

大会長講演

フィブリノゲン異常症・欠損症に関する
コンサルテーションおよび病因解析

奥村 伸生*

はじめに

私は 20 年以上にわたりフィブリノゲン(Fbg)の研究を行ってきた。このため、現在では全国各地の医師や検査技師の方からの Fbg 異常症・欠損症に関するコンサルテーションを年間 5~10 件行っており、その結果として遺伝子解析を依頼されることが年間 2~3 件ある。そのコンサルテーションと遺伝子解析結果報告例を提示し、今後、臨床検査技師がコンサルタント(専門家、スペシャリスト、エキスパート)として活躍する一つの可能性を紹介する。

さらに、これらのコンサルテーションを通じて遺伝子解析を依頼された症例の中で、時々大変興味のある症例に遭遇する。その中から医学的・科学的に重要だと考えられるものについて分子生物学的な研究を行ってきた。今回の講演では、5つの症例について研究テーマの設定の仕方と解析結果を報告する。

**I. 遺伝的 Fbg 低下症(異常症・欠損症)を疑う
問い合わせに対する返答例**

『Fbg 異常症に関するお問い合わせをいただきありがとうございます。遺伝的 Fbg の異常には、Fbg 機能異常症(99%以上がヘテロ接合体です)(活性量:低下、蛋白量:正常)、低 Fbg 症(狭義:

無 Fbg 血症のヘテロ接合体です)(活性量:低下、蛋白量:低下)、無 Fbg 血症(活性量:≒ 0、蛋白量:≒ 0)があります。また、Fbg は血液凝固能のほかに、創傷治癒・妊娠継続などに必要ですが、後者の機能は *in vitro* では測定できません。

Fbg 機能異常症の臨床症状としては、60~70%が無症状、15~20%が出血傾向、15~20%が血栓傾向を呈すると集計されています。出血症状と血栓症では対応や治療が全く異なるために遺伝子検査によって既報告例と比較することにより、予後のある程度予測することができます。日常生活では 50~100mg/dl 程度の Fbg が存在すれば出血の危険は少ないものと考えております。しかし、大手術・事故などの際の出血には注意が必要と考えますので、近親者又は担当の医師にその旨を理解いただいくことが肝要です。

一方、狭義の低 Fbg 症では蛋白量自体が少ないので、創傷治癒・妊娠継続の低下が心配されます。このため、蛋白量を測定して、Fbg 機能異常症か狭義の低 Fbg 症であるかを調べておくことが望ましいと考えます。また、特殊な例として、分泌されない異常 Fbg が肝細胞の粗面小胞体に蓄積し、肝機能障害や肝硬変をきたすものや、異常 Fbg の分解産物がアミロイドとして糸球体に沈着し腎アミロイドーシスを生じるものがあります。』

*信州大学学術研究院保健学系病因・病態検査学領域 nobuoku@shinshu-u.ac.jp

II. 遺伝子解析結果報告例

『Fbg A α 鎖、B β 鎖、 γ 鎖 DNA の PCR 増幅産物について、exon と exon-intron 境界部の DNA 塩基配列の解析を行いました。この結果、B β 鎖 exon2 の 68 番アミノ酸が Ala(GCT)から Thr(ACT)に置換するホモ異常が同定されました。PowerPoint File を添付いたします。

同じ変異のヘテロ症例を、1997年に現 聖隷浜松病院検査科の米川 修先生が学会で報告されています。また、ホモ症例についてはイタリアで 1 家系の報告があります。これによると、1 家族中の 3 例のホモ症例は全例血栓症を来すが、ヘテロ症例は血栓症にならないことが報告されています¹⁾。その理由として、正常 Fbg のこの部位は、トロンビン結合部位であり、この部位のホモ異常者ではトロンビンの結合力が低下していることが証明されています。これにより、生体内で血栓が形成された場合に、フィブリン塊にトロンビンを結合させる力が弱く、血流中へのトロンビン流出量を減少させることができません。したがって、血栓ができやすい状態になっていると考えられています。

以上より、ホモの方はかなり血栓症の危険が高いと予想されます。ご紹介いただいた家系では、発端者の両親がヘテロ、二人の兄弟はヘテロかホモの可能性があります。発端者以外のご家族が遺伝子検査を希望され、同意が得られれば、実施させていただきます。』

III. 症例 1

症例 1 は、Down 症候群の 1 歳男児で、心奇形の術前検査で Fbg 低値を指摘された。活性測定法 Fbg 16mg/dl、Fbg 抗原量 340mg/dl と著しい乖離が認められた。遺伝子解析の結果は γ Asp364His をきたす一塩基置換のヘテロ異常であった (Matsumoto I)²⁾。患者血漿から精製した Fbg のトロンビンによるフィブリン (Fbn) 重合反応を観察したところ、健常対照者およびヘテロ異常である γ Asn308Lys (Matsumoto II)、 γ Arg275Cys (Matsumoto III) の Fbg と比較したところ、著しい機能異常を呈した (図 1-A)³⁾。

そこで、ホモ異常の Fbg はどの程度異常な機能を有するのか知りたいと考え、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いてリコンビナント Fbg を作製して研究を行った。その結果、ホモ異常であるリコンビナント γ 364His はトロンビン添加後 3.5 時間すると重合が開始されるという、著しい異常が明らかになった (図 1-B, C)⁴⁾。さらに、この遅く開始される重合はどのような機序で生じるのかという疑問が生じた。これを明らかにするために、フィブリノペプチド A (FpA) のみを放出するレプチラーゼという酵素 (トロンビンは FpA とフィブリノペプチド B を放出する) を添加して Fbn 重合反応を観察した。この結果、図 1-D に示すように、レプチラーゼでは Fbn 重合反応が起こらないことが明らかになった⁴⁾。これらの実験結果から、トロンビン添加により生じる非常にゆっくり開始されるリコンビナント γ 364His の Fbn 重合反応は、いわゆる B-knob と b-hole の結合によって生じており、A-knob と a-hole の結合は起こらないことが明らかになった⁴⁾。

IV. 症例 2

症例 2 は、健康診断の血液検査で Fbg 低値を指摘された 20 歳代の女性であった。活性測定法 Fbg 81mg/dl、Fbg 抗原量 82mg/dl で低 Fbg 血症であった。すなわち、Fbg 欠損症のヘテロ患者であり、遺伝子解析の結果 γ Cys153Arg であった (Matsumoto II)⁵⁾。1 アミノ酸の置換により、なぜ血漿中に Fbg が分泌されないのであろうかという疑問が生じた。

そこで、リコンビナント γ 153Arg-Fbg を CHO 細胞に産生させたところ、細胞内の Fbg 濃度は 41 ± 31 ng/ml、細胞外 Fbg 濃度は < 10 ng/ml であり、正常 Fbg の細胞内 Fbg 濃度は 1134 ± 810 ng/ml、細胞外 Fbg 濃度は 1995 ± 1265 ng/ml より著しく低値であった。この結果は、図には示さないが Western blot 解析と Pulse-chase 解析の結果と合わせて、 γ 153Arg は細胞内で A α 鎖と B β 鎖と複合体を作ることができないために、Fbg が細胞外に分泌されないことが明らかになった⁵⁾。

再び、1 アミノ酸の置換により、なぜ Fbg が組

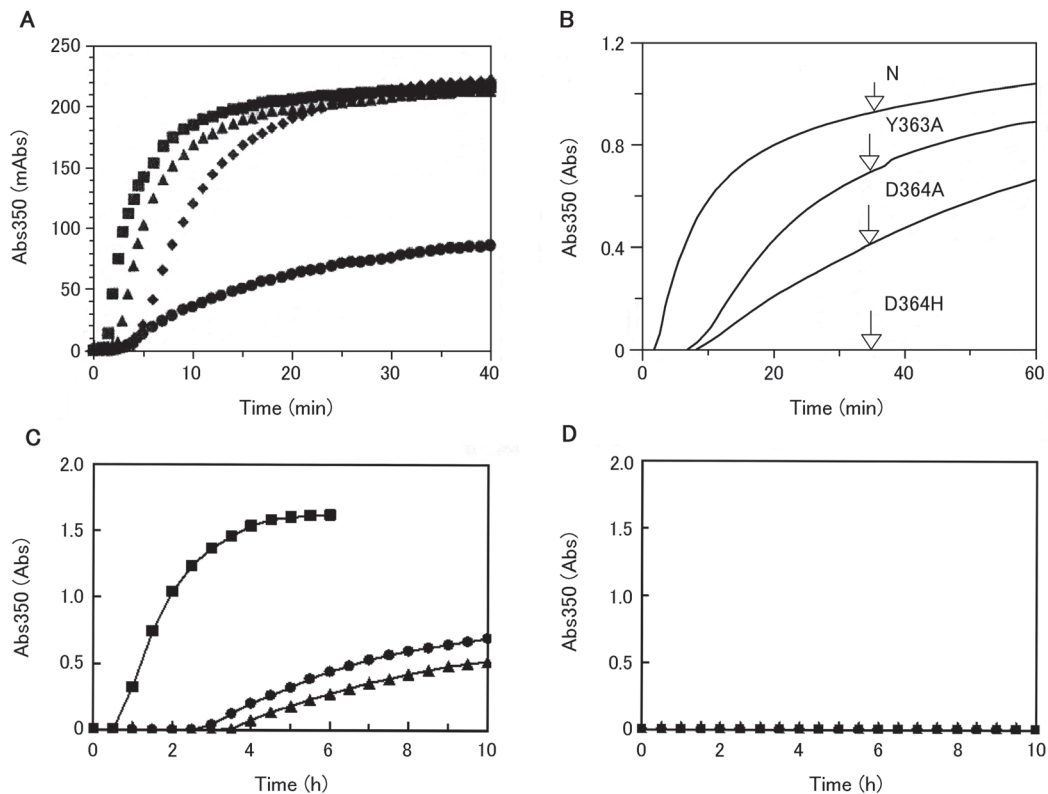


図1 Fibrinogen Matsumoto I (γ Asp364His) の血漿フィブリノゲンとリコンビナントフィブリノゲンのトロンビンあるいはレプチラーゼによるフィブリン重合反応

- A: 血漿フィブリノゲン フィブリノゲン濃度 0.18 mg/ml、トロンビン濃度 0.05 U/ml
 ■: normal control, ●: Matsumoto I (γ Asp364His), ▲: Matsumoto II (γ Asn308Lys),
 ◆: Matsumoto III (γ Arg275Cys)
- B: リコンビナントフィブリノゲン フィブリノゲン濃度 0.45 mg/ml、トロンビン濃度 0.05 U/ml
 N: normal control, D364H: γ Asp364His, D364A: γ Asp364Ala, Y363A: γ Tyr363Ala
- C: リコンビナントフィブリノゲン フィブリノゲン濃度 0.45 mg/ml、トロンビン濃度 0.05 U/ml
 ■: γ Asp364Ala, ●: γ Asp364Val, ▲: γ Asp364His
- D: リコンビナントフィブリノゲン フィブリノゲン濃度 0.45 mg/ml、レプチラーゼ濃度 0.05 U/ml
 ■: γ Asp364Ala, ●: γ Asp364Val, ▲: γ Asp364His

み立てられないのであろうか？ この疑問を明らかにするために、 $A\alpha$ 鎖、 $B\beta$ 鎖、 γ 鎖を $A\alpha$ 鎖+ $B\beta$ 鎖+ γ 鎖、 $A\alpha$ 鎖+ $B\beta$ 鎖、 $A\alpha$ 鎖+ γ 鎖、 $B\beta$ 鎖+ γ 鎖の4種類の組み合わせのCHO産生細胞を γ 153Arg鎖と正常 γ 鎖で作成した。この結果、図2に示すように、 γ 153Arg鎖は $A\alpha$ 鎖、 $B\beta$ 鎖とそれぞれ $A\alpha$ 鎖 γ 鎖複合体、 $B\beta$ 鎖 γ 鎖複合体を形成できないために $A\alpha B\beta\gamma$ 複合体を形成できないことが明らかになった⁶⁾。

V. 症例3

症例3は、無Fbg血症の1歳女兒(Kurashiki II)と4か月女兒(Yokkaichi)の2家系である。凝固検査結果を表に示した。遺伝子解析の結果、Kurashiki IIは $A\alpha$ 鎖の1238bp欠損(intron3-Intron4)と $A\alpha$ 鎖 c.54+3A>Cの複合ヘテロ(compound heterozygotes)であった⁷⁾。一方、Yokkaichiは $A\alpha$ 鎖の1238bp欠損のホモであった⁷⁾。それぞれの発端

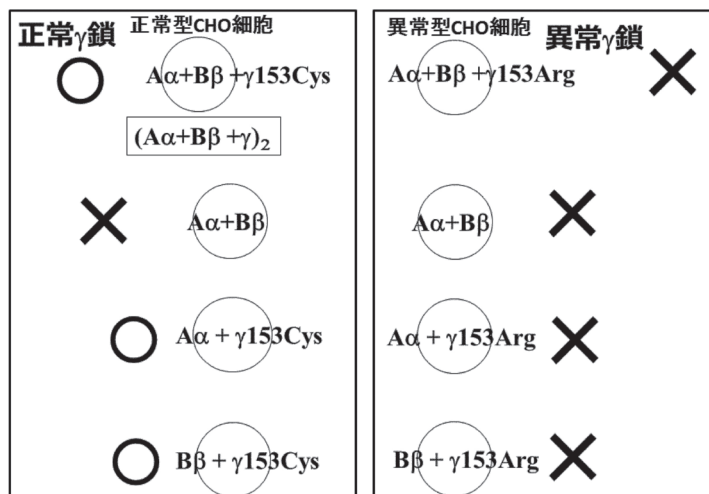


図2 Fibrinogen Matsumoto IV (γ Cys153Arg)によるフィブリノゲン組み立て中間体形成異常
 ○：複合体生成あり ×：複合体生成なし

表 無フィブリノゲン血症発端者とその両親の凝固系測定値と遺伝子異常

	PT (sec)	APTT (sec)	フィブリノゲン (mg/dl)		遺伝子異常	表現型
			トロンビン時間法	免疫法		
基準範囲	10.8-13.2	23.0-38.0	180-350	180-350		
Kurashiki II 家系						
発端者	>60.0	>200.0	<20	3	<i>FGA</i> c.54+3A>C <i>FGA</i> Δ 1238 bp	複合ヘテロ
父	11.7	28.6	313	311	<i>FGA</i> Δ 1238 bp	ヘテロ
母	12.4	29.3	223	231	<i>FGA</i> c.54+3A>C	ヘテロ
Yokkaichi 家系						
発端者	>60.0	> 200.0	<20	15*	<i>FGA</i> Δ 1238 bp	ホモ
父	11.3	29.0	191	248*	<i>FGA</i> Δ 1238 bp	ヘテロ
母	11.8	29.0	191	292*	<i>FGA</i> Δ 1238 bp	ヘテロ

PT: prothrombin time、APTT: activated partial thromboplastin time、*: EDTA 血漿使用

者と両親の凝固検査・遺伝子解析の結果から、どちらの家族も発端者の女兒は無 Fbg 血症であったにも関わらず、ヘテロの遺伝子異常を有する両親の血漿 Fbg 値はすべて基準範囲内であった。どうしてこのようなことが生じるのであろうか？

そこで、肝細胞を用いた mRNA 発現量を real time RT-PCR で定量したところ Aα 鎖、Bβ 鎖の mRNA 量は γ 鎖 mRNA 量の約半分であることが明らかになった⁸⁾。さらに、肝細胞癌株である HepG2

細胞を用いて、Aα 鎖、Bβ 鎖、γ 鎖の mRNA 量を siRNA を添加して約 50% に抑制した時の分泌 Fbg 量を ELISA で測定した。その結果、Aα 鎖では mRNA 量が 46.3±4.4% のときに Fbg 分泌量は 77.7±7.1% であるのに対して、Bβ 鎖では mRNA 量が 53.8±1.6% のときに Fbg 分泌量は 48.7±3.8%、γ 鎖では mRNA 量が 45.3±1.3% のときに Fbg 分泌量は 56.7±3.0% であった⁸⁾。

以上より、ヒト肝細胞の Aα 鎖 mRNA 量は、Bβ

鎖 mRNA 量と同等量産生されており、 γ 鎖の mRNA 量より 2 倍ほど多い。したがって、 $A\alpha$ 鎖 mRNA 量はヘテロ患者と同様に半分に減っても、産生される Fbg 量には影響をあたえないという結論を導き出した⁸⁾。

VI. 症例 4

γ 鎖 375 番 Arg が Gly に変異すると Fbg 機能異常症になるにもかかわらず、Trp に変異すると Fbg 低下症を呈し、さらにその分泌できない Fbg が肝細胞小胞体に蓄積し、やがて肝硬変 (Fibrinogen Storage Disease; FSD) に至る。なぜこのように一つのアミノ酸が別のアミノ酸になった時に異なる症状 (表現型) になるのでしょうか? わが国でも 2 歳の男児で発見された (症例 4)⁹⁾。その理由を明らかにするとともに、Fbg 低下症例について FSD に進展する症例かどうかを簡単に予測することを目指して、研究を開始した。

リコンビナント γ 375Trp-Fbg と γ 375Gly-Fbg を CHO 細胞に産生させたところ、 γ 375Gly の細胞内合成と細胞外分泌は野生型よりも高濃度であったが、 γ 375Trp では細胞外分泌が低下し、分泌されない異常 Fbg は細胞内に蓄積されていることが明らかになった¹⁰⁾。さらに、 γ 375Trp-Fbg 細胞は FITC 標識抗 Fbg 抗体による染色により、細胞

内に大粒状と繊維状を呈する異常封入体が多数観察された (図 3)¹⁰⁾。図には示さないが、粗面小胞体特異的蛋白であるカルネキシンに対する Texas Red 標識抗体を用いた二重染色の共焦点レーザー顕微鏡による観察と透過電子顕微鏡による観察で、2 種類の異常封入体はいずれも粗面小胞体由来であることが明らかになった¹⁰⁾。以上より、私たちの方法が、将来 FSD の発症前診断に使用できる可能性が出てきたので、今後研究をさらに発展させたい。

VII. 症例 5

症例 5 は、異常 Fbg の分解産物である異常ペプチドがアミロイドとして腎糸球体に沈着する腎アミロイドーシス症例であり、わが国第 1 例目である¹¹⁾。本症例は、遺伝子解析の結果 $A\alpha$ 鎖ポリペプチドの 523 番および 524 番アミノ酸をコードする 4 スクレオチド (AGTG) が欠損し、frameshift 異常により 24 個の異常なアミノ酸に変換され停止することが明らかになった (正常 $A\alpha$ 鎖は 610 個のアミノ酸からなる)¹¹⁾。現在まで、腎アミロイドーシスを呈する症例は、本症例を含め何れも Fbg $A\alpha$ 鎖 C 末端領域に変異が存在する 18 の型が報告されている。 $A\alpha$ 鎖 C 末端の異常により、その分解産物がなぜアミロイドとなって沈着するのか、そ

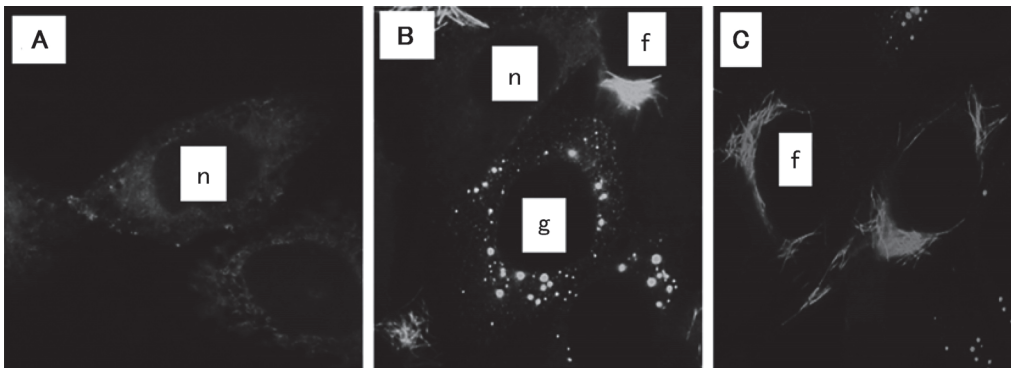


図 3 リコンビナントフィブリノゲン (γ Arg375Trp) 産生 CHO 細胞の抗フィブリノゲン抗体による染色像

- A: γ N フィブリノゲン産生 CHO 細胞
- B: γ Arg375Trp フィブリノゲン産生 CHO 細胞
- C: γ Arg375Trp フィブリノゲン産生 CHO 細胞
- n: 正常型、g: 大顆粒状、f: 繊維状

の機序を明らかにするために CHO 細胞を用いてリコンビナント Fbg を産生させ、血漿 Fbg との相違を検討している。

結 語

臨床検査の現場では、現在検査データの読み方、チーム医療、検査説明などの重要性が増している。また、ジェネラリストを目指すべきかスペシャリストを目指すべきかの議論がある。今回はスペシャリストとして検査に関するコンサルテーションについて、私が行っている Fbg 異常症・欠損症に関して紹介した。臨床検査技師がスペシャリストとして、専門分野の検査データに関して、医師と対等に議論できるようになることを期待している。

さらに、コンサルテーションを通じて遺伝子解析を依頼された症例の中で、興味あるものについて分子生物学的な研究を行った結果について、研究テーマの決め方と解析方法・証明方法を解説した。現場の臨床検査技師が特殊な症例・病態・測定値から研究を開始するためのヒントになれば幸いである。

文 献

- 1) Koopman J, Haverkate F, Lord ST, Mannuccill PM. Molecular basis of fibrinogen Naples associated with defective thrombin binding and Thrombosis. Homozygous substitution of B β 68 Ala \rightarrow Thr. *J Clin Invest* 1992; 90: 238-44.
- 2) Okumura N, Furihata K, Terasawa F, Nakagoshi R, Ueno I, Katsuyama T. Fibrinogen Matsumoto I: a γ 364Asp \rightarrow His (GAT \rightarrow CAT) substitution associated with defective fibrin polymerization. *Thromb Haemost* 1996; 75: 887-91.
- 3) Terasawa F, Okumura N, Higuchi Y, Ishikawa S, Tozuka M, Kitano K, et al. Fibrinogen Matsumoto III: a variant with γ 275Arg \rightarrow Cys (CGC \rightarrow TGC) -comparison of fibrin polymerization with those of Matsumoto I (γ 364Asp \rightarrow His) and Matsumoto II (γ 308Asn \rightarrow Lys). *Thromb Haemost* 1999; 81: 763-6.
- 4) Okumura N, Terasawa F, Haneishi A, Fujihara N, Hirota-Kawadobora M, Yamauchi K, et al. B:b interactions are essential for polymerization of variant fibrinogens with impaired holes 'a'. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2352-9.
- 5) Terasawa F, Okumura N, Kitano K, Hayashida N, Shimosaka M, Okazaki M, et al. Hypofibrinogenemia associated with a heterozygous missense mutation γ 153Cys to Arg (Matsumoto IV): In vitro expression demonstrates defective secretion of the variant fibrinogen. *Blood* 1999; 94: 4122-31.
- 6) Terasawa F, Fujita K, Okumura N. Residue γ 153Cys is essential for the formation of the complexes A α γ and B β γ , assembly intermediates for the A α B β γ complex and intact fibrinogen. *Clin Chim Acta* 2005; 353: 157-64.
- 7) Takezawa Y, Terasawa F, Matsuda K, Sugano M, Tanaka A, Fujiwara M, et al. Molecular analysis of afibrinogenemic mutations caused by a homozygous FGA1238 bp deletion, and a compound heterozygous FGA1238 bp deletion and novel FGA c.54+3A>C substitution. *Int J Hematol* 2012; 96: 39-46.
- 8) Takezawa Y, Matsuda K, Terasawa F, Sugano M, Honda T, Okumura N. siRNA down-regulation of FGA mRNA in HepG2 cells demonstrated that heterozygous abnormality of the A α -chain gene does not affect the plasma fibrinogen level. *Thromb Res* 2013; 131: 342-8.
- 9) Sogo T, Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Miida T, Callea F, et al. Fibrinogen storage disease caused by Aguadilla mutation presenting with hypobeta-lipoproteinemia and considerable liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49 :133-6.
- 10) Kobayashi T, Arai S, Ogiwara N, Takezawa Y, Nanya M, Terasawa F, et al. γ 375W fibrinogen-synthesizing CHO cells indicate the accumulation of variant fibrinogen within endoplasmic reticulum. *Thromb Res* 2014; 133: 101-7.
- 11) Yazaki M, Yoshinaga T, Sekijima Y, Nishio S, Kanizawa Y, Kametani F, et al. The first pure form of Ostertag-type amyloidosis in Japan: a sporadic case of hereditary fibrinogen A α -chain amyloidosis associated with a novel frameshift variant. *Amyloid* 2015; 22: 142-4.