

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。ミトコンドリア DNA A5178C 変異の 5178C とアンギオテンシン変換酵素の D allele は、冠動脈疾患を有する群で有意に高率に認められ、冠動脈硬化との関連が示唆された。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。

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を持つ症例には若年で狭心症や心筋梗塞を発症する症例があり、動脈硬化の危険因子の一つと報告された。ホモシステインの再メチル化に関わる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、酵素タンパクを不安定化して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。

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が、これまでの報告では、ホモシステインの血中濃度が高い方が虚血性心疾患や脳血管障害などの動脈硬化性疾患を増加させるとされている。今後、ホモシステインの投与によって再狭窄を予

防できるかを冠動脈形成術を行う症例で検討しなければいけない。

Neuropeptide Y の T1128C 多型は、北欧を中心に認められ、肥満や食行動との関連性が指摘されているが、本研究の対象者中に 1 例にも認められなかった。フランス人にも T1128C 多型が存在しないと報告されており、この遺伝子多型が北欧人のみに存在する可能性が示唆される。また、本邦における冠動脈疾患の罹患にこの遺伝子が大きな効果を持っていないことを示す。遺伝子多型性の研究においては人種差が認められ、例え海外で冠動脈疾患との関連性が示唆されていない多型性であっても、日本人を対象とした研究で冠動脈疾患の易罹病性を検討しなければならない。

## E. 結論

MMP-9 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を持っていた。また、C-1562T 多型性は冠動脈の新規狭窄病変の出現と関連し、MMP-9 が冠動脈狭窄を進展させている可能性がある。

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子多型は、経皮的冠動脈形成術で冠動脈を拡張できた症例における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。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。

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。

3. その他  
なし

#### 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 49 回日本心臓病学会学術集会(2001 年 9 月)において本研究の一部を発表

#### 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

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）  
「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」  
分担研究報告書

「脳血管障害における血栓形成の遺伝子的素因の解析」

分担研究者 棚橋 紀夫 慶應義塾大学医学部内科学専任講師

**研究要旨**【目的】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。そこで我々は虚血性脳卒中と A561C 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 301 名より静脈血採血を行った。E-selectin の A561C の多型について PCR 法にて 358bp 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】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。【結論】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わかった。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。

**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。他のグループのデータでは E-selectin の A561C 一遺伝子多型は E-selectin の血清中濃度を有意に上昇させ、その多型を有する培養細胞は臍帯静脈血管内皮に対する結合能が高い。また、日本人の心筋梗塞患者と健常者の比較では A561C 多型を有することが心筋梗塞発症の相対危険度を 2.0 倍に押し上げることが報告されている。このような背景を元に白血球と血管内皮細胞の両者に発現し、その接着に関与し血栓形成の足がかりとなるセレクチンファミリー

の一つである E-selectin の多型、A561C 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  $58.7 \pm 4.4$  歳、 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ )と年齢、性別を一致させた健常者 301 例(年齢  $58.3 \pm 7.8$  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(制限酵素 Pst1)を用いて A561C 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・喫煙が統計学的に有意に高かった( $P < 0.01$ )。ロジスティック解析の結果、虚血性脳卒中と高血圧( $P < 0.01$ )、喫煙歴( $P < 0.01$ )、糖尿病( $P < 0.01$ )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、その相対危険度は 2.37 であった。

### D. 考察

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。

### E. 結論

古典的危険因子である糖尿病と高脂血症を除いた場合、虚血性脳卒中患者と健常人の間では E-selectin 遺伝子多型(A561C)に統計学的に有意差を認め、E-selectin が脳梗塞の発症リスクである可能性が示唆された。

### 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

第二十九回日本脳卒中学会総会 (平成 16 年 3 月 18 日、名古屋)

虚血性脳卒中患者における E-selectin 遺伝子多型の解析と検討

服部英典<sup>1)</sup>、棚橋紀夫<sup>1)</sup>、村田満<sup>3)</sup>、渡辺清明<sup>3)</sup>、斎藤郁夫<sup>2)</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. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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.	<i>Blood Coagulation and Fibrinolysis</i>	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.	27 (2)	303-7	2004
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	313 (1)	212-6	2004
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
Azuma K, Oguchi S, Matsubara M, Mamizuka T, Murata M, Kikuchi H, Watanabe K, Katsukawa F, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T.	Novel resistin polymorphisms: Association with serum resistin level in Japanese obese individuals.	Hormone and Metabolic Research	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

20030366

以降は、雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」及び下記の「その他」をご参照ください。

「その他」

血栓症 21 第2回シンポジウム

居石克夫

日本血栓止血学会誌.14 巻2号 Page160-184(2003)

血小板, 出血, 凝固

横山健次, 村田満, 池田康夫