

within the leucine-rich repeat  
sequence of platelet glycoprotein Iba.  
XVIIIth Congress of the International  
Society on Thrombosis and  
Haemostasis. Paris, France, July, 2001

#### H. 知的所有権の取得

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部内科講師

研究要旨

動脈血栓症の危険因子としては、高血圧や従来から知られている動脈硬化の進展を早める因子、糖尿病や高脂血症に加え、血栓形成に関係する血液凝固能や血小板機能が重要である。平成 13 年度の研究では（1）血小板機能の個体差に関与する可能性のある遺伝子多型について、in vitro 実験系で検索するとともに、症例－対照研究で易罹病性との関係を調べた。また（2）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ってそれらの機能を総括的に評価するため準備を行った。

血小板活性化因子受容体 A224D 多型はそのシグナル伝達に影響することが報告されているが、PAF 刺激による血小板凝集と多型との関係を調べると、AA 型に比べ DD 型では明らかに凝集能が減弱していた。しかしこの遺伝子多型と虚血性脳血管障害（CVD）との関係について検討した結果、CVD 患者群と control 群との間で遺伝子型出現頻度に有意差は認められなかった。また血小板フォンビルブランド因子受容体の GPIb $\alpha$  の遺伝子多型 145Thr/Met またはくり返し配列多型（VNTR）について検討した。これらは、過去の我々の報告で CVD や、冠状動脈疾患と関連することが示された多型である。site-directed mutagenesis により、目的の DNA construct が作成可能であった。これらを CHO 細胞に導入し発現した受容体につき、(a) 可溶性リガンド結合能、(b) 流動状態下で固相化 vWF への CHO 細胞の接着、rolling につき、検討する準備が整った。さらに巨核球-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 を同定するため、血小板中に微量に含まれている 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。

A. 研究目的

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であろう血栓性疾患へのシステマチックな取り組みは、医学のみならず、医療経済の上からも、今、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。脳血管障害、心筋梗塞などは動脈血栓症が原因となって発症する。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。動脈血栓症の危険因子としては、高血圧や従来から知られている動脈硬化の進展を早める因子、糖尿病や高脂血症に加え、血栓形成に関係する血液凝固能や血小板機能が重要である。

本年度は(1)血小板活性化因子受容体(PAF-R)に最近報告されたのアミノ酸変異を伴うGCTからGATへの遺伝子多型A224Dについて検討した。この部位はwild typeではアラニン、mutant typeではアスパラギン酸である。報告によれば、chinese hamster ovary (CHO) cellにwild typeとmutant typeの遺伝子を導入したトランスフェクタントを比較すると、mutant typeを導入した細胞では、細胞内シグナル伝達にかかわる、細胞内カルシウム流入、イノシトールリン酸産生、アデニル酸シクラーゼ制御、の減弱が認められている。そこで、今回の研究では、日本人におけるこの遺伝子多型の出現頻度を調べることで、この多型が、実際に生体内のPAF-Rの機能と関連しているか否かを調べることで、およびこの多型と疾患との関連について調べた。(2)次に、血小板フォンビルブランド因子受容体のGPIIb $\alpha$ の遺伝子多型145Thr/Metまたはくり返し配列多型(VNTR)について検討した。これは、分担研究者らによって既に冠動脈疾患の有病率と関連することが報告されている。今年度は、遺伝子組み換え蛋白の発現実験によるin vitro研究によ

り、145Thr-1回反復、145Thr-4回反復、145Met-1回反復、145Met-4回反復、の4種類の組み換え体を作成し、リガンドであるvWFの結合能を検討することを目的とした。(3)また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ってそれらの機能を総括的に評価するための予備的検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 血小板活性化因子受容体 (PAF receptor) のA224D多型

既に報告のあるこの多型の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。また、血栓性疾患のひとつである虚血性脳血管障害(CVD)について疾患関連研究を行った。

### 2. 145Thr/Met またはくり返し配列多型 (VNTR)

GPIIb/IX/V複合体の膜上発現にはGPIIb $\alpha$ 、GPIIb $\beta$ 、GPIXの同時発現が必要であることから、予めGPIIb $\beta$ 、GPIXの遺伝子を導入したCHO細胞(山形大学内科、林朋博博士より供与)に、上述のごとく145Thr-1回反復、145Thr-4回反復、145Met-1回反復、145Met-4回反復、の4種類のGPIIb $\alpha$ 遺伝子を導入した。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する。

## C. 研究結果

### 1. 血小板活性化因子受容体 (PAF receptor) の多型

(1) 遺伝子多型と血小板機能との関連：  
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 に比べ弱くなっていた。一方、collagen  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  と ADP  $10^{-5} \text{M}$  の添加では、AA と DD ともに最大凝集を示した。

### (2) 遺伝子多型と疾患脳血管障害 (CVD) との関連

CVD 患者群 234 例と control 群 285 例における臨床的背景は、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。次に、この遺伝子多型と CVD との関係について検討した結果、CVD 患者群と control 群との間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。

### (3) 遺伝子多型とチロシンリン酸化との関連

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。

### 2. 145Thr/Met 多型またはくり返し配列多型 (VNTR) を持つ組み換え蛋白の作成

site-directed mutagenesis により、目的の DNA construct が作成可能であった。これらを CHO 細胞に導入し発現した受容体につき、(1) 可溶性リガンド結合能、(2) 流動状態で固相化 vWF への CHO 細胞の接着、rolling につき、検討する予定である。

### 3. 血小板 transcriptome 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。

#### D. 考察

PAF は種々の細胞に作用し生物活性を発揮する。血小板に対しては強力なアゴニストであり、低濃度で血小板活性化、凝集を引き起こす。近年報告された PAF receptor 多型は、一般人口にも高頻度に認められるため、血小板機能の個体差の原因となっている可能性がある。今回の研究でこの多型が *in vitro* の血小板機能へ関与することが示された。しかし脳血管障害の易感受性への関与は否定的であった。今後 PAF が関与する他の疾患についての検討が必要である。

血小板 GPIIb/IIIa の VNTR 多型の受容体機能への影響については引き続き検討する予定である。仮に *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。今後、血栓性疾患と易出血性の両側面から血小板、凝固因子を捕らえ、症例-対照研究などで検討してゆく予定である。

血小板 mRNA の定量的、定性的評価は今後の血小板 transcriptome 解析に有用な情報を与えた。

#### E. 結論

血小板機能の個体差に關与する可能性のある遺伝子多型（血小板活性化因子受容体、血小板フォンビルブランド因子受容体）について、*in vitro* 実験系で検索するとともに、症例-対照研究で易罹病性との関係を調べた。また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ってそれらの機能を総括的に評価するため準備を行った。

#### 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

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

## 2. 学会発表

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

## H. 知的所有権の取得

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）  
分担研究報告書

脳血管障害における血栓形成の遺伝子的素因の解析

分担研究者 福内 靖男 慶應義塾大学医学部内科教授  
研究協力者 棚橋 紀夫 慶應義塾大学医学部内科講師

研究要旨

[目的] 虚血性脳血管障害発症には環境因子とともに、遺伝因子も関与していることが知られている。我々はケースコントロールスタディーにて虚血性脳血管障害における遺伝的危険因子を解析した。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。[対象・方法] 対象は 220 - 235 名の虚血性脳血管障害患者、対照として 315 - 316 名の健常人とした。Restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction 法を用いてそれぞれの遺伝子多型を解析した。[結果] Notch3 遺伝子は虚血性脳血管障害患者と健常人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。[結論] Notch3 遺伝子多型 T6746C は脳血管障害とは相関しなかった。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。

A. 研究目的

虚血性脳血管障害発症には環境因子とともに、遺伝因子も関与していることが知られている。我々はケースコントロールスタディーにて脳血管障害における血栓形成の遺伝子的素因の解析を行った。ひとつは若年から脳梗塞を繰り返し、禿頭・痴呆などを伴う CADASIL の原因となる Notch3 の遺伝子多型 T6746C、もうひとつは血管内皮細胞間などのギャップジャンクションを構成する蛋白 Connexin37 の遺伝子多型 C1016T をそれぞれ検討した。

B. 研究方法

当院神経内科にて加療中の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) 220 - 235 例(年齢 58±8、mean±S.D.)と年齢、性別を一致させた健常人 315 - 316 例(年齢 59±4)より末梢血採血を行った。Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP) 法(Notch3 は制限酵素 Mwo I、Connexin37 は制限酵素 Mob I)を用いてそれぞれの遺伝子多型を解析した。

〈倫理面への配慮〉

対象全例より紙面による承諾を得た。

### C. 研究結果

Notch3 は虚血性脳血管障害患者において CC 型、CT 型、TT 型はそれぞれ 14.0 %, 45.5 %, 40.4 % であり、健常者においてはそれぞれ 14.3 %, 47.9 %, 37.8 % であった。Connexin37 は虚血性脳血管障害患者において CC 型、CT 型、TT 型はそれぞれ 60.9 %, 29.5 %, 9.5 % であり、健常者においてはそれぞれ 67.4 %, 28.2 %, 4.4 % であった。Notch3 遺伝子多型については有意な相関は見られなかったが、Connexin37 遺伝子多型については有意な相関が認められた ( $p=0.047$ )。

### D. 考察

Notch3 遺伝子多型 T6746C は各病型別解析を含めて虚血性脳血管障害とは有意な相関が認められなかった。Connexin37 遺伝子多型 C1016T は虚血性脳血管障害と有意に相関することが示された。しかし、ロジスティック回帰分析では高血圧の影響が考えられ、かつこの遺伝子多型と高血圧とが有意な相関を認めた。この遺伝子多型の虚血性脳血管障害への影響は高血圧を介した機序が推測された。

### E. 結論

脳血管障害における血栓形成の遺伝子的素因について、Notch3 遺伝子多型

T6746C 及び Connexin37 遺伝子多型 C1016T について検討した。

### 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. 学会発表

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<sup>1)</sup>、伊東大介<sup>1)</sup>、棚橋紀夫<sup>1)</sup>、村田満<sup>3)</sup>、渡辺清明<sup>3)</sup>、吉田正<sup>2)</sup>、斎藤郁夫<sup>2)</sup>、福内靖男<sup>1)</sup> 慶應義塾大学神経内科<sup>1)</sup>、同保健管理センター<sup>2)</sup>、同中央臨床検査部<sup>3)</sup>

#### 2. 論文発表

D Ito, N Tanahashi, M Murata, H Sato, I Saito, K Watanabe, Y Fukuuchi: Notch3 gene polymorphism and ischaemic cerebrovascular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 72: 382-384, 2002

### H. 知的所有権の取得

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし



冠動脈疾患における血栓形成の遺伝的素因の解析

分担研究者 小川 聡 慶應義塾大学医学部内科学教室教授

研究協力者 岩永 史郎 慶應義塾大学医学部中央臨床検査部助手

研究要旨

本研究は、血栓症や動脈硬化を基盤とする冠動脈疾患の遺伝的易罹病性を解明することを目的とする。冠動脈疾患に関与すると考えられる多くの遺伝子を、同一症例で縦断的に解析し、種々の遺伝子が発症に及ぼす効果を多面的に明らかにする。本年度はパイロット研究として、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。

A. 研究目的

本研究は、血栓症や動脈硬化を基盤とする冠動脈疾患の遺伝的易罹病性を解明することを目的とする。特に、発症前に症例ごとの罹病の可能性を評価し、個別化された適切な予防の手段を明らかにするための基礎的なデータを得ることを目的とする。本研究は、単一の遺伝子の変化が冠動脈疾患の発病に与える影響を検討するのみではなく、冠動脈疾患に関与すると考えられる多くの遺伝子を、同一症例で縦断的に解析し、種々の遺伝子が発症に及ぼす効果を多面的に明らかにす

ることを予定しているが、本年度はその前段階として、比較的小数の症例の限られた遺伝子を解析し、このような遺伝子多型性研究の問題点を、技術面のみならず倫理的な側面からも明らかにする。本年度の研究は、引き続き大規模で多面的な研究のためのパイロット研究として不可欠である。

冠動脈疾患に関連すると報告され、本邦における遺伝子多型性の頻度や病態との関連性が明らかにされていない二つの遺伝子を課題として選択した。一つは、Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の多型性

である。Matrix metalloproteinase (MMP)は、粥腫破裂、血管新生、心筋梗塞後の左室リモデリングに関与する結合組織中に存在する蛋白分解酵素である。多くの MMP の内、心筋組織では MMP-2 と MMP-9 が主に存在すると報告されているが、MMP-2 が常時発現しているのに対して、MMP-9 は発現量が必要に応じて調節されていることが明らかにされている。欧米人で MMP-9 遺伝子の promotor 領域に複数の多型が報告された。この内、C-1562T 多型は MMP-9 の発現量を約 1.5 倍に増加させる。また、検討されていない日本人における MMP-9 C-1562T 多型の頻度と冠動脈疾患との関連を検討した。

二つ目として、交感神経終末から分泌されるホルモンである Neuropeptide Y の遺伝子多型を検討した。Neuropeptide Y は血圧や摂食行動の調節に関与すると報告されている。フィンランド人とオランダ人で Neuropeptide Y 遺伝子の signal peptide にある T1128C 多型が発見され、この多型がアルコール摂取量の増加、血清コレステロール値、LDL-コレステロール値、頸動脈の内膜肥厚と関連することが示された。アジア系人種におけるこの遺伝子多型の検討はない。日本人における Neuropeptide Y T1128C 多型の頻度と冠動脈疾患との関連について検討した。

## B. 研究方法

冠動脈疾患患者 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、

研究方法について説明した後、文書による同意を取得した。採血を行い血清脂質、血液凝固系、CRP、葉酸、アンジオテンシン変換酵素を測定した。また、血液から抽出した DNA の MMP-9 遺伝子 C-1562T を含む領域を polymerase chain reaction 法で増幅した。また、Neuropeptide Y 遺伝子では T1128C を含む signal peptide の 238bp 領域を同様に増幅した。次に、restriction fragment length polymorphism 法を行って MMP-9 C-1562T 多型と Neuropeptide Y T1128C 多型の有無を症例ごとに調べた。病歴、既知の冠危険因子、超音波心エコー検査所見、冠動脈造影所見を調査し、遺伝子多型性との関連を解析した。

### (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。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。

具体的には、研究への協力は、患者個人の自由意志で任意に決定でき、例え研

究対象として同意しなかった場合にも診療上の不利益を被ることがないことを説明した。患者には研究方法として身体への安全性に問題がある点は採血のみであり、健康診断などで行われる一般的な採血と同程度の危険性があることを説明した。研究対象となる患者のプライバシーを守るために、採取した血液検体はすべて番号を用いて扱い、施錠された室内にある冷蔵庫に厳重に管理した。検体やそれから得られた検査結果は、本研究以外の目的に使用せず、また、研究結果の発表を含めて患者個人が特定できないようにした。さらに、一度、同意した患者が研究の途中で協力の撤回を申し出た場合には、直ぐに検体および検査結果を破棄し、同意を撤回した患者が研究に同意しなかった患者と同様に、診療上不利益を受けることのないように最善の配慮を行った。研究者が採取した検体ならびに患者の臨床データが、定められた以外の第三者に譲渡されることを禁止した。

患者個人の検査結果については、誰からの検体であるか特定されないように最善の対策を講じたが、現時点では予想できない不利益を対象患者被る恐れは完全には回避できないため、この点について十分な説明の上に同意を得た。解析の結果、患者本人が疾病の有無や病態について理解しておく方が好ましいと常識的に判断される結果が偶然に本研究で見いだされた場合には、患者本人がその結果を知る方が有益であると判断される場合に

限り、診療を担当する医師から患者本人の意志を確認した上で検査結果について開示する予定であった。開示した結果によって生じる患者や血縁者の疑問や不安を解決し、現時点で行える最良の治療手段を講じるために、診療を担当する医師に加えて、カウンセリングの専門家に協力を仰ぐ予定であったが、この研究の対象に該当する症例は発生しなかった。

### C. 研究結果

MMP-9 の C-1562T 多型は冠動脈疾患患者の 32% にあり、健常対象の 31% に存在した。これら二群間に有意な差を認めなかった。冠動脈疾患患者を心筋梗塞、労作性狭心症、急性冠疾患など疾患ごとに分類しても群間に差はみられなかった。発症年齢で、若年発症群とそれ以外の群に分類しても多型性の頻度は変わらなかった。冠動脈造影検査で診断した罹患冠動脈数で症例を分類すると、罹患冠動脈数が多い症例で T allele を有する頻度が有意に高くなっていた ( $p=0.03$ )。狭窄病変数で対象を分類した場合にも、病変数が多い症例で有意に T allele を有する頻度が有意に高く、特に狭窄病変を多数持つ症例では 41% が T allele を有していた ( $p=0.02$ )。重症冠動脈病変例にこの多型が多く認められることは、糖尿病やその他の危険因子の存在からは独立していた。心筋梗塞症例のみを対象として subgroup 解析を行うと心エコー法でみた左室拡大や左室収縮機能低下、発症時の peak CPK

値と C-1562T 多型性の頻度との間に有意な関連はなかった。しかし、初回冠動脈造影時に側副血行を持っていた症例には T allele が有意に多く認められた( $p=0.004$ )。さらに、6 ヶ月以上の間隔をあけて複数回の冠動脈造影検査を施行した症例では、後に施行した検査で新しく狭窄病変が出現した症例で T allele が多くみられた。

Neuropeptide Y の T1128C 多型は、冠動脈疾患群および健常対象群の合計 361 例中 1 例にも認められなかった。

#### D. 考察

MMP-9 の C-1562T 多型の頻度は、冠動脈疾患の有無や冠動脈疾患の病型ごとに差はみられなかった。しかし、罹患冠動脈数や狭窄病変数など冠動脈疾患の重症度を表わす指標とは有意に関連を持っていた。これは、冠動脈疾患の発症がこの多型性のみで一義的に決定されるわけではないことを示し、従来から冠動脈疾患の遺伝形式が多因子遺伝であるとする研究と矛盾しない。さらに、MMP-9 の C-1562T 多型は、冠動脈に新しい狭窄病変が出現した症例とも関連性を持っており、冠動脈の動脈硬化性狭窄病変を進展させ、多枝病変という重症冠動脈疾患を起こしやすくするといえる。この傾向は、T allele の heterozygote よりも T allele をふたつ有する homozygote で強く認められた。発症年齢とは関連性を持たなかったが、若年発症の心筋梗塞や狭心症は、臨床的に動脈硬化性狭窄病変が軽く、む

しろ血栓形成を誘因とすることが多く、この遺伝子多型性が血栓よりも動脈硬化により関与していることを示唆する。重症冠動脈病変を持つことが多い糖尿病やその他の危険因子からは独立していて、特に T allele の homozygote の症例では冠危険因子を十分にコントロールしなければ、重症冠動脈疾患の罹患率が高くなる可能性があり、今後このような症例に対する介入試験を行い評価しなければならない。側副血行を有する冠動脈疾患症例にも T allele が多く認められ、この遺伝子多型が冠動脈疾患患者の生命予後を悪化させるかは疑わしい。むしろ、生命予後を改善し、罹患期間を長期化させるために多枝病変が増加する可能性も残されている。より多くの症例で、3~5 年以上の観察期間の検討を行わなければ、冠動脈疾患患者の生命予後に与える影響を明らかにすることはできない。Neuropeptide Y の T1128C 多型は、北欧を中心に認められ、肥満や食行動との関連性が指摘されているが、合計 361 例の対象者の中に 1 例にも認められなかった。これまでの研究で、フランス人にも T1128C 多型が存在しないと報告されており、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。この結果は、確率的に本邦では冠動脈疾患の罹患にこの遺伝子が大きな効果を持っていないことを示す。遺伝子多型性の研究においては、人種差が少なからず認められ、例え海外で冠動脈疾患との関連性が示唆され

ていない多型性であっても、本邦で再度確認しなければ、日本人における冠動脈疾患の易罹病性への影響を明らかにすることはできない。

2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### E. 結論

MMP-9 C-1562T 多型性は冠動脈疾患の有無や病型に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、C-1562T 多型性は冠動脈の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。

北欧を中心として肥満や動脈硬化に関連すると報告された Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型は、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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

投稿準備中

##### 2. 学会発表

第 49 回日本心臓病学会学術集会(2001 年 9 月)に おいて本研究の要旨を発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

平成13年度厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）  
分担研究報告書

「血栓症に対する内分泌学的アプローチ」

分担研究者 猿田 享男 慶應義塾大学医学部内科教授

研究協力者 広瀬 寛 慶應義塾大学保健管理センター講師

研究要旨

FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型や LDL-R 遺伝子 C1773T 多型が、BMI、血圧、血糖、脂質、血清インスリンやレプチン濃度に及ぼす影響を明らかにするため、種々の年齢層の日本人男性を対象にこれらの関連を検討し、以下の結果を得た。

1.  $\beta$ 3-AR 遺伝子 Trp64Arg 多型と FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型はともに、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。

2. 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る。

A. 研究目的

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。

我が国においても、脂肪摂取の割合が増加しており、2型糖尿病の罹患率もまた増加している。また、高脂肪食を与えた実験動物に

おいて、インスリン感受性が低下していることが示されている。このことは、高脂肪食や高脂血症、さらには高遊離脂肪酸血症がインスリン抵抗性の発生に深く関連していることが示唆される。小腸の遊離脂肪酸結合蛋白 (FABP2)は小腸から遊離脂肪酸を吸収して、血中遊離脂肪酸や中性脂肪濃度の調節に重要な役割を果たしている蛋白である。ピマインディアンでは、FABP2 遺伝子がグルコースクランプ法によるインスリン刺激による糖取り込みと明らかな関連が認められている。最近、この遺伝子多型とインスリン抵抗性との関連が注目を浴びている。1995年

Baierらは、ピマインディアンのFABP2 Ala54Thr 遺伝子多型を同定し、それがインスリン抵抗性と強い相関があることを示唆した。ただし、ホモ変異を有する群では空腹時血漿インスリン、遊離脂肪酸濃度がより高く、グルコースクランプ法による糖取り込みは低下していた。FABP2 における Ala54Thr 変異は遊離脂肪酸との親和性を高め、小腸からの脂肪吸収を増加させることによって内臓脂肪蓄積を引き起こすと考えられている。Yamadaらは、54Thr-アレルの頻度が日本人では比較的高く、さらにこの変異がインスリン抵抗性と内臓脂肪蓄積と関連が認められること、しかしアレル頻度が2型糖尿病患者と健常者間で差が認められないことを報告した。またYagiらはFABP2 遺伝子座位と多型マーカーを使った糖尿病との関連性につき検討したが、明らかな相関は認めなかった。

上半身肥満、高血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常、内臓脂肪蓄積はしばしば合併し、このそれぞれが動脈硬化の独立したリスクファクターであり、遺伝因子と環境因子の両者とも、これらの病態と関連のあることが知られている。これまでのところ、脂質代謝の調節に関しては、低比重リポ蛋白受容体(以下LDL-R)遺伝子が脂質代謝において重要な役割を担っていることが知られており、この受容体の遺伝子変異が、家族性高コレステロール血症と関連していることが知られている。脂質代謝異常のみが注目されていた LDL-R

ノックアウトマウスにおいて、最近では高血圧も発症することが報告されている。これは、LDL-R が脂質代謝異常のみならずインスリン抵抗性や血圧調節にも関与していることを示唆するものであり、さらにインスリン受容体遺伝子も LDL-R 遺伝子の存在する染色体 19p13.2 の領域に位置しているので興味深い。しかし、本態性高血圧の病態もまた多因子で、遺伝と環境の両者が関与しているので、どのように LDL-R 遺伝子がインスリン抵抗性を引き起こしているのかは、未だ明らかにされてはいない。Borightらは、LDL-R 遺伝子 C1773T 多型が比較的頻度が高く、血中 LDL コレステロール濃度の増加と関連が見られること、さらに家族性高コレステロール血症の原因遺伝子として関連のあることを報告した。

本研究では、FABP2 および LDL-R の遺伝子多型が BMI、血圧、血糖、脂質、血清インスリンやレプチン濃度に及ぼす影響を、いろいろな年齢層の日本人男性を対象に検討した。

## B. 研究方法

FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型に関する検討では定期健康診断を受診した 21-39 歳の若年男性 196 名、40-65 歳の中老年男性は空腹時血糖値が 110 mg/dl 未満の正常血糖群 186 名と 110 mg/dl 以上の高血糖群 45 名、および当院内科外来通院者で 65 歳未満の時に糖尿病と診断された 77 名も高血糖群の対

象に加えた。ただし、内分泌疾患、高度の腎、肝機能障害を有する者、または全身的ステロイド投与を受けている者は除外した。さらに我々は、40-65 歳の中老年男性 231 名を、次のようなサブグループに分けて検討した。低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C) 値が、160 mg/dl 以上であるか、HMG-CoA 還元酵素阻害薬をはじめとする高脂血症治療薬の投与を受けている者を高脂血症群とした。一方、正脂血症群は、治療薬なしで LDL-C 値が 160 mg/dl 未満の者とした。

LDL-R 遺伝子 C1773T 多型の検討では、定期健康診断を受診した 40-65 歳の中老年男性 246 名を対象とした (ただし、悪性腫瘍を有する者や、ステロイド投与を受けている者は除外した)。さらに、この対象者を前記と同様に、高脂血症群と正脂血症群の 2 群に分けた。

身長、体重、血圧(収縮期と拡張期)、心拍数を測定した。血糖、血清脂質(TC, TG, HDL-C, LDL-C, 遊離脂肪酸)、尿酸値は空腹時採血にて採取された血液を用いて測定した。血清インスリンやレプチン濃度は、RIA 法にて測定した。インスリン抵抗性指数は、homeostasis model assessment を用いて計算した(HOMA-IR)。

静脈血の検体 5ml を、EDTA を含むチューブに採取した。ゲノム DNA を末梢白血球から標準法によって抽出した。約 500 ng の抽出した DNA を鋳型として使用した。FABP2 の 54 番目のアミノ酸のアラニンから

スレオニンへの変異は以下のようにして同定した。プライマーは Baier, et al の記載より、5'-ACA GGT GTT AAT ATA GTG AAA AG-3' と 5'-TAC CCT GAG TTC AGT TCC GTC-3' を使用した。MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, dNTP 各 0.2 mmol/L, プライマー各 5 pmol, Taq DNA polymerase 0.5U を合わせ、全体で 20 μL として反応を行った (タカラ社、東京)。DNA は 94°C 2 分で脱重合し、94°C 45 秒、55°C 1 分のアニーリング、72°C 45 秒の伸長反応のサイクルを 35 回繰り返して増幅した。その後、72°C 10 分の伸長反応を行った。

LDL-R 遺伝子の 1773 番塩基のシトシン (C) からチミン (T) への変異は以下のようにして同定した。プライマーは 5'-TCT CCT TAT CCA CTT GTG TGT-3' と 5'-CTT CGA TCT CGT ACG TAA GC-3' を使用した。MgCl<sub>2</sub> 2mmol/L, dNTP 各 0.2 mmol/L, プライマー各 5 pmol, Taq DNA polymerase 0.5U を合わせ、全体で 20 μL として反応を行った。DNA は 94°C 5 分で脱重合し、94°C 1 分、56°C 1 分、72°C 1 分の伸長反応のサイクルを 35 回繰り返して増幅した。その後、72°C 5 分の伸長反応を行った。

PCR 産物は 10 倍量の制限酵素で消化させた。制限酵素は FABP2 では Hha I で、LDL-R は HincII を使用し、酵素消化は 37°C で 3 時間行った。そして 0.5X トリス-ホウ酸-EDTA バッファーを用いて、3%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド



で染色して確認した。FABP2 の PCR 産物は、Hha I の切断部位で 99 塩基と 81 塩基に分けられるが、Ala54Thr 置換があると切断されなくなる。また、LDL-R の PCR 産物は、HincII の切断部位で 98 塩基と 35 塩基の断片に分けられるが、C1773T 置換があると切断されなくなる。

すべてのデータは平均値±標準偏差として表した。2 群間の比較には Mann-Whitney U test を、3 群間の比較には Kruskal Wallis test を、そして比率の比較には  $\chi^2$  検定を使用した。P 値 0.05 未満を統計学的に有意と解釈した。

以上の対象者全員に対して、事前にインフォームドコンセントが得られており、研究プロトコルも慶應義塾大学保健管理センターおよび内科学教室の倫理委員会で承認されている。

## C. 研究結果

### 1. FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型と 2 型糖尿病、高脂血症との関連について

中高年者を高血糖群および正常血糖群の 2 群に分けて、FABP2 遺伝子多型のゲノタイプとアレル頻度を比較した。その結果、高血糖群において FABP2 遺伝子の Thr/Thr54 型の頻度が高値傾向であったものの、有意差には至らなかった。さらに同多型につき、高脂血症群と正脂血症群の 2 群間においてゲノタイプとアレル頻度を比較した。しかし両群間において、多型のゲノタイ

プとアレル頻度には有意差を認めなかった。

次に、若年者および正常血糖である中高年者を対象として、FABP2 遺伝子多型のゲノタイプ間で、臨床、代謝指標を比較検討した。FABP2 遺伝子のゲノタイプは Ala/Ala, Ala/Thr, Thr/Thr の 3 つに分けられた。21-39 才のグループでは、各変異群で有意な差は認められなかった。本研究でのゲノタイプの頻度は、すべて Hardy-Weinberg の式に合致していた。表 1 に示すように、40-65 才の男性における Thr/Thr のホモ変異群では、他の群に比し空腹時血糖が有意に高値であった ( $P<0.01$ )。また、HOMA-IR もこの群で高値傾向にあったが、統計学的有意差には至らなかった ( $P=0.21$ )。

2 型糖尿病患者においては、FABP2 の Thr/Thr 変異と Thr アレルの頻度は、40 から 65 歳までのコントロール群 ( $FPG<110\text{mg/dL}$ ) と比し、有意な差は認めなかった。また、各種代謝指標や PAI-1 濃度においても、この 3 群間で有意差は認められなかった。

### 2. LDL 受容体遺伝子 C1773T 多型

対象者を LDL 受容体遺伝子の 1773T アレルの有無によって 3 群に分けた(CC, CT, TT)。CC, CT, TT のゲノタイプの頻度は、各々 75.2, 22.8, 2.0%であった。本検討において、ゲノタイプ頻度のすべてが Hardy-Weinberg の式と合致していた。血中コレステロールと LDL コレステロールの両者とも、

CC 群より、CT+TT 群の方が有意に高値を示していた (各々  $P=0.006, 0.015$ )。但し、この検討の中には、18 名(HMG CoA 還元阻害薬)の投与を受けている対象者も含まれている。さらに表 2 に示すように、ゲノタイプの頻度が、高脂血症群と正常群との間で、有意差が認められた ( $\chi^2=7.67, P=0.022$ )。すなわち、1773T アリール頻度が、高脂血症群の方が正脂血症よりも有意に高値であった ( $\chi^2=6.18, P=0.013$ )。

#### D. 考察

##### FABP2 遺伝子の Ala54Thr 多型に関して

本検討では 40-65 歳の正常血糖群の男性において、FABP2 の Thr/Thr ホモ変異群で空腹時血糖が有意に高値であった。この FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型が内臓脂肪蓄積を引き起こすことを Yamada らが報告しており、我々はこの変異によってインスリン抵抗性が増大し、その結果として空腹時血糖値の上昇を招いたと推測した。しかし本検討では、Baier らのピマインデアンにおける報告と異なり、FABP2 遺伝子のゲノタイプ間で、血中インスリン濃度と HOMA-IR には有意差は認められなかった。さらに腹部脂肪面積やウエスト/ヒップ (W/H) 比などの測定も残念ながら本検討では行っていない。また血中レプチン濃度が、FABP2 の Thr54 変異を有する壮年男性において高値傾向であったが、有意差には至らなかった。

中高年男性の高血糖群ではゲノタイプ間

で各種指標に有意差を認めるものはなかった。この相違は、FABP2 変異が徐々にインスリン抵抗性を惹起するが、高血糖を示す患者では、すでにインスリン抵抗性が形成されているためであると推測している。今後、これらの遺伝子多型の重要性を明らかにするために、他の変異アリールと組み合わせたり、異なった年齢層や性別、人種でのさらなる検討が必要と思われる。

##### LDL 受容体遺伝子の Ala54Thr 多型に関して

LDL コレステロールは LDL 受容体を介して細胞に取り込まれ、肝細胞やその他の末梢組織で利用される。LDL 受容体の数あるいは活性の減少が血中 LDL コレステロール濃度の増加につながる。その数が減少する機序は、コレステロールや飽和脂肪酸の食餌からの過剰摂取によって、コレステロールプールが増加することが関与すると考えられている。一方、後者の機序、すなわち LDL 受容体の活性が低下する機序は、LDL 受容体遺伝子の変異がそれ自身の変形を来すときに引き起こされるものと推測される。本検討では血中コレステロールと LDL コレステロール濃度の両者が、CC 群よりも CT+TT 群で有意に高いことが示された。さらに 1773T アリール頻度もまた、高脂血症群の方が正脂血症群に比し有意に高値であった。このことは、日本人においても 1773T アリールが血中 LDL 濃度の上昇を引き起こしていることに関与している可能性がある。Boright らは以前、

高脂血症のない白人の集団であっても、血中 LDL 濃度が CT+TT 群で有意に高いことを報告している。しかし、日本人を対象とした本検討では、白人の検討とは逆に、1773C アリール頻度の方が Tアリール頻度よりはるかに多く認められた。Borightらの報告で示された Tアリールの頻度は、我々の検討で得られた頻度の 4.7 倍であった。もし、この Tアリールが LDL コレステロール濃度の上昇を引き起こしているとするならば、白人において虚血性心疾患の罹患が非常に高いことは、この Tアリール頻度の高いという遺伝因子と、また一方、この集団では食事からの脂肪摂取が多いという環境因子の両者が関与している可能性が考えられる。日本人では、Tアリールの頻度が白人に比べるとかなり低いが、この遺伝因子によって引き起こされた高 LDL コレステロール血症が、虚血性心疾患の進展を規定する冠危険因子になる可能性がある。LDL-R の C1773T 多型は、アミノ酸の変異を伴わない silent mutation であるが、LDL-R 遺伝子の他の部位またはインスリン受容体遺伝子と連鎖不平衡を介して、インスリン抵抗性や本態性高血圧と関連している可能性が考えられる。

さらに現在、動脈硬化や冠動脈疾患の抑制因子と考えられているアディポネクチンの血清濃度や遺伝子多型との関連を検討中である。

## E. 結論

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 の C1773T 多型は、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。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る。

## F. 健康危機状況

なし

## G. 研究発表

Ishii T., Hirose H., Saruta T, et al : Effects of Intestinal fatty acid-binding protein gene Ala54Thr Polymorphism and  $\beta$  3-adrenergic receptor gene Trp64Arg Polymorphism on insulin resistance and fasting plasma glucose in young to older Japanese men. *Metabolism*, 50, 1301-1307, 2001

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1 正常血糖の40～65歳の男性186名における、小腸脂肪酸結合蛋白遺伝子Ala54Thr多型と臨床指標、代謝指標との関係 (平均±標準誤差)

Parameter	FABP2 genotype			P for 3 groups	P for Thr/Thr
	Ala/Ala	Ala/Thr	Thr/Thr		
No. of subjects	60 ( 32.3%)	101 ( 54.3%)	25 ( 13.4%)		
Age ( years )	51.7 ± 7.8	51.7 ± 6.9	52.9 ± 7.8	NS	NS
Body mass index ( kg/m <sup>2</sup> )	23.1 ± 2.4	23.4 ± 2.6	23.0 ± 3.7	NS	NS
Systolic blood pressure ( mm Hg )	118 ± 17	120 ± 17	121 ± 20	NS	NS
Diastolic blood pressure ( mm Hg )	75 ± 11	76 ± 12	78 ± 12	NS	NS
Heart rate ( /min )	74 ± 11	73 ± 13	77 ± 16	NS	NS
Glucose ( mg/dL )	96.5 ± 6.1	96.5 ± 5.9	99.8 ± 5.6	0.037	0.010
Insulin ( μU/mL )	7.4 ± 3.8	8.1 ± 4.5	6.3 ± 2.5	NS	NS
HOMA-IR ( - )	1.8 ± 0.9	1.9 ± 1.1	1.5 ± 0.6	NS	NS
Leptin ( ng/mL )	3.5 ± 1.5	3.8 ± 2.0	4.0 ± 1.9	NS	NS
Total cholesterol ( mg/dL )	205 ± 33	203 ± 29	207 ± 27	NS	NS
Triglycerides ( mg/dL )	147 ± 154	130 ± 73	159 ± 126	NS	NS
HDL cholesterol ( mg/dL )	54 ± 16	53 ± 14	58 ± 15	NS	NS
LDL cholesterol ( mg/dL )	122 ± 32	124 ± 28	117 ± 26	NS	NS
Uric acid ( mg/dL )	6.5 ± 1.2	6.4 ± 1.3	5.9 ± 1.6	NS	NS

NS, not significant (P>0.1).

n= 108 for insulin, HOMA-IR and leptin.