

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

平成13年度 総括・分担研究報告書

血栓症に関連する遺伝子の同定と多型解析に基づいた予防と治療の個別化
(H13-ゲノム-006)

主任研究者 池田 康夫
慶應義塾大学医学部内科学 教授

平成14(2002)年 3月

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

血栓症に関連する遺伝子の同定と多型解析に基づいた予防と治療の個別化
(研究課題番号：H13-ゲノム-006)

平成13年度
総括・分担研究報告書

平成14年3月

・・・・・・・・・・・・・・・・研究組織・・・・・・・・・・・・・・・・

(主任研究者)

池田康夫 慶應義塾大学医学部内科（血液・感染・リウマチ科） 教授

(分担研究者)

猿田享男 慶應義塾大学医学部内科（腎臓内分泌代謝科） 教授

福内靖男 慶應義塾大学医学部内科（神経内科） 教授

小川聡 慶應義塾大学医学部内科（呼吸・循環器内科） 教授

渡辺清明 慶應義塾大学医学部（検査医学） 教授

村田満 慶應義塾大学医学部内科（血液・感染・リウマチ科） 講師

目 次

血栓症に関連する遺伝子の同定と多型解析に基づいた予防と治療の個別化 (H13-ゲノム-006)

- I. 総括研究報告書 池田 康夫
- II. 分担研究報告
 - ① 研究総括及び血栓形成メカニズムの分子学的研究 池田 康夫
 - ② 血液凝固因子と血小板の遺伝的多様性が血栓症発症に与える影響 村田 満
 - ③ 脳血管障害における血栓形成の遺伝的素因の解析 福内靖男
 - ④ 冠動脈疾患における血栓形成の遺伝的素因の解析 小川聡
 - ⑤ 血栓症に対する内分泌学的アプローチ 猿田享男
 - ⑥ 血栓症の危険因子の遺伝子診断法の確立 渡辺清明
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表
- IV. 研究成果の刊行物・別冊
- V. その他
 - 学会発表抄録

総括研究報告書

血栓症に関連する遺伝子の同定と多型解析に基づいた予防と治療の個別化

主任研究者 池田康夫 慶應義塾大学医学部教授

研究要旨

生活習慣の欧米化、高齢化社会の到来など社会環境の変化の中で今後ますます増加し続けると思われる血栓性疾患への体系的な取り組みは、医学のみならず、医療経済の上からも我が国の社会に求められている最重要課題の一つである。血栓症も他の生活習慣病と同様、遺伝的要因が深く関わっていることが知られている。本研究は、血栓形成に関与する遺伝子多型に着目し、既知の single nucleotide polymorphisms (SNPs)がその遺伝子産物の量や機能に与える影響を調べること、ゲノムデータベースから得られる SNPs と血栓の基礎的研究から得られた情報に基づく因子の SNPs の双方を対象として、血栓症の頻度、重症度、血栓形成部位特異性（脳、冠動脈、深部静脈など）の関係を患者-対照試験で検討すること、新たな SNPs の探索を行うこと、さらに血栓形成と深い関係がある巨核球-血小板、血管内皮細胞などの RNA を解析し、新たな transcript を同定することによりこれら細胞機能を評価することを通じて、個人個人の疾患予測のための遺伝子診断システムを構築し、個体にあわせた血栓症予防法と治療法を考案することを目的としている。

平成 13 年度の研究成果は、以下の 3 点に集約される。(1) 遺伝子多型と機能の関連（実験研究）：血小板受容体に着目し、血栓形成の初期段階で重要な役割を演じる血小板フォンビルブランド因子受容体や血小板活性化因子受容体の遺伝子多型が血小板機能に与える影響を *in vitro* の発現実験系や、*ex vivo* での血小板機能で解析し、受容体機能に影響する遺伝子多型を同定した。また血小板の RNA を解析し、今後新たな遺伝子産物を発見する足掛かりとした。(2) 遺伝子多型と疾患の関連（分子疫学的研究）：今後の患者登録、検体採取、データベース構築等について検討すると共に、既存検体を用いて candidate gene approach による association study を進めた。虚血性脳血管障害については 20 以上の候補遺伝子の多型が検索され、疾患と関連を認める多型を同定した。これらのなかで、遺伝子頻度が症例-対照間で有意差がみられた 3 つの遺伝子について同時に複数の多型を有する頻度を患者-対照間で比較したところ、いくつかの遺伝的危険因子の同時存在は、脳血管障害の発症年令を低下させる可能性が示された。一方、冠状動脈疾患についても新たに関連のある遺伝子多型を同定した。肥満や高血圧、糖尿病、高脂血症はインスリン抵抗性を基盤とし、動脈硬化性心血管障害、血栓症の進展に、重要な役割を担っているが、血栓症に対する内分泌学的アプローチとしてインスリン抵抗性と関連する遺伝子を検討した。空腹時血糖や高脂血症に関与する遺伝子多型は、動脈硬化や血栓症を含む代謝症候群の危険因子（予知マーカー）となる可能性が示唆された。(3) 血栓性疾患の遺伝子診断法に関する研究：複数の遺伝子多型の効率的解析を目的とした診断法と開発し実際に応用した。

本研究成果は、日本人 SNPs のデータベースを用いた大規模な臨床研究の足掛かりになると思われる。新しい遺伝子多型を発見することは今後のオーダーメイド医療に欠かせないものであるが、多型の遺伝子検査が実際に臨床に応用されるにはまだ多くの問題点が残されている。今後は、新たな多型の発見とそれを対象とした症例-対象研究を行い、疾患との関連を検討することになるが、同時に臨床的意義のある遺伝子多型について遺伝子診断システムの体系的な構築と、実験研究による遺伝子-表現系における因果関係の証明が必要である。

分担研究者		
猿田享男	慶應義塾大学医学部	内科
教授		
福内靖男	慶應義塾大学医学部	内科
教授		
小川聡	慶應義塾大学医学部	内科
教授		
渡辺清明	慶應義塾大学医学部	中央
臨床検査部		教授
村田満	慶應義塾大学医学部	内科
講師		

A. 研究目的

動脈血栓症は死亡原因の第一位を占める心筋梗塞や脳梗塞などの生活習慣病の直接の発症原因であり、その予防は現代に求められる最重要課題の一つである。一般に動脈血栓症は複数の遺伝的要因と後天的要因が複雑に絡み合って発症すると考えられている。その病態はそれぞれの病型により異なるが、一般には動脈硬化が基盤に存在する。血栓形成に関係する因子は血液凝固、線溶因子、白血球、血小板など多岐に涉っており、これに環境・食事なども加わりその病態は甚だ複雑である。動脈血栓症の危険因子としては、血栓形成を助長させる血液凝固能や血小板機能の亢進を考慮せねばならない。本研究では血栓症のなかでも特に冠状動脈血栓症と脳血管障害に焦点をあて、

(1) 患者を登録し検体採取、臨床所見、検査値などのデータベースを構築すること、(2) 既知の遺伝子多型、特に single nucleotide polymorphisms (SNPs) について遺伝子タイピングをシステマチックに施行して遺伝子-疾患関連研究を行うこと、血栓に関連の深い因子に新たな遺

伝子多型を見出すこと、および(3) 動脈血栓症に重要な役割を演じている血小板、血液凝固因子、血管内皮細胞に着目し、その遺伝的多様性(正常人)や遺伝的変異(疾患)と血小板機能、凝固因子活性などとの関連を実験的研究にて検証することにより血栓形成と血栓症発症のメカニズムを分子学的に明らかにすること、さらに遺伝子診断を通じて血栓症の効率的な予防と治療を行うことを目的としている。我が国と欧米の間には血栓症の発症頻度や発症部位に明らかな差がみられ、遺伝子多型における対立遺伝子頻度に人種差があることなどから、わが国独自の遺伝子解析を行い、遺伝子多型の危険因子としての重みづけの評価が必要であることは明白である。

平成 13 年度の研究は、以下の 3 点に集約される。

- (1) 遺伝子多型と機能の関連(実験研究)
- (2) 遺伝子多型と疾患の関連(分子疫学的研究)
- (3) 血栓性疾患の遺伝子診断法に関する研究

(1) については、平成 13 年度は主に血小板受容体に着目し、血栓形成の初期段階で重要な役割を演じる血小板フォンビルブランド因子受容体や血小板活性化因子受容体の遺伝子多型が血小板機能に与える影響を in vitro の発現実験系や、ex vivo での血小板機能を解析することによって検討した。また一部の血液凝固因子についても検討した。この研究は主任研究者である池田康夫および分担研究

者である村田満が主に担当した。(2) については、患者登録、検体採取、データベース構築等について池田康夫の指導のもとに、虚血性脳血管障害については分担研究者福内靖男が、冠状動脈疾患については小川聡が、血栓症と関連する糖代謝異常について猿田享男が担当し、多数の遺伝子多型についてのデータを収集した。(3) については複数の遺伝子多型の効率的解析を目的とした診断法とその実際の応用について分担研究者渡邊清明が担当した。

B. 研究方法

(1) 遺伝子発現研究

血小板受容体の発現実験については CHO 細胞に pcDNA vector を導入することにより組み換え蛋白を発現させた。導入する遺伝子は、in vitro mutagenesis にて各 SNP のタイプを作成した。遺伝子導入細胞は抗生物質に対する薬剤耐性により選択した。受容体に対する各種モノクローナル抗体との反応性を比較するとともに、アイソトープラベルしたリガンドを用いて結合能を測定した。

(2) 血小板機能、血液凝固因子、および各種因子の血中濃度と機能の測定

血小板活性化因子受容体多型が血小板活性化に与える影響について、血小板凝集能と、血小板チロシンリン酸化について ex vivo で検討した。心血管危険因子のマーカーとしての paraoxonase、ホモシステイン、活性化 XII 因子、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の血中濃度は同意の得られた検診受診者について

検討した。これらをそれぞれの因子の遺伝子多型における遺伝子型と比較した。活性化血液凝固因子 XIIa については、抗ヒト活性化 XII 因子ヒツジポリクロナル抗体を用いた ELISA 法にて測定した。

(3) 疾患—遺伝子多型関連研究

虚血性脳血管障害患者 (アテローム硬化性脳梗塞、ラクナ梗塞、一過性脳虚血発作) 235 例と年齢、性別を一致させた健常者 316 例より末梢血採血を行った。PCR-RFLP 法を用いてそれぞれの遺伝子多型を解析した。解析した遺伝子は、アポリポタンパク E、リポ蛋白リパーゼ、アンギオテンシン変換酵素 (ACE)、プラスミノゲンアクチベータインヒビター 1 (PAI-1)、パラオキシナーゼ (PONA)、血液凝固因子 (フィブリノーゲン、VII 因子、XII 因子)、組織プラスミノゲンアクチベータ、血小板膜受容体 (GPIIb/IX)、内皮細胞 NO 合成酵素 (ecNOS)、セロトニン (5HT) 2A 受容体、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR)、エストロゲン受容体、血小板活性化因子 (PAF) アセチルヒドロラーゼ、アルドステロン合成酵素、プロスタサイクリン合成酵素、単球 CD 14、ヘモクロマトーシス遺伝子、NADPH p22 phox、コレステリルエステル転送蛋白 (CETP)、ミトコンドリア DNA 5178、心房性利尿ペプチド (ANP)、Notch3、Connexin37 等である。

冠動脈疾患患者については全例冠動脈造影を施行し、病変の認められた 178 例と年齢および性別をマッチさせた健常人 183 例を対象とした。血清脂質、血

液凝固系、CRP、葉酸、アンジオテンシン変換酵素等も測定した。対照とした遺伝子は上記の他に MMP-9 遺伝子も含めた。

血栓症と糖代謝異常の関連については FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型や LDL-R 遺伝子 C1773T 多型を、BMI、血圧、血糖、脂質、血清インスリンやレプチン濃度との関連で検索した。

(倫理面への配慮)

採取する血液検体については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って扱い、研究対象の候補となる患者からは厚生科学審議会によって作成された「遺伝子解析研究に関するガイドライン」に則ったインフォームドコンセントを行い、文書による同意を得ることとした。上記に則らずに、既に文書による同意の基に採取された検体については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」のうち「研究実施前提供資料等の利用」に定められている A 群試料として扱った。研究計画については、慶應義塾大学医学部倫理審査委員会の承諾を得た。

C. 研究結果

(1) 遺伝子多型と機能の関連 (実験研究)

血小板フォンビルブランド因子受容体サブユニット GPIIb α の遺伝子変異：最近我々が同定した GPIIb α 70Leu/Phe 多型について遺伝子多型と vWF 結合能との関連をみるため、2 種類の遺伝子組み

換え蛋白を作成し、これらをニトロセルロースメンブレンに固定し、リストセチン存在下 125I で標識 vWF の結合能を検討したが、野生型 (Leu) と変異型 (Phe) の間で差は見られなかった。しかし遺伝子多型がモノクローナル抗体への反応性に与える影響に差がみられた。数種類のモノクローナル抗体の中で、立体構造依存性のエピトープを認識する 2 種の抗体 (LJ-P3 および GUR83/35) の反応性だけが変異型 (Phe) で減弱していた。やはり最近我々が同定した G233S 変異については (1) 遺伝子変異と vWF 結合能との関連を 5 種類の遺伝子組み換え蛋白を作成しリストセチン存在下 125I で標識 vWF の結合能を検討した。患者で見出された変異である G233S に加え、G233A でも患者と同様の phenotype (低濃度リストセチンによる受容体機能の亢進) が観察された。一方、極性アミノ酸に置換した G233D、および G233K ではこの性質は観察されなかった (池田康夫)。

血小板活性化因子受容体 (PAF receptor) の多型：血小板機能との関連については、PAF を低濃度から順に $1 \times 10^{-7} \text{M}$, $2 \times 10^{-7} \text{M}$, $8 \times 10^{-7} \text{M}$ 添加していくと、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 添加では、AA と DD 両者とも 1 次凝集のみが見られたがその程度は、AA に比べ DD では約半分に減弱していた。 $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 添加では、AA は不可逆な 2 次凝集に至るのに対し、DD では 1 次凝集のみが認められた。 $8 \times 10^{-7} \text{M}$ 添加では、両者とも 2 次凝集に至るものの、DD における凝集の程度は AA に比

弱くなっていた。一方、collagen 1 μ g/ml と ADP 10⁻⁵M の添加では、AA と DD とともに最大凝集を示した。また遺伝子多型とチロシンリン酸化との関連について検討したが、wild type ホモ AA とヘテロ AD について PAF 刺激したもののチロシンリン酸化では、分子量 72Kda の syk と約 150Kda の蛋白において、ヘテロの方が、wild type に比べ、その程度が弱くなっている傾向が見られた（村田満）。

血小板 mRNA 解析：巨核球-血小板、血管内皮細胞などの RNA を解析し alternative splicing などによる新たな transcript を同定することは、血栓形成能の個体差の研究に重要と考えられる。血小板は血栓形成の key factor であるが核を有しないため一般に遺伝子発現の研究は困難と考えられている。しかし血小板には微量ではあるが RNA が存在しており、この RNA レパトリーを解析することは血小板機能研究に新たな知見をもたらす可能性がある。今年度の研究で、実際に血小板より mRNA を分離し、その定量的、定性的評価を行い血小板 transcriptome 解析のための予備的検討を行った（池田康夫、村田満）。

（2）遺伝子多型と疾患の関連（分子疫学的研究）

＜虚血性脳血管障害＞ CADASIL の原因遺伝子 Notch3 とギャップジャンクションを構成する蛋白 Connexin37 について検討した。Notch3 遺伝子は虚血性脳血管障害患者と健常者では有意な差は

みられなかった。一方、Connexin37 遺伝子は脳血管障害患者で遺伝子多型の T allele が有意に多かった。また、ロジスティック回帰分析にてこの遺伝子多型は高血圧の影響を受けることが推測された。さらに、高血圧例にて Connexin37 遺伝子多型の T allele が有意に多かった。Notch3 遺伝子多型 T6746C は脳血管障害とは関連しなかった。これらより Connexin37 遺伝子多型 C1016T は脳血管障害の危険因子となり得るが、高血圧を介した機序が推測された（福内靖男）。今年度の本研究課題で血小板機能との関連が示唆された PAF-R 遺伝子多型（上述）に関して、脳血管障害患者 234 例と control 群 285 例を比較した。臨床的背景は、性別と年齢に有意差はなく、喫煙、高血圧症、糖尿病については、CVD 患者群で有意に高く、逆に高コレステロール血症は、control 群のほうが有意に高かった。タイピングの結果、日本人における PAF-R 遺伝子多型の出現頻度は、wild type のホモ AA が約 75%、ヘテロである AD が 23%、mutant のホモ DD が 3%であることが明らかになった。脳血管障害患者群と control 群との間に多型出現頻度に有意差は認められなかった。同様に、男性と女性、60 歳以上と未満に分けた場合にも、両者に有意差を認めなかった。また、危険因子である喫煙、高血圧症、高コレステロール血症、糖尿病を持つか否かで分けた場合にも、有意差は認められなかった（村田満）。虚血性脳血管障害患者を対照に、以下の因子に報告されている遺伝子多型を検討した。

アポリポタンパク E、リポ蛋白リパーゼ、アンジオテンシン変換酵素 (ACE)、プラスミノゲンアクチベーター 1 (PAI-1)、パラオキシナーゼ (PONA)、血液凝固因子 (フィブリノーゲン、VII 因子、XII 因子)、組織プラスミノゲンアクチベータ、血小板膜受容体 (GPIb/IX)、内皮細胞 NO 合成酵素 (ecNOS)、セロトニン (5HT) 2A 受容体、メチレントetraヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR)、エストロゲン受容体、血小板活性化因子 (PAF) アセチルヒドロラーゼ、アルドステロン合成酵素、プロスタサイクリン合成酵素、単球 CD 14、ヘモクロマトーシス遺伝子、NADPH p22 phox、コレステリルエステル転送蛋白 (CETP)、ミトコンドリア DNA 5178、ANP。これらのなかで、遺伝子頻度が症例-対照間で有意差がみられた、血小板膜受容体 GPIb α 、血液凝固 XII 因子、NADPH p22 phox について同時に複数の多型を有する頻度を患者-対照間で比較し、また複数有する患者の phenotype を分析したところ、いくつかの遺伝的危険因子の同時存在は、その個人の血管イベントへの罹患率を著しく上昇させるとともに、発症年齢を低下させる可能性が示された (渡邊清明)。

〈冠状動脈疾患〉本邦における遺伝子多型性の頻度や冠動脈疾患との関連性が明らかにされていない Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の C-1562T 多型と Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型を冠動脈疾患患者と健常対象で検討した。C-1562T 多型性は冠動

脈疾患の有無や病型とは関連しなかったが、冠動脈病変の重症度と関連を持ち、この関連は既知の危険因子から独立していた。また、冠動脈側副血行や新規狭窄病変の出現と関連し、MMP-9 が冠動脈狭窄と側副血管新生を促進させている可能性を示した。T1128C 多型は北欧を中心として発見され、肥満や動脈硬化に関連すると報告されたが、日本人には存在しなかった。この遺伝子多型は北欧人のみに存在する可能性が示唆された (小川聡)。また冠状動脈血栓症患者の新規登録システムの構築に関して冠状動脈造影にて有為な病変を有する冠状動脈疾患患者の registry につき検討した。現在、国際的にも International Society of Thrombosis and Haemostasis の標準化委員会などで同様の登録システムの構築が進行中であり、血栓症患者の前向き研究を目的とした患者の登録方法の標準化は、標準 SNPs データを利用した大規模な疾患関連研究に欠くことのできないものである。今年度は検体採取、臨床所見、検査値などのデータベース構築法を具体的に検討した (池田康夫、小川聡、村田満)。

〈耐糖能異常と血栓症〉肥満や高血圧、糖尿病、高脂血症はインスリン抵抗性を基盤とし、動脈硬化性心血管障害、血栓症の進展に、重要な役割を担っている。血栓症に対する内分泌学的アプローチとしては、脂肪細胞から分泌され内臓脂肪や血栓症に関連のある Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)や、同じく脂肪細胞から分泌され動脈硬化性

疾患に関連のあるアディポネクチンがある。ここでは β 3-AR 遺伝子 Trp64Arg 多型と FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型を調べた。これらははともに、若年、中高年男性において2型糖尿病や高脂血症とは関連が認められなかったが、壮年日本人男性において FABP2 の Thr/Thr ゲノタイプで空腹時血糖が軽度ではあるが有意な高値が認められた。また LDL-R 遺伝子の C1773T 多型は、血中 LDL コレステロールと総コレステロール濃度の上昇と関連があることが示唆された。また、Tアリアル頻度は白人に比して本邦では0.12と低かったが、それが中高年日本人男性において高脂血症を引き起こしている可能性が示唆された。以上より、インスリン抵抗性を介して空腹時血糖や高脂血症に関与する遺伝子多型は、動脈硬化や血栓症を含む代謝症候群の危険因子(予知マーカー)となる可能性があり、今後さらに検討していくことが必要と考えられた(猿田享男)。

(3) 血栓性疾患の遺伝子診断法に関する研究

本研究課題では同一患者集団に対して多数の候補遺伝子の多型タイピングを行い複数の因子について血栓症との関連を検討した。これらを総括して解析し、一人ひとりの個体について複数の遺伝子多型の組み合わせが phenotype にどのように影響するかを検討する必要がある。今年度はそのための multiplex PCR を用いた遺伝子診断法も開発した。その際、通常の方法で抽出された遺伝子 DNA に

よる PCR のほか、全血からの直接 PCR も行った。その結果後者がほとんどの PCR 反応に有効であり、簡便であることが示された。多数の個体の遺伝子解析に適していると思われる(渡邊清明)。

D. 考察

ポストゲノムシーケンスの時代においては、個人個人にあわせたオーダーメイド医療の実現が望まれている。近年、高血圧症や糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病の遺伝的リスクを評価するための研究が急速に進んでいるが、臨床的に最も重要な最終イベントである血栓形成そのものに関する研究は少ない。我々は特に血栓症の遺伝的素因に関する研究を体系的に開始する必要があると考えている。その理由は、(1)日本人の死因の大多数を占める冠状動脈疾患と脳血管障害の原因が血栓症であること、(2)適切な予知と予防により多くの血栓症の発症が予防できるからである。具体的には(a)血小板、凝固因子など血栓形成因子の遺伝子多型と、これらの in vitro 機能(因子の phenotype)、血栓症の頻度、重症度、血栓形成部位(脳、冠動脈など)の関係を検討し、(b)欧米と遺伝子多型頻度が異なるわが国独自の危険因子を検索し、(c)個人個人の疾患の遺伝子診断システムを構築し、(d)個体にあわせた血栓症予防法と治療法を開発することを目的としている。

平成13年度の研究では、脳血管障害と冠状動脈疾患について既知の SNPs に対して患者-対照研究を施行し、関連あ

る遺伝子多型を見出した。新規 SNPs の検索も行った。また血栓症患者の検体採取、臨床所見、検査値などのデータベース構築法を検討した。さらに実験研究として、血栓形成と深い関係がある血小板受容体（フォンビルブランド因子受容体や血小板活性化因子受容体）の遺伝子多型が血小板機能に与える影響を、in vitro の発現実験系や ex vivo での血小板機能を解析することによって検討した。また巨核球-血小板、血管内皮細胞などの RNA を解析した。このような成果の蓄積により、日本人 SNPs のデータベースを用いた大規模な臨床研究が飛躍的に進むものと思われる。新しい遺伝子多型を発見することは今後のオーダーメイド医療に欠かせないものであるが、多型の遺伝子検査が実際に臨床に応用されるにはまだ多くの問題点が残されている。今後は血栓症に関連のある遺伝子多型を改めてスクリーニングし、新規に発見されたものについて症例-対象研究を行い疾患との関連を検討することになるが、それと平行して臨床的意義のある遺伝子多型につき遺伝子診断システムの体系的な構築と、実験研究による遺伝子-表現系における因果関係の証明が必要である。

E. 結論

動脈血栓症によってもたらされる代表的な疾患である脳血管障害と冠状動脈疾患について、血栓形成と関連の予想される既知の SNPs に対して患者-対照研究を施行し、関連ある遺伝子多型を見出した。新たな SNPs の search も行った。

また血栓症患者の検体採取、臨床所見、検査値などのデータベース構築法を検討し、今後の前向き研究の基盤を作成した。血栓性疾患の遺伝子診断のより簡便、経済的な方法論について検討した。さらに実験研究として、血栓形成と深い関係がある血小板受容体（フォンビルブランド因子受容体や血小板活性化因子受容体）に新たに見出された多型について、多型が血小板機能に与える影響を、in vitro の発現実験系や ex vivo での血小板機能を指標に解析し貴重な情報を得た。また巨核球-血小板の RNA を解析し、今後新たな遺伝子産物を発見する足掛かりとした。

F. 健康危険情報

現段階では上記の結果は実際の臨床の現場で疾病予防・治療に還元できるものではない。今後の更なる検討が必要と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U. The Frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese, and Africans.

Am J Hum Genet 70:758-762, 2002

Matsubara Y, Murata M, Moriki T,

Yokoyama K, Watanabe N, Nakajima H, Handa M, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, and Ikeda Y. A novel polymorphism, 70Leu/Phe, disrupts a consensus Leu residue within the leucine-rich repeat sequence of platelet glycoprotein Ib α . *Thrombosis and Haemostasis*, in press, 2002

Sonoda A, Murata M, Ikeda Y, Fukuuchi Y, Watanabe K. Stroke and platelet glycoprotein Ib α polymorphisms. *Thrombosis and Haemostasis* 85: 573-574, 2001

Ito D, Tanahashi N, Murata M et al: Notch3 gene polymorphism and ischemic cerebrovascular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72: 382-384, 2002

太田敦美、園田 啓、谷田部陽子、竹下栄子、斉藤郁夫、伊東大介、棚橋紀夫、福内靖男、菊池春人、村田 満、渡邊清明：健康診断受診者および脳血管障害患者における ANP 遺伝子多型の比較と血中 ANP 濃度 *臨床病理* 50: 296-300, 2002

2. 学会発表

Matsubara Y, Murata M, Moriki T, Yokoyama K, Watanabe N, Nakajima H, Handa M and Ikeda Y. Studies on a naturally occurring amino acid dimorphism, 70Leu/Phe, that disrupts a consensus Leu residue within the leucine-rich repeat sequence of platelet glycoprotein Iba.

XVIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Paris, France, July, 2001

村田 満：ゲノム創薬の展望：血栓症と SNP 第 33 回に本動脈硬化学会ジョイントシンポジウム 平成 13 年 6 月、東京

村田 満：SNPs と血栓研究 血液アゴラフォーラム 平成 13 年 8 月 東京

Sonoda A, Noji S, Takeshita E, Ito D, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Saito I, Murata M, Ikeda Y, Watanabe K. Heterozygous Deficiency of Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH) Caused by a Common Val279Phe Polymorphism is Associated with an Increased Risk for Stroke at Younger Age in the Japanese Population. 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA. Dec 2001.

Ishioka H, Sonoda A, Asano K, Fukunaga K, Yamaguchi K, Takeshita E, Ito D, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Saito I, Yoshida T, Murata M, Ikeda Y, Watanabe K. A polymorphism in the cytoplasmic domain of platelet-activating factor receptor (PAF-R), 224Ala/Asp, affects PAF-induced signaling and may cause inter-individual variation of platelet responsiveness to PAF. 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA. Dec 2001

Oguchi S, Mitsuyoshi Y, Ishii K, Takeshita E, Takei N, Meguro S, Saruta T, Tsushima M, Takei I, Murata M, Watanabe K. Coagulation factor XII 46C/T genotype and plasma XIIa levels are associated with calcification of abdominal aorta in patients with type 2 diabetes mellitus. XVIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Paris, France, July, 2001

健管理センター²⁾、同中央臨床検査部³⁾

Ishii K, Oguchi S, Ito D, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Saito I, Takeshita E, Murata M, Ikeda Y, Watanabe K. Association between ischemic cerebrovascular disease and fifteen candidate gene polymorphisms in the Japanese population. XVIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Paris, France, July, 2001

小口修司、光吉慶生、石井啓子、竹下栄子、武井直之、目黒 周、猿田享男、武井 泉、村田 満、渡邊清明：活性化凝固第 XII 因子濃度(XIIa)は内臓脂肪と関係する — 2 型糖尿病における検討— 第 48 回臨床検査医学会総会 平成 13 年 8 月、横浜

第二十六回日本脳卒中学会総会（平成 13 年 3 月 15 日、大阪）虚血性脳血管障害患者と Connexin37 遺伝子多型 C1019T の関係 慶應義塾大学神経内科・中央検査部・保健管理センター 佐藤秀樹¹⁾、伊東大介¹⁾、棚橋紀夫¹⁾、村田満³⁾、渡辺清明³⁾、吉田正²⁾、斎藤郁夫²⁾、福内靖男¹⁾ 慶應義塾大学神経内科¹⁾、同保

分担研究報告書

血栓形成メカニズムの分子学的研究

主任研究者 池田康夫 慶應義塾大学医学部教授

研究協力者 松原由美子 慶應義塾大学医学研究科

研究要旨

本研究は（１）実験研究として血栓形成と関連する遺伝子に遺伝的多様性（変異）を見い出し、変異によっておこる機能の変化を探究することにより、それぞれの血栓形成／抑制因子の血栓症発症への関与を分子学的に明らかにすること、（２）血栓症、特に冠状動脈血栓症患者を登録し、検体採取、臨床所見、検査値などのデータベースを構築することを目的としている。実験研究として今年度は、(a) 動脈血栓症の発症との関連が長い間議論されてきたメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型の haplotype 解析を行い、その変異の起源を探究するとともに、最近我々を含む日本人グループによって発見され血小板機能に重要と考えられる受容体の遺伝子多型について解析した。(b) 最近我々が報告した血小板フォンビルブランド因子受容体である GPIIb/IX/V 複合体の GPIIb α 70Leu/Phe 多型について、2 種類の遺伝子組み換え蛋白を作成し、リストセチン存在下 ^{125}I で標識 vWF の結合能を検討した。野生型 (Leu) と変異型 (Phe) の間で結合能に差は見られなかったが、これら蛋白のモノクローナル抗体への反応性を調べたところ、検索した数種類のモノクローナル抗体の中で、立体構造依存性のエピトープを認識する 2 種類の抗体の変異型 (Phe) への反応性が減弱していた。また我々は同受容体の機能が先天的に亢進している先天性血小板機能異常症患者より新たに見い出された変異 (G233S) について *in vitro* 発現系において検討した。その結果、G233S に加え、G233A でも患者と同様の phenotype（低濃度リストセチンによる受容体機能の亢進）が観察された。233 番目のアミノ酸は、その存在部位から受容体の機能を調節する可能性を想定したが、患者同様の phenotype は G233S、G233A 共に観察された。これら血小板受容体にみられる多型を含む変異は血小板機能、ひいては血栓形成能に影響する可能性があり、今後体系的な検索が必要と考えられた。

A. 研究目的

動脈血栓症は死亡原因の第一位を占める心筋梗塞や脳梗塞などの生活習慣病の直接の発症原因であり、その予防は現代に求められる最重要課題の一つである。

一般に動脈血栓症は動脈硬化病変を基盤とし、そこに血小板や血液凝固因子が主体となった血栓が形成することにより発症する。血栓症の発症には、高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙などの動脈硬化進

展の危険因子が重要な役割を演じていることは論を待たない。しかし家族集積性があること、これらの危険因子を有しない若年の血栓症など遺伝的素因が疑われる血栓症も多い。血栓症に関係する因子は血液凝固、線溶因子、白血球、血小板など多岐に涉っており、これに環境・食事なども加わりその病態は甚だ複雑である。動脈血栓症の危険因子としては、血栓形成を助長させる血液凝固能や血小板機能の亢進を考慮せねばならない。この両者は互いに関係しあっている。例えば動脈硬化の危険因子は易血栓性（凝固能や血小板機能の亢進）を招来し、逆に血栓が動脈硬化を進展させることも知られている。血栓症の遺伝的リスクの評価には、動脈硬化に関する遺伝的危険因子と血栓性素因に関係する遺伝的危険因子の両面からのアプローチが必要である。遺伝子のなかには、環境との interaction を認めるもの、すなわち特定の遺伝子タイプを有する個体にだけ環境因子が悪影響を引き起こす場合が知られている。従って個体の遺伝的リスクを評価することは、より効果的かつ経済的に疾患を予防することにつながり、未病という観点から重要である。本研究では血栓症、特に冠状動脈血栓症患者を登録し、検体採取、臨床所見、検査値などのデータベースを構築すること、および動脈血栓症に重要な役割を演じている血小板や血管内皮細胞に着目し、その遺伝的多様性（正常人）や遺伝的変異（疾患）と血小板機能との

関連を探索することにより、血栓形成メカニズムを分子学的に明らかにすることを目的としている。

動脈血栓症に関連する遺伝子多型として、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)）がよく知られている。これはホモシスチン代謝に関係する酵素で、変異型では酵素が熱に不安定で失活しやすく、その結果変異型を有する個体では血中ホモシスチンが上昇しやすい。血中ホモシスチン濃度の上昇は、心血管系の独立危険因子と考えられているが、MTHFR の遺伝子多型をホモ接合体で有する個体は特に葉酸摂取量が少ない場合に軽度の高ホモシスチン血症を示し、冠動脈疾患罹患率と関係すると報告された。この変異は多くの人種に広く認められ動脈硬化や血栓症との関係で世界中から注目を集めている。しかし変異頻度は人種によって異なることが知られていた。そこで研究者らはイスラエルの Dr U Seligsohn らと共同で、各人種での遺伝子頻度を検索するとともに、この遺伝子の haplotype を解析し、その変異の origin を探索することとした。

一方研究者らは最近、動脈血栓症に重要な意義をもつ血小板受容体に 2 つの新たな遺伝子変異を見いだした。いずれも血小板機能に重要な役割を担うフォンビルブランド因子受容体のなかに見い出されたものであり、アミノ酸変異を伴う多型であるため血小板機能への個体差への

関与が想定された。従って本年度の研究では、これら新規の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) が、受容体機能に与える影響を、(1) 健常人の血小板を用いた ex vivo 研究や、遺伝子組み換え蛋白の発現実験による in vitro 研究により探究すること、(2) 遺伝子多型が疾患の発症や病態と関連するか、を疾患一対照研究により検討することとした。具体的には最近我々が発見したフォンビルブランド因子受容体 GPIb/IX/V 複合体の α 鎖の 70Leu/Phe 多型と、同受容体の機能が先天的に亢進している先天性血小板機能異常症患者より最近我々が同定した G233S 変異について検討した。前者は、受容体の構造維持に大変重要と思われる leucine-rich repeat 配列内にあり、しかも多くの類似蛋白のこの配列内で保存されている Leu 残基の変異を起こしていることから、機能への影響が想定されたものである。一方、後者は、この受容体の機能調節部位に存在し、受容体の on/off を制御する可能性が示唆されている。

B. 研究方法

MTHFR の遺伝子多型 PCR 増幅の後直接シーケンス法で MTHFR 遺伝子にみられる新規多型をスクリーニングした。

GPIb α の変異 70Leu/Phe 多型: CHO 細胞に 2 種類の組み換え蛋白 (70Leu および 70Phe) を発現させ、

この蛋白を個相化し、125I で標識した vWF の結合を観察した。また、GPIb α に対する各種モノクローナル抗体との反応性を比較した。G233S 変異: CHO 細胞に 5 種類の可溶性組み換え蛋白 (野生型、G233S、G233A、G233D、G233K) を発現させた。これらの変異のうち、患者で観察されたものは G233S であるが、機能調節部位と想定されている 233 番目のアミノ酸が、何に変異するかによって機能が異なる可能性を考え、上述のごとく性質の異なる数種類のアミノ酸置換を作成した。これらの蛋白を個相化し、125I で標識した vWF の結合を観察した。また、GPIb α に対する各種モノクローナル抗体との反応性を比較した。

遺伝子解析に関しては倫理指針に則り文書による同意を得たのちに行った。

C. 研究結果

1. MTHFR の遺伝子の haplotype 解析

高ホモシステイン血症と関連するとされる 677T 多型は、イントロンに見られる別の 4 つの多型のうち、G-T-A-C haplotype と関連していた。これは 677T 多型が共通の founder に由来することを示唆する。妊婦が葉酸欠乏状態では 677T をもつ新生児が減少する一方、葉酸摂取が十分な場合は 677T をもつ新生児が増加するという報告もあり、677T を有することは一般に血栓症に不利と思われるが、その一方で、何らかの survival

advantage も予想される。

2. 血小板 GPIIb/IIIa の遺伝子変異

GPIIb/IIIa 70Leu/Phe 多型 (1) 遺伝子多型と vWF 結合能との関連: 2 種類の遺伝子組み換え蛋白を作成し、これらをニトロセルロースメンブレンに固定し、リストセチン存在下 125I で標識 vWF の結合能を検討したが、野生型 (Leu) と変異型 (Phe) の間で差は見られなかった。

(2) 遺伝子多型がモノクローナル抗体への反応性に与える影響: 数種類のモノクローナル抗体の中で、立体構造依存性のエピトープを認識する 2 種の抗体 (LJ-P3 および GUR83/35) の反応性だけが変異型 (Phe) で現弱していた。

G233S 変異 (1) 遺伝子変異と vWF 結合能との関連: 5 種類の遺伝子組み換え蛋白を作成し、これらをニトロセルロースメンブレンに固定し、リストセチン存在下 125I で標識 vWF の結合能を検討した。患者で見い出された変異である G233S に加え、G233A でも患者と同様の phenotype (低濃度リストセチンによる受容体機能の亢進) が観察された。一方、極性アミノ酸に置換した G233D、および G233K ではこの性質は観察されなかった。**(2) 遺伝子多型がモノクローナル抗体への反応性に与える影響:** 数種類のモノクローナル抗体はいずれも、どの組み換え蛋白にもよく反応した。

3. 冠状動脈血栓症患者の新規登録システムの構築

冠状動脈造影にて有為な病変を有する

冠状動脈疾患患者の registry につき検討した。現在、国際的にも International Society of Thrombosis and Haemostasis の標準化委員会などで同様の登録システムの構築が進行中であり、血栓症患者の前向き研究を目的とした患者の登録方法の標準化は、標準 SNPs データを利用した大規模な疾患関連研究に欠くことのできないものである。今年度は検体採取、臨床所見、検査値などのデータベース構築法を具体的に検討した。

D. 考察

血栓症については 1990 年台中盤からも多くの研究者が疾患感受性遺伝子の同定に鎬を削っている。多数の遺伝子変異や多型が報告されているが、未だに遺伝子診断として日常臨床に直接影響するほど確立されたものはなく、人種間での多型の意義の相違を理解するとともに新規の SNP を同定し、その機能評価を行うことが急務である。今回我々は古くから知られた MTHFR 多型の人種間比較とその起源、および血小板に新たに発見された 2 種類の変異を検討した。血小板 GPIIb/IIIa 70Leu/Phe 多型については、その存在部位から受容体機能を失活させる可能性を想定した。結果的には蛋白の高次構造の変化は認められたが vWF 結合能の明らかな減弱は示されなかった。しかし in vitro の実験系では差が明らかでなくても、疾患への感受性に影響する可能性

があるため今後、易血栓性、易出血性の両側面から症例一対照研究などで検討してゆく必要がある。GPIb α の G233S に関しては、G233S に加え G233A でも患者と同様の phenotype（低濃度リストセチンによる受容体機能の亢進）が観察された。しかし G233D や G233K ではこの現象は観察されなかった。233 番目のアミノ酸は、その存在部位から受容体の機能を調節する可能性を想定したが、患者同様の phenotype は G233S、G233A 共に観察されたことは、置換するアミノ酸の種類にある程度依存して受容体が活性化することを示しており、活性化における受容体の立体構造変化に重要な知見をもたらしたといえる。

E. 結論

血栓形成と関連する遺伝子の中で、血小板受容体に遺伝的多様性（変異）を見出し、変異によっておこる機能の変化を探究することにより血栓形成/抑制因子の血栓症発症への関与を分子学的に明らかにした。

F. 健康危険情報

現段階では上記の結果は実際の臨床の現場で疾病予防・治療に還元できるものではない。今後の更なる検討が必要と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opore-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U. The Frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese, and Africans.
Am J Hum Genet 70:758-762, 2002

Matsubara Y, Murata M, Moriki T, Yokoyama K, Watanabe N, Nakajima H, Handa M, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, and Ikeda Y. A novel polymorphism, 70Leu/Phe, disrupts a consensus Leu residue within the leucine-rich repeat sequence of platelet glycoprotein Ib α .
Thrombosis and Haemostasis, in press, 2002

2. 学会発表

Matsubara Y, Murata M, Moriki T, Yokoyama K, Watanabe N, Nakajima H, Handa M and Ikeda Y. Studies on a naturally occurring amino acid dimorphism, 70Leu/Phe, that disrupts a consensus Leu residue