

遺伝子名		PTGIR (NM_000960)		
	塩基変異の位置 (bp)	SNPs	アミノ酸変異	d5SNP
1	225	c/g	V53 (silent)	2229128
2	700	c/t	R212C	
3	745	c/t	R227W	
4	909	c/t	Y281 (silent)	
5	1050	c/a	S328 (silent)	2222129
6	1674	c/-		

\*塩基変異の位置は各遺伝子の GenBank™ accession number に対する位置で表す。

\*-は欠失を示す。

## 2) Edg-1 遺伝子多型の in vitro での機能検討

Edg-1 の生理的作動物質である SIP (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、SIP により刺激 (10  $\mu$ M, 10min) を行った。刺激後、ERK の活性化を、その活性化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 SIP に対する ERK 活性化に有意差は認められていない。

## D. 考察

今回同定された SNP のうち、 $\beta$ 2AR R16G については、 $\beta$ 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、 $\beta$ 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リアル頻度

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。

## E. 結論

血栓形成と関連する遺伝子の中で、血管

内皮や平滑筋細胞、血小板の機能に重要であり、かつ多くの薬剤のターゲット分子である 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。一部の SNP については、発現実験で機能変化を検討することにより、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

1. **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.

2. **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.

##### 2. 学会発表

なし

##### 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

#### 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

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  
研究協力者 松原由美子

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14年度の研究では(1)最近我々が同定した血小板膜 vWF 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見いだされた変異 (G233S) について、*in vitro* 発現系において検討し、またコンピュータモデリングシステムを用いてその蛋白構造変化を推定した。(2)血管の老化と関連が深いヒトテロメラーゼのサブユニット (h-TERT) 遺伝子をスクリーニングし、機能と関連の可能性のある SNP を同定した。(3)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 を網羅的に解析し、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基礎検討を行った。

血小板膜 vWF 受容体 (GPIb/IX/V) の  $\alpha$  サブユニット G233S 変異は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。今回 *in vitro* 発現系で、その受容体のリガンド結合能を定量的に解析すると共に、Molecular Operation Environment (MOE) System による構造解析を行った。G233S では患者と同様の 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、コンピュータモデリングシステムにより、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  $\beta$  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。h-TERT の promoter 領域に発見された SNPs はその promoter 活性に影響することが予想されたので、luciferase assay によってこの変化を確認した。これは個体の老化に影響する可能性のある一つの SNP として興味深い。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、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、白血球除去フィルターを用いた場合の白血球除去率を測定した。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。

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。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。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 14 年度は、(1) 動脈で血栓が出来る初期段階で機能する血小板膜受容体蛋白 (GPIb/IX/V) の  $\alpha$  サブユニットに見出された変異 G233S (この変異は受容体の機能を亢進させる、いわゆる gain-of-function mutation である) の蛋白構造立体モデリングを行い、リガンドとの結合様式を知るための一助する、(2) 血管の老化と関連が深いヒトテロメラーゼのサブユニット (h-TERT) 遺伝子をスクリーニングし、機能と関連の可能性のある SNP を同定し in vitro の実験にて検証する、(3) 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 を同定することを最終ゴールとしてまず血小板 RNA の網羅的解析を行う、の 3 点を目的とした。

## B. 研究方法

GPIb  $\alpha$  の変異発現と蛋白構造立体モデリング : 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、 $^{125}\text{I}$  で標識した vWF の結合を観察した。また、GPIb  $\alpha$  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  $\alpha$  N 末端ドメイン/vWFA1 ドメイン複合体の結晶構造を鋳型として、モデリングを行った。

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。

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を用いた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 にてこれら分子の 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。

## C. 研究結果

### (1) 血小板 GPIb $\alpha$ の変異蛋白の発現と立体構造モデリング

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) Ib  $\alpha$ 、G233S について組み換え蛋白 (Wild type; WT, Mutant; G233S) を作製、 $^{125}\text{I}$ -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  $\alpha$ N 末端ドメインと vWFA1 ドメインの複合体 (図 1) を鋳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  $\beta$  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 (図 2)。

### (2) 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。

### (3) 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 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。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。

**表 1 Scatchard-Plot Analysis of Ristocetin-induced vWF binding to recombinant GPIb  $\alpha$  fragments**

	Ristocetin 0.33 mg/ml Kd ( $\times 10^{-8}$ mol/l)	Ristocetin 1.0 mg/ml Kd ( $\times 10^{-8}$ mol/l)
WT	NM	6.4 (1.6-11.1)
G233S	7.8 (6.6-8.9)	5.8 (1.1-10.5)
G233V	8.0 (2.0-14.2)	4.1 (0.7-7.5)
G233A	NM	7.2 (1.5-12.9)
G233K	NM	13.4 (7.8-19.0)

NM, not measurable, Kd, dissociation constant  
Values in parenthesis indicate the 95% CI.

図1 vWF/GPIb $\alpha$ 複合体

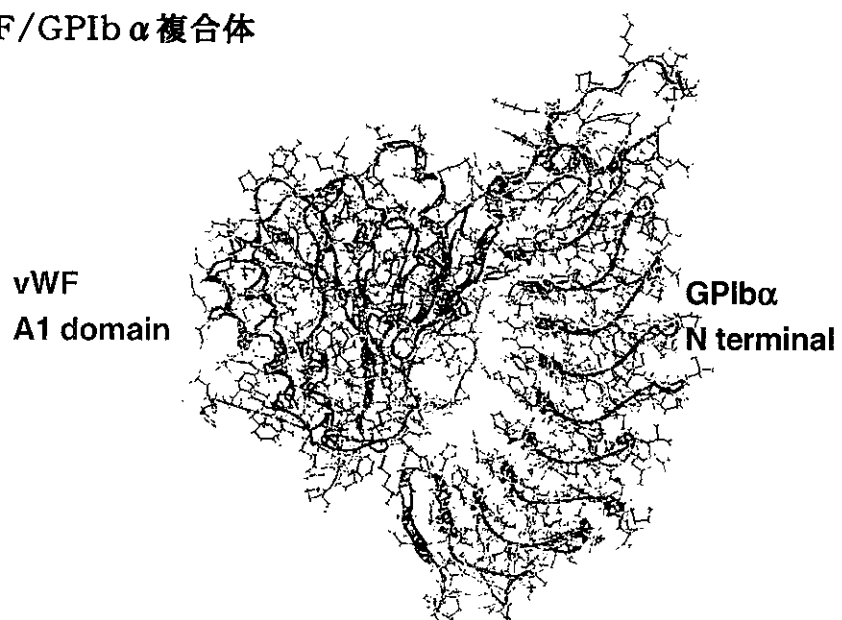
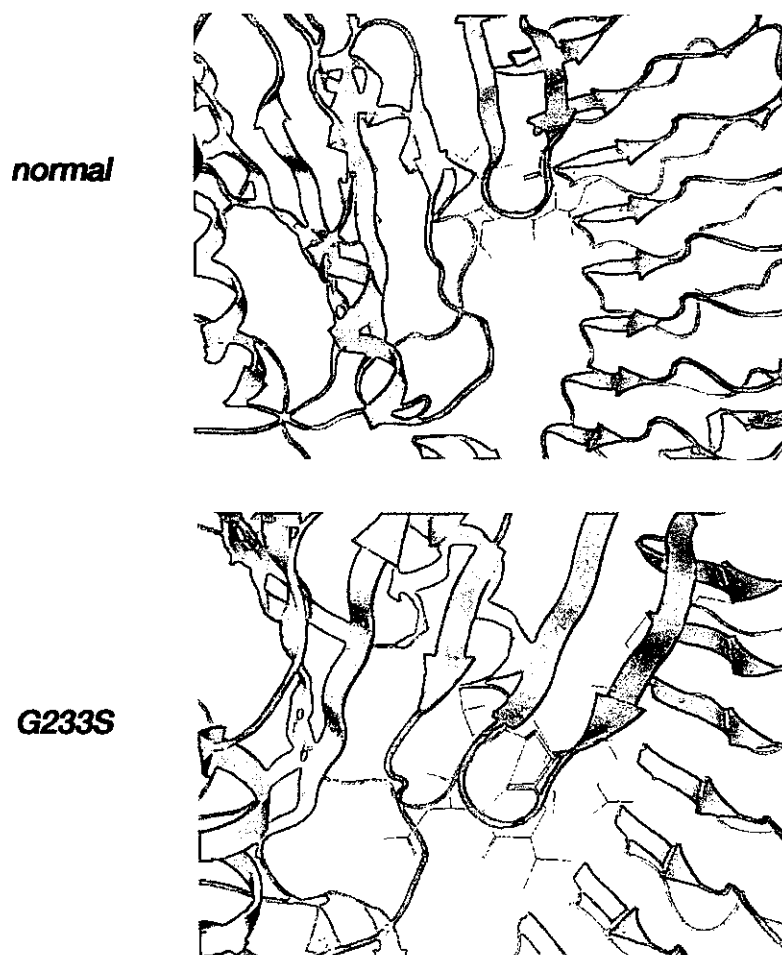


図2 GPIb $\alpha$ 変異による構造変化



#### D. 考察

GPIb  $\alpha$  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  $\beta$  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。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

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多型（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、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。血管の老化と関係する h-TERT に新しい多型を発見した。

また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

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  $\alpha$ . *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  $\beta$  gene. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* (in press, 2003)

村田 満：血栓形成における血小板の役割 医薬の門（特集「DIC：病態解明と治療の最前線」）42 (1): 54-59, 2002

村田 満：トピックス：血栓と遺伝子多型 **臨床医** 28 (11): 2259-2261, 2002

村田 満：SNP 解析 検査と技術「誰でもわかる遺伝子検査」 30 (10): 991-995, 2002

松原由美子、村田 満：脳卒中と血栓性素因の分子遺伝学 **分子脳血管病** 1 (4): 375-381, 2002

森木隆典、村田 満：先天的血栓性素因特集エコーミークラス症候群へのアプローチ **Heart Review** 6 (13): 64-68, 2002

村田 満：DNA チップ法—遺伝子診断の新展開—生活習慣病 **Medical Technology** 31 (1): 47-51, 2002

## 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 GPIba 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  $\alpha$  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

村田 満：動脈硬化と血栓症に関連する遺伝子多型研究 第 49 回日本臨床検査医学会 学会賞受賞講演 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  $\alpha$ , 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

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

脳血管障害における血栓形成の遺伝子的素因の解析

棚橋 紀夫 慶應義塾大学内科学講師

研究要旨

【目的】血管障害における血栓形成の過程の一つに単球の血管壁への接着がある。この単球の血管壁への接着にケモカインレセプターCX3CR1が関与しており、最近フランスのグループがこのCX3CR1のV249I多型と虚血性心疾患の関係について報告している。今回我々は、虚血性脳卒中とCX3CR1の多型との関係を検討した。【方法】遺伝子多型解析についてインフォームドコンセントを得た慶應義塾大学病院に通院中の虚血性脳卒中患者（心原性脳塞栓症を除く）235名と健常人306名より静脈血採血を行った。CX3CR1のV249IとT280Mの二つの多型についてPCR法にて307bpの遺伝子を増幅し制限酵素処理の後、電気泳動を行い判定した。【成績】I alleleとM alleleの出現頻度は、虚血性脳卒中患者と健常人の間で比較するとそれぞれ4.3% vs. 4.7% (P=0.705), 6.2% vs. 5.2% (P=0.506)となり統計学的有意差は認められなかった。また、ヘテロ患者を含めII+VI, MM+TMの頻度はそれぞれ7.7% vs. 8.2% (P=0.828), 10.6% vs. 1.0% (P=0.655)と統計学的有意差を認めなかった。【結論】虚血性脳卒中患者と健常人の間ではCX3CR1遺伝子多型に統計学的に有意な差はなく、CX3CR1と脳梗塞の発症リスクの関係は否定的であった。

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。血栓形成の足がかりとなる単球の血管壁への付着に必要なケモカインレセプターの一つとされるCX3CR1の二つの多型、V249IとT280Mについて比較検討した。

B. 研究方法

当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±S.D.)と年齢、性別を一致させた

健常者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。

〈倫理面への配慮〉

対象全例より紙面による研究参加への承諾を得た。

C. 研究結果

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。

#### D. 考察

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する多型である。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。

#### E. 結論

虚血性脳卒中患者と健常人の間では CX3CR1 遺伝子多型(V249I と T280M)に統計学的に有意な差はなく、CX3CR1 と脳梗塞の発症リスクの関係は否定的であった。

#### 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

現在、上記内容にて論文作成中。

##### 2. 学会発表

第二十八回日本脳卒中学会総会 (平成 15 年 3 月 14 日、東京)

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

服部英典<sup>1)</sup>、伊東大介<sup>1)</sup>、棚橋紀夫<sup>1)</sup>、村田満<sup>3)</sup>、斎藤郁夫<sup>2)</sup>、渡辺清明<sup>3)</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>

#### H. 知的財産権の出願・登録(予定も含む)

1. 特許取得 なし
2. 実案新案登録 なし
3. その他 なし

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 分担研究報告書

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 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

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、種々の遺伝子が冠動脈疾患発症に及ぼす効果を多面的に明らかにする。昨年度行った冠動脈疾患患者における Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の C-1562T 多型と Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型に加えて、本年度は冠動脈疾患との関連が報告されているミトコンドリア DNA5178A/C 変異、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)、Paraoxonase (PON)、CD14、アンギオテンシン変換酵素 (ACE)の遺伝多型を解析した。特に対象を経皮的冠動脈形成術を施行して冠動脈を拡張できた症例に限り、経皮的冠動脈形成術施行後の再狭窄の有無を冠動脈造影で確認した。多項ロジスティック回帰分析で、これらの遺伝多型の内、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の独立危険因子であった。CT 型 (AV)では 10.5 (1.9~57)、TT 型 (VV)では 10.2 (1.1~90)、T allele では 4.2 (1.5~12)の odds ratio で、再狭窄が少なかった。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る結果を示した。今後、症例数を増やして確認する必要があるが、再狭窄予防の一つの方策となる可能性を明らかにした。

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。本年度は、既に冠動脈疾患発症との

関連が報告されている複数の遺伝多型を、経皮的冠動脈形成術を施行して冠動脈の拡張に成功した症例のみを対象として調べた。狭心症や心筋梗塞の治療法としては、薬物療法、経皮的冠動脈形成術(PCI)、バイパス手術が選択肢として挙げられるが、近年、経皮的冠動脈形成術の重要性和頻度が飛躍的に増加している。薬物療法よりも治療効果が確実であり、バイパス手術に比べて低侵襲であるため、経皮的冠動脈形成術が治療法として選ばれることが多い。本法の最大の問題点は再狭窄による再発が避けられないことである。従来、施行3ヶ月以内に30~40%の症例

に再狭窄による再発がみられたが、金属ステントが使用されるようになって再狭窄の頻度は施行後 6 ヶ月で 20%まで低下した。しかしながら、再狭窄を減少させるために試みられたステント以外の手段は、総べて再狭窄率を減少させる効果を持たず、狭窄病変の拡張に成功しても 5 病変につき 1 病変は狭窄が再発する。再狭窄の決定因子として遺伝的因子の関与が疑われるため、本年度は経皮的冠動脈形成術施行後の再狭窄を規定する因子を、冠動脈疾患と関連すると既に報告されている遺伝多型からミトコンドリア DNA 5178A/C 変異、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)、Paraoxonase (PON)、CD14、アンジオテンシン変換酵素(ACE)の五つを選び、多項ロジスティック回帰分析で検討した。

## B. 研究方法

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。これらの対象に研究方法について十分に説明した後、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 DNA を抽出して、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。

### 1. ミトコンドリア DNA A5178C 変異

ミトコンドリア DNA A5178C 変異は、NADH 脱水素酵素の第 2 サブユニットを

コードする遺伝子の 5178 番目の塩基 C が A に変異するため、ロイシンからメチオニンへのアミノ酸の置換を生じる。百歳以上の症例を対象した研究で 5178A が高率に認められたが、疾患ごとの多型の頻度についてはまだ十分に解明されていない。当院の冠動脈疾患患者 136 例の検討では、狭心症を有する症例で 5178C が有意に高率に認められた。また、年齢でマッチさせた健常対象と比較すると心筋梗塞を有する症例でも有意に 5178C が高率であった。

### 2. メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR) C677T 変異

ホモシステインは、必須アミノ酸の一つであるメチオニン代謝の中間産物として合成され、再メチル化または硫黄転移によって代謝される。ホモシステインの再メチル化はメチオニン合成酵素とメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素によって行われ、ビタミン B12 と葉酸によって活性化される。高ホモシステイン血症の症例に動脈硬化性疾患の合併頻度が高く、また若年で狭心症や心筋梗塞を発症する症例が報告されたため、動脈硬化の危険因子の一つと考えられている。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子の 677 番目の C が T に変異する多型は、アラニンからバリンへのアミノ酸の変異を引き起し、この変異は、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素を不安定化させて血中ホモシステイン濃度を増加させることが報告された。当院の冠動脈疾患患者 128 例を対象として検討した結果では、変異の出現頻度は疾患群と健常対象とで差を認めなかった。

### 3. Paraoxonase (PON)

Paraoxonase は HDL に結合する蛋白で、LDL の酸化を抑制する。LDL の酸化は

動脈硬化の強い促進因子であり、Paraoxonase は抗動脈硬化作用を有するとされる。この遺伝子の 192 番目のアミノ酸であるアルギニンのグリシンへの変異は、冠動脈疾患の発症と関連すると報告されている。冠動脈疾患患者 124 例と健常対象例を比較した当院の研究では変異の出現頻度に有意差を認めなかった。

#### 4. CD14 C-260T 変異

CD14 は単球とマクロファージの表面マーカーである。血中の単球が動脈壁に浸潤してマクロファージとなり、これが LDL を貪食して泡沫細胞となることが動脈硬化の初期病変を形成する。心筋梗塞患者では血中 CD14 抗原が増加する。CD14 遺伝子のプロモーター領域にある 260 の位置の塩基 C が T に変異する多型が報告されている。当院の冠動脈疾患患者 163 例を対象とした検討では、健常例と疾患群の間に変異の出現頻度の差を認めなかった。

#### 5. アンギオテンシン変換酵素(ACE)

アンギオテンシン変換酵素は肺の血管内皮細胞で産生される酵素で、アンギオテンシン I をアンギオテンシン II に変換する。産生されたアンギオテンシン II は、末梢血管収縮や細胞増殖を促進させ、血圧を上昇させる。この遺伝子は第 17 染色体上に存在し、26 個のエクソンから構成されているが、エクソン 16 と 17 の間の 289 塩基対が欠損している欠如型(D)と、この塩基対を持つ挿入型(I)の多型が存在すると報告されている。男性の冠動脈疾患患者 97 例を対象とした当院の検討で、健常対象に比べて有意に D allele が高頻度にみられた。DD 型ではアンギオテンシン変換酵素活性が高くなり、虚血性心疾患の危険因子になると考えられる。

(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出された場合には、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

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, アンギ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。

### D. 考察

狭心症や心筋梗塞などの冠動脈疾患は動脈硬化や血栓塞栓症を基盤として発症する。しかし、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。血管形成術によって生じる血管内膜の剥離、プラークの破裂、内膜下組織の血液への露出、血小板血栓の形成、細胞増殖因子の分泌などが複合的に関与していると考えられる。循環血中の単球やマクロファージ、白血球などが損傷部位に浸潤し、内皮細胞や平滑筋細胞などを増殖させる増殖因子を分泌する。また、細胞外マトリックスとなる collagen や proteoglycan などの分泌を促す。これらには当然、細胞増殖に関与する細胞内シグナル伝達系や細胞周期

の調節因子が複雑に関与している。本年度は、冠動脈疾患発症との関与が報告されている遺伝多型のみを対象として検討したが、上述した多くの因子について関連性を評価する必要がある。これらには、まだ人における遺伝多型が明らかにされていない因子が多い。

ホモシステインは、必須アミノ酸であるメチオニンの中間代謝産物として合成され、再メチル化と硫黄転移で分解される。高ホモシステイン血症の症例に動脈硬化性疾患の頻度が高く、また若年で狭心症や心筋梗塞を発症する症例が報告されたため、動脈硬化の危険因子の一つと考えられている。ホモシステインの再メチル化に関わるメチオニン合成酵素やメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素はビタミン B12 と葉酸を補酵素として利用するため、これらの経口摂取による動脈硬化抑制の可能性が指摘されている。本研究で検討したメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子の変異は、酵素タンパクの不安定化をもたらし、血中ホモシステイン濃度の増加をもたらす。しかし、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の活性は、食餌から摂取されるビタミン B12 と葉酸の量にも依存する。当院の他の対象を用いた検討では、TT 型 (VV) の変異を持ち、かつ血中葉酸レベルが低値の症例でのみ血中ホモシステイン濃度が高値であった。日本人を対象とした他の報告でも、この変異が脳梗塞の危険率を上昇させ、特に多発性脳梗塞の頻度が高いとされているが、多型性に関わる変異は直接的に疾患を発症させるわけではなく、多くの他の遺伝因子や環境因子と共同して疾患の発症率に影響を及ぼす。

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。また、さらに症例数を増やしてこの結果を確認する必要がある。

## E. 結論

経皮的冠動脈形成術を施行して冠動脈を拡張できた冠動脈疾患患者を対象として、ミトコンドリア DNA 5178A/C 変異、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素、Paraoxonase、CD14、アンギオテンシン変換酵素の遺伝多型を解析した。冠動脈形成術施行後の再狭窄の有無を冠動脈造影で確認し、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。検討した遺伝多型の内、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)、TT 型 (VV) では 10.2 (95%信頼域: 1.1~90)、T allele では 4.2 (95%信頼域: 1.5~12) の odds ratio で、再狭窄が少なかった。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る結果を示した。今後、症例数を増やして確認する必要があるが、再狭窄予防の一つの方策となりうる。

## 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 51 回日本心臓病学会学術集会 (2003



年9月) に抄録投稿

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

血栓症の危険因子の遺伝子診断法の確立

渡邊 清明

研究要旨

分担研究者らはこれまで血栓性疾患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てきた。平成14年度の本研究課題においては、候補遺伝子アプローチ法にてこれらの疾患との関連が予想される幾つかの因子について新規 SNPs を発見した。また、これら SNPs による蛋白発現の変化、機能変化について実証し得た。

G タンパク質共役型受容体のうち、特に Edg-1 (sphingosine-1-phosphate receptor) 遺伝子にアミノ酸変異を伴う新たな SNP を同定し、発現実験にて機能を解析した。また心機能の指標として知られる脳性利尿ペプチド (BNP) の遺伝子多型を健常人でスクリーニングし、血中 BNP 濃度と関連する新たな SNP を同定した。さらに、既知の SNP の機能解析として、血小板活性化因子 (platelet-activating-factor : PAF) アセチルヒドロラーゼ (AH) の Val279Phe 多型の機能への影響と脳血管障害との関連を検討し、この多型が *ex vivo* 血小板活性化と関連すること、若年者脳血管障害と関連することを示した。

これまでの研究で得られた情報を基に、日本人には何が重要な多型かを吟味し、多因子病の遺伝子診断の方向性を見極めることが肝要である。

A. 研究目的

本研究課題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。近年、血栓症などの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おり、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、血栓症を診断することはない。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。

平成 14 年度は、以下の点について検討した。(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: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遺伝子での SNP 解析を血管性病変との相関の観点から検討した。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) に焦点をあてた。(2) 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 は主に心室で合成され、心機能の指標として知られている。BNP の遺伝子の多型を健常人でスクリーニングし、血中 BNP 濃度と遺伝子多型の関連を検討した。(3) 血小板活性化因子 (platelet-activating-factor : PAF) アセチルヒドロラーゼ (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 は強力な生理活性を有するリン脂質であり、特異的受容体を介して白血球、マクロファージ、血小板等を活性化して、炎症、アレルギー、ショック、血栓症、動脈硬化等に関与することが知られている。PAF-AH は、PAF および酸化リン脂質を加水分解し、これらの物質により惹起される種々の病態に対し防御的に働くものと考えられている。既知の多型のうち、Val279Phe は日本人に特有で、酵素活性をほとんど持たない遺伝子型 (Phe/Phe)が一般人口に 3%程度存在するとされる。PAF-AH 遺伝子多型 (Val279Phe) と血小板機能との関連について我々は報告してきたが、ここでは虚血性脳血管障害患者(CVD)と健常人における出現頻度について層別解析を行った。

## B. 研究方法

学内倫理委員会で承認された様式による文書での同意を対象者全員から得た。

(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: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、exon 領域を適切なプライマーを用いて PCR 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 (GenBank™ accession number; EDG1: AL109741) と比較した。(2) 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) 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、健常人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。

## 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 であったが、

塩基変異によるアミノ酸置換として、S15Lが同定された(表1)。

表1 Edg-1 (sphingosine-1-phosphate receptor)に見られた遺伝子多型

遺伝子名		EDG1 (AL109741)		
	塩基変異の位置 (bp)	SNPs	アミノ酸変異	dbSNP
1	35970	a/g		
2	36380	g/c		
3	36382	g/-		
4	36422	a/g		
5	38330	c/t		3737578
6	38366	g/t		3737577
7	38418	c/t	S15L	
8	39268	a/g	V298 (silent)	
9	39650	a/g		3765683
10	40173	a/g		
11	40674	c/t		

(2) 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。(3) 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2)。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(表3)。