

遺伝性異常フィブリノゲン血症の遺伝子変異特定と その考察

血液・免疫・感染症内科学講座 山之内 純講師

36番 齋藤 玲



本レポートの作成は、提出者本人が行い、研究不正に該当する剽窃、偽造、捏造を行なっていないことを確認しました。

指導教員自署

謝辞

本研究遂行にあたりご指導いただきました、山内先生、南さんに感謝申し上げます。

1.要約

本研究では、フィブリノゲン値が71mg/dlと低値を示し、異常フィブリノゲン症が疑われた患者に対して、ダイレクトシーケンス法を行い、Fbg γ 鎖(FGG)遺伝子の変異を見つけ出し、その変異がフィブリノゲン値を低下させる原因について検討した。その結果、FGGのエクソン8においてヘテロ接合体で遺伝子異常が認められ、902番目の塩基GがAに変わっており、301番目のアミノ酸CGC(R: Arg アルギニン)が、CAC(H: His ヒスチジン)に変化していることが確認できた。本患者は、遺伝性フィブリノゲン血症と判断した。出血の既往がないこととフィブリノゲン測定における反応曲線から止血には問題ないと判断した。今後処置においても新鮮凍結血漿(FFP)輸注やフィブリノゲン製剤の補充は必要ないと考えた。

2.緒言

フィブリノゲン(fibrinogen, Fbg)は、肝臓で産生される凝固因子の第1因子である。血栓の骨格となるフィブリンの前駆体で、血小板凝集にも関わる止血機構に重要な物質である。フィブリノゲンはトロンビンによる限定分解を受けてフィブリンモノマーに転じ、きわめて規則的に進展する重合反応を介しフィブリン(Fbn)繊維、次いでより太いFbn束を形成する。この過程で適当な間隔で分岐してFbn網を作り、止血血栓の主たる基材として働いている⁽¹⁾。Fbgは異なる3本鎖ポリペプチドがジスルフィド結合により相互に連携し、2量体(A α B β γ)₂を形成している(図1)。6個のアミノ末端が集まったcentral domain(fragment E)と2個の86-kDのD領域(Fragment D)がD-E-Dと左右対照に位置し、3本鎖のらせん構造がD-E間を連結する構造であることが電子顕微鏡解析により明らかにされている⁽²⁾。

フィブリノゲン分子の組み立て

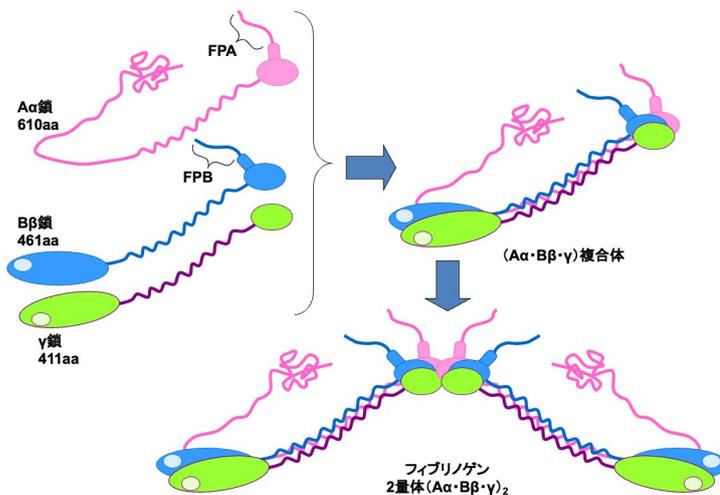


図 1 フィブリノゲン分子の組み立て

フィブリノゲン異常症は、遺伝性の構造異常により Fbn 網を形成する反応系に機能障害が生じているものを指す。遺伝性フィブリノゲン(Fbg)異常は、Fbg 欠損症(無 Fbg 血症)、Fbg 機能異常症、Fbg 欠損症ヘテロ接合体型である低下症の 3 型に分類され、遺伝子異常の原因としては種々のものが報告されている。症状としては、無症状が 52%、出血が 26%、血栓が 22%である。一部の症例では不育症を呈し、さらには家族性腎アミロイドーシスを呈する症例や、異常 Fbg が肝細胞に蓄積して肝障害や肝硬変を呈する症例が報告されている。Fbg 欠損症の場合には、臍帯・頭蓋内・消化管などでの出血症状が顕著であり治療が必要である⁽³⁾。

フィブリノゲン異常症では、フィブリノゲンを構成する α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖のいずれかの分子異常症で、フィブリノゲン抗原量は保たれているものの、フィブリノゲンの機能異常を呈する病態である。この中には、トロンビンによるフィブリンモノマー形成が低下している症例や、フィブリンモノマーの重合不全を引き起こす症例など様々な病態が含まれる。また、プラスミンによる分解が起きにくくなる変異のために血栓傾向を呈する症例もある⁽³⁾。

本研究では、術前検査でフィブリノゲン値が低値を示し異常フィブリノゲン症が疑われた患者に対して、ダイレクトシーケンス法を行い、Fbg γ 鎖(FGG)遺伝子の変異を見つけ出し、その変異がフィブリノゲン値を低下させる原因について検討した。

3.症例

症例は、50 歳代女性で、慢性腎炎症候群として経過をみていたが、蛋白尿が持続するため、精査目的で腎生検を予定していた。その術前検査でフィブリノゲン値が

71mg/dl (正常値：200~400mg/dl)と低値を示した。腎臓内科担当医より、FFP 輸注もしくはフィブリノゲン製剤の補充が必要かどうかを血液内科に相談があった。現在明らかな出血傾向はなく、また、過去の抜歯時や手術時に止血困難はないことを確認した。フィブリノゲン測定はトロンビン時間法(Clauss 法)で測定している。本患者のフィブリノゲン測定における反応曲線をみると、立ち上がりは遅いものの、変化量は正常検体と同程度であり、フィブリン生成反応遅延が疑われるものであった(図2)。

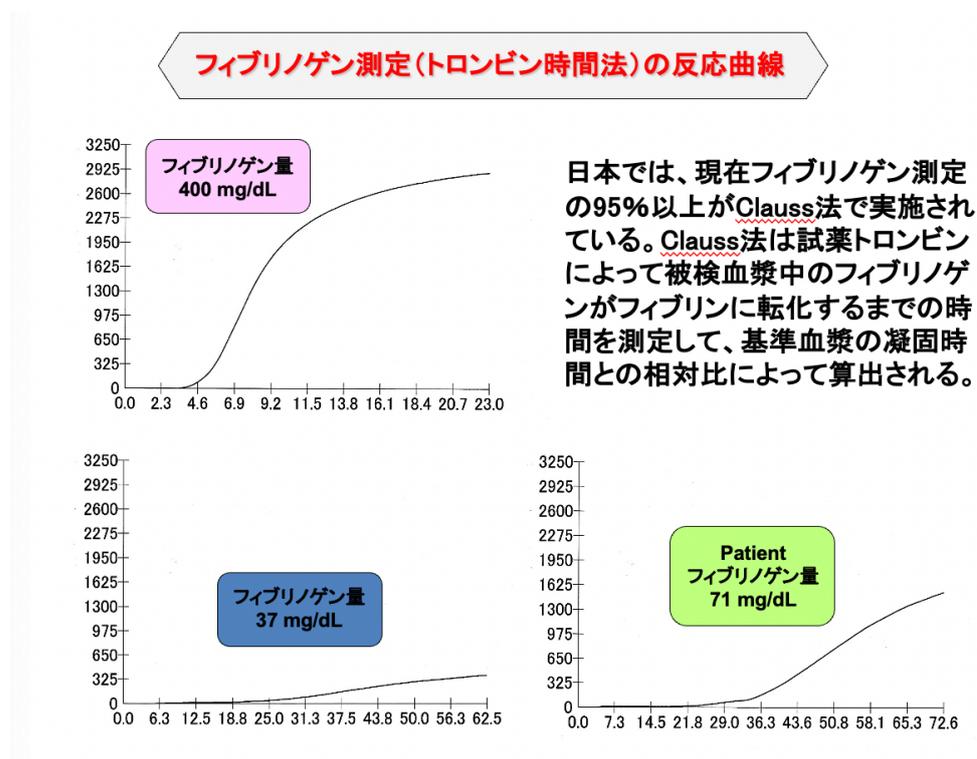


図2 フィブリノゲン測定(トロンビン時間法)の反応曲線

4.方法

患者から静脈血サンプルを採取し、そしてQIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN)を使用しDNAを抽出した。日本人で過去にフィブリノゲン異常症と報告のあった遺伝子異常を含むエクソンについて検討するため、抽出DNAを鋳型としてFGGのエクソン8とFbg α鎖(FGA)のエクソン2の前後イントロン領域にプライマー(表1)を設定した。

表1.プライマー

exon	sense	antisense	Annealing temperature(°C)

FGGexon8	cgaaagaggggaacttctgag	ccacctgctgcaaaatatcc	52
FGAexon2	gctctccttaatctctgtga	gagcactgtttatttacctc	52

そして、PCR 法により増幅した後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を確認した。

増幅した PCR 産物を TOPO TA cloning kit (Invitrogen)を用いて、cloning した。大腸菌のコロニーの 18 個のサンプルを用意した。そして、生えてきたコロニーをピックアップして大腸菌から DNA を増幅し、シーケンスを確認した。

なお、本研究は、愛媛大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承諾を得て、患者の同意を得た後に実施した。

5.結果

本研究での症例において、FGA のエクソン 2 に関して遺伝子異常を認めなかった。しかし、FGG のエクソン 8 においてはヘテロ接合体で遺伝子異常を認めた。異常があったコドンは 902 番目の塩基 G が A になっており、301 番目のアミノ酸 CGC(R: Arg アルギニン)が、CAC(H: HIS ヒスチジン)に変化していることが確認できた。今回ヘテロ接合体遺伝子異常であった。塩基配列において正常と異常が重なって見えたので、変異遺伝子をはっきりさせるためにクローニングを行なった。下に記したように変異遺伝子が確認できた(図 3)。

フィブリノゲン異常症 遺伝子解析

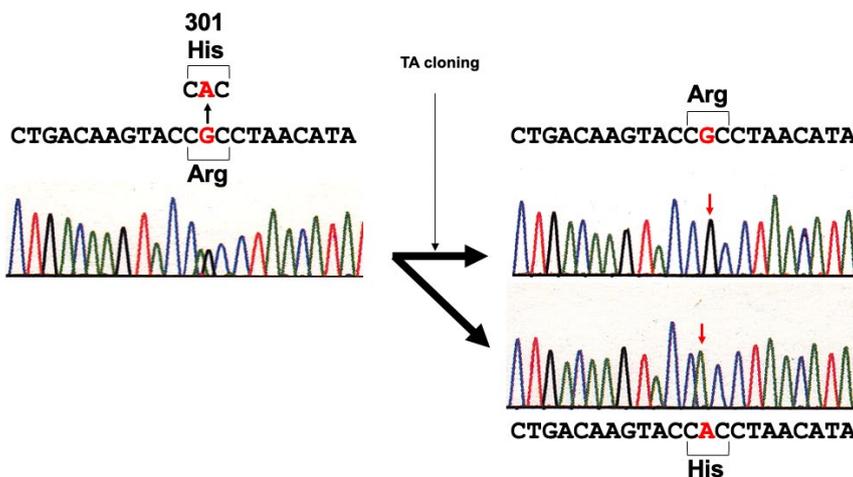


図 3 遺伝子解析結果

6. 考察

本研究では、フィブリノゲン値が 71mg/dl と低値を示し、異常フィブリノゲン症が疑われた患者に対して、ダイレクトシーケンス法を行い、Fbg γ 鎖(FGG)遺伝子の変異を見つけ出し、その変異がフィブリノゲン値を低下させる原因について検討した。その結果、FGG のエクソン 8 においてヘテロ接合体で遺伝子異常が認められ、902 番目の塩基 G が A に変わっており、301 番目のアミノ酸 CGC(R : Arg アルギニン)が、CAC(H : His ヒスチジン)に変化していることが確認できた。

今回のフィブリノゲンの測定はトロンビン時間法(Clauss 法)を用いて行なった。Clauss 法では、血漿中に存在するアンチトロンビンとヘパリンコファクター II の影響を抑制するため、過剰量のトロンビンを添加して凝固時間を測定する。標準液の検量線からフィブリノゲン濃度を算出する。検査する血漿をベロナール緩衝液(pH7.35)で希釈し、5分以内加温処理、トロンビン試薬添加後の凝固時間を測定する。検量線は、フィブリノゲン標準液をベロナール緩衝液で 1:5、1:15、1:40 に希釈して凝固時間を測定して両対数グラフから作成する。この検量線と対比してフィブリノゲン濃度を算出する。Clauss 法でのフィブリノゲン値の基準範囲は 150~350mg/dl である⁽⁴⁾。

全自動血液凝固分析装置コアプレスタ 2000(CP2000)の検出系は、凝固時間法(散乱光度法)、合成基質法、ラテックス比濁法の 3 種類の測定原理に対応している。凝固時間法の測定原理は感度の高い散乱光度法を採用し、光源には超高輝度発光ダイオード(LED)を使用している。LED の光を反応キュベットに照射し、直角方向の散乱光(660nm)を光検出部で受光する。凝固反応の進行に伴い散乱光の強度は増加し、凝固反応が終了すると光の強度変化がなくなる。これらの過程の変化を 0.1 秒毎に検出し、コンピュータで検出し、コンピュータで演算して凝固時間を算出する。凝固時間の演算は、一定時間毎に積算し、隣り合う積算値の割合が一定値となった時点を凝固終了点として求める。この凝固終了点の散乱光に対し、一定%の散乱光となる時間(t)を凝固時間として算出する(図 4)⁽⁵⁾。

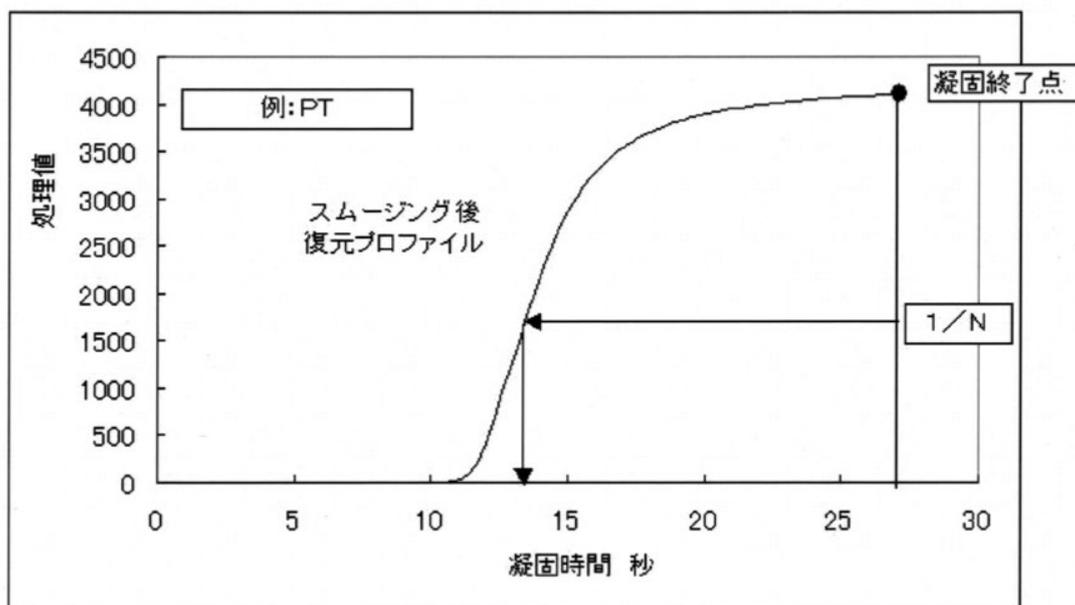


図 4 凝固時間(PT)演算

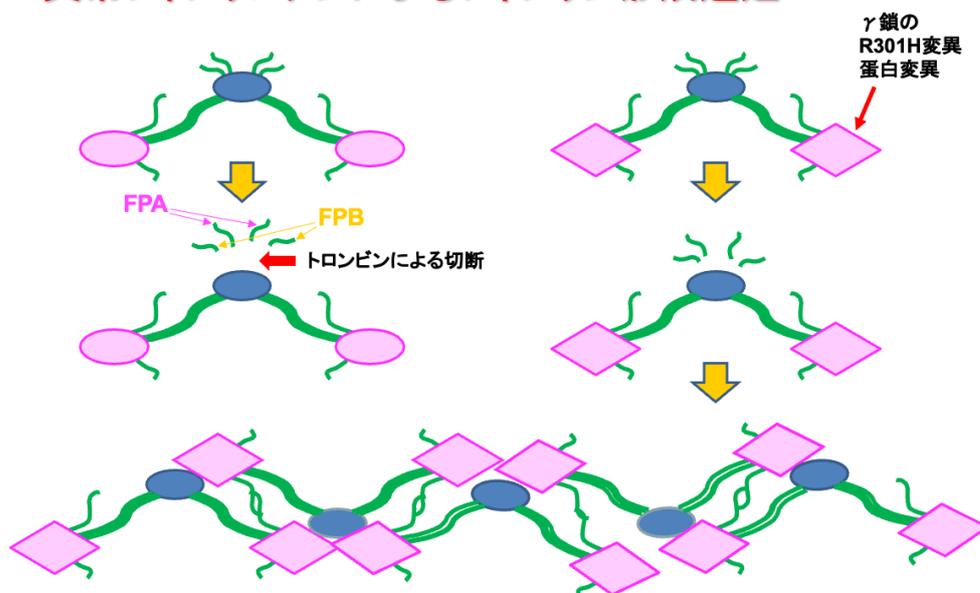
フィブリノゲンは血小板凝集による一次止血にも Fbn 網形成による二次止血にも利用される重要な成分である。そのため、フィブリノゲンの減少は出血傾向をきたすことになる。フィブリノゲンは、プラスミンにより分解されるとフィブリノゲン・フィブリン分解産物(FDP)となる。その減少は、肝臓障害による産生低下や止血機序における消費、プラスミンによる分解等で減少する種々の病態を鑑別に入れておく必要がある。とくに出血傾向のない患者で、Clauss 法で低値に遭遇した際に抗原量を測定し異常症を疑うことや異常症は出血だけでなく血栓形成を引き起こす可能性があることを考慮しておくことが重要である。一方、急性反応性物質として炎症時や悪性腫瘍で増加する⁽⁴⁾。

フィブリノゲン異常症は、遺伝性の構造異常により Fbn 網を形成する反応系に機能障害が生じているものを指す。これまでに構造異常と機能障害との関係が明らかにされた異常分子での変異型は 60 を超えるが、その多くは臨床的に無症状であり、出血、血栓症、あるいは創傷治癒不全など、Fbg の生理的機能の障害として、その分子機作が明瞭に示されたものはむしろ数少ない。フィブリノゲン異常症は、蛋白が存在しない無 Fbg 血症(ホモ症例)、無 Fbg 血症のヘテロ症例である低 Fbg 血症、蛋白は存在するがフィブリンになる機能に異常がある Fbg 機能異常症の 3 種に分類される⁽³⁾。

今回の症例は γ 鎖のエクソン 8 におけるヘテロ接合体の遺伝子異常であった。異常があったコドンは 902 番目の塩基 G が A に変わっており、301 番目のアミノ酸 CGC(R: Arg アルギニン)が、CAC(H: HIS ヒスチジン)に変化していたことより、D-D 結合の異常であるとわかる。本来、2 本鎖 protofibril の形成は異なる Fbn モノマーの E:D 結

合を起点に、D 領域 γ 鎖 C 末端領域がお互いに反対方向に近接して並び、分子間 D:D 結合が形成されることにより急速に伸展する。D:D 結合の接合面にある程度の溶媒が入り込める間隙が存在するが、両サイドの多くのアミノ酸間隙の水素結合により密接に結合している。そのため、D:D interface やその近傍に位置するアミノ酸が別のアミノ酸に置換した場合、正規の水素結合が形成されず D:D 結合が阻害されると推定される。実際、接合面で中心的役割を果たす γ 301R が C,H,S に置換した異常 Fbg では E:D 結合は正常に進むが D:D 結合が阻害されると報告されている(図 5)。 γ 301R が H や S に置換した場合は、立体構造モデルでは正規の水素結合に近い水素結合に近い水素結合を取ることが可能で、重合障害を示す異常分子の実体に一致しなかった⁽²⁾。本症例で認められた遺伝子変異は Fibrinogen Fukushima⁽⁶⁾、Fibrinogen Crete⁽⁷⁾、Fibrinogen Cordobal⁽⁸⁾、として報告がある。

異常フィブリノゲンによるフィブリン形成遅延



- ① フィブリンの重合が遅延する。
- ② Dダイマーが形成されない。

愛媛大学 新家敏之先生より供与

図 5 異常フィブリノゲンによる形成遅延

本症例は、フィブリン異常症が疑われたが、問診結果とフィブリノゲン測定における反応曲線から止血には問題ないと判断し、FFP 輸注やフィブリノゲン製剤の補充はなしで腎生検を施行してもらった。その結果、異常出血はなく、腎生検は無事終了した。

文献

1. 松田道生, 諏合輝子, 中三川千鶴子, 関根理 遺伝性異常フィブリノゲン血症 血栓止

血誌 12(1):47-56;2001

2. 諏合輝子 フィブリノゲンの立体構造からみた異常フィブリノゲン 血栓止血誌 10(1):100-105;1999

3. 奥村伸生, 寺澤文子 フィブリノゲン異常症と欠損症から明らかになったフィブリノゲンの機能異常と産生異常 信州医誌 57(5):145-154;2009

4. 新井盛大 血液凝固・線溶検査の試剤・器具と基礎的方法 臨床検査法提要(改訂第32版, 東京, 金原出版) 419-421;2005

5. 須長宏行 全自動血液凝固装置コアプレスタ 2000 の特徴とその有用性(測定原理からミキシングテストまで) 生物資料分析 Vol32 No5;2009

6. Yuji Imafuku, Kyoko Tanaka, Kiyooki Takahashi, Kazuei Ogawa, Minoru Sanpei, Hidekazu Yamada, Akira Sato, Hiroshi Yoshida Identification of a dysfibrinogenemia of γ R275C(Fibrinogen Fukushima) 151-156;2002

7. A.Travlou, A.Gialeraki, E.Merkouri, M.Politou, A.Sfyridaki, M.Neerman-Arbez Coexisting dysfibrinogenemia (γ Arg275His) and FV Leiden associated with thrombosis (Fibrinogen Crete) Thrombosis Research 126 162-164;2010

8. Hugo A. Guglielmone, Salvador Minoldo, Gustavo D. Jarchum, Daniel Abate Daga, Jose L.Bocco Fibrinogen Cordoba I :A γ Arg 275 His substitution associated with defective polymerization Thrombosis Research 121 429-430;2007