

厚生労働科学研究費補助金ヒトゲノム再生医療研究事業

平成15年度 分担研究報告書

血栓形成メカニズムの分子学的研究

主任研究者 池田康夫 慶應義塾大学医学部内科教授

研究協力者 一色郁子 慶應義塾大学医学部内科

座間 猛 慶應義塾大学医学部内科

研究要旨 本研究は血栓形成と関連する遺伝子にみられる遺伝的多様性（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、それぞれの遺伝子の血栓形成／抑制への関与ならびに血栓症発症への関与を探究し、ひいては血栓形成メカニズムの分子学的機序を解明することを目的としている。実験研究として今年度は、（１）血小板に発現する mRNA の網羅的解析を行い、（２）血管の老化と関連の深いヒトテロメラーゼ逆転写酵素サブユニット（h-TERT）遺伝子の多型の意義を検討し、さらに（３）血栓症の発症に最も重要な血液凝固因子であり近年抗血栓薬のターゲットとなっている凝固 X 因子の変異について検討した。その結果、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、今研究で血小板の mRNA レポートリーが解析可能となった。また hTERT プロモーター領域内の⁻¹³²⁷C/T 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。⁻¹³²⁷C/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。さらに今回の解析により、凝固 X 因子の遺伝子変異と血栓形成能の関連が明らかとなった。これらの結果は血液凝固因子、血小板などの血球や血管内皮細胞機能と SNPs との関連研究により、血栓の原因因子ならびに危険因子の解明が可能であることを示すとともに、動脈血栓形成に重要な役割を演じる血小板に対して分子生物学的アプローチが可能であることを示唆した。

A. 研究目的

血栓症は多因子病であり、環境因

子とともに複数の多型遺伝子が複雑

に絡み合って発症する。なかでも動

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。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当然であるが、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、その成果は合理的な薬剤開発と選択的適用に利用できる。今年度の研究で我々は、(1) ヒトゲノム情報の血栓研究へ応用の一つとして DNA チップを用い血小板に発現する mRNA の網羅的解析を行い、(2) 候補遺伝子アプローチ法の一つとして老化と関連の深いヒトテロメラーゼ逆転写酵素サブユニット (h-TERT) 遺伝子の多型の意義を検討、さらに(3) 血栓症に最も重要な血液凝固因子に着目し、なかでも近年抗血栓薬のターゲットとなっている凝固 X 因子の変異について実験研究を中心に遂行した。

B. 研究方法

(1) 血小板 mRNA の網羅的解析：
健康人より末梢血 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。

(2) h-TERT 遺伝子多型の意義：
hTERT のプロモーター領域の遺伝子多型の研究を行うため、はじめに健康人 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。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を検討するために実験研究 (ルシフェラーゼアッセイ)を行った。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。

(3) 変異型凝固 X 因子の機能解析:
11 歳の女兒 (スリランカ系フランス人) から見出された Gly366Ser 変異を対象とした。患者は APTT が 140 秒と著明に延長し、X 因子活性は 1% 未満、抗原量は 65%であり、CRM 陽性の X 因子欠損症と考えられた。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。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム遺伝子解析研究であり、合同指針の則り当該施設の倫理委員会で承認を受けた。すべての検体提供者から十分な説明の後インフォームドコンセントをえた。検体はすべて匿名化した後解析された。

C. 研究結果

(1) 血小板 mRNA の網羅的解析:
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 (表 1)。

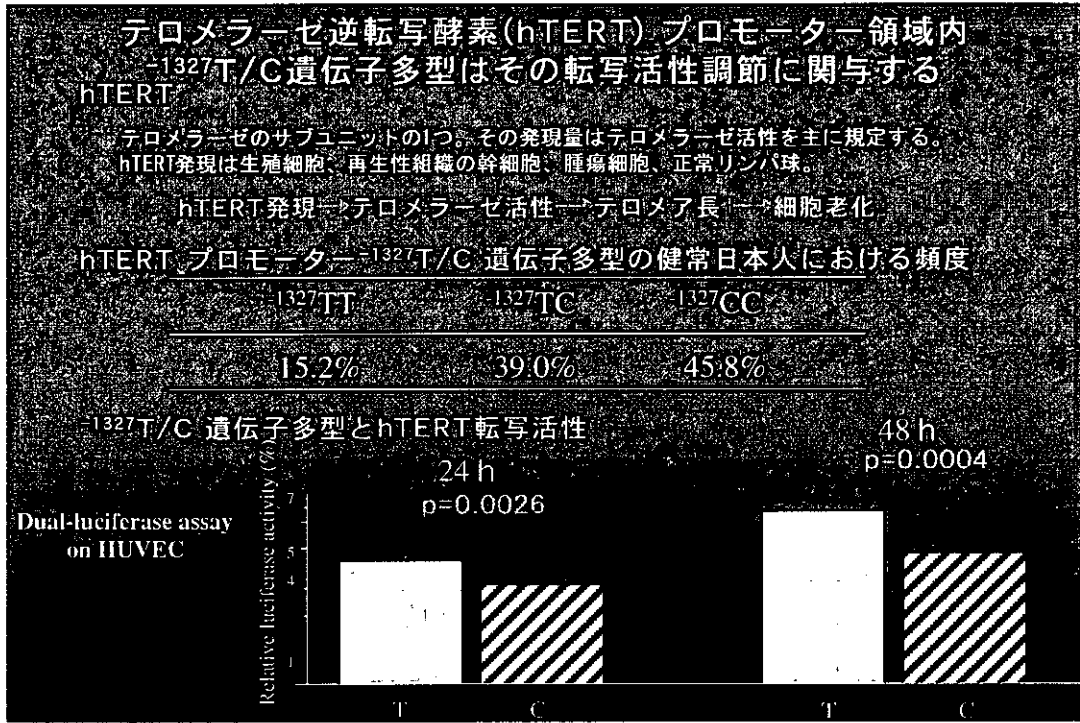
表 1
 血小板に発現する遺伝子
 (上位 30 より抜粋)

Alpha 1 globin	Beta-actin
Beta globin chain variant	Sickle cell beta globin
Mutant beta globin gene	Alpha-globin gene with flanks
Platelet factor 4	Hemoglobin alpha 1
Beta 2 microglobulin	Bacteriophage P1
H3 histon family 3A	Hemoglobin alpha 2
Ferritin	Pro-platelet basic protein
Protein kinase C substrate	18S rRNA
E-cadherin	Hypothetical protein FLJ20030

(2) h-TERT 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⁻¹³²⁷C/C 型 45.8%、⁻¹³²⁷C/T 型 39.0%、⁻¹³²⁷T/T 型 15.2% であった。よって⁻¹³²⁷C/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、⁻¹³²⁷C/C 型は⁻¹³²⁷T/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 (図 1)。次に⁻¹³²⁷C/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⁻¹³²⁷C/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⁻¹³²⁷C/C 型の遺伝子型頻度が高くなることが認められた。

図1



(3) 変異型凝固X因子の機能解析： 対象患者に、X因子の活性中心(serine protease domain) に変異が発見された(図2)。患者はホモ接合体と考えられた。

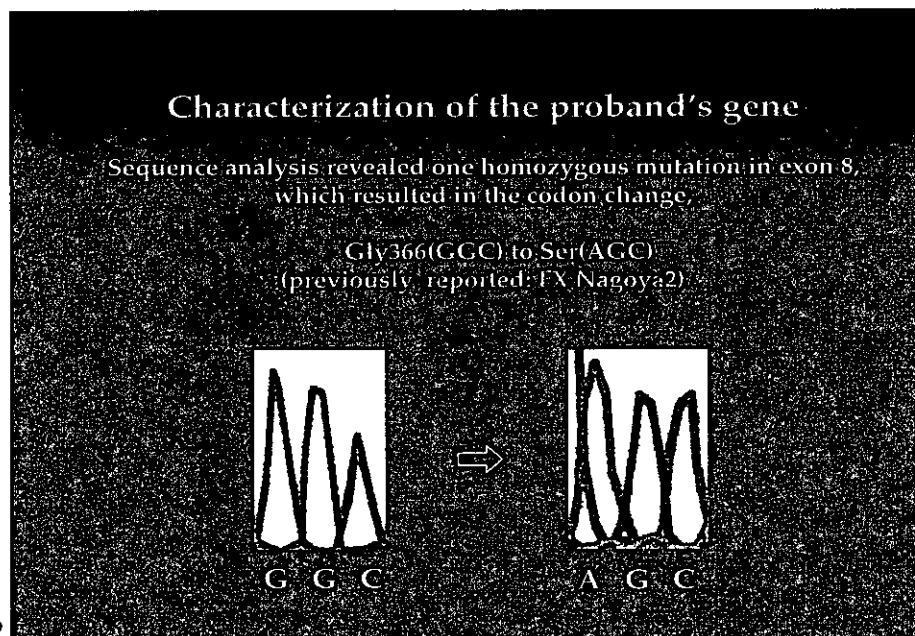
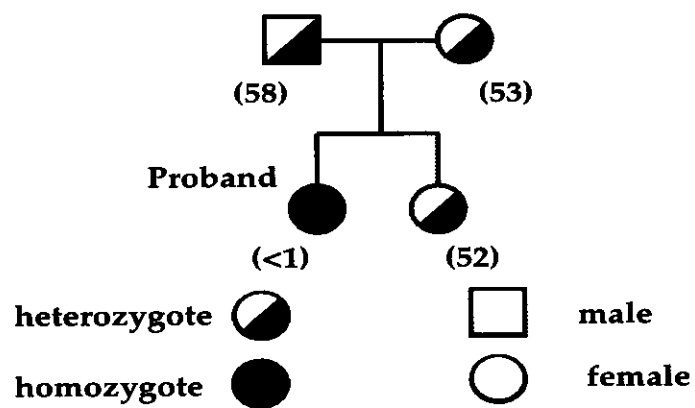


図2

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 (図3、図中の数値はX因子活性を示す)。

図3

RFLP analysis of family members



培養上清中のX因子抗原量は野生型 (図5)。
と比較し大きな差はなかった (図4、

in vitro expression of FXGly366Ser Western blot analysis

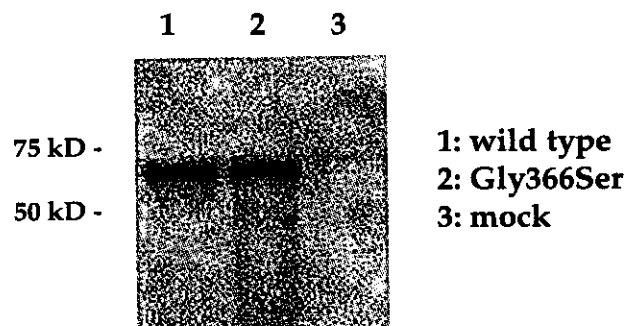
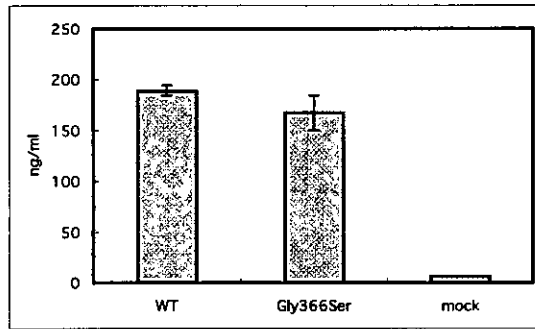


図4

図 5

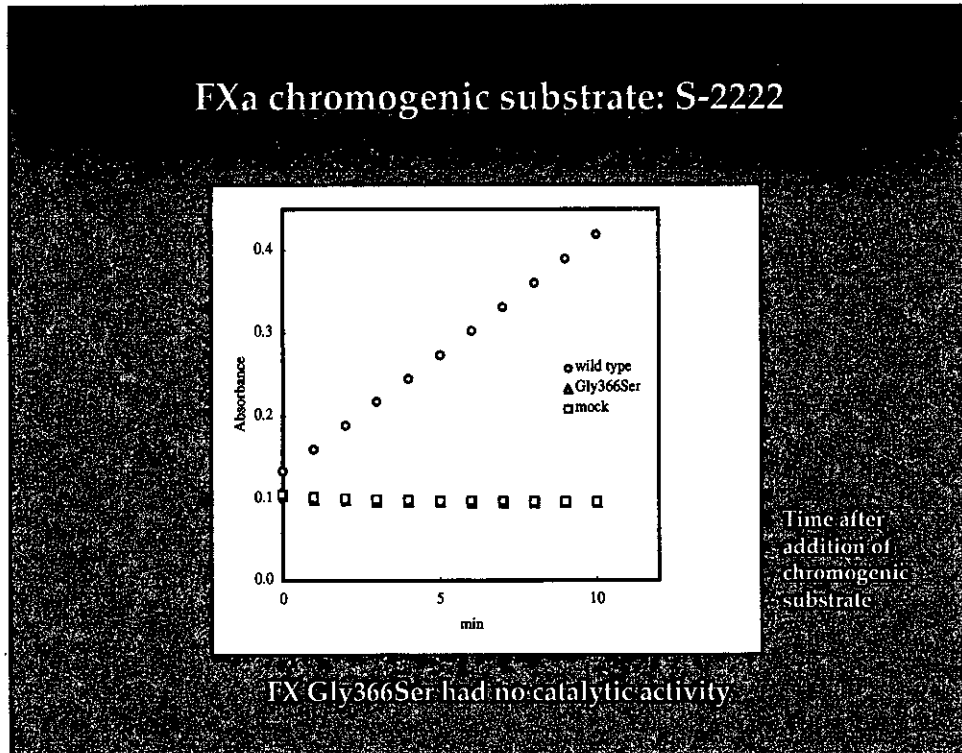
FX antigen levels in culture media determined with ELISA



There was no significant difference between the levels of wild type FX and mutant FX ($p=0.1007$, unpaired Students *t*-test, performed in triplicate).

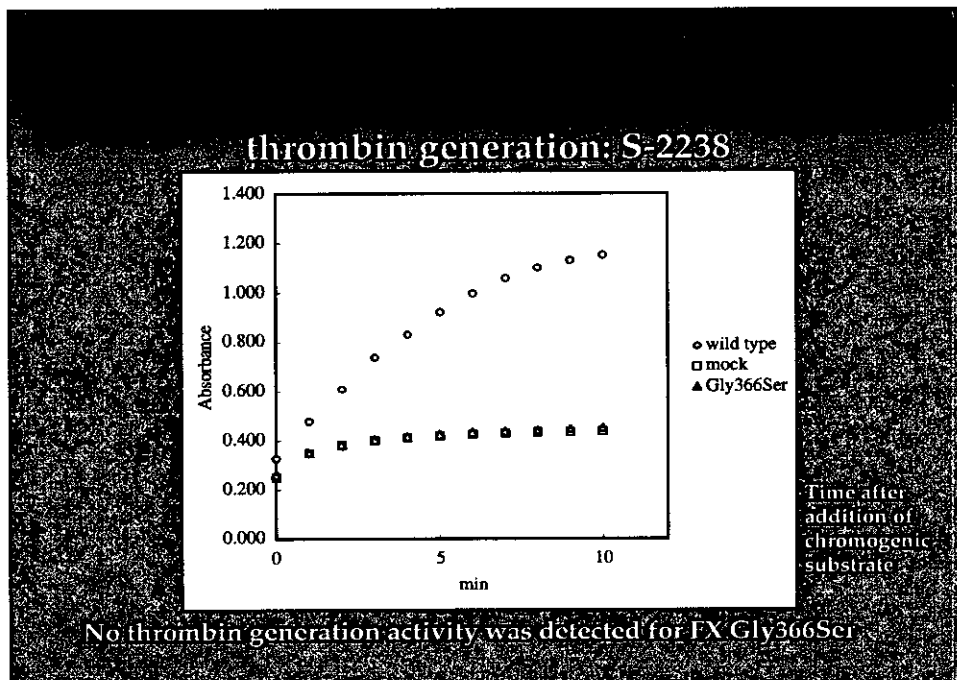
発色基質 S-2222 を用いた検討では いた (図 6)。
Gly366Ser の機能は著明に低下して

図 6



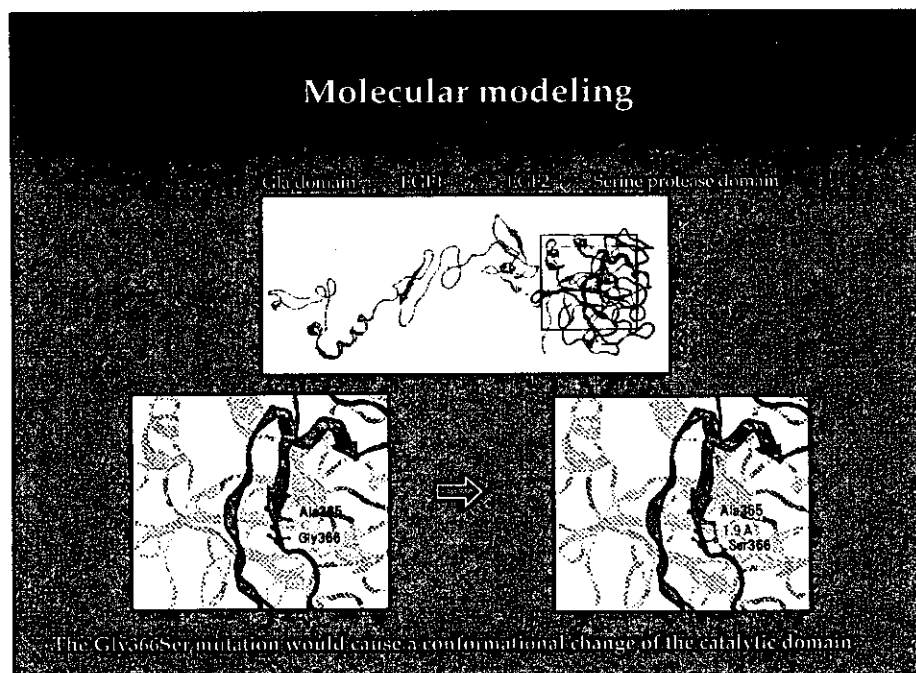
thrombin 発色基質を用いた検討でも いた (図7)。
 Gly366Ser の機能は著明に低下して

図7



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。

図8



D. 考察

(1) 血小板 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。

(2) h-TERT 遺伝子多型の意義 :

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⁻¹³²⁷C/T 遺伝子多型の⁻¹³²⁷C/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。

(3) 変異型凝固 X 因子の機能解析 :

今回解析した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。これら成績は、現時点では複合疾患と見なされている血栓症についても、長期的展望として血液凝固因子、血小板などの血球や血管内皮細胞機能と SNPs との関連研究により、原因因子ならびに危険因子の解明が可能である事を示唆している。

E. 結論

血小板 RNA を網羅的解析に解析し、発現遺伝子を同定することが可能となった。またヒトテロメラーゼ逆転写酵素サブユニットの⁻¹³²⁷C/T 遺伝子多型はその転写活性に影響を与え、冠状動脈疾患と関係することが示唆された。血液凝固因子の遺伝子変異と機能の関連につき解析した。これらの結果により血栓形成の分子メカニズムの一端を明らかにした。

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

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)

2. 学会発表

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. Birmingham, UK, July, 2003

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

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

厚生労働科学研究費補助金ヒトゲノム再生医療研究事業

平成15年度 分担研究報告書

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中央臨床検査部教授

研究協力者 勝川史憲 慶應義塾大学スポーツ医学研究センター講師

森木隆典 慶應義塾大学保健管理センター講師

研究要旨 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15年度は（1）脳血管障害に関して、これまでに収集された患者データと遺伝子多型データを総括的に解析した。脳血管障害と関連する遺伝子多型の解析で、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のあることが示唆された。（2）インスリン抵抗性と関係する分泌タンパクで最近クローニングされたレジスチン遺伝子において多型をスクリーニングし、発見されたSNPをレジスチン血中濃度や患者 phenotype と比較した。レジスチン遺伝子の一部のSNPは、インスリン抵抗性因子と関連する可能性が示唆された。（3）血液凝固ならびに線溶と関係が深い血液凝固 XII 因子に発見された遺伝子変異を *in vitro* で発現し、その機能解析を行うことにより、XII 因子の構造-機能関連を明らかにした。本研究で得られた情報は日本人の血栓症に關与する遺伝子多型の重要性を示しており、新たな遺伝子診断の道を開くものである。

A. 研究目的

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關与するものと考えられている。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。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關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15年度は、以下の点について検討した。（1）脳血管障害に関して、これまでに収集された患者データと遺伝子多型データを総括的に解析し、危険因子となる多型を同定した。（2）インスリン抵抗性と関係する分泌タンパクで最近クローニングされたレジスチン遺伝子において多型をスクリーニングし、発見されたSNPをレジスチン血中濃度や患者 phenotype と比較した。（3）血液凝固ならびに線溶と関係が深い血液凝固XII因子に発見された遺伝子変異を *in vitro* で発現し、その機能解析を行った。

B. 研究方法

（1）脳血管障害に関連する遺伝子多型の総括的解析：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、1,Fibrinogen β -chain（Fib β ; G-455A）2,Coagulation factor XII（F-XII; C46T）3,Plasminogen Activator Inhibitor-1（PAI-1 promoter; 4G/5G）4,Platelet glycoprotein（GPI b α ; Thr145Met）5,Atrial natriuretic peptide（ANP; G664A）6,Nitric-oxide synthase（NOS; 4repeat/5repeat）7,Angiotensin-converting enzyme（ACE; insertion/deletion）8,Serotonin receptor 5HT2A（T102C）9,Apolipoprotein E（APO-E; ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4）10,Cholesterylester transfer protein（CETP; Taq1 genotype of intron 1）11,Paraoxonase（PON;Gln192Arg）

12, Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR; C677T) 13, NADPH oxidase p22PHOX (His72Tyr) 14, Monocyte CD14 antigen (promotor C-260T) 15, 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

(2) 日本人におけるレジスチン遺伝子多型の解析：

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。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。

(3) 血液凝固 XII 因子に見出された遺伝子変異の機能解析：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クエンス法で塩基配列を決定した。この変異をPCI^{neo} (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。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム遺伝子解析研究であり、合同指針の則り当該施設の倫理委員会で承認を受けた。すべての検体提供者から十分な説明の後インフォームドコンセントをえた。検体はすべて匿名化した後解析された。

C. 研究結果

(1) 脳血管障害に関連する遺伝子多型の総括的解析：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、 χ^2 二乗検定で危険率 p が 0.1 以下だったのは GPI b α ($p=0.0956$)、APO-E ($p=0.0801$)、p22PHOX ($p=0.0760$) の 3 遺伝子のみであった。すなわち、GPI b α ではメチオニン (Met)、APO-E では E2 アリル ($\epsilon 2$)、p22PHOX では t アリルを有するタイプがそれぞれのリスク型遺伝子とされており CVD 患者では他の遺伝子多型項目よりもリスク型遺伝子の出現頻度が高率であった。さらに、3 つの遺伝子を、リスク型遺伝子をもつグループと持たないグループの 2 群とし分割表分析し、 χ^2 二乗検定を行ったところ、その危険率は GPI b α では 0.0464、APO-E は 0.0291、p22PHOX は 0.0234 であり、CVD 患者でこれらリスク型遺伝子を持つものが有意に多かった。他の 12 遺伝子については今回の解析では健常者との間に出現頻度の有意差は認められなかった。次に、CVD 患者の中でリスク型遺伝子を複数持つ患者について解析し、リスク型遺伝子が CVD の発症や病態とどのような関連があ

るかを検討した。ただし、今回の検討では、3 つの遺伝子すべてがリスク型遺伝子であるという例は CVD 群、コントロール群のなかで 1 例もなく、また、APO-E は例数が少ない為解析の対象から除外し、GPI b α と p22PHOX のリスク型遺伝子の組合せについて解析を加えた。GPI b α が Met タイプ、p22PHOX が t アリル、すなわちリスク型遺伝子を 2 つ有するものはすべての CVD 患者で 11 例 (5.5%)、どちらか一方のリスク型遺伝子を有するものはすべての CVD 患者で 72 例 (36.0%) であり、コントロール群とは危険率 0.0120 でその出現頻度に有意差を認めた。CVD の病態別でもラクナ梗塞、TIA で危険率 0.05 以下の有意差を認めたが、解析した例数が少ない為、病態別による詳細な検討は出来なかった。CVD 患者でリスク型遺伝子をもつ患者の、コントロール群に対するオッズ比を検討した。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 歳未満に限り解析すると、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。

(2) 日本人におけるレジスチン遺伝子多型の解析：R群およびS群の臨床背景を表1に示した。GLU、IRI、

HOMA-IRにおいて両群のあいだに有意差がみられたが、その他の項目においては有意な差はみられなかった。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。なお以後の解析においては、BioVendor社でのデータを用いた。

表1

	resistant		sensitive		p
n (M/F)	30(15/15)		30(15/15)		N.S.
age(years)	31.9±	9.7	32.2±	9.4	0.904
ht(cm)	165.0±	9.1	166.3±	10.0	0.615
wt(kg)	90.0±	14.9	90.0±	17.1	0.992
BMI	33.0±	4.7	32.5±	4.9	0.667
fGLU(mg/dl)	96.6±	7.9	89.7±	7.5	0.000
fIRI(μU/ml)	17.8±	6.0	10.1±	4.3	<0.000
HOMA-IR	4.22±	1.40	2.22±	0.98	<0.000
TC(mg/dl)	202.8±	34.1	203.4±	42.0	0.957
TG(mg/dl)	128.0±	61.9	115.2±	53.3	0.397
HDL-C(mg/dl)	47.7±	11.9	47.1±	11.8	0.853
LDL-C(mg/dl)	139.7±	25.0	132.6±	30.8	0.377
UA(mg/dl)	6.67±	1.20	6.39±	1.80	0.470
leptin(ng/ml)	14.7±	7.8	12.4±	6.7	0.235
adiponectin(ng/ml)	16.7±	11.8	16.7±	7.5	0.998
resistin-B*(ng/ml)	24.0±	15.1	23.8±	9.0	0.935
resistin-P**(ng/ml)	5.50±	2.66	5.12±	2.71	0.591

B* : BioVendor
P** : Phoenix
Mean ± SD

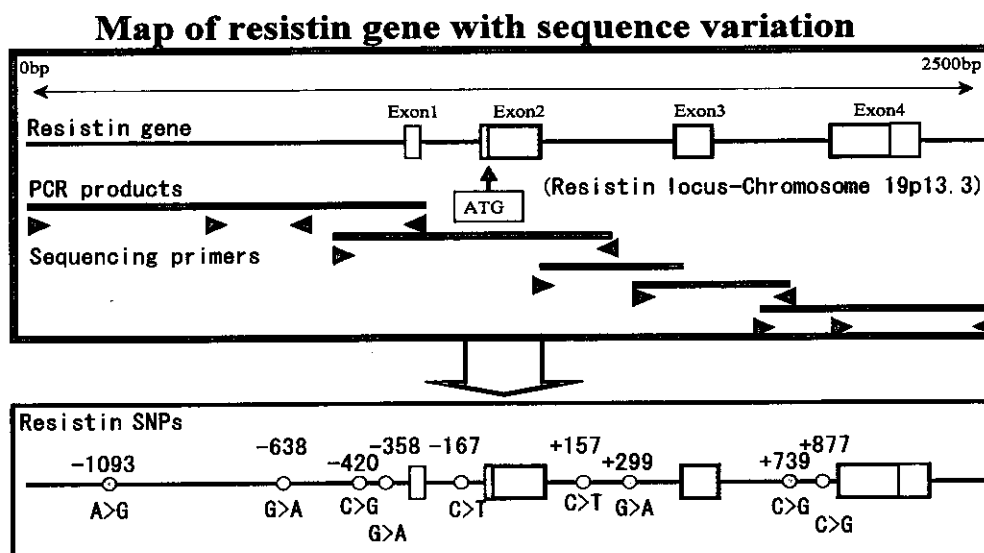
レジスチン遺伝子のマップを図1に示した。全長約2500bpのDNAについて、水色で示した5つのPCR

productを作成し、ピンクで示した位置にSequence primerを設定した。下段には、解析し得たレジスチン遺

伝子の SNP を示した。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。

図 1



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 群の出現頻度の間には有意な差は認められなかった (図 2)。

図 2

Genotype frequencies of resistin SNPs in patients with obesity

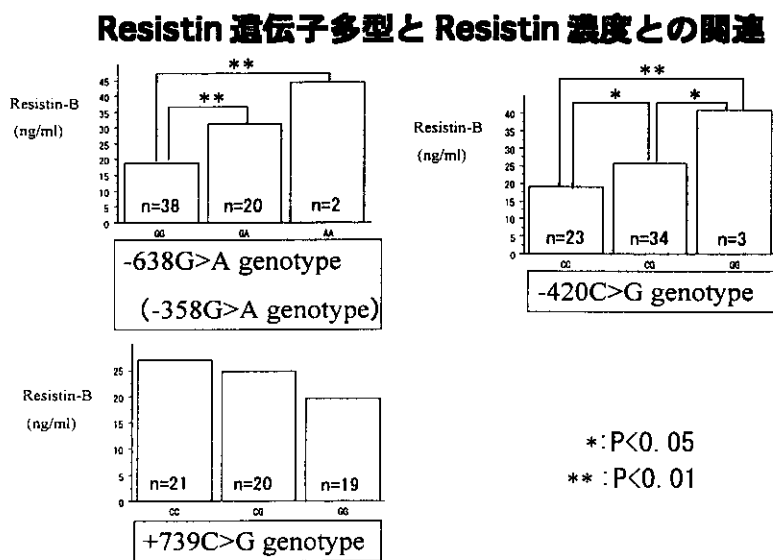
-1093A>G				
	AA(%)	AG(%)	GG(%)	p
Total	49 (81.7)	11 (18.3)	0 (0.0)	
S群	22 (73.3)	8 (26.7)	0 (0.0)	0.095
R群	27 (90.0)	3 (10.0)	0 (0.0)	

+739C>G				
	CC(%)	CG(%)	GG(%)	p
Total	21 (35.0)	20 (33.3)	19 (31.7)	
S群	11 (36.7)	11 (36.7)	8 (26.6)	0.697
R群	10 (33.3)	9 (30.0)	11 (36.7)	

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(図3)。

図3



(3) 血液凝固 XII 因子に見出された遺伝子変異の機能解析: 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(図4)。

図4

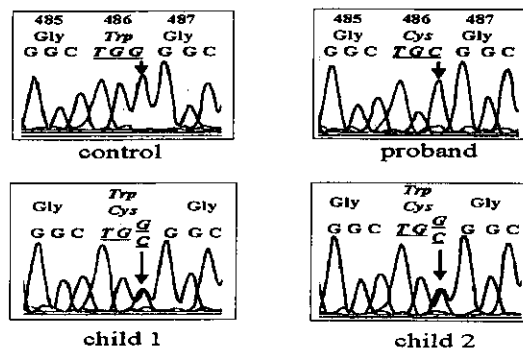


Fig.1

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。

図 5

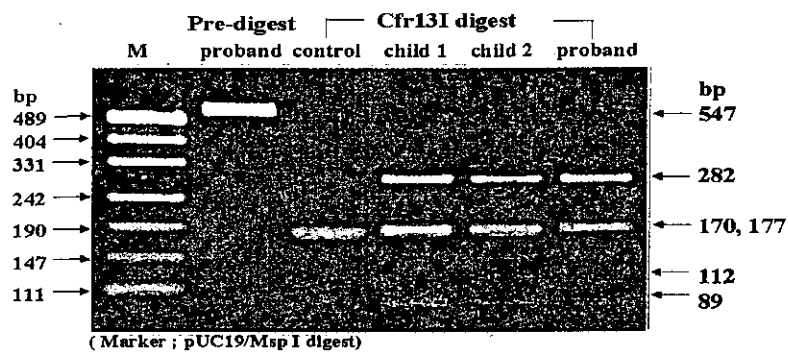


Fig.2

この変異を CHO 細胞に導入したところ、図 6 の Western blot に示すごとく 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。

図 6

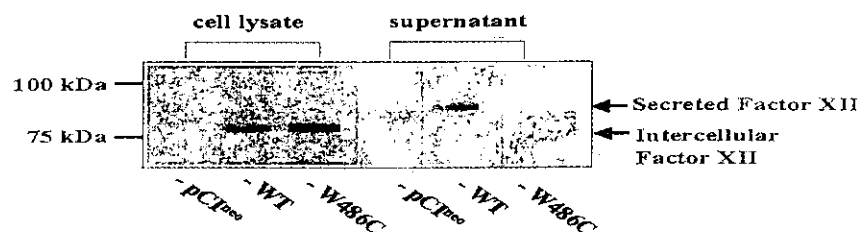


Fig.3