

**Evidence for a dominant-negative effect of a missense mutation
in the *SERPING1* gene responsible for hereditary angioedema
type I**

(遺伝性血管性浮腫 I 型を引き起こす *SERPING1* 遺伝子の
ミスセンス変異による dominant-negative 効果の証明)

安野 秀一郎

山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 皮膚科学分野

令和 4 年 1 月

目次

1 要旨	3
2 背景と目的	3
3 方法	5
1) 発現ベクターの作製	5
2) Western blot (WB)と共免疫沈降法	6
3) 間接蛍光抗体法	7
4 結果	7
1) p.S150F 変異型 C1INH は細胞外に全く分泌されず、さらに野生型 C1INH の分泌を阻害した	7
2) 野生型 C1INH の細胞内での発現量および細胞外への分泌量は、p.S150F 変異型 C1INH の用量依存的に減少した	8
3) 野生型 C1INH と p.S150F 変異型 C1INH は細胞質内において同様の発現様式を示したが、共発現系では野生型の発現量が顕著に減少した	10
4) p.S150F 変異型 C1INH は極めて高い重合体の形成能を有しており、野生型 C1INH とも強く結合した	11
5 考察	12
6 謝辞	13
7 参考文献	14

1 要旨

遺伝性血管性浮腫 (hereditary angioedema:以下 HAE) は、全身の様々な部位に突発性、一過性の浮腫を生じる稀な常染色体優性遺伝性疾患である。HAE は、C1 inhibitor (C1INH) をコードする serpin family G member 1 (*SERPING1*) 遺伝子の変異により生じる HAE I 型および II 型、*SERPING1* 遺伝子以外の遺伝子異常を認める HAE III 型 (HAE with normal C1INH) の 3 つに分類される。これまでに、*SERPING1* 遺伝子においては多数の病的変異が同定されているが、各変異による HAE の発症機構については未だ十分に解明されていないのが現状である。

本研究では、以前に我々が報告した HAE I 型の患者に同定された *SERPING1* 遺伝子のミスセンス変異 c.449C>T (p.S150F) に関して、詳細な発現・機能解析を *in vitro* レベルで行った。まず、p.S150F 変異型 C1INH は細胞内では安定して発現するが、細胞外には全く分泌されないことが示された。次に、変異型 C1INH が野生型 C1INH の分泌を強力に阻害することが明らかになった。さらなる解析で、野生型 C1INH は変異型 C1INH との相互作用によって細胞質内に留め置かれてしまうだけでなく、分解も誘導されることが示唆された。本研究によって、p.S150F 変異型 C1INH は野生型 C1INH に対して dominant-negative 効果を発揮することが証明され、それが本遺伝子変異による HAE I 型の主要な発症メカニズムと考えられた。

2 背景と目的

遺伝性血管性浮腫 (hereditary angioedema:以下 HAE) は、皮膚を含む全身の様々な臓器に一過性の浮腫を突発的に生じる稀な常染色体優性遺伝性疾患である¹。顕著な浮腫が皮膚、消化管、咽頭・喉頭などに生じるため、腹痛や呼吸困難、時には咽頭浮腫による窒息を来すリスクもある難治性疾患であり、本邦における指定難病にも認定されている。

HAE は 3 つの型に分類されている (HAE I 型～III 型)。その中で、HAE I 型および II 型 (OMIM #106100) は、plasma protease C1 inhibitor (C1INH) をコードする serpin family G member 1 (*SERPING1*) 遺伝子の変異により生じる^{2,3}。HAE I 型と II 型の違いは、I 型では血液中の C1INH の蛋白量・活性がともに低下する一方で、II 型では C1INH の蛋白量は正常で活性のみが低下することである (表 1)。HAE III 型 (OMIM #610619) は、血液中における C1INH の定量・活性がともに正常であることから、HAE with normal C1INH とも呼ばれている⁴。HAE III 型は、遺伝学的に heterogeneous な疾患であり、現在までに factor XII (*F12*)、plasminogen (*PLG*)、angiopoietin (*ANGPT1*) の 3 つが原因遺伝子として報告されている (表 1)⁵⁻⁷。

表 1. 遺伝性血管性浮腫の分類

	I 型	II 型	III 型 (HAE with normal C1INH)
C1INH 値	低下	正常/上昇	正常
C1INH 活性	低下	低下	正常
原因遺伝子	<i>SERPING1</i>		<i>F12, PLG, ANGPT1</i>

我々は最近、反復する腹痛を主訴とする HAE I 型の日本人患者の症例報告を行った⁸。患者は、血液検査において、C1INH 値が 4.0 mg/dL (正常値 21-39 mg/dL)、C1INH 活性が 37 % (正常値 70-130 %) といずれも低値であり、HAE I 型と診断した⁸。さらに、患者の末梢血から抽出した DNA を用いて *SERPING1* 遺伝子をサンガー法で解析した結果、ミスセンス変異 c.449C>T (p.S150F) をヘテロ接合型で同定した⁸。本変異は過去に欧米人の HAE I 型の家系にも同定されていたことから既知の病的変異だったが⁹、発現・機能解析は未施行だった。

C1INH は、シグナルペプチド (アミノ酸残基 1-22)、N 末端領域 (アミノ酸残基 23-135) および serpin 領域 (アミノ酸残基 136-500) から構成される (図 1)。これらのうち、C 末端領域に存在する reactive center loop (RCL) が C1INH として機能するために重要な酵素活性部位であり、過去に報告された HAE II 型の変異は RCL 内またはその近傍に集中している^{8,10}。我々が HAE I 型の患者に同定したミスセンス変異 p.S150F は serpin 領域の N 末端側に局在しており (図 1)、三次元構造においては、コドン 150 のセリンは α -helix 構造内に位置する (図 2a)。おそらくは、コドン 150 のアミノ酸残基が極性のセリンから芳香族で非極性のフェニルアラニンに置換されることで C1INH の α -helix 構造が大きく変化し、発現量や細胞外への分泌能に異常を来す可能性が高いと推測された。過去にも、C1INH の α -helix 構造内に多数のミスセンス変異が同定されており (図 2b)^{8,9,11-16}、C1INH の構造や機能に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、それらの変異が HAE を引き起こすメカニズムに関しては完全には解明されていない。本研究では、*SERPING1* 遺伝子のミスセンス変異 c.449C>T (p.S150F) に関する一連の発現・機能解析を通して、本変異が HAE I 型を発症させる分子機構の解明を行った¹⁷。

図 1. C1INH の模式図と変異 p.S150F の位置 (参考文献 17 より引用)

SP, signal peptide; RCL, reactive center loop

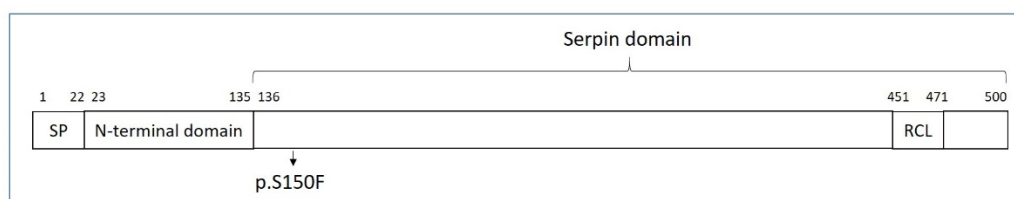
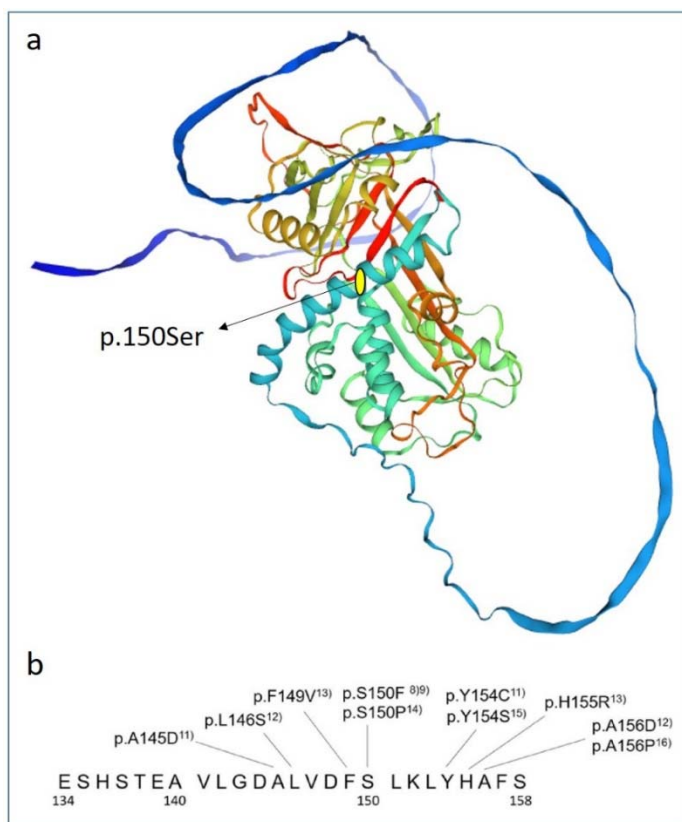


図 2. C1INH の立体構造と、過去にコドン 150 およびその近傍に同定されたミスセンス変異

(b を参考文献 17 より引用)

(a) 全長の C1INH の三次元構造 (AlphaFold ID: AF-P05155-F1)。矢印で示したコドン 150 のセリン残基 (p.150Ser) は α -helix 構造内に位置する。

(b) 過去に p.150Ser を含む α -helix 構造内に同定されたミスセンス変異。



3 方法

1) 発現ベクターの作製

健康人の頭皮由来の total RNA から逆転写反応で作製した first-strand cDNA を鋳型として、遺伝子特異的なプライマーを用いて *SERPING1*-cDNA のコーディング配列を polymerase chain reaction (PCR) 法で増幅した (表 2)。その際に、reverse primer に Flag-tag または hemagglutinin (HA)-tag の塩基配列を導入した。増幅した PCR 産物を *NotI* と *NheI* サイトで pCXN2.1 ベクターに組み込み、野生型 C1INH の発現ベクターを作製した。なお、pCXN2.1 ベクターは chicken β -actin promoter を有し、cytomegalovirus (CMV) promoter よりも強力に目的の蛋白を培養細胞内で過剰発現させることができるという特長を有する¹⁸。

次に、site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies)と変異特異的なプライマーを用いて変異 c.449C>T (p.S150F)を野生型発現ベクター内に導入することで、変異型 C1INH の発現ベクターを作製した(表 2)。なお、作製した全てのベクターの塩基配列はサンガー法で確認を行った。

表 2. PCR 法で使用したプライマー

制限酵素の塩基配列を一重下線で、変異導入部位を二重下線で示した。

ベクター	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')
C 末端に Flag-tag を導入した野生型発現ベクター	AAAGCGGCCG <u>CC</u> CATGGCCTCCAG GCTGACCCT	AAAGCTAGCTACTTATCGTCGTC ATCCTTGTAATCGGCCCTGGGGT CATATACTC
C 末端に HA-tag を導入した野生型発現ベクター		AAAGCTAGCTAGGCGTAGTCGGG CACGTCGTAGGGGTAGGCCCTGG GGTCATATACTC
変異型発現ベクター	GCTTTGGTAGATTTCT <u>TC</u> CCTGAAG CTCTACCAC	GTGGTAGAGCTTCAGG <u>A</u> AGAAAT CTACCAAAGC

2) Western blot (WB)と共免疫沈降法

10%ウシ胎児血清 (Life Technologies)と 100 IU/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Life Technologies)で HEK293T 細胞を培養した。トランスフェクションの前日に細胞を 6 well plate に撒いた。Lipofectamine 2000 (Life Technologies)を用いて、説明書に記載された方法で、C1INH およびカラの pCXN2.1 の発現ベクターをそれぞれ 0.8-3.2µg ずつトランスフェクションし、10%ウシ胎児血清を加えた DMEM (抗生剤の含有なし)で 30 時間培養を行った。その後、細胞培養液を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移して 4°C, 500 G で 10 分間遠心分離を行い細胞成分を除去し、上清を培養液サンプル (medium)として回収した。細胞については溶解バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 2mM EDTA, 0.5% Triton X, 1× Protease Inhibitor Cocktail (Takara Bio))でホモジェナイズした。その後、4°C, 15,000 g で 15 分間遠心分離し、上清を細胞溶解液サンプル (cell lysate)として回収した。各サンプルを 4X LDS sample buffer および 10X reducing agent (Life Technologies)と混合し、75°Cで 10 分間加熱処理した後に 4-12% NuPAGE ゲル (Life Technologies)で泳動した。なお、非還元下の実験は、還元剤 (dithiothreitol, DTT)を含む 10X reducing agent を加えずに行った。また、細胞溶解液サンプルにマウスモノクローナル抗 HA アガロースゲル (Sigma-Aldrich)を加えて共免疫沈降法 (co-immunoprecipitation: Co-IP)を行った。WB と Co-IP の詳細な手順に関しては、過去の論文に記載されている手法に従って行った¹⁹。培養液サンプルが同等の条件下で泳

動されていることを確認するために、転写後のニトロセルロース膜を Ponceau 3R (Wako) で染色した。WB で使用した一次抗体は、ウサギポリクローナル抗 DDDDK (Flag) 抗体 (diluted 1:1000; MBL International)、ウサギポリクローナル抗 HA 抗体 (diluted 1:3000; Abcam)、マウスモノクローナル抗 β -actin 抗体 (diluted 1:3000; Sigma-Aldrich) である。

各実験を 3 回行い、結果が同様の傾向を示すことを確認した。Flag-tag を導入した野生型 C1INH の量は、Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて定量を行い、結果の統計学的解析は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Tukey 検定で行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

3) 間接蛍光抗体法

トランスフェクションの前日に HEK293T 細胞を 8 well chamber slides (Nalge Nunc International) に撒いた。Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いて、各 50 ng の発現ベクターをトランスフェクションし、30 時間培養を行った。培養細胞における間接蛍光抗体法は、過去の論文で行われた手技に従って実施した²⁰。用いた一次抗体は、ウサギモノクローナル抗 DDDDK (Flag) 抗体 (diluted 1:500; MBL International)、マウスモノクローナル抗 calnexin 抗体 (clone AF18; diluted 1:200; Life Technologies)、マウスモノクローナル抗 DDDDK (Flag) 抗体 (diluted 1:2000; MBL International)、ウサギポリクローナル抗 HA 抗体 (diluted 1:1000; Abcam) である。二次抗体は、Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 594 が付加されたヤギ抗マウス IgG またはヤギ抗ウサギ IgG (diluted 1:500; Life Technologies) を用いた。細胞の核は、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories) で染色した。撮影には、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Olympus Fluoview FV3000) を使用した。

4 結果

1) p.S150F 変異型 C1INH は細胞外に全く分泌されず、さらに野生型 C1INH の分泌を阻害した

最初に、C 末端に Flag-tag を付加した野生型 C1INH (C1INH-Flag-Wt) と変異型 C1INH (C1INH-Flag-S150F) の発現ベクターを単独で、または両者を共に HEK293T 細胞にトランスフェクションし、細胞溶解液 (cell lysate) および培養液 (medium) での発現量を抗 Flag 抗体を用いた WB 法で比較検討した。野生型・変異型ともに細胞内では安定して発現を認めたが、培養液中では変異型 C1INH の発現は全く認められなかった (図 3a)。さらに、野生型と変異型の共発現

系では、野生型 C1INH の分泌量が明らかに減少していた (図 3a)。

次に、C 末端に Flag-tag または HA-tag を付加した野生型 C1INH (C1INH-Flag-Wt; C1INH-HA-Wt) と、HA-tag を付加した変異型 C1INH (C1INH-HA-S150F) の発現ベクターを用いて同様の実験を行った結果、図 3a に示した結果と同様に、野生型と変異型の共発現系において、野生型 C1INH の培養液中での発現量は顕著に減少しており (図 3b)、野生型のみの発現系と比較した際に統計学的有意差を認めた (図 3c)。

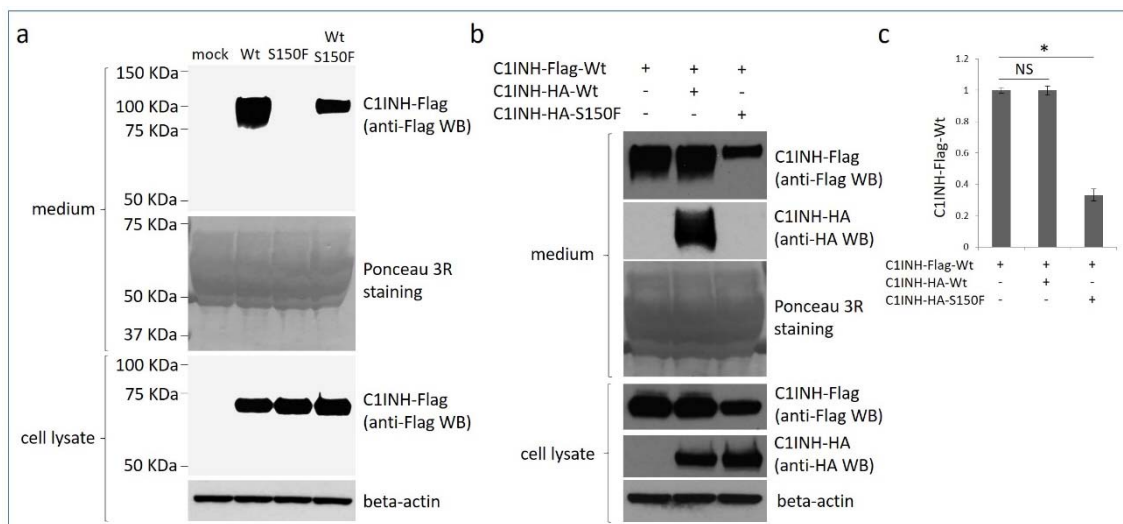
図 3. p.S150F 変異型 C1INH は細胞外に分泌されず、野生型 C1INH の分泌を低下させる

(参考文献 17 より引用)

(a) C 末端に Flag-tag を付加した野生型 (Wt) と変異型 (S150F) C1INH 蛋白の細胞溶解液 (cell lysate) および培養液 (medium) 中での発現量を、抗 Flag 抗体を用いた WB 法で解析した。

(b) C 末端に Flag-tag または HA-tag を付加した野生型と、HA-tag を付加した変異型 C1INH の細胞溶解液および培養液中での発現量を、抗 Flag 抗体および抗 HA 抗体を用いた WB 法で解析した。なお、各条件のサンプルが等量であることを示す目的で、培養液についてはニトロセルロース膜を Ponceau 3R で染色し、細胞溶解液については抗 β -actin 抗体を用いた WB 法を行った (a) (b)。

(c) (b) で培養液中に検出された野生型 C1INH (C1INH-Flag-Wt) の発現量を Image J を使用して測定した。アスタリスクは統計学的に有意差 ($p < 0.05$) を認め、NS は有意差がなかったことを示す。



2) 野生型 C1INH の細胞内での発現量および細胞外への分泌量は、p.S150F 変異型 C1INH の用量依存的に減少した

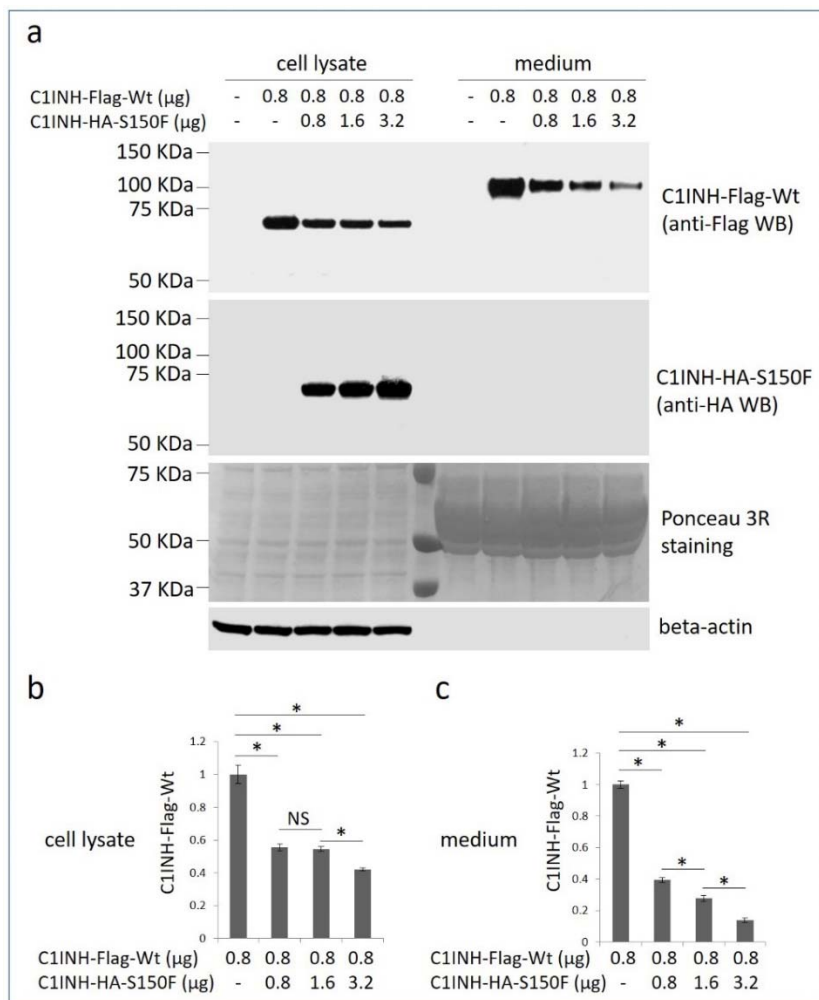
次に、一定量の野生型 C1INH (C1INH-Flag-Wt) に対して、共発現させる変異型 C1INH (C1INH-HA-S150F) の量を変えて、野生型 C1INH の発現量を解析した。その結果、共発現さ

せる変異型蛋白の量が増えるに従って、細胞内・培養液中ともに野生型 C1INH の発現量の低下が認められた(図 4a)。Image J を用いた定量では、細胞内・培養液ともに野生型 C1INH の発現量は変異型 C1INH の用量依存的に減少していたが、特に培養液での減少の方がその傾向が明らかだった(図 4b, c)。

図 4. 野生型 C1INH の細胞内での発現量および細胞外への分泌量は、p.S150F 変異型C1INHの用量依存的に減少する (参考文献 17 より引用)

(a) C-末端に Flag-tag を付加した野生型 C1INH と C-末端に HA-tag を付けた p.S150F 変異型 C1INH を共発現させ、抗 Flag 抗体および抗 HA 抗体を用いて WB 法を行った。図 3 に示した実験と同様の目的で、ニトロセルロース膜の Ponceau 3R による染色と抗 β -actin 抗体を用いた WB 法の結果を提示した。

(b) (c) 細胞溶解液および培養液中に検出された野生型 C1INH (C1INH-Flag-Wt) の発現量を Image J を使用して測定した。アスタリスクは統計学的に有意差 ($p < 0.05$) を認め、NS は有意差がなかったことを示す。(b) が細胞溶解液、(c) が培養液の解析結果。



3) 野生型 C1INH と p.S150F 変異型 C1INH は細胞質内において同様の発現様式を示したが、共発現系では野生型の発現量が顕著に減少した

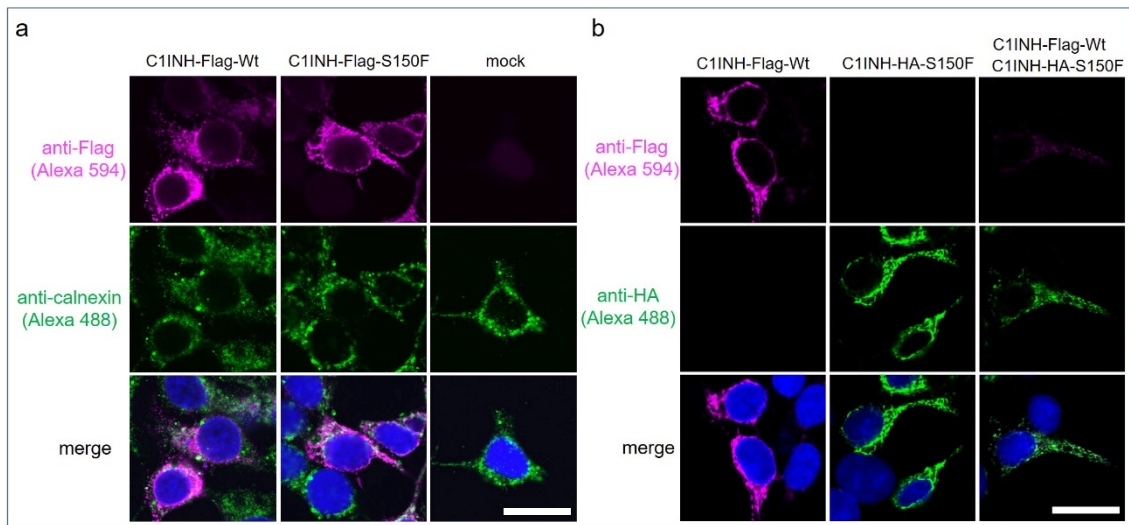
続いて、C1INH の細胞内での局在を確認するために間接蛍光抗体法を行った。まず、Flag-tag を付加した野生型と変異型のそれぞれを発現させ、抗 Flag 抗体および抗 calnexin 抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った結果、野生型と変異型 C1INH はともに細胞質内において同様の発現様式を示した(図 5a)。つまり、いずれの C1INH も小胞体に部分的に局在し、さらに細胞質内において顆粒状に発現していた(図 5a)。

次に、Flag-tag を付加した野生型 C1INH および HA-tag を付加した変異型 C1INH を発現させ、抗 Flag 抗体および抗 HA 抗体を用いて発現様式を比較した結果、野生型と変異型を共発現させた条件で、野生型 C1INH の著明な発現の低下を認めた。この結果は、図 4 に示した WB 法の結果に合致していた(図 5b)。

図 5. 野生型および p.S150F 変異型 C1INH の細胞内での局在 (参考文献 17 より引用)

(a) C 末端に Flag-tag を付加した野生型 (C1INH-Flag-Wt) および変異型 (C1INH-Flag-S150F) C1INH の HEK293T 細胞内での発現を解析するために、抗 Flag 抗体と抗 calnexin 抗体を用いた間接蛍光抗体法を行った。野生型・変異型ともに、calnexin で標識された小胞体に部分的に発現を認めた。

(b) C1INH-Flag-Wt と C 末端に HA-tag を付加した変異型 C1INH (C1INH-HA-S150F) の HEK293T 細胞内での発現を解析するために、抗 Flag 抗体と抗 HA 抗体を用いた間接蛍光抗体法を行った。それぞれ単独で発現させた際には、野生型・変異型ともに同様の発現様式を示したが、両者の共発現系では明らかに野生型 C1INH の発現量が低下していた。青色は DAPI を用いた核染で、scale bar は 20 μm である(a) (b)。



4) p.S150F 変異型 C1INH は極めて高い重合体の形成能を有しており、野生型 C1INH とも強く結合した

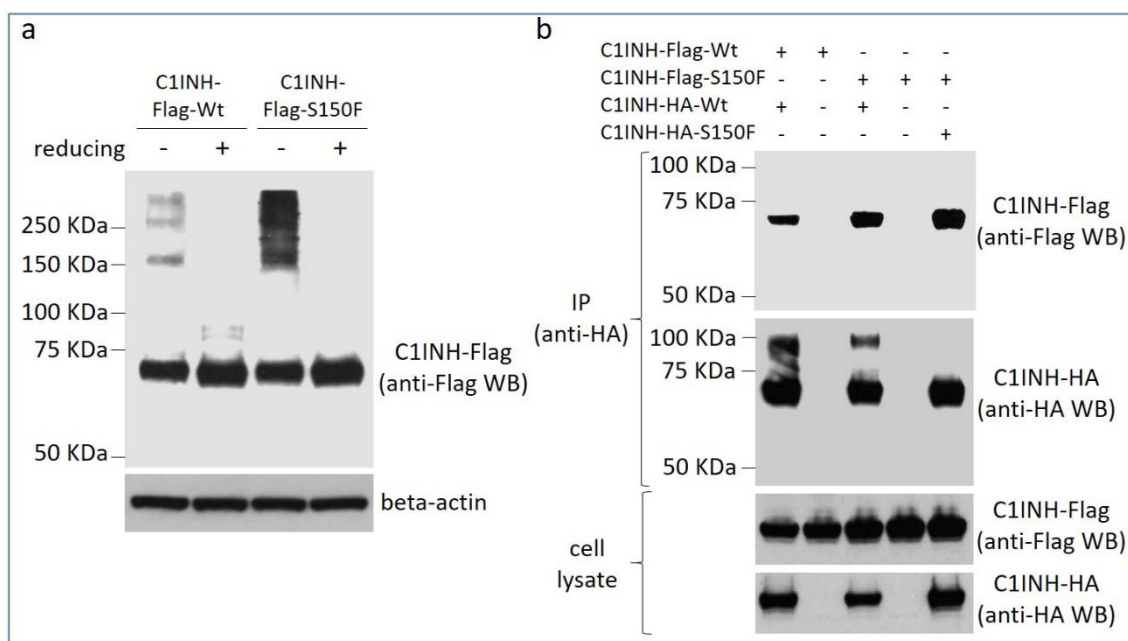
続いて、C1INH の重合体形成能を調べるため、HEK293T 細胞に C 末端に Flag-tag を付加した野生型 (C1INH-Flag-Wt) および変異型 (C1INH-Flag-S150F) C1INH を発現させ、非還元下、還元下でそれぞれ WB 法を行った。非還元下において、野生型 C1INH では重合体の形成はわずかししか認めなかったのに対して、変異型 C1INH では顕著に重合体の形成を認めた(図 6a)。この結果から、変異型 C1INH では極めて強固に重合体を形成することが示唆された。

最後に、野生型 C1INH と変異型 C1INH の相互作用の有無を解析するために、野生型 C1INH と変異型 C1INH の共免疫沈降法 (Co-IP) を抗 HA 抗体を用いて行った。野生型 C1INH 同士、野生型と変異型 C1INH、変異型 C1INH 同士のいずれでも共免疫沈降を認めたが、野生型 C1INH 同士と比較し、野生型 C1INH と変異型 C1INH、および変異型 C1INH 同士の条件では、共沈してきた C1INH-Flag の量が明らかに多かった(図 6b)。

図 6. p.S150F 変異型 C1INH は重合体の形成能を有し、野生型 C1INH とも強く結合する
(参考文献 17 より引用)

(a) Flag-tag を付加した野生型および p.S150F 変異型 C1INH を発現させた細胞溶解液を用いて、非還元下および還元下で WB 法を行った。野生型と比較して、変異型でより強い重合体の形成能を認めた。標準化のコントロールとして、抗 β -actin 抗体を用いた WB 法を行った。

(b) 様々な C1INH の組み合わせで Co-IP を行った。HA 抗体を用いて C1INH-HA を免疫沈降し、共沈してきた C1INH-Flag を抗 Flag 抗体を用いた WB 法で解析した。



5 考察

本研究では、HAEI 型の患者に同定された *SERPING1* 遺伝子の既知のミスセンス変異 c.449C>T (p.S150F) の詳細な発現・機能解析を *in vitro* レベルで行った。その結果、変異型 C1INH は、細胞内では安定して発現する一方で、細胞外へは完全に分泌されないことが分かった(図 3a,b)。さらに、野生型 C1INH の分泌は変異型 C1INH によって強力に抑制されることを確認した(図 3a,b)。この現象は、我々が行った共免疫沈降法で変異型 C1INH と野生型 C1INH が強く結合していたことから裏打ちされるように(図 6b)、細胞内において変異型 C1INH が野生型 C1INH と強固に重合することで、野生型 C1INH が細胞内で捕捉されるためと考えられる。

我々の実験系では、野生型 C1INH のみを発現させた場合と比較して、変異型 C1INH と共発現をさせた場合の野生型 C1INH の分泌量は 30-40% に低下していた(図 3c,4c)。これは、患者血清における C1INH の分泌量(10-20%)よりも多い量だった。この違いは、*in vitro* レベルでの解析の限界を示唆している。一方で、*in vivo* (患者の生体内)における状態と同様の傾向を示す結果が得られたとも解釈できる。

Huslund らは、HAE I 型の家系に同定された 6 種類の *SERPING1* 遺伝子変異の詳細な機能解析の結果を報告している²¹。その報告では、我々の実験結果と同様に、解析した全ての変異において、細胞外への変異型 C1INH の分泌不全、および変異型 C1INH による野生型 C1INH の分泌阻害が認められていた²¹。その点においては、今回の我々の研究は彼らの実験結果を再確認したに過ぎない。しかしながら、彼らの実験系では、野生型 C1INH と変異型 C1INH の共発現を行った際に細胞内の野生型 C1INH の量は増加していたが²¹、我々の実験系では、野生型 C1INH と p.S150F 変異型 C1INH を共発現させた際には細胞内の野生型 C1INH の発現量は減少していた(図 4a,b、図 5b)。我々は HEK293T 細胞を使用したか、Huslund らは HepG2 細胞と HeLa 細胞を使って実験を行っており、この結果の違いは単に異なる細胞を使用したことに起因しているのかもしれない。しかしながら、我々の実験結果は変異 p.S150F に特異的な現象を検出した可能性もあり、今後の更なる検討を要する。

これまでに、複数の変異型 C1INH に関しては、変異型 C1INH 同士で重合体を形成し、さらに野生型 C1INH とも重合することが示されている^{21,22}。しかしながら、それらの報告では、野生型 C1INH 同士の重合体の形成は認められておらず^{21,22}、この点は我々の実験結果とは異なっている(図 6a,b)。この矛盾の理由は未だ未解明である。しかしながら、我々の実験結果からは、野生型 C1INH 同士は分泌に影響を与えない程度に弱く結合している一方で、野生型 C1INH と p.S150F 変異型 C1INH は細胞内において強力に結合することによって、細胞内での野生型

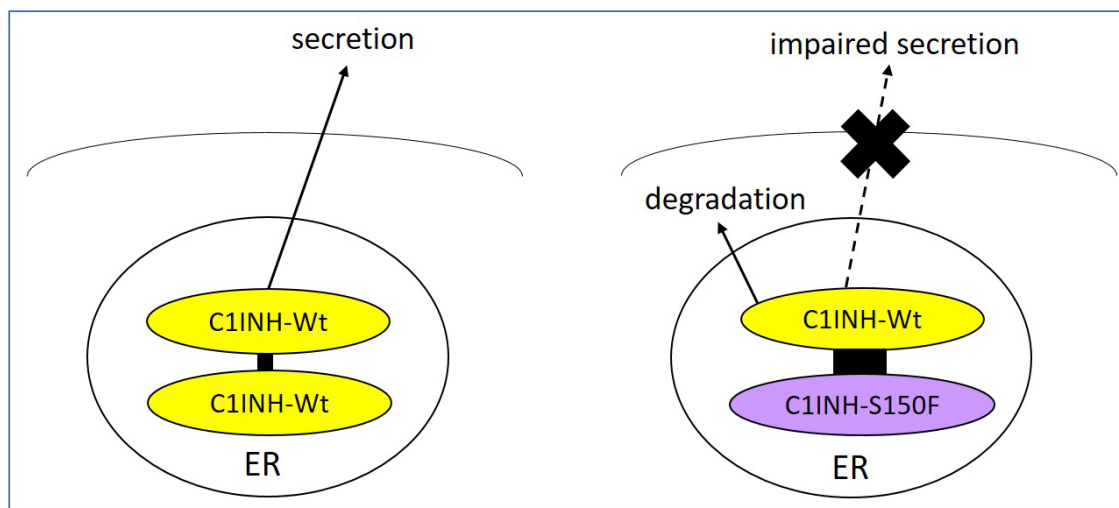
C1INH の分解の促進および野生型 C1INH の分泌の阻害が生じていると推測される (図 7)。

HAE I 型の発症機序を完全に解明するには更なる追加実験が必要であるが、本研究を通じて、*SERPING1* におけるミスセンス変異の 1 つである c.449C>T (p.S150F) に関しては、変異型 C1INH が野生型 C1INH に対して dominant-negative 効果を発揮することが証明され、それが HAE I 型の発症に深く関与していることが強く示唆された。

図 7. 変異 p.S150F による HAE I 型の予想される発症機序 (参考文献 17 より引用)

健常人では野生型 C1INH (C1INH-Wt) の分泌に影響を及ぼさない程度にしか重合体の形成能は認めない(左)。一方で、変異 p.S150F を有する患者では、特に小胞体内 (endoplasmic reticulum: ER) において変異型 C1INH (C1INH-S150F) が野生型 C1INH と強固に結合することで、最終的に野生型 C1INH の分解の促進および分泌の低下が生じると考えられる(右)。

黄色: 野生型 C1INH; 紫: p.S150F 変異型 C1INH。



6 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導・ご鞭撻を頂きました山口大学大学院医学系研究科皮膚科学講座の下村 裕教授に御礼申し上げます。また、実験の一部を担当していただき、ご指導・ご支援頂いた新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞医学専攻細胞機能講座皮膚科学分野の林 良太先生と安齋 理先生に感謝致します。

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患政策研究事業 20FC1052) を使用して実施された。利益相反の申告はない。

7 参考文献

1. Zuraw BL, Christiansen SC. HAE Pathophysiology and Underlying Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 2016; 51: 216-229.
2. Ariga T, Igarashi T, Ramesh N, Parad R, Cicardi M, Davis AE 3rd. Type I C1 inhibitor deficiency with a small messenger RNA resulting from deletion of one exon. *J Clin Invest* 1989; 83: 1888-1893.
3. Levy NJ, Ramesh N, Cicardi M, Harrison RA, Davis AE 3rd. Type II hereditary angioneurotic edema that may result from a single nucleotide change in the codon for alanine-436 in the C1 inhibitor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 265-268.
4. Margerl M, Germenis AE, Maas C, Maurer M. Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor: Update on Evaluation and Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am* 2017; 37: 571-584.
5. Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 1286-1289.
6. Bork K, Wulff K, Steinmüller-Magin L et al. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy* 2018; 73: 442-450.
7. Bafunno V, Firinu D, D'Apolito M et al. Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141: 1009-1017.
8. Nakamura S, Shimomura Y. A case of hereditary angioedema type 1 with a known mutation in the SERPING1 gene. *Nishinohon J Dermatol* 2020; 82: 418-421.
9. Rijavec M, Korošec P, Šilar M, Zidarn M, Miljković J, Košnik M. Hereditary angioedema nationwide study in Slovenia reveals four novel mutations in SERPING1 gene. *PLoS One* 2013; 8: e56712.
10. Ponard D, Gaboriaud C, Charignon D et al. SERPING1 mutation update: Mutation spectrum and C1 Inhibitor phenotypes. *Hum Mutat* 2020; 41: 38-57.
11. López-Lera A, Garrido S, Roche O, López-Trascasa M. SERPING1 mutations in 59 families with hereditary angioedema. *Mol Immunol* 2011; 49: 18-27.

12. Gösswein T, Kocot A, Emmert G et al. Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema. *Cytogenet Genome Res* 2008; 121: 181-188.
13. Bissler JJ, Aulak KS, Donaldson VH et al. Molecular defects in hereditary angioneurotic edema. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109: 164-173.
14. Speletas M, Szilagyi A, Psarros F et al. Hereditary angioedema: molecular and clinical differences among European populations. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 570-573.
15. Martinho A, Mendes J, Simões O et al. Mutations analysis of C1 inhibitor coding sequence gene among Portuguese patients with hereditary angioedema. *Mol Immunol* 2013; 53: 431-434.
16. Pappalardo E, Caccia S, Suffritti C, Tordai A, Zingale LC, Cicardi M. Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: functional and structural correlates. *Mol Immunol* 2008; 45: 3536-3544.
17. Yasuno S, Ansai O, Hayashi R, Nakamura S, Shimomura Y. Evidence for a dominant-negative effect of a missense mutation in the SERPING1 gene responsible for hereditary angioedema type I. *J Dermatol* 2021; 48: 1243-1249.
18. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; 108: 193-199.
19. Okita T, Asano N, Yasuno S, Shimomura Y. Functional studies for a dominant mutation in the EDAR gene responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Dermatol* 2019; 46: 710-715.
20. Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A et al. *Apcdd1* is a novel wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature* 2010; 464: 1043-1047.
21. Haslund D, Ryø LB, Seidelin Majidi S et al. Dominant-negative SERPING1 variants cause intracellular retention of C1 inhibitor in hereditary angioedema. *J Clin Invest* 2019; 129: 388-405.
22. Madsen DE, Hansen S, Gram J, Bygum A, Drouet C, Sidemann JJ. Presence of C1-inhibitor polymers in a subset of patients suffering from hereditary angioedema. *PLoS One* 2014; 9: e112051.