## アンチトロンビンレジスタンス(ATR)モデルマウスを用いた病態解析と血栓傾向評価アッセイの開発

## 鈴木伸明

### 名古屋大学医学部附属病院 輸血部

### 【研究の背景】

2012年に、我々のグループは世界で初めて新規血栓性素因「アンチトロンビンレジスタンス(ATR)」を報告した(Miyawaki, NEIM, 2012)。それまで原因不明であった血栓症多発家系の遺伝子解析から、血栓症の原因遺伝子がプロトロンビン遺伝 子に由来することを同定し、プロトロンビン遺伝子変異が血栓症の原因であることを示した。しかしながら、この変異を保有す る患者のほぼすべてがすでに抗凝固療法を受けているため、この変異プロトロンビン解析をヒト検体を用いて行うことには限 界がある。

#### 的】

本研究では、その原因遺伝子である R593L をノックインした ATR モデルマウス (R593L マウス)を作製し、その血栓性素因 の詳細な病態解析を行うと同時に、Thrombin Generation Assay (TGA) や Rotational thromboelastometry (ROTEM)を用いて、 包括的に血栓傾向を評価するアッセイ系の構築を試みることを目的とした。

#### 【方 法】

R593L ノックインマウスは Cre-loxP システムを用いて作製。 CAG-Cre マウスと交配することにより、全身性に変異遺伝子を 発現させる手法によりマウスを作製した。血液凝固学的解析は以下の手法にて実施した。

- ① 血漿プロトロンビン解析
- (i) アンチトロンビンによる不活性化

血漿に AT を添加し、様々なインキュベート時間を設定したうえで、プロトロンビン活性を測定。AT 添加後のプロトロンビン 活性を野生型と変異型で比較する。

(ii) トロンビン-アンチトロンビン(TAT)形成能の解析

ヒトの R596L プロトロンビン由来の異常トロンビンは、アンチトロンビンとの結合しにくいため、TAT 形成能が低いことがわか っている。すなわち、ATRとなる機序として、TAT形成能が悪く、トロンビンが不活性化されにくいことが血栓症発症の原因で あると考えられている。そのため、TAT を ELISA にて測定し、野生型と比較してその形成能を解析する。

② 包括的凝固能評価による血栓傾向の検討

Rotational thromboelastometry (ROTEM)と Thrombin Generation Assay (TGA)を用いて包括的凝固能評価を行った。 ROTEM の特徴は血小板を含む全血を用いて血液の凝固過程を経時的に評価できるところにあり、まさに血液凝固の全過 程を評価できる。 今回 TGA は Platelets Poor Plasma (PPP)を用いて、AT 添加の有無により、トロンビン生成がどのように変化 するかを解析予定とした。ROTEMに関してはINTEM, EXTEM, NATEMなどのうち、マウスに適したモード(試薬)を選定し、 AT やヘパリンを添加して、評価することとした。

## 【結 果】

### ・マウスの作製

R593L ヘテロマウスのみならず、R593L ホモマウスも問題なく繁殖可能であった。生存期間もほぼすべての個体が 6 か月以上生存し、血栓傾向のため、短命であるということは示唆されなかった。

- ① 血漿プロトロンビン解析
- (i) アンチトロンビン(AT)による不活性化解析

ATを添加し、経時的にプロトロンビン活性を測定したところ、野生型マウス、R593L ヘテロマウス、R593L ホモマウスの順に 残存活性が高くなった。興味深いことにヒトでの解析結果に比較して、AT レジスタンスの程度は相対的に軽度であり、R593L ホモマウスとヒトでのヘテロ接合体がほぼ同等の AT レジスタンス程度であると考えられた。

(ii) トロンビン-アンチトロンビン(TAT)形成能の解析

今回の研究期間内では公表できるデータが得られなかった。原因はマウスの繁殖速度に起因する。基礎検討は終えることができたため、今後も解析を続ける。

- ② 包括的凝固能評価による血栓傾向の検討
- (i) ROTEM による解析

すべてのモード(試薬)を検討した結果、全般的にマウス検体はヒトと比較して、ROTEM 試薬への反応性が高く、何も添加しない NATEM が最も評価に適すると判断した。野生型マウスと R593L ホモマウスの結果を比較検討すると R593L ホモマウスの方がクロット形成までの時間である Clotting Time が優位に長かった。クロットの生成速度を示す Clot Formation Time (CFT)や、クロットの強度を示す Maximam Clot Firmness (MCF)には差を認めなかった。 ヘパリンを添加し、野生型とのヘパリンの感受性の違いについても検討した。 AT に抵抗性であることから、R593L ホモマウスではヘパリンに対しても抵抗性であることが予測されたが、今回行った実験においては両者に明らかな違いは見られず、予想とは異なる結果であった。

#### (ii) トロンビン生成能試験

条件設定に時間がかかり、基礎検討のみの実施となった。ヒトと同等の条件設定ではうまくトロンビン生成の波形を得ることができなかった。組織因子(TF)濃度をあげて、血漿を得る過程で2回遠心し、血小板の混入を防ぐことにより、マウス検体でもきれいな波形が得られるようになった。今後も解析を続ける予定である。

## 【考 察】

R593L ホモマウスが健常に生存したことは予想外の結果であった。臨床的な血栓傾向を得るためには、より強い血栓傾向を与える必要があり、現在、AT ノックアウトマウスと交配し、より血栓傾向を高め、今後、検討を行う予定である。ROTEM の結果から、R593L は Clot Time はむしろ延長しており、血栓傾向とは逆の性質を示したのは興味深い所見であった。このような結果からは R593L 変異による血栓傾向は AT の抗凝固活性に抵抗性であることにより引き起こされる凝固反応の遷延にあると考えられた。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

プロトロンビン R593L は凝固反応のピークを高めるのではなく、凝固反応の収束を抑制することにより、血栓傾向を呈すると考えられた。このような特性は健常人においては血栓傾向を呈し、デメリットとなるが、血友病のような出血性疾患においては有利に働く可能性がある。今後、血友病治療薬としての可能性を模索する。

# 【参考・引用文献】

Miyawaki Y, et al. N Engl J Med. 2012 Jun 21;366 (25):2390-6