

◆ 原 著 ◆

先天性 antithrombin III (AT III) 欠乏症家系に おける AT III 遺伝子の DNA 解析

宇野由佳*¹, 重清俊雄*¹, 吉本勝彦*¹
斎藤史郎*¹, 猪本享司*²

DNA Analysis of Antithrombin III (AT III) Gene in Three Japanese Kindreds with Congenital AT III Deficiency

Yuka UNO*¹, Toshio SHIGEKIYO*¹, Katsuhiko YOSHIMOTO*¹
Shiro SAITO*¹ and Takashi INOMOTO*²

Key words: congenital AT III deficiency, AT III gene, RFLP

DNA samples from white blood cells of 9 patients and 10 healthy members in 3 Japanese kindreds (Family Mo, Mi and Tu) with congenital antithrombin III (AT III) deficiency, and of 48 normal Japanese individuals were analysed by Southern blotting method using AT III cDNA probe PA62.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) by uses of *Pst* I and PA62 demonstrated + allele in 50%, - allele in 50%, F allele in 59% and S allele in 41% of 96 alleles from 48 normal Japanese individuals, indicating that the frequencies of RFLP in Japanese are almost the same as those in other races reported before. This suggests that DNA analysis on Japanese families with congenital AT III deficiency was possible using RFLP of AT III gene because of high frequencies of RFLP in normal Japanese.

All patients in 3 kindreds with congenital AT III deficiency had a -/+ genotype, indicating that complete deletion of one allele of AT III gene can be neglected. No abnormal DNA fragments were observed by Southern blot analysis of genomic DNAs from the patients in the 3 kindreds digested with various restriction enzymes (*Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Bgl* II, *Bcl* I, *Kpn* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Taq* I and *Xba* I). This suggests that AT III deficiency in our 3 kindreds is not caused by major structural alterations such as partial deletion, rearrangement and duplication, small deletion, insertion or limited nucleotide substitution in the AT III gene. In addition, it was suggested by analysis of polymorphism of AT III gene in the members of Family Mo and Mi that abnormal AT III gene existed on -, F allele in these families.

*¹ 徳島大学医学部第一内科〔〒770 徳島県徳島市蔵本町2丁目50〕: The First Department of Internal Medicine, School of Medicine, the University of Tokushima, Tokushima, Japan

*² 香川県立津田病院内科〔〒769-24 香川県大川郡津田町津田〕: Department of Internal Medicine, Tsuda Hospital, Kagawa, Japan 受付: 1990.4.25, 受理: 1990.7.12.

緒 言

先天性 antithrombin III (AT III) 欠乏症は 1965 年, Egeberg¹⁾ により初めて報告されて以来, 世界中で多くの報告があり, 我国でも 20 数家系が報告されている. 本症は常染色体優性遺伝を示し, 人口約 5,000 人に 1 人の割合で発生するといわれている. 患者は重篤な血栓性素因を有し, 特に静脈血栓症や肺梗塞の発症が多い. 1982 年に AT III の cDNA がクローン化されたが²⁾, その後, AT III 遺伝子は染色体の lq 23~25 上に存在し, 6 つの exon と 5 つの intron より構成され, 総長約 19 kb であることが証明された^{3,4)}. その結果, 本症は遺伝子レベルでの解析が可能となったが⁵⁾⁻⁷⁾, まだ大部分の家系では遺伝子異常の本態は明らかにされていない. われわれは本症の自験 3 家系について AT III 遺伝子の DNA 解析を試みたので, その成績を報告する.

I. 対象と方法

1. 対象

対象は後述の先天性 AT III 欠乏症 3 家系の患者 9 名, 正常家系員 10 名, 正常日本人 48 名 (男性 23 名, 女性 25 名) である.

2. 血漿 AT III の活性と抗原量

AT III 活性は, heparin cofactor 活性をテストチーム AT III キット (Kabi) を用い, 合成基質法で, progressive antithrombin 活性を von Kaulla ら⁸⁾ の方法に準じて測定した. AT III 抗原量は NOR パルチゲン (Hoechst) を用い, 単純免疫拡散法で測定した. 交叉免疫電気泳動は大場⁹⁾ の方法に準じて行った.

3. DNA の解析方法

末梢血 10~20 ml をヘパリン加採血し, 白血球を分離後, 高分子ゲノム DNA を抽出した¹⁰⁾. 抽出した DNA 約 10 μ g を, 各種制限酵素 (東洋紡) で切断し, 0.8% アガロースゲルに電気泳動し, アルカリ処理で一本鎖 DNA にした後, ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell) に転写した¹¹⁾. その後, ラングムブライミング法により, [α -³²P]-dCTP でラベルした AT III cDNA probe PA 62 (Dr. Bock よ

り供与)²⁾ とプロットした DNA を 42°C で 1 晩, ハイブリダイズさせた後, ニトロセルロース膜を 50°C で, 60 分間, 3 回洗浄した¹⁰⁾. その後, Kodak X-OMAT フィルム (Eastman Kodak) を使用し, オートラジオグラフィーにより cDNA probe とハイブリダイズした DNA フラグメントを検出した.

4. AT III 遺伝子の restriction fragment length polymorphism (RFLP)

AT III 遺伝子の RFLP には, sequence polymorphism と, length polymorphism の 2 種類が知られている. sequence polymorphism は N 末端より 305 番目の glutamine をコードする塩基に CAA と CAG の 2 種類が存在し, CAA は *Pst* I により切断されないが CAG は切断されるために生じるもので, 切断される allele を +, 切断されない allele を - で表示すると, サザンプロット上, + allele は 5.5 kb と 5.0 kb の位置に, - allele は 10.5 kb の位置にバンドを生じる⁵⁾. length polymorphism は AT III 遺伝子の翻訳開始コドンより 345 塩基 5' 側に 108 塩基または 32 塩基の variable segment が存在するために生じるもので, 108 塩基を含む allele を S, 32 塩基を含む allele を F と表示し, *Bam* HI による処理断片では, 76 塩基の差により, ゲル上の易動度が異なるため S, F allele を鑑別しうる¹²⁾. また, *Pst* I による処理断片では, S allele 上には, *Pst* I site が存在するが, F allele 上には存在しないため, 1.7 kb と 1.2 kb の polymorphism が認められ, 1.7 kb のバンドが F allele に, 1.2 kb のバンドが S allele に相当する¹³⁾.

II. 症 例

1. Mo 家系 (Fig. 1)

発端者 (IV-2) は, 40 歳, 男性. 徳島県出身. 昭和 63 年 3 月末より腹痛が出現し, 近医に胃潰瘍, 脾炎を疑われ加療中, 4 月 25 日, 下血が出現し, 当院第一外科に紹介され入院. 同日, 緊急手術をうけ腸間膜静脈血栓症と診断され, 血液凝固学的検査のため当科に紹介された. 術後, 左側胸痛, 血痰, 呼吸困難が出現.

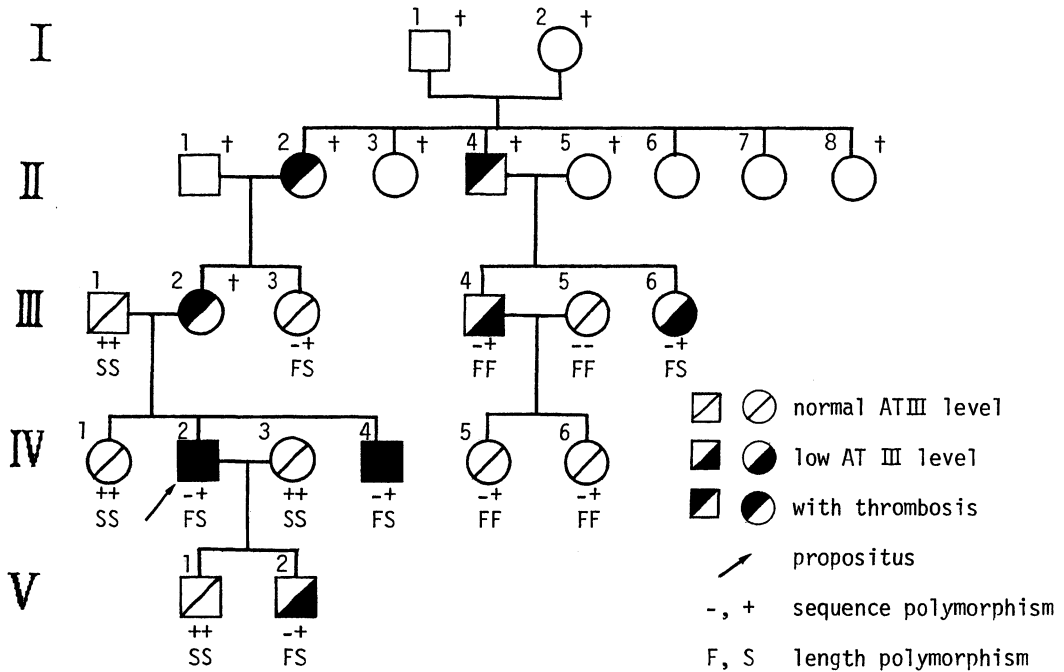


Fig. 1 Pedigree of Family Mo

Table 1 Plasma ATIII levels in Family Mo

family	heparin cofactor activity (%)	ATIII antigen (mg/dl)
III-1	95	31.5
III-3	101	29.0
III-4	52	11.1
III-5	75	24.4
III-6	50	14.4
IV-1	96	29.0
IV-2	68	14.0
IV-3	95	31.5
IV-4	51	12.0
IV-5	90	28.6
IV-6	97	31.5
V-1	103	28.5
V-2	63	16.5
normal range	80-130	27.2-32.9

肺血流シンチグラフィーで肺梗塞と診断され、ヘパリン、ウロキナーゼの投与により症状は改善し、その後ワーファリンの投与を受けている。発端者の弟 (IV-4) も 33 歳時に腸間膜静脈血栓症で広範囲小腸切除術を受けている。母親 (III-2) は 40 歳代より transient ischemic attack (TIA) を繰り返し、69 歳時に脳梗塞で

死亡している。また、母方の祖母 (II-2) は脳梗塞で死亡し、その弟 (II-4) は 30 歳代で腸間膜静脈血栓症様症状で死亡している。発端者 (IV-2) の血漿 AT III 活性は、heparin cofactor 活性 68%、progressive antithrombin 活性 60%、AT III 抗原 14.0 mg/dl と、活性と抗原量とともに正常値の約半分に低下していた。その他の家系員 4 名 (III-4, III-6, IV-4, V-2) に同様の低下を認め (Table 1)、本家系は先天性 AT III 欠乏症と診断された。なお、交叉免疫電気泳動では患者と正常者の AT III の易動度と波形に差はみられなかった。

2. Mi 家系 (Fig. 2)

発端者 (III-2) は、25 歳、女性。香川県出身。昭和 63 年 1 月 18 日 (妊娠 13 週) に突然左下肢の異和感、疼痛、腫張が出現し、香川県立津田病院外科を受診し、左下肢深部静脈血栓症と診断された。その後同院内科で先天性 AT III 欠乏症と診断され、AT III 製剤の投与を受けながら無事出産した。発端者の父親 (II-2) は 33 歳時にネフローゼ症候群で入院中、左下肢静脈血栓症に罹患した既往があり、父親の長兄 (II-1) は 15 歳時に腸間膜静脈血

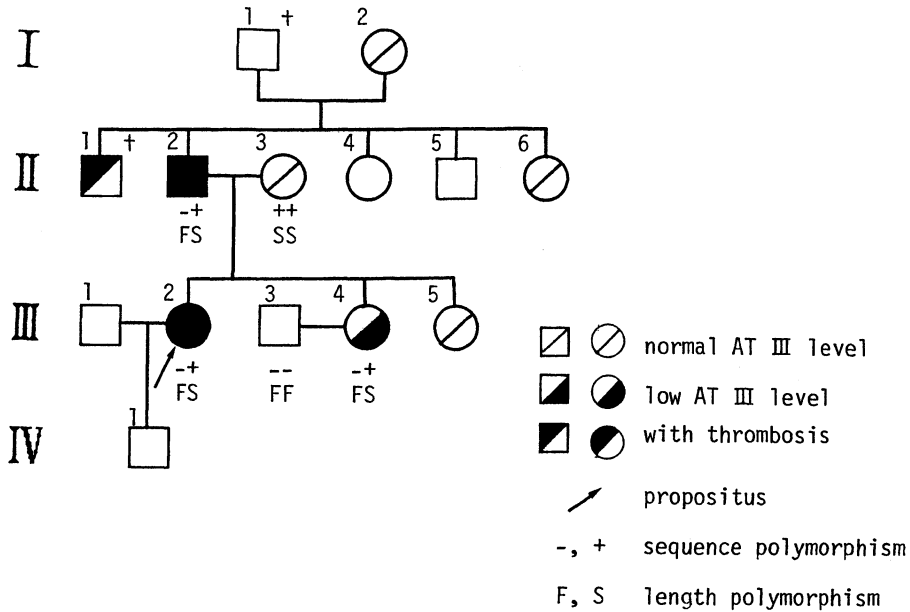


Fig. 2 Pedigree of Family Mi

Table 2 Plasma ATIII levels in Family Mi

family	heparin cofactor activity (%)	ATIII antigen (mg/dl)
I-2	88	26.1
II-2	56	20.3
II-3	108	24.6
II-6	92	24.2
III-2	59	18.7
III-4	50	21.4
III-5	79	26.1
normal range	80-130	27.2-32.9

栓症様症状で死亡している。家系員の AT III の測定結果を Table 2 に示す。発端者 (III-2) の血漿 AT III 活性は heparin cofactor 活性 59%, progressive antithrombin 活性 49%, AT III 抗原 18.7 mg/dl と、活性値と抗原量がともに正常値の約半分に低下していた。その他の家系員 2 名 (II-2, III-4) でも同様の低下を認め、本家系を先天性 AT III 欠乏症と診断した。交叉免疫電気泳動では患者と正常者の AT III の易動度と波形に差は認められなかった。

3. Tu 家系

発端者は 42 歳, 男性, 広島県出身, 25 歳

時, 下肢静脈血栓症を指摘されている。昭和 57 年, 左大腿部の疼痛, 腫張が出現し, 広島大学原医研内科にて AT III 活性, 抗原量の低下を指摘され, また次女に AT III 活性, 抗原量の低下が認められ, 先天性 AT III 欠乏症と診断されている¹⁴⁾。現在, 患者はワーファリンを服用中であるが, 血漿 AT III の heparin cofactor 活性は 67%, AT III 抗原量は 16.8 mg/dl である。交叉免疫電気泳動では, 患者と正常者の AT III の易動度と波形に差は認めなかった。

III. 結 果

1. 正常日本人における AT III 遺伝子の RFLP の検討

正常日本人 48 名のゲノム DNA の Pst I 処理断片を検討した結果, genotype としては, -/+・F/S を 16 名, -/-・F/F を 13 名, +/+・S/S を 10 名, -/+・F/F を 6 名, +/+・F/S を 3 名に認め, -/-・F/S, -/-・S/S, -/+・S/S, +/+・F/F を示すものは認めなかった。また, sequence polymorphism の頻度は, + allele 50%, - allele 50%, length polymorphism の頻度は, F allele 59%, S allele 41% であった。

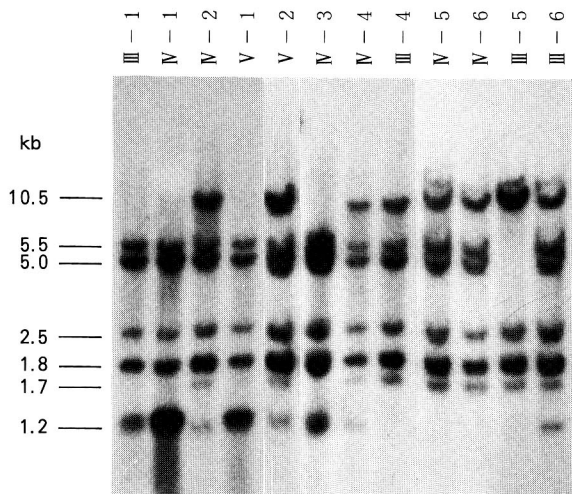


Fig. 3 Southern blot analysis of genomic DNA from the members of Family Mo, DNA was digested with *Pst* I.

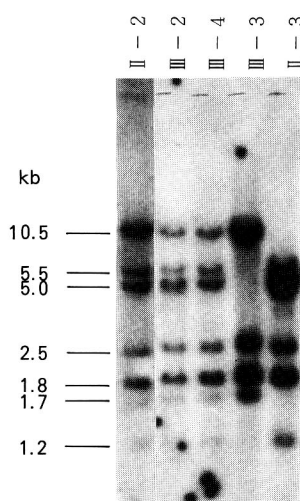


Fig. 4 Southern blot analysis of genomic DNA from the members of Family Mi, DNA was digested with *Pst* I.

2. 先天性 AT III 欠乏症家系における AT III 遺伝子の RFLP の検討

Mo 家系における結果 (Fig. 1, 3) は, AT III 欠乏症の発端者 (IV-2) とその次男 (V-2) の genotype は $-/+ \cdot F/S$ であり, AT III 正常の発端者の妻 (IV-3) の genotype は $+/+ \cdot S/S$ であった. したがって, 発端者の次男の $+$, S allele は母由来で正常であり, $-$, F allele が父由来で異常と考えられた. AT III 欠乏症のほかの家系員 (IV-4, III-4, III-6) もすべて, $-$, F の allele を有しており, 異常遺伝子は, $-$, F allele 上に存在することが推測された.

Mi 家系では Fig. 2, 4 のごとく, AT III 欠乏症の発端者の父 (II-2) と発端者 (III-2) の genotype は, $-/+ \cdot F/S$ であり, AT III 正常の発端者の母 (II-3) の genotype は, $+/+ \cdot S/S$ であった. したがって, 発端者の $+$, S allele は母由来で正常であり, $-$, F allele は父由来で異常であると考えられた. AT III 欠乏症のほかの家系員 (III-4) も, $-$, F allele を有しており, 異常遺伝子は, $-$, F allele 上に存在すると推測された.

Tu 家系では, 患者は $-/+ \cdot F/S$ genotype を示した.

3. 先天性 AT III 欠乏症家系における AT

III 遺伝子の各種制限酵素による切断片の検討

各種制限酵素 (*Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Kpn* I, *Bgl* II, *Bcl* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Taq* I, *Xba* I) を用いてゲノム DNA を切断し, AT III 遺伝子の切断片のパターンを先天性 AT III 欠乏症患者と正常人で比較した. Mo家系, Mi家系, Tu家系ともに患者の *Bam* HI, *Eco* RI による AT III 遺伝子の切断片のパターンは従来, 報告されている正常人のバンド⁶⁾ と差はなく, その他の制限酵素による AT III 遺伝子の切断片の所見も患者と正常人で差を認めなかった.

IV. 考 察

先天性 AT III 欠乏症の日本人家系について AT III 遺伝子の RFLP による DNA 分析が可能か否かを検討するために, 始めに正常日本人における AT III 遺伝子の RFLP の頻度を求めたところ, $-$, $+$ allele はそれぞれ 50% ずつ, F , S allele はそれぞれ 59% と 41% に認められた. このことは日本人でも AT III 遺伝子の RFLP の頻度は十分高いことを示し, それによる DNA 分析が可能であることを示唆した. 日本人の AT III 遺伝子の RFLP の頻度については, Oguma ら¹⁵⁾ も報告してお

り、われわれの成績とほぼ同様である。Prochownik ら⁵⁾ は、ギリシア人、イタリア人、黒人、インド人などの AT III 遺伝子の sequence polymorphism の頻度を示しているが、ほぼ 50% ずつに -、+ allele を認めている。また、Bock ら¹⁶⁾ は、北欧人について RFLP の頻度は、- allele は 66%、+ allele は 38%、F allele は 75%、S allele は 25% と報告しており、AT III 遺伝子の RFLP にはあまり人種差がないと考えられる。

われわれが調べた先天性 AT III 欠乏症の 3 家系では患者はすべて *Pst* I polymorphism で -/+ genotype をもつヘテロ接合体であったため、AT III 遺伝子の 1 つの allele の完全欠失は否定された。さらに患者 DNA の *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Bgl* II, *Bcl* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Taq* I, *Kpn* I, *Xba* I などの制限酵素による切断片のパターンが正常人のそれらと差を認めなかったことより、AT III 遺伝子上の部分欠失、再構成、重複などの大きな異常の存在は考え難く、点突然変異のような小さな変化の存在が疑われた。また、Mo 家系と Mi 家系では、家系員の検討より、-、F allele 上に異常の存在することが推定された。しかし、理論上、AT III 遺伝子以外に AT III 蛋白の合成、分泌に影響を及ぼす遺伝子の異常 (trans-acting unlinked mutation) も否定できないため、連鎖解析による検討が必要と考えられるが、現在のところ -、F allele と AT III 欠乏症との Lod score は、Mo 家系で 1.2、Mi 家系で 0.3 であり、今後、連鎖を証明するためにはさらに多くの家系員を検索する必要がある。

先天性 AT III 欠乏症の遺伝子異常に関する研究は、1983 年、Prochownik ら⁵⁾ が AT III cDNA probe を用いた Southern blot 法によって本症の 1 家系で AT III 遺伝子の 1 つの allele の完全欠失を見出だし、ほかの 1 家系で完全欠失のないことを示して、本症の病因に heterogeneity が認められることを報告したのが最初である。次いで、1987 年、Bock ら⁶⁾ は、先天性 AT III 欠乏症の 16 家系で、*Pst* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Hin* d III の 4 酵素による切断片を検討し、15 家系の AT III 遺伝子で

は 2 つの allele が存在すること、異常断片は認められないことから、これらの家系における AT III 欠乏の原因は、AT III 遺伝子上の 100 bp 以下のごく狭い範囲の欠失、挿入、点突然変異、あるいは trans-acting unlinked mutation によるものと推定している。また、1988 年、Sacks ら¹⁷⁾ は、先天性 AT III 欠乏症のスコットランドの大家系について連鎖解析を行い、AT III 遺伝子の 1 つの allele の完全欠失のない本症の家系で AT III 欠乏の原因が AT III 遺伝子自身の異常に起因していることを示した。本邦では、先天性 AT III 欠乏症の遺伝子異常に関する研究は少なく、小熊ら⁷⁾ の報告をみるにすぎない。彼らは本症の 4 家系について Southern blot 分析を実施し、4 家系とも AT III 遺伝子の 1 つの allele の完全欠失はみられないことを証明した。さらにそのうちの 2 家系では -、F allele 上に、1 家系では +、F allele 上に異常遺伝子が存在することを推定している。

最近、先天性 AT III 異常症の一種である AT III Utah¹⁶⁾ の異常遺伝子の構造解析が行われ、407 位の proline の leucine への置換 (CCT→CTT mutation) が証明された¹⁸⁾。また、AT III Oslo¹⁹⁾ では、404 位の alanine の threonine への置換も同定されている²⁰⁾。この 404 位から 407 位の部位は、AT III の分子構造を保持するために不可欠の部位と考えられ、この部の一塩基置換により生じた異常 AT III 分子は、turn over が促進し、その結果、患者 AT III の抗原量が低下し、先天性 AT III 欠乏症と鑑別困難な病態になると推測されている²⁰⁾。したがって、従来、先天性 AT III 欠乏症と考えられてきた症例の中に、この報告例のような先天性 AT III 異常症が混在していることが想像される。ただ、AT III Utah では、Western blot 法で異常なバンドが認められ¹⁶⁾、AT III Oslo では交叉免疫電気泳動で陰極側に異常なピークが認められているので¹⁹⁾、これらの点で先天性 AT III 欠乏症との鑑別は可能と思われる。われわれが調べた 3 家系の AT III は、交叉免疫電気泳動で異常ピークが認められず、AT III Oslo のような AT III 異常症とは

考えにくい、Western blot をまだ実施しておらず、AT III Utah のような AT III 異常症であることを完全には否定はできない。

謝辞：AT III cDNA probe PA 62 を分与していただいた Temple 大学の Dr. Bock, ならびに連鎖解析について御指導いただいた国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部の中込弥男先生に深謝します。また、家系員の検索にご協力下さいました小松島赤十字病院内科の藤野修先生、宮恵子先生、高松赤十字病院内科の河内康憲先生に感謝します。

文 献

- 1) Egeberg, O.: Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **13**: 516~530, 1965.
- 2) Bock, S. C., Wion, K. L., Vehar, G. A. and Lawn, R. M.: Cloning and expression of the cDNA for human antithrombin III. *Nucleic Acids Res.*, **10**: 8113~8125, 1982.
- 3) Bock, S. C., Harris, J. F., Balazs, I. and Trent, J. M.: Assignment of the human antithrombin III structural gene to chromosome 1q 23~25. *Cytogenet. Cell Genet.*, **39**: 67~69, 1985.
- 4) Prochownik, E. V., Bock, S. C. and Orkin, S. H.: Intron structure of the human antithrombin III gene differs from that of other members of the serine protease inhibitor superfamily. *J. Biol. Chem.*, **260**: 9608~9612, 1985.
- 5) Prochownik, E. V., Antonarakis, S., Bauer, K. A., Rosenberg, R. D., Fearon, E. R. and Orkin, S. H.: Molecular heterogeneity of inherited antithrombin III deficiency. *N. Engl. J. Med.*, **308**: 1549~1552, 1983.
- 6) Bock, S. C. and Prochownik, E. V.: Molecular genetic survey of 16 kindreds with hereditary antithrombin III deficiency. *Blood*, **70**: 1273~1278, 1987.
- 7) 小熊 豊, 桜川信男, 平賀紘一: AT III 遺伝子の制限酵素断片の多型性について—正常人, 異常 AT III「富山」ならびに AT III 欠乏症における検討. *臨床病理*, **81**: 64~74, 1989.
- 8) von Kaulla, E. and von Kaulla, K. N.: Antithrombin III and disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, **48**: 69~80, 1967.
- 9) 大場教子, 石崎武志, 橋爪一子, 堀田 宏, 吉谷久子, 伊東恵子, 松原藤継, 松田 保: 交叉免疫電気泳動法を用いた AT III の動態の研究. *臨床血液*, **27**: 710~716, 1986.
- 10) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold spring Harbor Laboratory press, Cold spring Harbor, New York, 1982.
- 11) Southern, E. M.: Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503~517, 1975.
- 12) Bock, S. C. and Levitan, D. J.: Characterization of an unusual DNA length polymorphism 5' to the human antithrombin III gene. *Nucleic Acids Res.*, **11**: 8569~8582, 1983.
- 13) Prochownik, E. V.: Molecular genetics of inherited Antithrombin III deficiencies. *Am. J. Med.*, **87** (suppl 3B): 3B-15s~3B-18s, 1989.
- 14) 久住静代, 小林 誠, 高田 昇, 今中文雄, 前浜修爾, 武富嘉亮, 藤村欣吾, 蔵本 淳: 先天性 AT III 欠乏症に対する AT III 濃縮製剤輸注効果. *臨床血液*, **25**: 25~30, 1984.
- 15) Oguma, Y., Sakuragawa, N. and Hiraga, K.: The antithrombin III gene polymorphism in Japanese: Examination for haplotypes relevant to abnormal antithrombin III biosynthesis. *Thromb. Haemostas.*, **62**: 382, 1989.
- 16) Bock, S. C., Harris, J. F., Schwartz, C. E., Ward, J. H., Hershgold, E. J. and Skolnick, M. H.: Hereditary thrombosis in a Utah kindred is caused by a dysfunctional antithrombin III gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **37**: 32~41, 1985.
- 17) Sacks, S. H., Old, J. M., Reeders, S. T., Weatherall, D. J., Douglas, A. S., Winter, J. H. and Rizza, C. R.: Evidence linking familial thrombosis with a defective antithrombin III gene in two British kindreds. *J. Med. Genet.*, **25**: 20~24, 1988.
- 18) Bock, S. C., Marrinan, J. A. and Radziejewska, E.: Antithrombin III Utah: Proline-407 to Leucine mutation in a highly conserved region near the inhibitor reactive site. *Biochemistry*, **27**: 6171~6178, 1988.
- 19) Hultin, M. B., McKay, J. and Abildgaard, U.:

- Antithrombin Oslo : Type Ib classification of the first reported antithrombin-deficient family, with a review of hereditary antithrombin variants. *Thromb. Haemostas.*, **59** : 468~473, 1988.
- 20) Bock, S. C., Silbermann, J. A., Wikoff, W., Abildgaard, U. and Hultin, M. B. : Identification of a threonin for alanine substitution at residue 404 of antithrombin III Oslo suggests integrity of the 404~407 region is important for maintaining normal plasma inhibitor levels. *Thromb. Haemostas.*, **62** : 494, 1989.
-