

〔学位論文〕

細胞外分泌障害を認めた新規遺伝子変異を含む
先天性アンチトロンビン欠損症2家系の病態解析に関する研究

佐藤 陽美

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

Studies on pathological mechanisms of congenital antithrombin deficiency
in two families including a novel gene mutation that causes disturbance
of extracellular secretion

Harumi SATO

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido**Key words** : gene mutation, congenital antithrombin deficiency, Ins Ile187, serpin, thrombophilia

要 旨

アンチトロンビン (AT) は活性型第X因子, トロンビンのようなセリンプロテアーゼを抑制し, 血液凝固を制御する血漿中に存在する1本鎖糖蛋白である. ATは464残基のアミノ酸として肝細胞において合成された後, この前駆体からリーダーシーケンスの32残基が切り離されて432残基の3つのジスルフィド結合を有するポリペプチドとして血中に放出される. 血漿中濃度は15 mg/dl程度である. また, AT遺伝子は染色体1q23~q25に存在し, ゲノム全長は約14Kbで7つのエクソンで構成されている (Olds et al., 1993).

先天性AT欠損症は常染色体優性遺伝形式であり, 疫学的にはその発症頻度は0.005~0.05%とされている (Harper et al., 1991; Maclean and Tait, 2007). しかしながら, 本邦では0.15%程度とその頻度はやや高い傾向にある (Miyata et al., 2006). また, 深部静脈血栓症患者の5~6%に本疾患を基礎疾患として有することが報告されている (Miyata et al., 2006). AT欠損症は表現型により2つに分類される. AT抗原量および活性が低下するType Iと抗原量が正常で活性のみが低下するType IIである. 歯科口腔領域における診療において本疾患に遭遇する機会は稀ではあるが, 観血的処置を回避できない場面も報告されている (小田ら, 1996). また, 凝固制

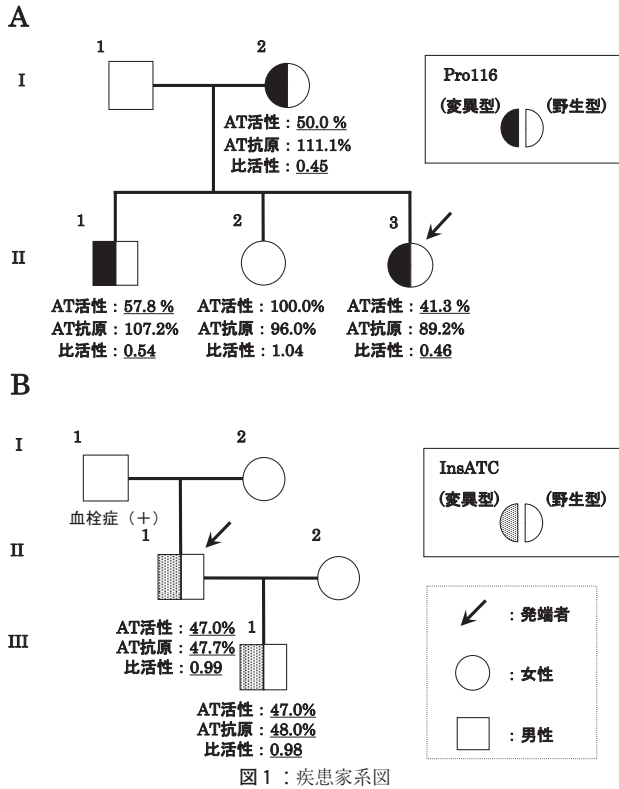
御系因子の遺伝子変異や多型による先天性血栓性素因の病態解明が進むとともに, 今後有病者数の増加が予測される. したがって, 歯科領域においても本疾患の病態機序の理解は治療を円滑にすすめる上で重要である.

今回, 先天性AT欠損症が疑われる2家系において遺伝子解析を行う機会を得た. この遺伝子解析過程において2つの異なる遺伝子変異を同定し, このうち1つは文献検索上過去に報告のない新規の遺伝子変異であった. 現在までに先天性AT欠損症の遺伝子報告は多数存在するが, AT蛋白発現実験を施行し詳細に検討した例は少ない. 本研究では, 遺伝子配列解析により発見された新規遺伝子変異 (187 Ins Ile) に関わる先天性AT欠損症 Type Iの病態をin vitroによる変異AT蛋白発現実験をとおして解明したのでここに報告する.

以下の実験は北海道医療大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員および北海道医療大学組換えDNA実験安全委員会の承認を得ている.

対象は遺伝的素因が疑われるAT欠損症2家系の患者 (発端者) およびその家族とした (図1). 遺伝子解析および血漿解析の結果, 症例1ではAT遺伝子のエクソン3aにT5342→Cの一塩基置換が認められ, Ser116→Proの1アミノ酸変異をヘテロ接合体で保有していることが確認された. (図2-A) 発端者のAT活性 (正常値: 80%~130%) は41.3%と低下していたが, AT抗原量は

受付:平成21年3月30日



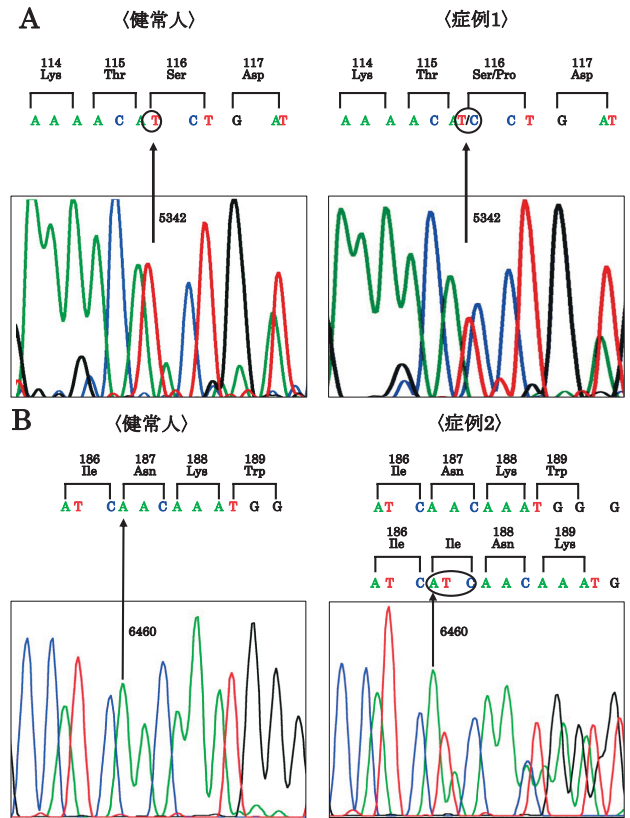
A: 家系-1
 図中の下線はA T活性および比活性の低下を示す。被験者4名のうち3名(発端者, 母親, 兄)にSer116変異(AT-Nagasaki)が認められた。

B: 家系-2
 図中の下線はAT抗原量および活性値の低下を示す。すべての被験者(発端者, 長男)にIns Ile 187変異が認められた。

89.2% (正常値: 80%~120%) であるためAT欠損症type IIと診断した(図1-A)。また, 家族のAT遺伝子解析の結果, 母と兄も同一のヘテロ接合体保有者であった。この遺伝子変異は, AT-Nagasakiとしてすでに報告されており(Okajima et al., 1993), ヘパリン結合能の異常によりAT活性のみが低下するType II AT欠損症であることが証明されている(Kyotani et al., 2007)。

症例2では, AT遺伝子のエクソン3bに塩基番号6460-6463までの3塩基挿入(ATC)が認められ, Ins Ile 187の1アミノ酸挿入をヘテロ接合体で保有していることが確認された(図2-B)。発端者のAT活性は47.0%, AT抗原量は47.7%とともに低下しており, AT欠損症type Iと診断した(図1-B)。また, 発端者の息子においても同一の変異をヘテロ接合体で保有していることが明らかになった。この変異(以下Ins Ile 187)は文献検索上, 過去に報告例がなく, 新規の遺伝子変異であった。

Ins Ile 187による1アミノ酸挿入がAT蛋白合成に対してどのような影響を与えるかを検討するためにCOS-1細胞株における一過性発現実験を施行した。発現実験で得られた培養上清中におけるAT抗原量をELISA法にて



A: エクソン3aのシーケンス解析(症例-1)
 健康人の塩基配列を示す(左図)。症例1の塩基配列ではT5342→Cによるミスセンス変異(Ser116→Pro)を同定した(右図)。

B: エクソン3bのシーケンス解析(症例-2)
 健康人の塩基配列を示す(左図)。症例2の塩基配列では6460番目から3塩基挿入(ATC)によるインフレーム変異(Ins 187 Ile)を同定した(右図)。また, 3塩基挿入後のシーケンス波形がシフトしていた。

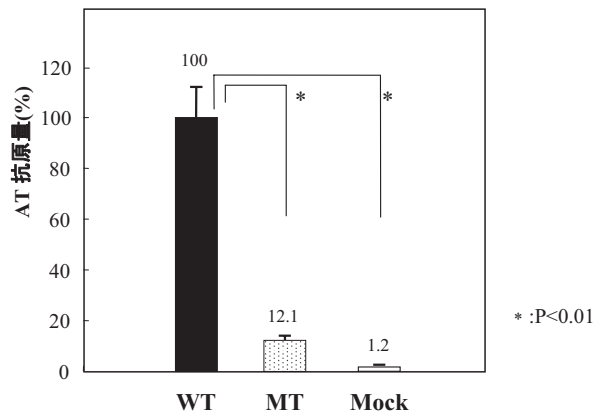


図3: 遺伝子導入COS-1細胞における培養上清中のA T抗原量
 WT: AT野生型, MT: AT変異型, Mock: ベクターのみ

COS-1細胞株に対して遺伝子導入48時間後における培養上清中のAT抗原量をELISA法にて測定した。実験は各々3回独立して施行され, データは平均±標準偏差(mean±SD)により示す。有意差はt検定による。

測定した結果, 変異AT蛋白の培養上清中への分泌がWTに比較して有意に低下しており, 発端者の血漿AT抗原量の実測値と同様の傾向であった(図3)。また, ウエ

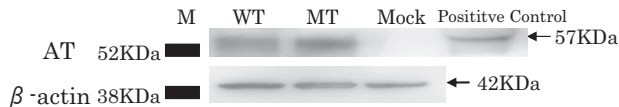


図4：遺伝子導入COS-1細胞における細胞内AT蛋白発現

M：マーカー，WT：AT野生型，MT：AT変異型，Mock：ベクターのみ，positive control：健康人血漿

COS-1細胞株に対して遺伝子導入24時間後における細胞内AT蛋白をウエスタンブロット法より検出した。各々のレーンにはサンプルとして20 μ gの蛋白をローディングした。また，健康人血漿はTBSにて50倍希釈してサンプルとした。

スタンプロテイング法による細胞内AT蛋白の検出ではWT，MTともに細胞内で発現しており，細胞内蛋白合成はWTと同様に正常に行われていることが確認されたが，検出されたバンドの画像解析の結果ではWTと比較してMTではバンド量比が約1.5倍に増加していた（図4）。したがって，Ins 187 Ile変異型AT蛋白はmRNAからの翻訳／合成後に細胞内に貯留するため，細胞外分泌不全を引き起こし，AT欠損症の病因となることが示唆された。

日常診療におけるAT活性・抗原量測定のみでは病態を予測するには困難な場合があり，本研究のように分子生物学的手法を組み合わせることにより正確な病因を把握することが可能であった。

参考文献

- Huber R and Carrell RW. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 28 : 8951-8966, 1989.
- Kyotani M, Okumura K, Takagi A, Murate T, Yamamoto K, Matsushita T, Sugimura M, Kanayama N, Kobayashi T, Saito H and Kojima T. Molecular basis of antithrombin deficiency in four Japanese patients with antithrombin gene abnormalities including two novel mutations. *Am J Hematol* 82 : 702-705, 2007.
- Maclean PS and Tait RC. Hereditary and acquired antithrombin deficiency : epidemiology, pathogenesis and treatment options. *Drugs* 67 : 1429-1440, 2007.
- Miyata T, Kimura R, Kokubo Y and Sakata T. Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese : importance of protein S K 196E mutation. *Int J Hematol* 83 : 217-223, 2006.
- 小田有紀子，宇佐美雄司，重富俊雄，各務秀明，新美直哉，上田 実．先天性アンチトロンビンIII欠乏症患者における多数歯抜歯経験の1例．*日本口腔外科学会雑誌* 45 : 393-395, 1999.
- Okajima K, Abe H, Maeda S, Motomura M, Tsujihata M, Nagataki S, Okabe H and Takatsuki K. Antithrombin III Nagasaki (Ser116-Pro) : a heterozygous variant with defective heparin binding associated with thrombosis. *Blood* 81 : 1300-1305, 1993
- Olds RJ, Lane DA, Chowdhury V, De Stefano V, Leone G and Thein SL. Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene : evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Bio-*

chemistry 32 : 4216-4224, 1993.