

20030366

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

平成15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16(2004)年 3月

厚生労働科学研究費補助金  
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 15 年度  
総括・分担研究報告書

平成 16 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)

渡辺清明 慶應義塾大学医学部 (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

棚橋紀夫 慶應義塾大学医学部内科 (神経内科) 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 血栓形成メカニズムの分子学的研究 池田 康夫
  - ② 血栓症の危険因子の遺伝子診断法の確立 渡辺清明
  - ③ 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
  - 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 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
- 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

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15年度 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内科教授

研究要旨 本研究の目的は、(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、(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 splice variant も含めて解析し、新たな transcript を同定する、ことであり、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最終ゴールとしてスタートした。平成15年度は、(1) 候補遺伝子に見られる SNPs の疾患関連研究、(2) 候補遺伝子に見られる遺伝子変異の機能への影響の in vitro での検討、(3) 候補遺伝子における新規 SNPs の探索、(4) 動脈血栓症に重要な役割を演じている血小板に発現する mRNA の網羅的解析、を行った。その結果、(1) 虚血性脳血管障害と関連が予想された15の遺伝子多型を改めて解析し、リスク型遺伝子を同時に複数有することは、CVD発症のリスクを増加させ、より早期の発症をもたらすことを示した。また動脈血栓の形成に重要な血小板機能を調節する von Willebrand 因子分解酵素 (ADAMTS13) の遺伝子多型と血栓症の関連、同じく血小板機能を調節する血小板膜 GPIb/IX/V 複合体 (VWF 受容体) や GPVI (コラーゲン受容体) の多型と血栓症の関連を示した。また hTERT プロモーター領域内の遺伝子多型が冠状動脈疾患 (CAD) と関係する事が明らかとなった。(2) GPIb $\alpha$  の <sup>145</sup>Thr/Met 多型と繰り返し配列多型 (1R~4R) のうち、<sup>145</sup>Met と 4R (疫学研究により冠状動脈疾患・脳血管障害の危険因子と報告されている遺伝子型) が流動状態下で高い vWF との反応性を示すことを明らかにした。またレジスチン遺伝子の SNP が血中濃度に関連することを突き止めた。(3) 血栓症と関連する因子に新たな遺伝子多型や変異を同定し、これらのうち幾つかは当該因子の血中濃度や機能、そして疾患と関連することを示した。例えば ADAMTS13 に新たな多型を発見した。そして、(4) 高純度の血小板から得た RNA 解析により血小板に発現する遺伝子が多数同定され、今研究で初めて血小板の mRNA レパートリーが解析可能となった。

主任研究者

池田康夫 慶應義塾大学医学部内科教授  
分担研究者

渡邊清明 慶應義塾大学医学部中央臨床  
検査部教授

小川聡 慶應義塾大学医学部内科教授

棚橋紀夫 慶應義塾大学医学部内科講師

村田満 慶應義塾大学医学部内科講師

## A 研究目的

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。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重要課題の一つである。

本研究は血栓症、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開始された。具体的には、(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（候補遺伝子）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。

平成15年度も前年に引き続き、(1)候補遺伝子に見られるSNPsの疾患関連研究、(2)候補遺伝子に見られる遺伝子変異の機能への影響のin vitroでの検討、(3)候補遺伝子における新規SNPsの探索、(4)動脈血栓症に重要

な役割を演じている血小板に発現する mRNA の網羅的解析, を行った。

## B 研究方法

### (1) 候補遺伝子に見られる SNPs の疾患関連研究

脳血管障害に関連する遺伝子多型の総合的解析: 対象は虚血性脳血管障害

(CVD) 患者 200 例であり、内訳はアテローム血栓性脳梗塞 52 例、ラクナ梗塞 126 例、TIA 22 例である。すべての患者について脳の CT スキャンまたは MRI を行い、NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) による診断基準に基づいて分類した。コントロールは慶応大学教職員の健康診断受診者 281 名であった。血圧は収縮期 140mmHg、拡張期 90mmHg 以上、又は降圧剤服用中を高血圧症、総コレステロール 220mg/dl、トリグリセライド 150mg/dl 以上、又は薬物治療中を高脂血症、また空腹時血糖 140mg/dl 以上又は治療中を糖尿病ありとした。多型解析した 15 の遺伝子は以下のとおりである。すなわち、Fibrinogen  $\beta$ -chain (Fib  $\beta$ ; G-455A), Coagulation factor XII (F-XII; C46T) Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1 promoter; 4G/5G), Platelet glycoprotein (GPIb  $\alpha$ ; Thr145Met), Atrial natriuretic peptide (ANP; G664A), Nitric-oxide synthase (NOS; 4repeat/5repeat), Angiotensin-converting enzyme

(ACE; insertion/deletion), Serotonin receptor 5HT2A (T102C), Apolipoprotein E (APO-E;  $\epsilon$  2,  $\epsilon$  3,  $\epsilon$  4), Cholesterylester transfer protein (CETP; Taq1 genotype of intron 1), Paraoxonase (PON; Gln192Arg), Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR; C677T), NADPH oxidase p22PHOX (His72Tyr), Monocyte CD14 antigen (promotor C-260T), Mitochondrial DNA 5178 (m-5178; C5178A) の 15 の遺伝子である。これらの遺伝子を全血直接 PCR 法あるいは PCR-RFLP 法を用いて解析し、CVD 患者とコントロール群でのそれぞれの遺伝子型を決定した。

ADAMTS13 遺伝子における多型と血栓症の関連: 患者一対照研究で、ADAMTS13 遺伝子多型が血栓症の危険因子となりうるかを検討した。虚血性脳血管障害 (CVD) 患者 232 名、冠状動脈造影を施行された冠動脈疾患 (CAD) 患者 191 名、健常人 342 名を対象とした。

### (2) 候補遺伝子に見られる遺伝子変異の機能への影響の in vitro での検討

血小板膜 GPIb  $\alpha$  の多型の機能への影響: 本研究では疫学研究により得られたその関連の分子学的機序を解明するために 2 つの実験研究を行った。1 つめは、GPIb  $\alpha$  の N 末端 45kDa を含むアミノ酸 1-302 番までの組み換え蛋白 2 種 (145T と 145M) それぞれが培養上清中に分泌されるための培養細胞株を樹立し、培養上清中に分泌された GPIb  $\alpha$  の断片蛋白

をウエスタンブロット法とドットブロット法を用いてその発現確認と発現量の定量解析を行った後、GPIb $\alpha$ を固相化したニトロセルロースメンブレンにアイソトープ ( $^{125}$ I) 標識 vWF をリストセチン存在下で反応させ、その放射活性カウントによる定量解析を行った。2 つめの実験研究では 145T と 145M の比較に加え、繰り返し配列の比較、さらに  $^{145}$ Thr/Met と繰り返し配列のどちらが vWF 反応と関係するかを検討するために 4 種の GPIb $\alpha$ 配列(実在する; 145T/1R、145M/4R、実在しない;145T/4R、145M/1R)を有する組み替え蛋白を GPIb $\beta$ /IX とともに複合体として発現させた。GPIb $\alpha$ 発現をフローサイトメトリー法で確認、同程度に発現している GPIb $\alpha$ / $\beta$ /IX 複合体を FACS 法にて得た後、さらに EIA 法による発現量の定量解析を行った。これらの細胞と vWF の反応を血管内の血流速度を想定した流動状態下で解析した。

**血液凝固因子の変異とその機能:** 11 歳の女兒から見出された変異型凝固 X 因子 Gly366Ser 変異を対象とした。FXcDNA を含む plasmid vector に当該の変異を導入し、HEK293 細胞に一過性に発現させ、ELISA および Western Blot を用いて、野生型 (WT) および異常型 (Gly366Ser) FX 蛋白の発現を解析した。また、血液凝固 XII 因子に見出された遺伝子変異の機能解析では、APTT が著明に延長し、凝固 XII 因子活性が著明に延長する 49 歳女性の XII 遺伝子を解析した。通常の方法で XII 因子遺伝子を増幅したあと直接シーケンス

法で塩基配列を決定した。この変異を PCI<sup>no</sup> (Promega, Madison, WI) に導入し、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に遺伝子導入、発現する蛋白を Western blot で解析するとともに凝固活性を APTT 法で検討した。また Taqman 法で細胞内 mRNA 量を定量した。

**hTERT のプロモーター領域の遺伝子多型が hTERT の転写活性に与える影響:** ルシフェラーゼアッセイ用ベクター (それぞれの遺伝子多型を有する hTERT のプロモーター配列を組み込んだルシフェラーゼ発光ベクター)を遺伝子導入効率を補正するためのベクターとともに正常ヒト臍帯静脈内皮細胞に導入し 48 時間培養後、そのルシフェラーゼ発光を定量解析した。

**レジスチン遺伝子多型:** 解析対象は慶應義塾大学病院・肥満外来通院中で糖尿病や服薬のない肥満患者 60 名で、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR の高い群、30 例を insulin resistant (以下 R 群) とし、低い群 30 例を insulin sensitive (以下 S 群) の 2 群に分類した。方法は、関連因子として各検査項目を調べるとともに、レジスチン遺伝子の SNP との関連を比較検討した。血清中のレプチン、アディポネクチン、レジスチンを測定した。

**ADAMTS13 遺伝子における多型と機能の関連:** 一方、in vitro の発現実験で、組み換え蛋白を作製し、各種遺伝子型での VWF-CP 機能を測定した。発現系の構築は、発現ベクター(pcDNA3.1) に ADAMTS13 の cDNA を導入し、



HEK293 細胞に発現させた。培養上清を Western blot と ADAMTS13 活性測定 (VWF マルチマー解析) に供した。

### (3) 候補遺伝子における新規 SNPs の探索

hTERT のプロモーター領域の遺伝子多型の研究を行うため、はじめに 健常人 17 名からの DNA を対象に hTERT のプロモーター領域の遺伝子配列の全塩基解読による塩基置換の検索を行った。それらの結果と DNA のデータベース (GENBANK) に登録されている既知の hTERT プロモーター領域の配列

(Accession No AF098956) と比較検討した。レジスチン遺伝子の SNP 解析は全領域を PCR 増幅・精製後、ダイターミネータ法による塩基配列解析をおこない SNP 候補を推定した。シークエンス反応は MegaBACE ET Terminator を、シークエンサーは MegaBACE1000 を使用した。また、タイピングは Single Nucleotide Primer Extension 法にて行った。

ADAMTS13 遺伝子に新しい多型を発見し、活性や血栓性疾患との関連を検索するため、まず日本人 71 名の genomic DNA を対象に ADAMTS13 遺伝子の全エクソンと、エクソン-イントロン境界領域の塩基配列を解析した。発見された single nucleotide polymorphism (SNP) について健常人を対象にしたタイピングにより遺伝子型頻度を求めた。

### (4) 血小板に発現する mRNA の網羅的解析

健常人より末梢血 50ml を採取し可及的すみやかに 1/9 量の 3.8% クエン酸と混合、通常の方法で遠心により多血小板血漿をえた。白血球除去フィルター処理 (1 回または 2 回) 後、抗 CD45 モノクローナル抗体、抗 CD71 モノクローナル抗体、抗 glycophorine モノクローナル抗体などによる negative selection (Automacs™ を使用) で血小板を純化した。混入する白血球と赤血球の除去効率の測定は、検体を適宜希釈し、(1) 通常の末梢血カウンター、(2) 目算、(3) flow cytometry (FACS)、によった。Trizol™ による Total RNA の抽出後、血小板 RNA の純度をリアルタイム定量 RT-PCR 法を用いて、白血球由来 RNA (CD45, CD13, CD14, CD20, CD3, CD56 等)、赤血球由来 RNA (CD71, glycophorine) について検討した。逆転写反応による cDNA の作成のあと cRNA を作成した。ビオチン標識した cRNA サンプルを、ヒト遺伝子 14,500 個・転写反応物やそのバリエーション約 4,000 個の遺伝情報を有する DNA チップ (GeneChip™) にて発現解析を行った。

#### (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) 候補遺伝子に見られる SNPs の疾患関連研究

脳血管障害に関連する遺伝子多型の総合的解析：解析したCVD患者とコントロール群の臨床背景の比較においてCVD患者とコントロール群の年齢、男女比に有意差は認めなかった。しかし喫煙、高血圧、高脂血症、糖尿病合併、BMI、トリグリセライド、HDLコレステロール、血糖値についてはCVD患者とコントロール群でその頻度に有意差を認めた。解析が出来た15の遺伝子多型で、コントロール群と比べCVD患者でリスク型遺伝子の出現頻度が比較的高く、 $\chi^2$ 乗検定で危険率 $p$ が0.1以下だったのはGPIb $\alpha$ ( $p=0.0956$ )、APO-E( $p=0.0801$ )、p22PHOX( $p=0.0760$ )の3遺伝子のみであった。すべてのCVD患者ではリスク型を2つ有するもので2.67、1つ有するもので1.63であったが、60歳未満に限って解析すると、リスク型遺伝子を2つ有するものはそのオッズ比が4.68と有意に高く、同様に60歳未満で解析して求めた高血圧(4.90)の次に高く、喫煙(4.22)よりも高いオッズ比であった。表

には示さないが、60歳未満で、リスク型遺伝子を2つ持つものはCVD患者で10.6%なのに対し、コントロール群では2.9%のみであった( $p<0.05$ )。リスク型遺伝子を2つ有するものと、1つあるいは1つも持たないものと比較した。性別や喫煙、高血圧、高脂血症、糖尿病の有無や生化学データに大きな有意差はみられなかった。しかし、平均発症年齢で約5歳の差を認め、危険率0.0254でリスク型遺伝子を2つ有するものの発症年齢が有意に若いことが解析の結果から判明した(渡邊清明, 棚橋紀夫)。

他の候補遺伝子：GPVI(コラーゲン受容体)の多型とCADに関連が見られた(小川 聡)。またADAMTS13遺伝子における多型と血栓症の関連CVD患者、CAD患者、健常人を対象として多型の頻度を解析したところ、minor alleleの頻度はCVD、CAD、健常人の順でそれぞれ448Eが19.8%、19.6%、16.8%、475Sが7.3%、5.0%、6.0%、903Lでは4.5%、4.5%、4.5%であった。WTホモ、ヘテロ、変異ホモの3群間比較でも有意差はみられなかった(小川 聡, 棚橋紀夫, 村田 満)。白血球と血管内皮細胞の接着は動脈硬化の一過程として重要とされている。両者ともに発現する接着分子の一つにE-selectinがあるが、そのA561C多型は日本人の心筋梗塞の相対危険度を2倍にすると報告された。そこで虚血性脳卒中とE-selectinのA561Cの多型について検討した。ロジスティック解析の結果、虚血性脳卒中と高血圧( $P<0.001$ )、喫煙歴( $P=0.002$ )、糖尿病( $P<0.001$ )との間で相関関係が認

められたが、C allele の存在と虚血性脳卒中(P=0.566)やその他の危険因子との間には相関関係は認められなかった。患者群とコントロール群でACの頻度はそれぞれ9.4% vs. 8.3%(P=0.668)と統計学的有意差を認めなかったが、糖尿病と高脂血症を持つ人を除いた比較ではそれぞれ12.7% vs. 5.8%(P=0.036)と有意差を認めた。すなわち危険因子である糖尿病と高脂血症を持たない集団内ではC allele を有する群が虚血性脳卒中を発症する相対危険度は2.37と有意に高いことが判明し、C allele の存在が日本人の虚血性脳卒中リスクを高める可能性が示唆された(棚橋紀夫)。また初年度および昨年度に施行したMMP-9とMTHFRの多型研究の検討症例数を増加させた。その結果、MMP-9のC-1562T多型性は、既知の冠動脈危険因子から独立して冠動脈病変の重症度と関連し、また、冠動脈の新規狭窄病変の出現とも関連した。MTHFR遺伝子の多型は、経皮的冠動脈形成術後の再狭窄の独立危険因子であった。T allele を持つ症例で再狭窄が少なく、CT型(AV)およびTT型(VV)はCC型(AA)に比べて再狭窄が少なかった(小川 聡)。

## (2) 候補遺伝子に見られる遺伝子変異の機能への影響のin vitroでの検討

血小板膜GPIIb/IIIaの多型の機能への影響：<sup>125</sup>I標識vWFと組み換え蛋白の反応は145Tと145Mの比較検討において有意差は認められなかった。結合親和性(Kd)の検討においても145Tと145Mの比較検討における有意差は認められな

かった。細胞表面に受容体複合体を発現させる実験では、細胞間で発現量に差は認められなかった。流動状態下において、ガラス板に固相化したvWFと細胞の反応を細胞の回転速度(rolling velocity；この値が低いほどvWFとの反応性は高い)で評価するためにリアルタイム画像処理による検討を行った。その結果、145M/4Rが145T/1Rに比し有意差をもってvWFと高い反応を示すことが認められた。145T/4R、145M/1Rは前述2つの中間の値を示し、これらにvWF反応の差異は認められなかった(村田 満)。

血液凝固因子の変異とその機能：X因子欠乏患者に、X因子の活性中心(serine protease domain)に変異が発見された。患者はホモ接合体と考えられた。PCR-RFLPで家系を解析したところ、両親、妹ともにヘテロ接合体と考えられた。培養上清中のX因子抗原量は野生型と比較し大きな差はなかった。発色基質S-2222を用いた検討ではGly366Serの機能は著明に低下していた。thrombin発色基質を用いた検討でもGly366Serの機能は著明に低下していた。アミノ酸立体構造ホモロジーモデリングでは、酵素活性に影響を及ぼす立体構造障害が予測された。凝固XII因子にTGG→TGCを同定した。この結果、Trp486→Cysが想定された。患者はこの変異に関しホモ接合体であり、患者の子2人はヘテロホモ接合体であった。発見された変異を確認する為、患者と子のPCR産物をRFLP法で解析したところ、それぞれの変異が同定された。一方、

同方法により一般人 95 名の遺伝子解析を行ったが、同変異を有する個体は一人も見出されなかった。この変異を CHO 細胞に導入したところ、XII 因子蛋白は細胞内にはコントロールと同レベルかそれ以上見られたが、細胞培養上清には見られなかった。次に細胞 lysate の mRNA 量を定量したところ、変異を導入した細胞にはコントロールと同等以上の XII 因子 mRNA が存在していることが明らかとなった (池田康夫, 渡邊清明)。

レジスチン遺伝子多型: レジスチンは BioVendor と Phoenix で異なる値をとったが、R 群と S 群では有意な差はみられなかった。この濃度の解離は、BioVendor が異なるサイトを認識する、2つの抗体を用いたサンドイッチ法であるに対し、Phoenix は N 末端側の 51-108 番アミノ酸を認識する抗体を用いた競合法であることから、使用している抗体の認識部位の違いに依存すると推測された全長約 2500bp の DNA について、プロモーター領域では -1093, -638, -420, -358 の 4 カ所に、イントロンには -167, +157, +299, +739, +877 の 5 カ所で、計 9 個の SNP があり、そのうちピンクで示した -1093A>G と +739C>G は新規の SNP であった。新規 SNP の出現頻度は -1093AA が 81.7%、AG が 18.3%、+739 では CC が 35.0%、CG が 33.3%、GG が 31.7% であった。また他の SNP での出現頻度については、ほぼ既報に準じていた。なお、すべての SNP において R 群と S 群の出現頻度間に有意な差は認められなかった。遺伝子多型とレジスチン濃度との関連をみ

ると、-638G>A、-420C>G、-358G>A において多型との間に互いに有意差を認めた。また下段の +739C>G においては、有意差はみられなかったが、CC、CG、GG と段階的に低値となる傾向がみられた。なお、他の SNP についてはレジスチン濃度とのあいだに有意な差はみられなかった (渡邊清明)。

ADAMTS13 遺伝子における多型と機能の関連: 発見された 3 つの変異

(Q448E, P475S, S903L) を導入した vector を HEK293 細胞にトランスフェクトすると、培養上清中には Q448E, P475S, S903L のいずれの場合も野生型と同等量の ADAMTS13 の発現が確認された。組み換え ADAMTS13 蛋白の活性は、野生型に比較し Q448E と S903L ではほぼ同等であったが、P475S では著明な低下が見られた (村田 満)。

### (3) 候補遺伝子における新規 SNPs の探索

hTERT のプロモーター領域の遺伝子多型: 翻訳開始点より 1375 塩基上流に C/T 塩基置換を 2 検体から検出した。この置換は National Center for Biotechnology Information のデータベースに報告されていたがその頻度についての報告はなかったため、この置換が遺伝子多型であるか (集団の 1% 以上にみられるか) を検討した。解析検体数 46 における遺伝子型の頻度解析の結果は <sup>1327</sup>C/C 型 45.8%、<sup>-1327</sup>C/T 型 39.0%、<sup>1327</sup>T/T 型 15.2% であった。よって <sup>1327</sup>C/T 置換は、遺伝子多型であることが認められた。ルシフェラーゼアッセイ

の結果、<sup>-1327</sup>C/C型は<sup>-1327</sup>T/T型に比し転写活性が低いことが有意差をもって認められた。次に<sup>-1327</sup>C/T遺伝子多型と冠状動脈疾患(CAD)の関係を検討するための疫学研究を行った。CAD患者104名とその患者群と年齢や性別を一致させるように選ばれた健常人115名における遺伝子型の頻度を検討した。患者群での<sup>-1327</sup>C/C型の遺伝子型頻度(51.9%)は健常人群でのそれ(36.5%)に比し高いことが有意差をもって認められた。また、患者群において重症度別に遺伝子型の頻度を検討した結果、重症度が高くなるほど<sup>-1327</sup>C/C型の遺伝子型頻度が高くなることが認められた(池田康夫, 小川 聡)。

#### (4) 血小板に発現する mRNA 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と、Automacs による glycophorine の negative selection により、血小板に混入する白血球と赤血球が効率良く除去できることが明らかとなった。GeneChip

により、血小板に発現する遺伝子が 500 以上同定された(池田康夫)。

#### D 考察

##### (1) 候補遺伝子に見られる SNPs の疾患関連研究

遺伝子多型解析の結果、GPIb  $\alpha$ , APO-E, p22PHOX で CVD 患者と健常者との間に出現頻度の有意差を認めた。CVD 患者で、GPIb  $\alpha$ , p22PHOX 遺伝子どちらもリスク型遺伝子を持つものは、健常者群に比し有意に多く認められた。特に 60 歳未満の CVD 患者で、リスク型遺伝子を 2 つ有するもののオッズ比は 4.68、1 つ有するものは 1.58 であった。すなわち、若年者では、より遺伝子多型の関与が高いと考えられる。また CVD 患者で、リスク型遺伝子を 2 つ有するものは、1 つあるいは 0 のものに対し、その発症が平均で約 5 歳早期であった。以上より、CVD と関連する遺伝子多型で、リスク型遺伝子を同時に 2 つ以上有することは、CVD 発症のリスクを増加させ、より早期の発症をもたらす可能性が示唆された。また ADAMTS13 遺伝子の SNP スクリーニングで発見された ADAMTS13 多型のうち、Q448E と P475S はそれぞれ TSP-1 domain と cysteine-rich domain にあり、機能的に重要な部位であることから機能への関連が想定されたが、明らかに機能低下を来すと思われたのは P475S のみであった。これは Kokame らの報告と合致する。一方、

本研究ではじめて発見された S903L は機能に影響しなかった。しかし分子構造変化を起こす可能性はあり、これら変異が蛋白の抗原性などにどのように影響してくるか今後の研究を待たねばならない。また今回調べた E-selectin の A561C 多型は coding sequence にあり、Ser128Arg とアミノ酸配列を変更する。つまり E-selectin の表現型に直接影響する多型である。今回のデータでは古典的危険因子である糖尿病と高脂血症を除いた場合に有意差を認めた。これは他の危険因子である喫煙などが E-selectin の血清中濃度に影響しないのに対し、2 型糖尿病で網膜症などの微小血管病変を有する群や 2 型糖尿病かつ高脂血症を有する群では血清中 E-selectin 濃度が有意に高いといった他グループの報告とも矛盾しない。つまり直接的には血清中 E-selectin 濃度が虚血性脳卒中の発症因子である可能性が示唆された。Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の C-1562T 多型は、冠動脈疾患の有無との間に関連性を有さなかったが、冠動脈造影検査で診断した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性を持っていた。この多型は、冠動脈の新規狭窄病変出現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、重症冠動脈疾患を起こしやすくする可能性がある。これは 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。重症冠動脈病変を合併する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る。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。

冠動脈形成術後の再狭窄は、冠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雑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関与している。冠動脈疾患発症との関与が報告されている遺伝多型を対象として研究を行ったが、上記の因子についても検討する必要がある。

#### (2) 候補遺伝子に見られる遺伝子変異の機能への影響の in vitro での検討

VWF 受容体のサブユニットである Ibaはその細胞外の N 末端から 45kDa(アミノ酸 1-300)の中に vWF と

の結合部位を有している。Ib $\alpha$ とvWFの反応は血栓形成過程において重要な役割を演じている。この反応は必ず応力依存性であることが知られている。すなわち静止下(定常)状態ではIb $\alpha$ /vWF反応を認めず、流動状態下のみ認められる。in vitroにおいて静止下状態では生体内物質とは異なる反応惹起剤の1種であるリストセチンの存在下でその反応が認められる。GPIb $\alpha$ は<sup>145</sup>Thr/Met、それと連鎖不均衡の<sup>397</sup>Pro-<sup>409</sup>Glnの1-4repeat(R)の繰り返し配列の遺伝子多型を有している(<sup>145</sup>Thrと1R、2Rの連鎖・<sup>145</sup>Metと3R、4Rの連鎖)。これまで我々は<sup>145</sup>Metと4R遺伝子多型が冠状動脈疾患の有病率や重症度・脳血管障害の危険因子であることを疫学研究結果により示してきた。今回の結果はこの疫学的観察事実を実験的研究により始めて裏付けたことになる。生体内でGPIb $\alpha$ 多型がどの程度、血栓形成能に影響しているか、今後の課題である。

変異型凝固X因子の機能解析では、変異は蛋白立体構造を変化させることにより、凝固因子の酵素活性を低下させると考えられた。凝固XII因子に同定された遺伝子変異W486Cは細胞内では蛋白合成は正常に起こるものの、細胞外への分泌に障害を来していることが明らかとなった。この成績は患者phenotype、すなわちCRM陰性の凝固因子欠乏症に合致する所見である。XII因子には20対のジスルフィド結合が想定されているが、今回発見されたCysへの変異はこれらジスルフィド結合に影響する可能性が示唆され、XII因子の分子機能解明の

一助になると考えられた。

レジスチンの発現に際してプロモーターへの転写因子C/EB $\alpha$ の結合やそれを調節するcoactivatorのP300、CREB-binding proteinなどが関与していると言われている。今回、プロモーター領域に属する-638G>A、-420C>G、-358G>AのSNPはレジスチン濃度と関連しており、互いに連鎖していたこと、また、イントロン3にある+739C>GのSNPもレジスチン濃度と関連する傾向がみられ、さきの3つのSNPと連鎖があったことに注目し、これらのSNP周辺における転写因子の結合サイトを調べると、+739周辺ではCの時はP300とSp1が結合可能であるのに対し、Gの時はP300のみとなっていることがわかった。このことから、SNPの違いにより転写因子の関与が異なり、その結合状態が変わることが予想され、連鎖と合わせてレジスチン量の発現に関与すると推測された。

また我々はADAMTS13を検討する過程で血小板でのADAMTS13の発現を見出した。血漿中のADAMTS13活性が必ずしもTTPの発症や重症度と関連しないことや、ADAMTS13の生理的基質は現在VWFのみ知られているが体内のどの部位で最も効率良くこの酵素が働くか、など不明な点も多い。今回我々によってはじめて血小板中にADAMTS13が発見されたことには幾つかの意義が見出される。まず、血小板中のVWFをregulateしている可能性が示唆されること(血小板VWFの活性を調節している可能性)が挙げられる。こ

れは局所での血栓形成の制御と関連するかも知れない。さらにTTPやその他の血栓性疾患において血小板ADAMTS13が解析される可能性である。血小板に局在するADAMTS13は本分子の構造-機能相関を検討する上で重要なtoolとなる可能性がある。

### (3) 候補遺伝子における新規SNPsの探索

hTERTのプロモーター領域の遺伝子多型：hTERTはテロメラーゼの活性を規定する働きを有するサブユニットであり、細胞老化や分化、細胞の形質転換に関与している。そのhTERTの発現量はプロモーターの転写活性に調節されていることが報告されている。これまでにその発現調節に関わる転写因子の研究は広く行われているが、遺伝的因子の影響についての報告はない。本研究によりhTERTプロモーター領域内の<sup>-1327</sup>C/T遺伝子多型の<sup>-1327</sup>C/C型はその低い転写活性を有し、おそらく内皮細胞の老化→動脈硬化の進展という、経路でCADの発症と関連するものと考えられた。

### (4) 血小板に発現するmRNAの網羅的解析

血小板は核を有さず、巨核球由来のごく微量のmRNAが存在するのみである。この事実がこれまで血小板の分子生物学的アプローチを困難にしていたといえる。今研究で血小板のmRNAレパートリーが解析可能となったことは大きな意義がある。一つは血小板産生のメカニズムとそのregulationの解析に有意義であり、

また造血器疾患など病的状態での血小板産生の機構の変化を知る事が可能となろう。すなわちスプライスバリエーションを含め血小板での遺伝子発現regulationを知る上で貴重な情報である。さらに、汎用されている抗血小板薬に対する血小板の反応機構を知る上で大きな手がかりである。今後「アスピリン不応症」など抗血小板薬に対する反応の個体差の分子メカニズムを解明する上で有用な手段になると思われる。

## E 結論

血栓症と関連する因子に新たな遺伝子多型や変異を同定し、これらのうち幾つかは当該因子の血中濃度や機能、そして疾患と関連することを示した。虚血性脳血管障害と関連が予想された遺伝子多型の解析で、リスク型遺伝子を同時に複数有することは、CVD発症のリスクを増加させ、より早期の発症をもたらす可能性のあることが示唆された。また動脈血栓の形成に重要な血小板機能を調節するADAMTS13、血小板膜GPIIb/IX/V複合体やGPVIの多型と血栓症の関連を示した。またhTERTプロモーター領域内の遺伝子多型が機能と関係する可能性を示した。さらに、高純度の血小板から得たRNA解析により血小板に発現する遺伝子が多数同定され、今研究で初めて血小板のmRNAレパートリーが解析可能となった。

## 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

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* 14 (4): 387-394, 2003

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. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1 (10): 2198-2205, 2003

Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T. Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res.* 11(8): 997-

1001, 2003.

Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, Murata M, Saruta T. Relation Between Development of Nephropathy and the p22phox C242T and Receptor for Advanced Glycation End Product G1704T Gene Polymorphisms in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care.* 2004 Feb; 27(2): 303-7.

Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y. Detection of von Willebrand factor - cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 2; 313(1): 212-6.

Murata M, Maruyama T, Suzuki Y, Saruta T, Ikeda Y. Paraoxonase 1 192Gln/Arg polymorphism is associated with the risk of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* (in press, 2004)

Ishii K, Oguchi S, Moriki T, Yatabe Y, Takeshita E, Murata M, Ikeda Y, Watanabe K. Genetic analyses and expression studies identified a novel mutation (W486C) as a molecular basis of congenital coagulation factor

XII deficiency. Blood Coagulation and Fibrinolysis (in press, 2004)

石井啓子、小口修司、竹下栄子、村田 満、伊東大介、棚橋紀夫、福内靖男、斉藤郁夫、池田康夫、渡辺清明 虚血性脳血管障害と関係する遺伝子多型解析 臨床病理 52(1):22-7, 2004

## 2. 学会発表

一色郁子、森木隆典、村田 満 ほか、先天性凝固第 X 因子異常症 Factor X Tokyo (Gla32Gln)の機能解析 第 26 会日本血栓止血学会学術集会 平成 15 年 11 月、東京

Murata M, Uchida T, Suzuki M et al. Screening of single nucleotide polymorphisms in the ADAMTS13 (von Willebrand factor-cleaving protease) gene and studies on their association with stroke and coronary artery disease. 45th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology, Decembt with recurrent hemolytic-uremic syndrome. 45th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology, December 2003, San Diego, USA

Suzuki M, Murata M, Matsubara Y et al. ADAMTS13 (von Willebrand factor-cleaving protease) is

expressed in human platelets. 45th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology, December 2003, San Diego, USA

Matsubara Y, Murata M, Hayashi T et al. Polymorphisms of platelet glycoprotein Ib<sub>β</sub> affect its interaction with von Willbrand factor under flow conditions. 45th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology, December 2003, San Diego, USA

Isshiki I, Moriki T, Murata M, Ishihara H, Uchida T, Shibano T, Ashida S, Tabone MO, Van Dreden P, Ikeda Y, Favier R : Genetic analysis of hereditary factor X deficiency in a French patient of Sri Lanka ancestry: in vitro expression study identified Gly366Ser substitution as the molecular basis of the dysfunctional factor X. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Bermingham, UK, July, 2003

Oguchi S, Ishii K, Moriki T, Yatabe Y, Takeshita E, Nishida H, Murata M, Ikeda Y, Watanabe K. Genetic analyses and expression studies Identified two novel mutations (A392T and W486C) as molecular bases of two distinct families with congenital coagulation factor XII

deficiency. 45th Annual Meeting and  
Exposition, The American Society of  
Hematology, December 2003, San  
Diego, USA

村田 満：遺伝子は証に迫れるか？－  
SNP 解析による個別化治療の可能性－  
日本東洋医学会関東甲信越支部東京都部  
会講演会「東と西の対話」 平成16年  
3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

## 分担研究報告書