

20020416

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14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15(2003)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 14 年度
総括・分担研究報告書

平成 15 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・リウマチ内科) 教授

(分担研究者)

棚橋紀夫 慶應義塾大学医学部内科 (神経内科) 講師

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中央臨床検査部 (臨床検査医学) 教授

村田満 慶應義塾大学医学部内科 (血液・感染・リウマチ内科) 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 棚橋紀夫
 - 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

別添4

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

本研究は、(A) 既知の一塩基多型 single nucleotide polymorphism (SNPs)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－対照試験で検討し、一塩基多型の血栓症リスクとしての意義と位置づけを知る (B) 血栓形成能と関連する新たな SNPs の発見とその機能解析を行う。これは (a) ゲノムデータベースから得られる SNP と、(b) 血栓の基礎的研究から得られた情報に基づく因子 (candidate gene) の SNP、の双方を対象とする。(C) 血栓症の治療がどの遺伝子型の患者に有効かについての臨床研究を計画する。(D) 血栓形成能の個体差を評価するため、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。これにより膜受容体やシグナル分子の variant を同定する。以上の結果に基づき、血栓症リスク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予防法と治療法を確立することを目標としている。

平成14年度は特に、(1) 血栓症患者のデータベースの完備、(2) 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、血管内皮細胞に発現する因子の多型と血小板機能、凝固因子活性との関連の実験的研究、(3) 既知の遺伝子多型（特に SNP）についての体系的遺伝子タイピングによる遺伝子－疾患関連研究、(4) 血小板 mRNA の網羅的解析、を行った。

その結果、血栓症と関連する因子に新たな遺伝子多型を同定しこれらのうち幾つかは当該因子の血中濃度や機能に影響することを示した。特に血小板機能の個体差に関与する可能性のある遺伝子変異や多型について、in vitro 実験系で検索するとともに、蛋白立体構造モデリングを行い機能調節に重要な残基を同定した。7 回膜貫通型受容体 (GPCR) 遺伝子の SNP 解析を体系的に行い、新規 SNP を同定しその機能との関連を検討した。また血管の老化と関係する h-TERT に新しい多型を発見した。冠動脈形成術施行後の再狭窄について多項ロジスティック解析で再狭窄と関連する遺伝子多型を明らかにした。また虚血性脳血管障害に関係する遺伝子多型を検討した。さらに動脈血栓の形成に重要な働きをする血小板に発現する蛋白を網羅的に解析する為 splice variant を含めた mRNA のカタログ作成を開始した。

(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

(分担研究者)

棚橋紀夫 慶應義塾大学医学部内科

(神経内科) 講師

村田 満 慶應義塾大学医学部内科

(血液・感染・リウマチ内科) 講師

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血栓性疾患へのシステム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。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となる。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ただけで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。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。

具体的には、以下を目標としている。(A) 既知の一塩基多型 single nucleotide polymorphism (SNPs)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し、一塩基多型の血栓症リスクとしての意義と位置づけを知る。(B) 血栓形成能と関連する新たな SNPs の発見とその機能解析を行う。これは (a) ゲノムデータベースから得られる SNP と、(b) 血栓の基礎的研究から得られた情報に基づく因子 (candidate gene) の SNP、の双方を対象とする。(C) 特定の治療がどの遺伝子型の患者に有効かについての前向き臨床研究を計画する。(D) 血栓形成能の個体差を評価するため、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。これにより膜受容体やシグナル分子の variant を同定する。以上より、血栓症リスク予測のための遺伝子診断システムを構築し、個体にあわせた予防法と治療法を確立する。プロジェクト前半で (A) を、プロジェクト後半で (B) (C) (D) を達成する。

平成 14 年度は上記のうち、(A) (B) (D) を推進した。特に以下の 4 点を具体的目標とした。(1) 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した。(2) 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、それら因子の多型（正常人）や病的変異（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した。(3) 既知の遺伝子

多型、特に SNPs について遺伝子タイピングを体系的に施行し遺伝子-疾患関連研究を行い、血栓に関連の深い因子に新たな遺伝子多型を見出した。(4) 血小板の RNA を解析し、splice variant を含めた新たな transcript を同定することによって血栓形成の新たなメカニズムの解明を行った。

B. 研究方法

(1) 既知 SNPs が蛋白発現/機能や疾患感受性に与える影響

(A) PAF-AH における既知の多型 (Val279Phe) の機能への影響と脳血管障害との関連: 血小板機能の測定は、健康者ボランティアより得たクエン酸加血からの多血小板血漿 (PRP) を用い、PAF 添加後の凝集能について検討した。遺伝子多型の検討は、CVD 患者 234 例およびコントロール群として検診受診者 298 例の末梢血を試料とした。既報のプライマーを使用し、Ampdirect (島津) を用いた全血 PCR 法にて DNA を増幅し、制限酵素 Msp I による RFLP にてタイピングを行った。

(B) 経皮的冠動脈形成術施行後の再狭窄に關係する遺伝子多型: 冠動脈疾患を有していて、主要冠動脈枝の有意狭窄病変に対して経皮的冠動脈形成術を施行し、冠動脈の拡張に成功した患者 50 例を対象とした。対象の全例に確認冠動脈造影検査を行って、再狭窄の有無を確認した。各遺伝子の多型を有する領域を polymerase chain reaction 法で増幅した。次に、restriction fragment length polymorphism 法またはゲル電気泳動法でタイピングを行った。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。

(C) 脳血管障害における血栓形成の遺伝子

的素因の解析: 慶應大学病院神経内科にて加療中の発症時 70 歳以下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) 235 例 (年齢 58.3 ± 7.8 歳、mean \pm S.D.) と年齢、性別を一致させた健康者 306 例 (年齢 58.6 ± 4.3 歳) より末梢静脈血採血を行った。但し、心原性脳塞栓症は対象から除外した。Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP) 法 (V249I は制限酵素 Psp1406I, T280M は制限酵素 BsmBI) を用いてそれぞれの遺伝子多型を解析した。

(2) 新規 SNPs の発見と遺伝子発現研究

我々は既に、多くの健康人ならびに冠動脈疾患を有する患者より、informed consent を取得後、ゲノム DNA を得ており、本年度は、以下について行った。

(A) G タンパク質共役型受容体遺伝子上における SNPs の同定: 血管内皮細胞上に発現し、血栓凝固及び動脈硬化病変形成に関与すると予想される G タンパク質共役型受容体のうち、特に Edg-1、 β 2AR (β 2-adrenergic receptor)、TP (thromboxane A2 receptor)、および IP (prostaglandin I2 receptor) について、その遺伝子 exon 上の SNPs を各々 50 人の患者を対象に同定した。解析方法としては、患者ヒトゲノム DNA を鋳型とし、各遺伝子における exon 領域を適切なプライマーを用いて PCR (polymerase chain reaction) にて増幅し、ダイレクトシーケンスにより配列の確認を行った。この際、50 検体の解析結果を GenBank™ に登録されている配列 (各遺伝子名: GenBank™ accession number; EDG1: AL109741, ADRB2: NM_000024, TBXA2R NM_001060, PTGIR: NM_000960) と比較し、1 検体以上での異なる塩基を変異部位とした。a) 細胞培養および遺伝子導入: 哺

乳動物細胞培養において、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC (Clonetics)を用いた。細胞への遺伝子導入には、後者の細胞株に対しLipofectAMINE 2000 (Invitrogen)あるいは PolyFect (Qiagen)を用いた。b) 各受容体遺伝子の全長 cDNA クローニングおよびその SNPs 部位における塩基置換：ヒト血管内皮細胞である HUVEC を用いて、その total RNA から RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)にて cDNA を得た後、各 ORF を適切なプライマーを用いて増幅し、ヒト Edg-1 およびβ2AR の全長 cDNA をクローニングした。クローニング後、その全塩基配列を DNA シークエンスにより確認した。また、同定された SNPs によるアミノ酸変異が培養細胞に対し与える影響を比較検討するため、遺伝子上アミノ酸変異が予想される SNPs 部位において PCR に基づいた方法により1塩基置換を行った。現在までに、Edg-1 およびβ2AR の全長 cDNA をクローニングし、前者については、その SNPs に基づいた Edg-1、Edg-1 S15L 双方の cDNA を得ている。c) 哺乳動物発現ベクターの作製：上記 Edg-1、Edg-1 S15L およびβ2AR の全長 cDNA を、組み換え DNA 技術を用いて哺乳動物発現ベクターにサブクローニングした。ベクター作製後、293 および HeLa 細胞に遺伝子導入し、細胞溶解バッファーによる細胞抽出液を調整、sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)の後、ウエスタンブロッティングにより抗 HA 抗体 (12CA5, Roche Diagnostics)を用いて発現を確認した。d) 安定発現細胞株の作製：一過性発現系に加え、SNPs による Edg-1 遺伝子変異 S15L が実際に細胞に及ぼす影響をみるため、安定発現細胞株をそのコントロールとともに作製している。細胞は、HeLa および293細胞を用い、また、発現細胞株は限界希釈法にて single clone

から作製し、高発現株を HA tag に対するウエスタンブロッティングにて確認する。また、各々の発現株はアクチン等の内部標準を基準に、同程度発現しているものを選択した。

(B) h-TERT の多型解析：学内倫理委員会で承認された承諾書によりインフォームドコンセントを得た後、末梢血を採取し、h-TERT の遺伝子多型を解析した。発見された多型に対し、luciferase assay にてその意義を検討した。(C) 脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)遺伝子における新たな SNP の発見とその機能：BNP 遺伝子のほぼ全域についてダイレクトシーケンスで塩基配列を決定した。次に246例の健康診断受診者を対象に、発見された SNP について single nucleotide primer extension 法により遺伝子型を決定した。また血中 BNP 濃度の測定は、市販の測定キットを用いた IRMA 法で行った。

(3) 血栓形成における gain-of-function mutation の同定と蛋白立体構造予測のモデリング

血小板 vWF 受容体である GPIb α に同定された gain-of-function mutation が、いかなる機序で血栓形成を促進するかを解明するため、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。蛋白構造立体モデリングは Molecular Operation Environment (MOE) System を用

い、最近発表された GPIb α N 末端ドメイン/vWFA1 ドメイン複合体の結晶構造を鑄型として、モデリングを行った。

(4) 血小板 RNA の網羅的解析

血小板 RNA を純度よく分離するためには、全血から得られた乏血小板血漿から効率良く白血球を除去する必要がある。従ってまず、白血球除去フィルターによる白血球除去率を定量的に測定した。ここでは白血球に特異的に発現するとされる CD45 等を対象に、flow cytometry にて乏血小板血漿中の白血球をカウントするとともに、定量的 PCR にて CD20 の RNA 量を測定し、乏血小板血漿中の白血球混入量を定量した。これによって作製した純度の高い血小板 RNA を MPSS 法で解析し、血小板 RNA 発現の profile を構築した。

(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) 既知 SNPs が蛋白発現/機能や疾患感受性に与える影響

(A) PAF-AH における既知の多型 (Val279Phe) の機能への影響と脳血管

障害との関連：PAF-AH 酵素活性をほとんど示さない Phe/Phe 型が 7 例(4%)認められた。野生型である Val/Val の酵素活性に対し、Val/Phe 型はほぼ 1/2 の活性を示した。野生型 Val/Val 型に比較し、Val/Phe 型では低濃度 PAF による血小板の活性化が亢進していた。PAF-AH 遺伝子多型のコントロール群および CVD 患者群における出現頻度はそれぞれ、Phe/Phe 型 10 例(3.4%)、9 例(3.8%)、Val/Phe 型 83 例(27.9%)、84 例(35.9%)、Val/Val 型 205 例(68.8%)、141 例(60.3%)であった。Phe 型の有無により 2 群に分けて比較すると (Phe/Phe+Val/Phe vs Val/Val)、CVD 患者群において Phe 型を持つ群が高頻度に認められた($p < 0.05$, OR=1.5)。患者群において 60 歳を境に 2 群に分けて同様の検討を行うと、60 歳以下の群で強い関係が認められた($P < 0.01$, OR=1.9, 表 1)。また、喫煙者群と非喫煙者群に分けた場合には、非喫煙者群においてより強い関係が認められた($p < 0.01$, OR=2.5)。さらに解析対象者を 60 歳以下、非喫煙者の女性とすると、OR は 3.8 に上昇し、環境因子の影響の少ない集団ほど遺伝的因子の効果がより強く認められた(村田 満)。

(B) 経皮的冠動脈形成術施行後の再狭窄に
関係する遺伝子多型：既に行われた当院の冠動脈疾患を有する患者と健常対象例とを比較した検討では、ミトコンドリア DNA A5178C 変異では 5178C が、アンギオテンシン変換酵素の多型では D allele が冠動脈疾患を有する群で有意に高率に認められた。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素、Paraoxonase, CD14 の多型は健常例と冠動脈疾患群に有意な出現頻度の差を認めなかった。再狭窄の有無とこれらの各遺伝多型の出現頻度との関連を単純ロジスティック回帰分析で検討すると、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の T allele を有する症例で再狭窄が有意に少な

かった($p=0.04$, odds ratio=2.5)。ミトコンドリア DNA A5178C 変異、Paraoxonase, CD14, アンジオテンシン変換酵素の遺伝多型と再狭窄の発症との間には、有意な関連はなかった。各遺伝多型間の交互作用も含めて検出するため、上記の五つの遺伝多型を因子とする多項ロジスティック回帰分析を行った。全ての遺伝多型の内、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の多型のみが再狭窄発症の独立危険因子であった。CT型(AV)では10.5 (95%信頼域: 1.9~57, $p=0.007$)、TT型(VV)では10.2 (95%信頼域: 1.1~90, $p=0.004$)、T allele では4.2 (95%信頼域: 1.5~12, $p=0.005$)のoddsratioで、再狭窄が少なかった。これらは、既知の冠動脈硬化の危険因子からは独立していた。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素のT allele は、高ホモシステイン血症と関連して動脈硬化を促進すると報告されているが、再狭窄の発症はC allele で有意に高頻度であり、動脈硬化の促進とは異なった結果を示した(小川 聡)。

(C)脳血管障害における血栓形成の遺伝子素因の解析：患者群ではControl群に比較して古典的な危険因子である高血圧・糖尿病・喫煙が統計学的に優位に高かった($P<0.001$)。I allele とM allele の頻度は患者群とControl群でそれぞれ4.3%対4.7%、6.2%対5.2%であった。Odds比はそれぞれ0.89 (95%信頼区間: 0.50-1.60, $p=0.70$)と1.19 (同: 0.71-2.00, $p=0.51$)であり、alleleの頻度と虚血性脳卒中の危険率とは統計学的に無関係であることが示された。一方、多型を有する人々(II+VI or MM+TM)の頻度は患者群とControl群でそれぞれ7.7%対8.2%、10.6%対1.0%であった。Odds比はそれぞれ0.93 (95%信頼区間: 0.49-1.76, $p=0.83$)と1.14(同: 0.65-2.00, $p=0.66$)で多型を有している人々が虚血性脳卒中にかかりやすいという仮説は棄却された。病型別比較でもControl

群と優位差を認める病型はなかった(棚橋紀夫)。

(2)新規SNPsの発見と遺伝子発現研究

(A) G タンパク質共役型受容体遺伝子上におけるSNPsの同定：同定されたORF(open reading frame)上の塩基変異部位はそのほとんどがsilentであり、一方、塩基変異によるアミノ酸置換は、各受容体について、Edg-1 S15L、 β 2AR R16G、TP R60L、IP R212C、IP R227Wとして予想された。Edg-1の生理的作動物質であるS1P(sphingosine-1-phosphate)に対する各受容体の反応性を、その下流シグナルであるERK(extracellular signal-regulated kinase)の活性化を指標に比較検討した。ここでは、一過性発現系を用いて、HA-Edg-1およびHA-Edg-1 S15LをそのレポーターであるERKと共にCOS-7細胞に遺伝子導入し、一過性発現の後、S1Pにより刺激(10 μ M、10min)を行った。刺激後、ERKの活性化を、その活性型を認識する抗リン酸化ERK抗体を用いてウエスタンブロッティングにて確認した。現在までのところ、上記条件下においては、各受容体におけるS1Pに対するERK活性化に有意差は認められていない(池田康夫)。

(B) h-TERTの多型解析：プロモータ領域に多型が見出された。転写因子結合予測プログラムにより、これらの多型が転写因子の結合に影響する可能性が示唆されたため、luciferase assayにて実験的に検討した。使用する細胞によって異なった結果ではあったが、見出された多型がh-TERTの発現に影響する可能性を示唆する成績が得られた(村田 満)。

(C) 脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)遺伝子における新たなSNPの発見とその機能：3つのSNP(102T/C, 1760-1766のT7へのT挿入, 1767-1768のAAへの

A 挿入)が発見された。このうち A 挿入は我々により始めて発見された。102T/C と BNP 血中濃度に関連が見られ、C を有するタイプで BNP が高値であった(渡邊清明)。

(3) 血栓形成における gain-of-function mutation の同定と蛋白立体構造予測のモデリング

血小板型 von Willebrand 病 (plt-vWD) 患者に見出された新たな変異、血小板膜糖蛋白(GP) Iba α 、G233S について組み換え蛋白 (Wild type; WT, Mutant; G233S) を作製、¹²⁵I-vWF との結合を検討した結果、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(表 1)。組み換え GPIb α N 末端ドメインと vWFA1 ドメインの複合体を鑄型としたコンピュータモデリングでは G233S 変異ではセリン残基が近傍のアミノ酸残基と反応することによって β hairpin 構造を強固にすることによって受容体機能を高めている可能性が示唆された(村田 満)。

(4) 血小板 RNA の網羅的解析

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 を同定するため、血小板中に微量に含まれている mRNA を分離し、transcriptome 解析を行うことによってその定量的、定性的評価を行った。血小板 RNA を純度よく分離するためには、全血から得られた乏血小板血漿から効率良く白血球を除去する必要がある。このため、今年度は白血球除去フィルターを用いた場合の白血球除去率を、白血球特異蛋白を対象として (1) flow cytometry

(2) 定量的 PCR にて測定した。白血球除去フィルターを 2 回通過させることにより PCR において CD20 mRNA が測定感度以下のレベルに低下した。これによって作製した純度の高い血小板 RNA を MPSS 法で解析し、血小板 RNA 発現の profile を構築した(池田康夫, 村田 満)。

D. 考察

本年度は当初の計画が順調に実行された。遺伝子多型と機能の関連(実験研究)と遺伝子多型と疾患の関連(分子疫学的研究)については予定以外の新知見も得られた。血栓性疾患の遺伝子診断法に関する研究については、ひとつ一つの多型の重要性の評価と複数の遺伝子多型の組み合わせの評価が血栓症リスクの遺伝子診断に重要であることは明白であるが、具体的な診断法の開発についてはプロジェクト後半の課題と考えている。

PAF-AH の酵素活性は、PAF-AH 遺伝子多型と対応していた。PAF-AH 遺伝子多型(Val/Phe)は、PAF-AH の血小板活性化抑制作用を減弱させた。PAF-AH 遺伝子多型と虚血性脳血管障害発症との間に有意な関係が示唆された。両者の関係が血小板活性化抑制作用によるものか、酸化リン脂質の分解による抗動脈硬化作用によるものかについては、更なる検討が必要である。

脳血管障害患者を対象に今回調べた CX3CR1 の二つの多型は両者とも coding sequence にある。つまり CX3CR1 の表現型に直接的に影響しうる多型である。他のグループのデータでは V249-T280 の末梢血単球と I249-M280 の末梢血単球で、CX3CR1 のリガンドである fractalkine の結合能を調べると、野生型である前者に比較して後者では統計学的に有意に結合能が落ちる。また、フランスのグループは I249 の allele の存在が虚血性心疾患のリ

スクを有意に減らすことを示した。今回のデータはこれらを否定する形となったが、遺伝素因の違いが血栓形成に与える影響が虚血性脳血管障害の場合と他の部位における虚血性血管障害では異なる可能性が示唆された。

冠動脈形成術後の再狭窄は、動脈硬化の進展を効果的に防止できる高コレステロール血症治療薬や冠動脈の血栓性閉塞を予防できる抗血小板薬で抑制することはできない。組織学的には拡張させた冠動脈自体の径の縮小(elastic recoil)と平滑筋細胞や線維芽細胞などの増殖がみられる。このことは、再狭窄が動脈硬化のプロセスとは異なり、拡張に伴う血管組織の過剰な創傷治癒によって生じる可能性を示唆する。本研究で、ホモシステインの血中濃度を上げる T allele の存在が再狭窄の頻度を低下させたことは、ホモシステインの投与によって再狭窄を予防できることを直接的には示唆しない。今後、対象症例の遺伝多型のみではなく、血中ビタミン B12 濃度や血中葉酸濃度など環境因子の変化を含めて解析する必要がある。

7 回膜貫通型受容体 (GPCR) で今回同定された SNP のうち、 β 2AR R16G については、 β 2AR を発現している細胞と比較して、作動物質である isoproterenol に反応した受容体発現の down-regulation (Liggett *et al.*) が知られており、 β 2 作動薬による脱感作との関連 (Okumura *et al.*) についても報告されている。また、本研究での冠動脈疾患患者におけるアレル頻度 Arg16 : Gly16 = 53% : 47% は、既に報告 (Okumura *et al.*) のある日本人健常人 (Arg16 : Gly16 = 46% : 54%) と比較して有意差はないと考えられた。TP R60L については、既知の変異であり、TXA2 (thromboxane A2) に対する血小板不応として出血傾向をきたすことで知られ

ている (Narumiya *et al.*)。IP においては、IP R212H が既知の SNP として受容体の活性化障害をきたすことが *in vitro* の研究において報告 (Hwa *et al.*) されているが、本研究において同部位にはアミノ酸変異置換として IP R212C が認められた。最後に TP R60L、IP R212C、IP R227W については、各々一例がヘテロとしてみられた。上記 SNPs が冠動脈疾患を有する患者群において認められたことは、その血管内皮細胞における生理機能および薬理効果に対する差が各個人間で生じ得る可能性を示唆する。今後特に受容体遺伝子上、アミノ酸置換が予想される ORF の SNPs について、各々が受容体機能に与える影響に関し、培養細胞を用いて発現実験で解析を行う予定である。

血小板 vWF 受容体 GPIb α の蛋白立体構造モデリングでは gain-of-function 変異である G233S ではセリン残基が近傍のアミノ酸残基と反応することによって β hairpin 構造が安定する可能性が示唆された。この知見は本受容体の機能調整を考える上で重要な情報である。すなわち G233S 変異は受容体が非活性型→活性型に変換する立体構造変化を示している可能性があり興味深い。h-TERT のプロモータ領域に発見された多型は転写活性に影響することが示唆された。使用する細胞によって成績が異なる点など、今後の解析が待たれるが、老化に関与する因子の一つとして重要と思われる。

BNP に関しては幾つかの SNP が血中 BNP 濃度を規定している可能性が示唆された。今後、病態との関連を検索してゆく必要がある。

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、混入する白血球の問題がほぼ解決され、血小板 transcriptome 解析を開始することができた。血小板 mRNA の定量的、定性的評価は今後の血小板機能解析に欠くことのできない重要な情報を与えると考えられる。

E. 結論

既知の一塩基多型 single nucleotide polymorphism (SNPs)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し、一塩基多型の血栓症リスクとしての位置づけを検討すると共に血栓形成能と関連する新たな SNPs の発見とその機能解析を行った。そして血栓症と関連する因子に新たな遺伝子多型を同定し、これらのうち幾つかは当該因子の血中濃度や機能に影響することを示した。

血小板機能の個体差に関与する可能性のある遺伝子変異や多型について、in vitro 実験系で検索するとともに、蛋白立体構造モデリングを行い、機能調節に重要な残基を同定した。7 回膜貫通型受容体 (GPCR) 遺伝子の SNP 解析を体系的に行い、新規 SNP を同定した。また血管の老化と関係する h-TERT に新しい多型を発見した。冠動脈形成術施行後の再狭窄について多項ロジスティック解析で再狭窄と関連する遺伝子多型を明らかにした。さらに血栓形成と深い関係がある血小板の RNA を網羅的に解析するため、純度の高い血小板 RNA を作製した。

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

Zama, T., R. Aoki, T. Kamimoto, K. Inoue, Y. Ikeda, and M. Hagiwara. 2002. Scaffold role of a mitogen-activated protein kinase phosphatase, SKRP1, for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem* 277: 23919-26.

Zama, T., R. Aoki, T. Kamimoto, K. Inoue, Y. Ikeda, and M. Hagiwara. 2002. A novel dual specificity phosphatase SKRP1 interacts with the MAPK kinase MKK7 and inactivates the JNK MAPK pathway. Implication for the precise regulation of the particular MAPK pathway. *J Biol Chem* 277: 23909-18.

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 Iba. *Thrombosis and Haemostasis* 87: 867-872, 2002

Kawano K, Yoshino H, Aoki N, Udagawa H, Watanuki A, Hioki Y, Hasumura Y, Yasumura T, Homori M, Murata M, Ikeda Y, Ishikawa K. Shear-induced platelet aggregation increase in patients with proximal and severe coronary artery disease. *Clin Cardiol* 25: 154-160, 2002

Watanabe R, Ishibashi T, Saitoh Y, Shichishima T, Maruyama Y, Enomoto Y, Handa M, Oda A, Ambo H, Murata M, and Ikeda Y. Bernard-

Soulier syndrome with a homozygous 13-bp deletion in the signal peptide-coding region of platelet glycoprotein Ib β gene. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* (in press, 2003)

2. 学会発表

松永聖子、丸山太郎、山本幸宏、本橋佳子、広瀬 寛、島田 朗、村田 満、猿田享男：2 型糖尿病の腎症の進展増悪における NADH/NADPH オキシダーゼ p22phox 遺伝子 C242T 多型の関与 第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 14 年 5 月、東京

中野里美、丸山太郎、本橋佳子、荒木理沙、松永聖子、立石さとみ、東 佳美、五内川里子、村田 満、丸山千寿子、都島基夫、猿田享男：2 型糖尿病患者の脈波伝播速度に対するメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子 677C/T 多型の関与 第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 14 年 5 月、東京

荒木理沙、丸山太郎、本橋佳子、山田 聡、村田 満、丸山千寿子：2 型糖尿病の腎症の発症、進展に MTHFR677C/T 遺伝子多型は関与しない 第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 14 年 5 月、東京

村田 満：易血栓性と急性冠動脈症候群 第 7 回 Vascular Medicine 学会シンポジウム 平成 14 年 7 月、神戸

Murata M: Ethnic differences in genotype distribution and risk of cardiovascular disease : the case of Japanese". The 48th Scientific Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Boston, USA, 2002

松原由美子、村田 満、杉田憲一、池田康夫：血小板 GPIb α の機能調節における 233Gly 残基の役割 第 25 回日本血栓止血学会総会 平成 14 年 11 月、神戸

大野 岳、松原由美子、伊東大介、棚橋紀夫、福内靖男、斉藤郁夫、渡邊清明、吉田 正、村田 満、池田康夫：血小板 GPIb α 70 Leu/Phe 遺伝子多型：蛋白構造への影響と血栓性疾患との関連 第 25 回日本血栓止血学会総会 平成 14 年 11 月、神戸

村田 満：血栓症のリスクファクターを考える：遺伝子多型 第 25 回日本血栓止血学会スポンサーシンポジウム 平成 14 年 11 月、神戸

太田敦美、菊池春人、津田隆洋、中川幸子、潮謙一郎、竹下栄子、河辺博史、斉藤郁夫、村田 満、渡邊清明：脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 遺伝子多型と血中 BNP 濃度との関係 第 9 回日本遺伝子診療学会大会 平成 14 年 10 月、京都

園田 啓、石岡英恵、浅野浩一郎、福永興彦、山口佳寿博、竹下栄子、伊東大介、棚橋紀夫、福内靖男、斉藤郁夫、吉田 正、村田 満、池田康夫、渡邊清明：血小板活性化因子受容体遺伝子多型 (A224D) と血小板凝集能および脳血管障害との関連 第 9 回日本遺伝子診療学会大会 平成 14 年 10 月、京都

石井啓子、小口修司、谷田部陽子、竹下栄子、森木隆典、村田 満、池田康夫、渡邊清明：先天性凝固第 XII 因子欠損症 2 症例の遺伝子解析 第 49 回臨床検査医学会総会 平成 14 年 11 月、大阪

小口修司、狸塚 隆、竹下栄子、東宏一郎、勝川史憲、山崎 元、菊池春人、村田 満、渡邊清明：日本人におけるレジスチン遺伝子多型の解析 —肥満者における検討— 第 49 回臨床検査医学会総会 平成 14 年 11 月、大阪

SNP:
6-2311|Edg-1

園田 啓、野路しのぶ、石岡英恵、竹下栄子、伊東大介、棚橋紀夫、福内靖男、斎藤郁夫、吉田 正、村田 満、池田康夫、渡邊清明：血漿型 PAF アセチルヒドラーゼ遺伝子多型 (Val279Phe) と血小板凝集能および脳血管障害との関連 第 49 回臨床検査医学会総会 平成 14 年 11 月、大阪

Matsubara Y, Murata M, Sugita K, Ikeda Y. Identification of a novel point mutation in platelet glycoprotein Ib α , Gly to Ser at residue 233, in a Japanese family with platelet-type von Willebrand disease. 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Philadelphia, USA. Dec 2002.

村田 満：血小板受容体の遺伝的多様性と血栓症 第 5 回 Cardiovascular Research Forum 平成 14 年 12 月、東京

服部英典、伊東大介、棚橋紀夫、村田満、斎藤郁夫、渡邊清明、福内靖男：虚血性脳卒中患者における CX3CR1 遺伝子多型についての検討 第 28 回日本脳卒中学会総会 平成 15 年 3 月、東京

3. データベース登録

Zama, T et al.; ACCESSION: AL109741,
SNP:
6-2311|ADRB2, 6-2311|TBXA2R,
6-2311|PTGIR-1

Murata, M et al.; ACCESSION: AL109741,

分担研究報告書

血栓形成メカニズムの分子学的研究

池田 康夫
研究協力者 座間 猛

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、多くの薬剤の標的となっているGタンパク質共役型受容体(GPCR)遺伝子内のSNP解析を血管性病変との相関の観点から行うこととした。具体的には冠動脈疾患を有する患者群において、主に血管内皮細胞上に発現されているGタンパク質共役型受容体の遺伝子でのSNP解析を行った。血管内皮細胞上に発現し、血栓凝固及び動脈硬化病変形成に関与すると予想されるGタンパク質共役型受容体のうち、特にEdg-1(sphingosine-1-phosphate receptor)、 β 2AR(β 2-adrenergic receptor)、TP(thromboxane A2 receptor)、およびIP(prostaglandin I2 receptor)について、その遺伝子exon上のSNPsを各々50人の患者を対象に同定した。その結果、多数の新規SNPが同定された。ORF(open reading frame)上の塩基変異部位はそのほとんどがsilentであり、一方、塩基変異によるアミノ酸置換は、各受容体について、 β 2AR R16G、TP R60L、IP R212C、IP R227Wが見い出された。またGタンパク質共役型受容体のひとつであるEdg-1の多型(S15L)について、機能との関連を実験的に検索した。生理的作動物質であるS1P(sphingosine-1-phosphate)に対する各受容体の反応性を、その下流シグナルであるERK(extracellular signal-regulated kinase)の活性化を指標に比較検討した。これらは血栓症発症へのGPCRの関与を明らかにする上で欠くことのできない貴重な知見である。

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。

近年、ヒトゲノム計画によるゲノム全体の塩基配列決定後、そこに存在するすべての遺伝子構造が明らかにされつつあるが、これらのゲノム研究の中で、SNP (single nucleotide polymorphism; 1塩基多型) は特定の集団において通常1%以上の頻度で認められ、薬剤感受性あるいは多くの疾患との相関が予想されるため最近注目されている。既知の SNPs においては Invader 法などの簡便な方法で患者個人の SNP 診断を実行することにより、ある SNPs をもつ患者への有害薬剤の回避や、投与量の加減などで生じる薬剤副作用を最小限に抑えることができると予想される。したがって、患者個人に対し

てその SNP genotyping により、効果的かつ効率的な薬剤治療を行うことが可能となる。この individualized medicine の実現に最も近い距離にある領域が pharmacogenomics であり、これは薬剤代謝や動態に関与する酵素や受容体の遺伝子変異の影響を研究し、その成果を合理的な薬剤開発と選択的適用に利用する。そこで我々は、現在多くの薬剤の標的となっている G タンパク質共役型受容体の遺伝子での SNP 解析を血管性病変との相関の観点から行うこととした。長期的展望としては現時点では複合疾患と見なされている動脈硬化疾患についても、血管内皮細胞機能と上記受容体 SNPs との相関により原因因子ならびに危険因子などが解明されると思われる。また、機能未知の受容体の場合においては、SNPs と臨床情報（発現形式）とを比較解析する association study により disease susceptibility が同定できることが期待される。以上の理由から、今回、我々は冠動脈疾患を有する患者群において、主に血管内皮細胞上に発現されている G タンパク質共役型受容体の遺伝子での SNP 解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

我々は既に、多くの健常人ならびに冠動脈疾患を有する患者より、informed consent の上、ゲノム DNA を得ており、本年度は、以下について行った。

1) G タンパク質共役型受容体遺伝子上における SNPs の同定

血管内皮細胞上に発現し、血栓凝固及び動脈硬化病変形成に関与すると予想される G タンパク質共役型受容体のうち、特に β 2AR (β 2-adrenergic receptor)、TP (thromboxane A2 receptor)、および IP (prostaglandin I2 receptor) について、その

遺伝子 exon 上の SNPs を各々50 人の患者を対象に同定した。解析方法としては、患者ヒトゲノム DNA を鋳型とし、各遺伝子における exon 領域を適切なプライマーを用いて PCR (polymerase chain reaction)にて増幅し、ダイレクトシーケンスにより配列の確認を行った。この際、50 検体の解析結果を GenBank™ に登録されている配列 (各遺伝子名: GenBank™ accession number; ADRB2: NM_000024, TBXA2R NM_001060, PTGIR: NM_000960) と比較し、1 検体以上での異なる塩基を変異部位とした。

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。

2) Edg-1 遺伝子多型の *in vitro* での機能検討

本年度の本研究班の研究で、渡邊清明らは Edg-1 遺伝子にアミノ酸変化を伴う新たな多型を同定した。そこで、この多型が機能に及ぼす影響を実験的に検討した。

a) 細胞培養および遺伝子導入: 哺乳動物細胞培養において、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC (Clonetics)は、2%ウシ胎仔血清と L-グルタミン、抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン) を添加した EBM-2 で培養した。ヒト胎児腎細胞 293、ヒト子宮頸部癌細胞 HeLa ならびにアフリカミドリザル細胞 COS-7は、10%ウシ胎仔血清と L-グルタミン、抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で培養した。また、細胞への遺伝子導入には、後者の細胞株に対し LipofectAMINE 2000 (Invitrogen)あるいは PolyFect (Qiagen)を用いた。

b) 各受容体遺伝子の全長 cDNA クローニングおよびその SNPs 部位における塩基置換: ヒト血管内皮細胞である HUVEC

を用いて、その total RNA から RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)にて cDNA を得た後、各 ORF を適切なプライマーを用いて増幅し、ヒト Edg-1 および β 2AR の全長 cDNA をクローニングした。クローニング後、その全塩基配列を DNA シーケンスにより確認した。また、同定された SNPs によるアミノ酸変異が培養細胞に対し与える影響を比較検討するため、遺伝子上アミノ酸変異が予想される SNPs 部位において PCR に基づいた方法により1塩基置換を行った。現在までに、Edg-1 および β 2AR の全長 cDNA をクローニングし、前者については、その SNPs に基づいた Edg-1、Edg-1 S15L 双方の cDNA を得ている。

c) 哺乳動物発現ベクターの作製: 上記 Edg-1、Edg-1 S15L および β 2AR の全長 cDNA を、組み換え DNA 技術を用いて哺乳動物発現ベクターにサブクローニングした。この際、ベクターは pME 18S、および安定発現細胞株作製を考慮し、薬剤耐性遺伝子 *Neo* を有する pcDNA3 (Invitrogen)を選択し、また tag として HA をその ORF5'側に in frame になるよう付加した。ベクター作製後、293 および HeLa 細胞に遺伝子導入し、細胞溶解バッファーによる細胞抽出液を調整、sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)の後、ウエスタンブロッティングにより抗 HA 抗体 (12CA5, Roche Diagnostic)を用いて発現を確認した。

d) 安定発現細胞株の作製: 一過性発現系に加え、SNPs による Edg-1 遺伝子変異 S15L が実際に細胞に及ぼす影響をみるため、安定発現細胞株をそのコントロールとともに作製している。細胞は、HeLa および 293 細胞を用い、また、発現細胞株は限界希釈法にて single clone から作製し、高発現株を HA tag に対するウエス

タンプロットングにて確認する。また、各々の発現株はアクチン等の内部標準を基準に、同程度発現しているものを選択した。

C. 研究結果

1) G タンパク質共役型受容体遺伝子上

における SNPs の同定

同定された ORF (open reading frame) 上の塩基変異部位はそのほとんどが silent であり、一方、塩基変異によるアミノ酸置換は、各受容体について、 β 2AR R16G、TP R60L、IP R212C、IP R227W として予想された (表)。

表 冠動脈疾患を有する患者において同定された、目的とする G タンパク質共役型受容体遺伝子上変異

遺伝子名		ADRB2 (NM_000024)		
	塩基変異の位置 (bp)	SNPs	アミノ酸変異	dbSNP
1	173	c/t		1042711
2	265	a/g	R16G	1042713
3	471	g/a	L84 (silent)	1042717
4	742	c/a	R175 (silent)	1042718
5	1272	g/c	G351 (silent)	1042719
6	1398	t/c	T393 (silent)	3730182
7	1458	g/a	L413 (silent)	1042720
8	1494	c/g		3777123
9	1555	a/-		
10	1629	g/a		3777124
11	1925	g/a		
12	1979	g/-		
13	2030	a/t		1126871

遺伝子名		TBXA2R (NM_001060)		
	塩基変異の位置 (bp)	SNPs	アミノ酸変異	dbSNP
1	1170	g/t	R60L	5748
2	1426	g/a	S145 (silent)	1131882
3	1786	t/c	I265 (silent)	4523
4	1915	t/c	Y308 (silent)	
5	2110	g/a		
6	2265	c/g		
7	2471	c/t		
8	2676	g/a		
9	2880	a/-		