生型、変異1、変異2をそれぞれ遺伝子導入し、一過性に発現させた。遺伝子導入後24時間で細胞回収し、total RNAを抽出後に逆転写酵素によりcDNAを合成した。β-actinを内在性コントロールとして等量のcDNAをテンプレートにreal time quantitative PCR (q-PCR) 法にて遺伝子レベルのPC発現量を検討した。細胞外PC分泌はProtein C ELISA kitを用いてELISA法により遺伝子導入後48時間における培養上清中のPC抗原量を測定することにより確認した。野生型を100%としてそれに対する各々のPC (%) を算出した。細胞内PC発現量はウェスタンブロッティングにより比較検討した。遺伝子導入後24時間でBHK-21細胞から細胞溶解液を得た。回収した蛋白の濃度をBCA assayにて精密測定し、各試料30μgを10%ポリアク

受付:平成21年3月30日

リルアミドゲル上で電気泳動した。泳動後にPolyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写し、一次抗体としてマウス抗ヒトPCモノクローナル抗体 (1:200) を、また二次抗体としてHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (1:500) を反応させ、化学発光にて目的蛋白を検出した。

## 結 果

塩基配列の解析およびPCR-RFLP解析結果から発端者の一方のアレルのエクソン9に変異1 (8559G→A: Gly 282→Ser), 対立するアレルのエクソン9に変異2 (8807G→A: Met 364→Ile) の複合ヘテロ接合体変異を確認した。妹にも同一の複合ヘテロ接合体変異を認め、父親および発端者の次女の両者は変異2のみのヘテロ接合体変異であることが判明した。また以上の結果から、すでに他界している母親は変異1のみのヘテロ接合体であると推定された。さらに詳細な病態解析を行うため、変異遺伝子を用いて蛋白発現実験を施行した。BHK-21細胞に遺伝子導入後に、q-PCRにて遺伝子発現を検討した。野生型PCおよび変異型PCのmRNA発現量は、ほぼ同等であった (Ct値; 野生型: 22.64, 変異1: 24.76, 変異2: 26.21)。ELISAの結果からは細胞外PC分泌の抗原量は変異1:  $55.2 \pm 1.5\%$ , 変異2:  $0.9 \pm 0.2\%$ であった。変異1および変異2の両者において培養上清中のPC抗原量は低下していたが、変異2の細胞外分泌の抑制は顕著であった。よって本家系にみられた血栓症の主病因は変異2によるものと判断した。またウェスタンブロッティングの結果からは野生型と比較して変異1ではPC発現量は細胞内において軽度増加が認められ、変異2では対照的に低下していた。以上のデータより細胞外PC分泌低下の原因は変異1と変異2では相違しており、変異1ではPCの細胞内貯留、また変異2ではPCの細胞内分解が示唆された。

## 考 察

先天性PC欠乏症は抗原量 (<50%) と活性値の両者が低下するタイプIと抗原量は正常値であるが活性値のみが低下するタイプIIに分類される。発端者は血漿検査ではタイプI PC欠乏症と判断されたが、PC遺伝子に複合ヘテロ接合体変異 (変異1および変異2) がみられたため、一般的な臨床検査のみでその病態を推測することが困難である。

本研究では、分子生物学的手法を用いた変異PC蛋白

発現実験により、変異1と変異2のPC蛋白の細胞外分泌は変異1に比べ変異2で顕著に抑制され、両変異における病態の差異が明らかとなり、また本家系にみられた血栓症の主病因が変異2であることが判明した。本家系で同定された変異2はすでに本邦特有のタイプI異常を呈するPC遺伝子変異であると報告されていたが、ごく最近、韓国においても同一のPC遺伝子変異が報告されたことから、本遺伝子変異は日本人と韓国人の共通祖先に発生したものと推察された。

## 結 語

本家系の複合ヘテロ接合体変異の主病因は変異2であった。