

表2 中高年男性246名における、LDL受容体遺伝子C1773T多型と
高LDLコレステロール血症との関係

	Subjects		P*
	LDL-C \geq 160 mg/dL	LDL-C <160 mg/dL	
Genotype			
CC	19 (59.4 %)	166 (77.6 %)	
CT+TT	13 (40.6 %)	48 (22.4 %)	0.046
Total (n)	32	214	
Allele			
C	48 (75.0 %)	378 (88.3 %)	
T	16 (25.0 %)	50 (11.7 %)	0.009

* Fisher's exact probability tes

血栓症の危険因子の遺伝子診断法の確立

分担研究者 渡邊清明 慶應義塾大学医学部臨床検査部教授

研究要旨

本研究は、血栓症との関連が予想される十数種類の候補遺伝子を挙げ、遺伝子型と血栓症の頻度、重症度、血栓形成部位特異性（脳、冠動脈、深部静脈など）の関係を患者一対照試験で検討するとともに、これら遺伝子の関与を包括的に評価し、対立遺伝子頻度が欧米と異なるわが国でも、同じように危険因子となりうるか、わが国独自のデータを蒐集し、これらの結果に基づき、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た。分担研究者らは過去に患者の蓄積と検体採取、臨床所見、検査値の整理を行い、脳血管障害、糖尿病の代表的合併症である大血管症、ならびに閉塞性動脈硬化症と、いくつかの遺伝子多型の関連を明らかにした。平成 13 年度本研究課題においては、心血管危険因子マーカーとして paraoxonase、ホモシステイン、活性化血液凝固 XII 因子、心房性利尿ペプチド（ANP）の血中濃度測定法の確立とその臨床的意義を検討し、これら因子にみられる遺伝子変異（多型）がその因子の活性に大きく影響することを明らかにした。特に paraoxonase については測定方法に強く依存することが明らかになった。また脳血管障害について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を示した。さらに複数の遺伝子多型の同時解析のために multiplex PCR を用いた遺伝子診断法を開発した。具体的には通常の multiplex PCR 技法を用い、末梢血から直接遺伝子型タイピングを行なえるシステムを検討し、実際に幾つかの遺伝子の組み合わせにおいて本方法が有効であることを示した。今後は遺伝子診断システムの構築を目指して、これまでの研究で得られた情報を基に日本人に特有な多型を対象とした診断法の開発を開発が必要と思われる。

A. 研究目的

近年、生活習慣病にも遺伝的要因が深く関わっていることが知られている。血栓症も同様であり、後天的要因に加え多くの遺伝的素因が関与するものと思われる。しかし遺伝子検査の結果をもって、血栓症の臨床診断を下すことはない。現

時点での血栓症における遺伝子検査の意義は、（１）臨床像や種々の生化学的検査で血栓性素因（易血栓性）を有することが既に明らかとなった患者に対して、その分子生物学的病態を明らかにする、（２）同じ変異を有する家族の保因者診断や発症リスクの予測、である。生活習

慣病の代表である心筋梗塞、脳卒中などは動脈硬化が原因となるが、最近の血管内視鏡や超音波の進歩により、それらの直接の発症には血栓が関与していることが分かってきた。また心血管病のリスクファクターといわれる糖尿病、高脂血症、喫煙などは血管病の進展のみならず、血栓傾向（血小板機能や凝固能の亢進）を招来することが知られている。従って血栓傾向の診断と評価は致命的な心血管病を未然に防ぐために非常に重要である。心血管病の危険因子の一部が遺伝的に決定されていることが明らかとなった現在、これらに対する遺伝子検査の可能性が日常の話題となっている。本研究課題においては、血栓症の遺伝的易罹病性を解明することにより発症前診断と適切な発症予防を講じる為の基礎データを蒐集し、日本人に適切な遺伝子診断法を開発することを目的としている。

平成 13 年度は、以下の点について検討した。(1) 心血管危険因子マーカーとして paraoxonase、ホモシステイン、活性化 XII 因子、ANP の血中濃度測定法の確立とその臨床的意義の検討し、これらに対して遺伝子変異（多型）が活性にどのように影響するか。特に測定法が困難な paraoxonase 活性については測定方法にが如何に影響するか。(2) 分担研究者らは過去に同一患者集団に対して多数の候補遺伝子（下記）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報告した。ここでは、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。(3) 解析した多型の中で、血栓症と関連の見られた血液凝固 XII 因子の 46T/C 多型についてさらに検討をすすめた。血液凝固 XII 因子は血液凝固における接触相に働き、異物である陰性荷電体に接することにより活性化 XII 因子(以下 XIIa)となる。生体内では F-XII の活性化が内皮下組織やリポ蛋白への接触で起こることが知られている。これまでに健常人における血中 XIIa 濃度を測定し、XIIa が F-XII 活性、TG、総コレステロール、PAI-1 と相関することを報告している。また、F-XII 遺伝子の exon1 には 46C/T 多型が存在し、この多型と血中 XIIa 濃度は、T/T<T/C<C/C と有意に関係することも報告した。これらの背景より血中 XIIa 濃度は生体内での脂質代謝と何らかの関連があることが推測される。そこで今回は 2 型糖尿病患者における血中 XIIa 濃度と脂肪の体内分布との関連を調べた。

B. 研究方法

心血管危険因子のマーカーとして paraoxonase、ホモシステイン、活性化 XII 因子の血中濃度を検討した。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。心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の血中濃度についても同様の検討を行った。

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、リポ蛋白質リパーゼ、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ー、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、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。動脈硬化病変の評価は、臨床症状や通常の臨床検査の他に頸動脈エコー、大動脈 CT 所見で評価した。冠状動脈疾患については冠状動脈造影が得られた症例のみエントリーした。また遺伝子多型検査は末梢白血球の genomic DNA を用いた。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。

XIIa については、本院外来通院中の 2 型糖尿病患者 194 例 (男性 112 例、女性 82 例、年齢 59.3 ± 8.8 才、BMI $23.1 \pm 3.0 \text{kg/m}^2$) を対象とし、遺伝子型タイピングと XIIa 濃度を測定した。XIIa 濃度は抗ヒト活性化 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。また、患者の体脂肪分布については腹部 CT スキャンで臍高の脂肪断面積を内臓脂肪以下 (V-fat) および皮下脂肪 (S-fat) に分け比較検討した。FXII 遺伝子 exon1 の 46C/T 多型は Shimadzu Ampdirect 試薬を用いた全血直接 PCR 法による DNA 増幅ののち制限酵素 Hin1 I および Fok I を用いた RFLP 法で解析し、C/C、C/T、T/T 型の 3 タイプに分類した。

遺伝子解析にあたっては文書による同意の得られた患者および検診受診者を対照とした。

C. 研究結果

paraoxonase 活性、ホモシステイン、活性化 XII 因子、ANP の血中濃度を測定した。その結果、これらの遺伝子変異 (多型) が活性に大きく影響すること、特に基質による paraoxonase 活性のちがいても、遺伝子型に依存することが明らかとなった。ANP 遺伝子多型は血中 ANP 濃度に影響しなかった。

虚血性脳血管障害患者を対照とした複数の遺伝子多型の同時解析により、GPIb

α 、NADPH p22 phox、凝固 XII 因子などにみられる多型のうち、幾つかを同時に危険型で有する個体は、そうでない個体に比べ虚血性脳血管障害の発症年齢が低いことが明らかになった。疾患の重症度、病型とは関連が見られなかった。

糖尿病患者における XIIa 血中濃度については、患者全体でみると V-fat ($R=0.281$, $p=0.0029$)、S-fat ($R=0.244$, $p=0.0103$)ともに有意な正相関がみられた。V-fat は、この他に BMI、IRI、UA、TG、PAI-1 と有意な正相関を認めた。FXII 遺伝子多型の出現頻度は、T/T83 例 (42.8%)、T/C92 例 (47.4%)、C/C19 例 (9.8%)であり、FXII 遺伝子型と年齢、性別、喫煙、BMI、一般生化学データとの間には、有意な関連は認められなかったが、FXII 遺伝子型と XIIa 濃度は、T/T<T/C<C/C 型と有意な相関 ($p<0.0001$)が認められた。特に C/C 型を呈した群に絞って解析すると、XIIa 濃度と脂肪量の相関はより強くなり、V-fat で $R=0.78$ 、S-fat で $R=0.59$ となった。

D. 考察

疾患と遺伝子多型の関連を論じる際に遺伝子産物の定量的、定性的評価は非常に重要である。また臨床検査の基準値の立場から考えると、血中濃度が遺伝子多型に依存するかどうかの情報は甚だ重要である。基準範囲が広い血液凝固 XII 因子や XIIa の血中濃度が 46C/T 多型に依存することが明かとなった意義は大きい。

ANP についてもその多型が propeptide に関連する部位であることから ANP 濃度との関連が予想されたが、今回の検索結果では関連が見られなかった。凝固 XII 因子 46C/T 多型は九州大学のグループにより始めて報告されたが、C 型で翻訳効率が高く、また実際に C 型を有する個体では血中 XII 因子抗原量が高いとされた。また我々の過去の検討により、活性化 XII 因子血中濃度 (XIIa) もこの多型に強く依存していることが判明している。また日本人は白人に比べ T 型の頻度が高いことが知られている。日本人の平均凝固 XII 因子活性が白人のそれに比べ低いことの一つの原因と思われる。今回の検討では XIIa が 2 型糖尿病患者において体脂肪面積と関連し、なかでも内臓脂肪量をより反映する可能性が示唆された。XIIa 濃度がいかなる機序で内臓脂肪と関連するかは今後の検討を待たねばならない。

虚血性脳血管障害患者を対照とした複数の遺伝子多型の同時解析では、複数の危険型遺伝子多型を有することが若年での虚血性脳血管障害の発症と関連することが示唆された。これらの検討の際、我々は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。後者についてその方法が簡便であることから、本研究のように多数の個体の遺伝子解析に適していると考えられた。

日本人において single nucleotide

polymorphisms (SNPs)のデータベースが蓄積され、今後これら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検査に利用されるには、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一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が必要である。これまでの研究で得られた情報を基に、日本人に特有な多型を対象とした診断方法の開発が急務と思われる。

E. 結論

心血管病の危険因子マーカーとして paraoxonase、ホモシステイン、活性化血液凝固 XII 因子心房性利尿ペプチド (ANP) の血中濃度測定法の確立とその臨床的意義を検討し、これらやこれらと関連する因子にみられる遺伝子変異 (多型) がその因子の活性に大きく影響することを明らかにした。また脳血管障害について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を示した。さらに複数の遺伝子多型の同時解析のために multiplex PCR を用いた遺伝子診断法を

開発した。

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

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

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

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

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

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

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

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Roseberg N., Murata M., Ikeda Y., Seligsohn U., et al.	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
Ito D, Tanahashi N, KWatanabe, Y Fukuuchi, et al.	Notch 3 gene polymorphism and ischaemic cerebrovascular disease	J Neurol Neurosurg Psychiatry	72	382-384	2002
Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y, et al.	A novel polymorphism, ⁷⁰ Leu/Phe, Disrupts a consensus leu residue within the leucine-rich repeat sequence of platelet glycoprotein Ib α	Thromb. Haemostasis	87	In press	2002
Ishii T., Hirose H., Saruta T, et al	Effects of Intestinal fatty acid-binding protein gene Ala54Thr Polymorphism and β 3-adrenergic receptor gene Trp64Arg Polymorphism on insulin resistance and fasting plasma glucose in young to older Japanese men	Metabolism	50	1301-1307	2001
太田敦美、 棚橋紀夫、 福内靖男、 村田満、渡 辺清明、他	健康診断受信者および虚血性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

研究成果の刊行物・別冊

20010421

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。