

第 15 回 北陸銀行若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名		助成金額
長屋 聡美	医薬保健研究域保健学系・助教		600,000 円
研究課題名	内皮細胞プロテイン C レセプターとの結合障害を有する異常プロテイン C の血栓形成メカニズムの解明		
研究の概要	<p>〔研究開始当初の背景, 研究の目的, 研究の方法等について記入〕</p> <p>生理的凝固阻止因子であるプロテイン C (PC) は、活性化 PC (APC) になると抗凝固作用だけでなく、血管内皮細胞上の内皮プロテイン C レセプター (EPCR) との結合を介して細胞保護作用を発揮する。我々は 21 歳で血栓症を発症した先天性 PC 異常症患者において、EPCR との軽度結合障害を有すると報告されている R189W 変異と同じ部位の R189Q 変異を同定したが、これらの変異が血栓症をもたらす分子メカニズムは未だ十分に解明されていない。本研究では、PC または APC と EPCR との結合異常が血栓形成に果たす役割を詳細に解析するため、PC 精製手法の確立、R189W および R189Q の抗凝固機能評価、表面プラズモン共鳴法を用いた EPCR との結合親和性解析を行った。</p>		
研究の成果	<p>〔成果の具体的内容, 意義, 重要性及び今後の展望等について記入〕</p> <p>【成果内容】 HEK293 細胞を用いた一過性 PC 発現にて、R189W は培養上清への分泌が野生型 (WT) の約 3 割、R189Q は約 6 割程度に低下していた。次に PC 安定発現細胞株を樹立し、培養上清の陰イオン交換および 3xFLAG-tag アフィニティ精製にて高純度の PC を取得することに成功した。精製 PC をトロンビン・トロンボモジュリン複合体で APC へと活性化し、APC への活性化効率 (EPCR 非存在下) および APC のアミド分解活性を比較したところ、R189W および R189Q は共に WT と同等であった。表面プラズモン共鳴法を用いて固相化した EPCR と PC との親和性解析を行った結果、R189W は WT より親和性が低下していたが、R189Q は WT と同等であることが明らかとなった。</p> <p>【意義・重要性】 R189 を含む PC の軽鎖 C 末端側の 10 アミノ酸 (189-199) は未だ結晶構造が解明されていない。また、この部位に変異を有する異常 PC は抗凝固作用や内皮保護作用が低下するとされるが、そのメカニズムや分子動態は不明である。今回の 2 つの R189 変異体は、アミノ酸の違いにより分泌量や EPCR との結合親和性に差があり、これらを詳細に解析することにより、PC 軽鎖 C 末端側の新しい機能が明らかとなる可能性がある。さらに、この部位のアミノ酸置換体を作製し機能評価を行うことで、炎症性疾患に対する治療薬として細胞保護作用を増強させた APC 製剤の開発につながる可能性がある。</p> <p>【今後の展望】 R189W は PC 分泌障害と EPCR との結合障害により APC への活性化効率低下が血栓症の原因であると示唆された。一方で R189Q は中程度の分泌障害のみであり、現在 APC と活性化凝固第 V 因子・第Ⅷ因子との相互作用、APC と EPCR の親和性、内皮細胞を介した抗炎症作用の評価系構築を目指している。本研究を足掛かりとして、PC 軽鎖 C 末端の機能解明とこの部位の変異体による血栓形成メカニズムを解明したい。</p>		
研究成果発表状況	<p>〔雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成した Web ページ等について記入〕</p> <p>1. 安田芽生, 長屋聡美, 桑島大和, 松本陽斗, 油井陸斗, 今井湧太, 森屋羽瑠雅, 菊池結香, 竹川清太郎, 築田怜奈, 西野優那, 森下英理子. プロテイン C 遺伝子バリエーション p.Arg189Gln の病態解析. 第 46 回日本血栓止血学会学術集会、金沢、2024 年 6 月 (予定)</p>		
経費の執行状況	費目	事項 (主な使用事項を記載)	執行額 (円) (費目毎総額を記入)
	物品費	細胞培養、タンパク質精製試薬、ELISA キット、精製 EPCR 試薬など	600,000 円
	旅費		
	人件費・謝金		
	その他		