

学位論文の要旨

保健学専攻	医療生命科学分野 医療生命科学領域	氏名	向井 早紀
<p>題目 Differences in the function and secretion of congenital aberrant fibrinogenemia between heterozygous γD320G (Okayama II) and $\gamma\Delta$N319-ΔD320 (Otsu I) (先天性異常フィブリノゲン血症ヘテロ接合体 γD320G (Okayama II) と $\gamma\Delta$N319-ΔD320 (Otsu I) の機能および分泌の違い)</p>			
<p>要旨</p> <p>背景：血漿中のフィブリノゲン (Fbg) が低濃度であり、かつ機能異常を有する Fbg 異常症患者2名に遭遇し、Okayama II および Otsu I と同定した。Okayama II および Otsu I の異常および欠失アミノ酸部位は重複していたにもかかわらず、血漿中の Fbg 活性濃度と、Fbg 活性濃度とタンパク濃度の比が著しく異なっていた。</p> <p>方法：血漿 Fbg 濃度はトロンビン時間法 (活性濃度) と免疫学的方法 (タンパク濃度) により求めた。遺伝子解析は Fbg の全エクソンおよびエクソンとイントロン境界領域をダイレクトシーケンス法にて行った。Fbg の凝固機能解析は患者血漿中から精製した Fbg を用いて、トロンビンによるフィブリン (Fbn) 重合試験、Clottability 試験および Ca イオンあるいは GPRP ペプチドによる Fbg のプラスミン分解抑制試験を行った。また、異常リコンビナント Fbg を CHO 細胞にて合成させて、細胞培養上清および細胞破碎上清中の Fbg 濃度を ELISA にて測定して Fbg の分泌能を解析した。タンパク解析は、患者血漿中から精製した Fbg および Fbg 安定化発現 CHO 細胞を破碎した上清を用いて、SDS-PAGE およびウエスタンブロットを行った。</p> <p>結果：Okayama II の Fbg 測定値は活性量0.41g/L、抗原量0.85g/L であり (比は0.482)、遺伝子解析ではγ320番コドンに GAT→GGT のヘテロ変異が認められ、このヌクレオチド置換はアミノ酸 Asp→Gly の置換 (γD320G) を引き起こす。そして Otsu I の Fbg 測定値は活性量0.09g/L、抗原量1.43g/L であり (比は0.063)、遺伝子解析ではγ319およびγ320に AATGAT のヘテロ欠失が認められ、結果としてγAsn319 および γAsp320 の欠失 ($\gamma\Delta$N319-ΔD320) を引き起こす。精製血漿 Fbg を用いて SDS-PAGE と CBB 染色を行ったところ、異常γ鎖が Okayama II でははっきりせず、Otsu I では明瞭に存在していた。しかし、抗γ鎖抗体を用いたウエスタンブロット法では Okayama II においてもわずかな異常γ鎖が観察された。トロンビンによる Fbn 重合試験を行ったところ、Okayama II では lag period が正常コントロールよりもわずかに長いだけであった一方、Otsu I では30分以内に重合が起こらなかった。その他の Fbg 機能においては大きな差は認められなかった。両者の異常γ鎖は CHO 細胞にて合成され、Fbg へ組み立てられていた。しかしながら、γD320G の培養液/細胞破碎液の Fbg 濃度比は 0.11 ± 0.02 であり、$\gamma\Delta$N319-ΔD320 の 0.66 ± 0.18 よりも6倍低かった。</p> <p>結論：Okayama II の血漿 Fbg 中に存在する異常γ鎖の割合が低いため、Fbn 重合反応はほぼ正常に行われ、一方、Otsu I では血漿 Fbg 中に存在する異常γ鎖の割合が高いため、Fbn 重合反応が著しく低下したと考えられた。</p> <p style="text-align: right;">研究指導教員 信州大学学術研究院 (保健学系) 教授 奥村 伸生</p>			