

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 (図 7)。

図 7

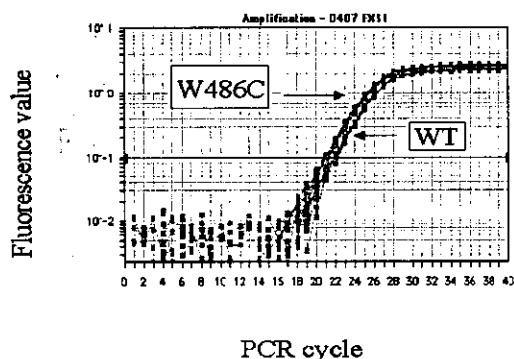


Fig.4

#### D. 考察

(1) 脳血管障害に関連する遺伝子多型の総括的解析：15 項目の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。

(2) 日本人におけるレジスチン遺伝子多型の解析：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/EBB $\alpha$  の結合やそれを調節する coactivator の P 300、CREB-binding protein などが関与している

とされている。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。

(3) 血液凝固 XII 因子に見出された遺伝子変異の機能解析：今回の検討により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。

#### E. 結論

血栓症と関連する因子に新たな遺伝子多型は変異を同定し、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。CVD 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。ま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。今後、症例数を増やした検討とともに、SNP がプロモーター活性に与える影響を in vitro の実験で検討することが必要と考えられる。さらに血液凝固 XII 因子の変異発現解析を通じて血栓症と密接に関連するこの分子の構造-機能関連を明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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、齊藤郁夫、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

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

村田 満、小口修司 血栓因子 SNP と動脈硬化 第会日本動脈硬化学会 シンポジウム 平成15年9月

## 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

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部内科講師  
研究協力者 松原由美子 慶應義塾大学医学部内科

研究要旨 本研究事業において我々は、動脈血栓症の遺伝的易罹病性を解明することを目的に、候補遺伝子アプローチ法を用いて各種因子の遺伝子多型と蛋白発現や機能、血栓症の易罹病性について検討している。平成15年度は、(a) 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、(b) 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) の多型と血栓症の関連、を検討した。(a) 日本人において ADAMTS13 遺伝子に SNP を発見した。このうちアミノ酸変化を伴うものは、Q448E, P475S, S903L であった。発現実験により、P475S は活性低下をきたすことが示された。虚血性脳血管障害患者 232 名、冠状動脈造影を施行された冠動脈疾患患者 191 名においてこれら 3 つの多型の遺伝子型頻度を検討したが、健常人と有為な差は見られなかった。また、健常人血小板に ADAMTS13 蛋白と mRNA をはじめて同定した。(b) 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。

A. 研究目的

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

て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。動脈血栓症は脳血管障害、心筋梗塞の原因となる。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動脈血栓症への体系的な取り組みは、

今、我が国に求められている最重要課題の一つである。本研究は血栓症、特に動脈血栓症の遺伝的易罹病性を解明することにより個人の発症リスクを予知し、適切な予防を講じる為の基礎データを蒐集することを目的としている。平成 15 年度は、(a) 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 (VWF) を分解することによって血栓形成を制御している VWF 分解酵素 (VWF-cleaving protease, 又は ADAMTS13) の遺伝子変異と血栓症の関連、(b) 同じく血小板機能を調節する血小板膜 GPIIb/IIIa/V 複合体 (VWF 受容体) の多型と血栓症の関連、について、変異が機能変化を起すか、機能変化が血栓症の易罹病性と繋がるか、について検討した。ADAMTS13 については、血球細胞での発現についても検討した。

## B. 研究方法

### (1) ADAMTS13 遺伝子における多型の探索、多型が機能に与える影響、

多型と血栓症の関連：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ことを目的とした。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。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。さらに患者-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。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。患者-対照研究は、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 (表 1)。

表 1

Characteristics and genotypes of control subjects, CAD, and CVD patients

	Control	CAD	CVD
Number	342	191	232
Age, y ( $\pm$ SD)	56.5 $\pm$ 6.6	52.6 $\pm$ 9.2	58.4 $\pm$ 7.6
Male/Female	226/116	182/9	181/51
Smoking, %	23.7	67.2	53.1
Hypertension, %	24.3	53.4	56.1
Diabetes mellitus, %	5.9	28.3	26.1
Hyperlipidemia, %	36.8	69.9	20.9

(2) 血小板での ADFAMTS13 の発現：健常人より末梢血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後の多血小板血漿を実験に供した。ADAMTS13 蛋白発現は特異抗体を用いた Western blot ならびに flow cytometry、血小板中 mRNA は特異 primer を用いた RT-PCR および  $\beta$  アクチンを standard とした定量的 RT-PCR (Taqman 法) によった。

(3) 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。

(倫理面への配慮)

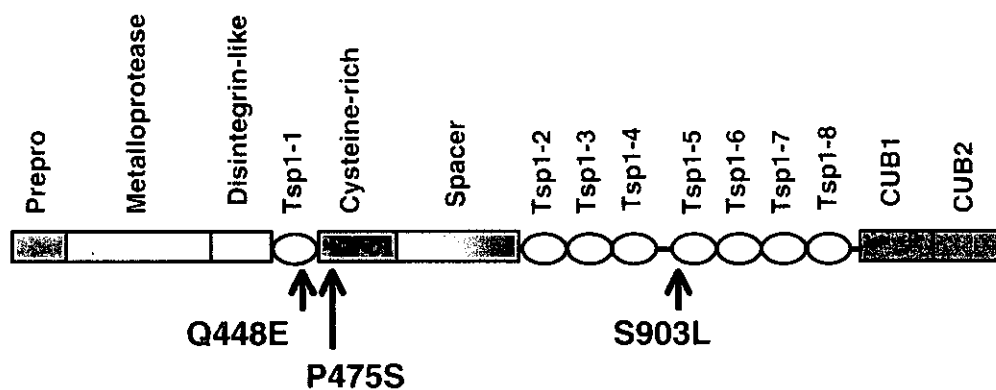
S903L を新たに発見した (図 1)。

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) ADAMTS13 遺伝子における多型の探索、多型が機能に与える影響、多型と血栓症の関連：数個の SNP を発見した。このうちアミノ酸変化を伴うものは既報 (Kokame et al, 2002) の Q448E, P475S に加え

図 1



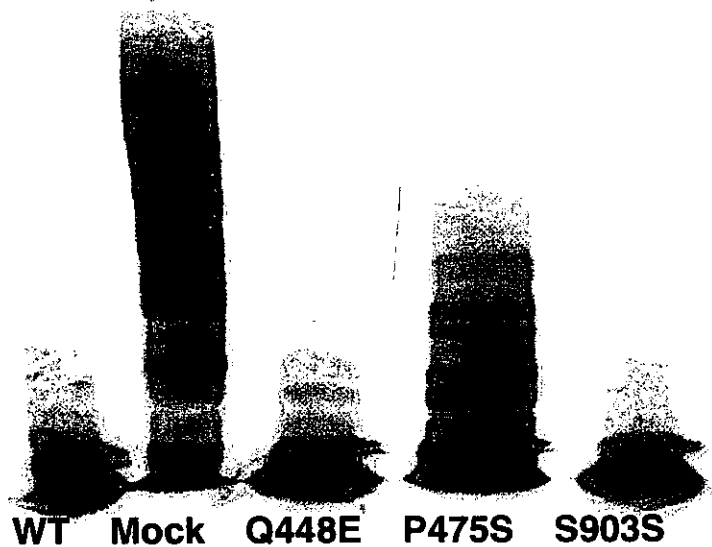
上記3つの変異を導入した vector を HEK293 細胞にトランスフェクトす

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(図 2)。

図 2



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(表 2)。

表 2

Genotype Distributions of the Three ADAMTS13 Polymorphisms

	Control (n=342) n (%)	CAD (n=191) n (%)	Stroke (n=232) n (%)
<b>exon12 Q448E</b>			
Q/Q	240 (70.1)	125 (65.4)	155 (66.8)
Q/E	90 (26.3)	57 (29.8)	62 (26.7)
E/E	12 (3.5)	9 (4.7)	15 (6.5)
<b>exon12 P475S</b>			
P/P	303 (88.6)	172 (90.0)	200 (86.2)
P/S	37 (10.8)	19 (9.9)	28 (12.1)
S/S	2 (0.6)	0 (0.0)	4 (1.7)
<b>exon21 S903L</b>			
S/S	313 (91.5)	175 (91.6)	211 (90.9)
S/L	27 (7.9)	15 (7.9)	21 (9.1)
L/L	2 (0.6)	1 (0.5)	0 (0.0)



(2) 血小板での ADAMTS13 の発  
現 : Western blot により、血小板に ADAMTS13 蛋白をはじめて同定した (図3)。

図3

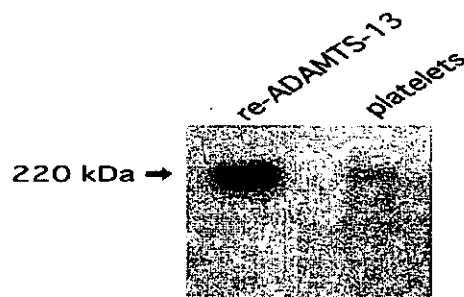


Figure 1. Suzuki M. et al.

ADAMTS13 は flow cytometry の結  
果では、permealize することにより  
発現が見られるようになることから、  
細胞表面には存在せず細胞内に局在  
すると考えられた (図4)。

図4

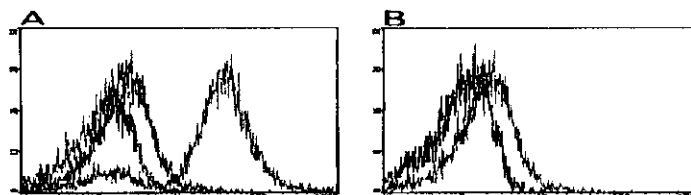


Figure 2. Suzuki M. et al.

次に6人の血液 donor につき血小板 lysate の定量的 PCR を行った。すべての個体に同様の発現が認められた (図5、表3)。

図5

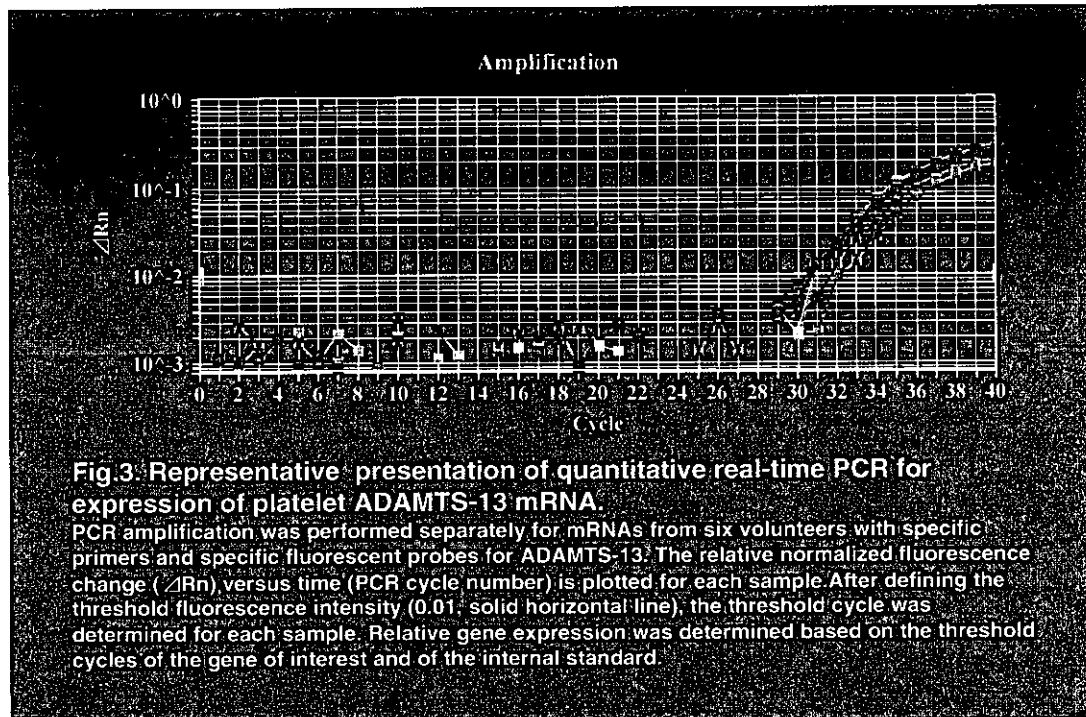


表3

TABLE 1. Ratio of the threshold cycle of  $\beta$ -actin versus that of ADAMTS-13. Data are expressed as the ratio of the threshold cycle (Ct) of the internal standard  $\beta$ -actin vs. ADAMTS-13.

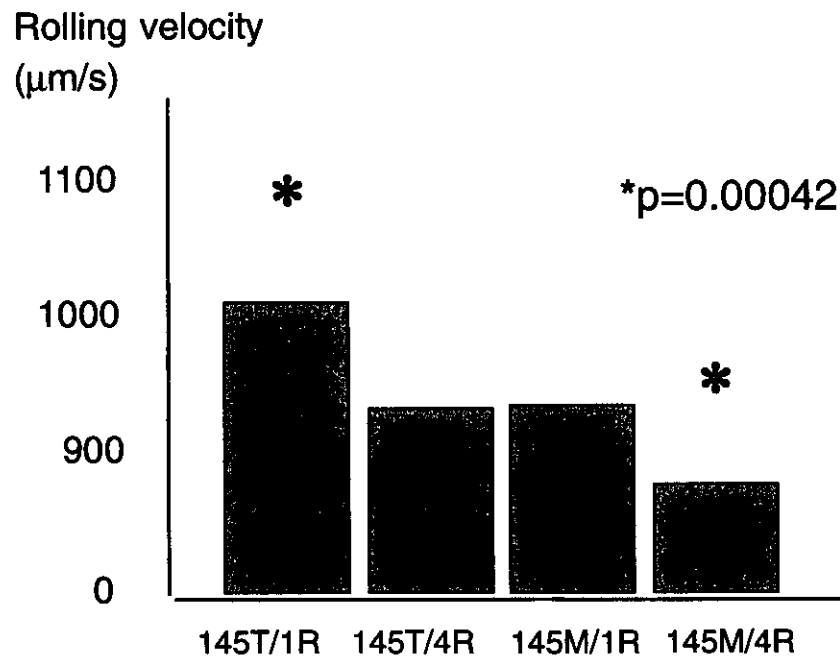
These are the means  $\pm$  SD from three independent determinations.

	Ct of $\beta$ -actin	Ct of ADAMTS-13	$\beta$ -actin/ADAMTS-13
PRP 1	15.99 $\pm$ 0.24	28.52 $\pm$ 0.36	0.563 $\pm$ 0.007
PRP 2	16.06 $\pm$ 0.11	28.16 $\pm$ 0.26	0.570 $\pm$ 0.005
PRP 3	16.47 $\pm$ 0.03	29.08 $\pm$ 0.25	0.567 $\pm$ 0.005
PRP 4	16.95 $\pm$ 0.06	29.62 $\pm$ 0.13	0.572 $\pm$ 0.003
PRP 5	16.79 $\pm$ 0.34	28.83 $\pm$ 0.19	0.583 $\pm$ 0.004
PRP 6	17.13 $\pm$ 0.04	30.47 $\pm$ 0.36	0.563 $\pm$ 0.007

(3) 血小板膜 GPIb $\alpha$ 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、ガラス板に認められなかった。

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、図 6 に示すように 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、これらの間に vWF 反応の差異は

図 6



#### D. 考察

(1) ADAMTS13 遺伝子における多型の探索、多型が機能に与える影響、多型と血栓症の関連：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。

(2) 血小板での ADFAMTS13 の発現：血漿中の ADAMTS13 活性が必ずしも TTP の発症や重症度と相関しないことや、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) 血小板膜 GPIIb/IIIa の多型の機能への影響：VWF 受容体のサブユニットである GPIIb/IIIa 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。GPIIb/IIIa 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 GPIIb/IIIa/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 種であるリリストセチンの存在下でその反応が認められる。GPIIb/IIIa 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 GPIIb/IIIa 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。

## E. 結論

日本人において ADAMTS13 遺伝子に新たな SNP を発見した。アミノ酸変異を伴うものに関しては活性低下をきたすものがあるが、CAD や CVD

との関連は見出されなかった。また、健常人血小板に ADAMTS13 蛋白と mRNA をはじめて同定した。GPIb $\alpha$  の <sup>145</sup>Thr/Met と繰り返し配列

(1R~4R) の遺伝子多型のうち、<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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

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.

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.

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

村田 満：血液凝固因子の遺伝子変異と静脈血栓症 第23回日本静脈学会総会シンポジウム 平成15年4月、東京

村田 満、小口修司 血栓因子 SNP と動脈硬化 第会日本動脈硬化学会シンポジウム 平成15年9月

村田 満 日本人の遺伝子多型と血栓症 - オーバービュー 第44回日本脈管学会総会シンポジウム 平成15年11月、福岡

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, December, 2003, San Diego, USA

Uchida T, Wada H, Iwashita M et al. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient

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 Iba 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

## 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

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）

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

分担研究者 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 中央臨床検査部助手

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。初年度および昨年度には、冠動脈疾患患者、特に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を対象として Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の C-1562T 多型、Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型、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、アンギオテンシン変換酵素(ACE)の遺伝多型を解析した。これらによって、冠動脈疾患の易罹病性や経皮的冠動脈形成術後の再狭窄発症を規定する遺伝的因子を明らかにしてきた。本年度は、初年度および昨年度に施行した検討の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。北欧を中心として肥満や動脈硬化に関連すると報告された Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型は、日本人には存在しなかった。この遺伝子多型は北欧人のみに存在する可能性が示唆された。

## 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。昨年度までの研究で、冠動脈疾患患者、特に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を対象として Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の C-1562T 多型、Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型、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、アンギオテンシン変換酵素(ACE)の遺伝多型を解析した。本年度は、初年度および昨年度に施行した検討の対象症例数を増加させることを目的とした。

## B. 研究方法

冠動脈疾患を有する患者、特に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て冠動脈の拡張に成功した患者を対象とした。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、アンギ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。

検討した遺伝多型は、Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の C-1562T 多型、Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型、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、アンギオテンシン変換酵素(ACE)の遺伝多型である。

### 1. Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の C-1562T 多型

Matrix metalloproteinase (MMP) は、粥腫破裂、血管新生、心筋梗塞後の左室リモデリングに関与する結合組織中に存在する蛋白分解酵素で



あり、この遺伝子の promoter 領域にある C-1562T 多型は MMP-9 の発現量を約 1.5 倍に増加させる。欧米人を対象とした研究で、多型と冠動脈疾患の関連が報告されたが、日本人においてはまだ関連性が検討されていない。

## 2. Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型

Neuropeptide Y は交感神経終末から分泌され、血圧や摂食行動の調節に関与すると報告されている。遺伝子の signal peptide 部分にある T1128C 多型がフィンランド人とオランダ人で発見され、アルコール摂取量の増加、血清コレステロール値、LDL-コレステロール値、頸動脈の内膜肥厚と関連することが示された。日本人を含めたアジア系人種におけるこの遺伝子多型の報告はない。

## 3. 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 に変異する多型であるが、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。

## 4. 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。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素はホモシステインの再メチル化を行う酵素のひとつで、ビタミン B12 と葉酸によって活性化される。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。高ホモシステイン血症は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。しかし、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。

## 5. 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が、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。

#### 6. 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。

#### 7. 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

### 1. Matrix metalloproteinase-9 遺伝子の C-1562T 多型

MMP-9 の C-1562T 多型は冠動脈疾患患者の 32%、健常対象の 31%に存在し、出現頻度に有意差を認めなかった。冠動脈疾患患者を心筋梗塞、労作性狭心症、急性冠疾患など疾患ごとに分類しても群間に差はみられなかった。発症年齢による多型性の頻度の差もなかった。冠動脈造影検査で診断した罹患冠動脈数で症例を分類すると、罹患冠動脈数が多い症例で T allele を有する頻度が有意に高かった。狭窄病変数が多い症例も有意に T allele を有する頻度が高く、特に狭窄病変を複数持つ症例の 41%が T allele を有していた。重症冠動脈病変例にこの多型が多く認められることは、糖尿病や喫煙、その他の危険因子の存在からは独立していた。また、初回冠動脈造影時に側副血行を持っていた症例には T allele が有意に多く認められた。さらに、6 カ

月以上の間隔をあけて複数回の冠動脈造影を施行した症例では、2回の検査の間に新しく狭窄病変が出現した症例でT alleleが多くみられた。

## 2. Neuropeptide Y 遺伝子の T1128C 多型

Neuropeptide YのT1128C多型は、冠動脈疾患群および健常対象群の合計361例中1例にも認められなかった。

## 3. ミトコンドリア DNA A5178C 変異

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 変異の5178Cが冠動脈疾患を有する群で有意に高率に認められた。再狭窄の有無と遺伝多型の出現頻度との間に有意な関連を認めなかった。

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

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、T alleleを有する症例で再狭窄が有意に少なかった。

## 5. Paraoxonase (PON)

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。また、再狭窄の有無と遺伝多型の出現頻度との間に有意な関連を認めなかった。

## 6. CD14 C-260T 変異

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。また、再狭窄の有無と遺伝多型の出現頻度との間に有意な関連を認めなかった。

## 7. アンギオテンシン変換酵素(ACE)

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、アンギオテンシン変換酵素の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。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。

## 8. 多項ロジスティック回帰分析

各遺伝多型間の交互作用も含めて検出するため、上記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odds ratio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