

200400040A

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16年度 総括・分担研究報告書  
訂正版

抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定  
(H16-ゲノム-002)

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17 (2005) 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

抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定  
(研究課題番号：H16-ゲノム-002)

平成16年度  
総括・分担研究報告書

平成17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・リウマチ内科） 教授

(分担研究者)

村田満 慶應義塾大学医学部内科（血液・感染・リウマチ内科） 講師

猪子英俊 東海大学医学部（基礎医学系分子生命科学） 教授

鈴木則宏 慶應義塾大学医学部内科（神経内科） 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

### 抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定 (H16-ゲノム-002)

- I. 総括研究報告書 池田 康夫
- II. 分担研究報告
  - ① 抗血小板薬の反応性と関係する分子の機能研究 池田 康夫
  - ② 抗血小板薬の薬効評価の為に血小板機能検査 村田 満
  - ③ 全ゲノム解析による抗血小板薬の薬効を規定する遺伝子の同定 猪子英俊
  - ④ 脳梗塞患者の臨床像の解析 鈴木 則宏
  - ⑤ 脳梗塞患者における抗血小板薬の効果判定と血小板 mRNA プロファイリング 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

## 総括研究報告書

## 抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定

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** 高齢者の重要な疾患である急性冠動脈症候群や虚血性脳血管障害は、血小板が主体となった動脈血栓により発症する。動脈血栓症によっておこる疾患は我が国の死亡原因の第一位を占め、その予防は現代に求められる最重要課題の一つである。加齢とともに血栓症の頻度は増加する。高齢化社会を迎え血栓症の予防や治療が今後益々重要になることは間違いない。

動脈血栓症に対する再発予防、および最近では一次予防に抗血小板薬が頻用されている。しかしその予防効果は必ずしも十分とはいえない。その原因の一つとして抗血小板薬の効果に個人差が大きいことが指摘されてきた。特に最近、いわゆる「アスピリン不応症」の病態が明確になってきており、大規模研究でも不応症の患者では血栓の予防効果が低く、再発率が高いことが示されている。従って抗血小板薬に対する responder, non-responder の原因を突き止めることが急務となっている。これは個々の患者ごとに適切な抗血小板薬を選択する根拠となり、無効な薬剤の使用を減少させる効果が期待される。本研究は、抗血小板薬の効果の個体差の原因となる遺伝子を同定することを目的としている。研究初年度である 16 年度は対象者からの検体と臨床情報の蒐集、血小板機能評価、血小板発現遺伝子プロファイリング、全ゲノムスキャンの基礎検討を主な目的とした。抗血小板薬服用者の *ex vivo* 血小板機能評価法、健常人血液に *in vitro* で抗血小板薬を添加した際の血小板機能評価法を確立した。対象者の DNA を抽出するとともに幾つかの候補遺伝子についての多型検索を行い疾患との関連を見いだした。また whole genome 解析の予備検討を行い、抗血小板薬反応性（凝集能など定量的値）を指標にした QTL マッピングのための、3 万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析の準備が整った。マイクロアレーによる RNA 発現プロファイリングについても、血小板での実験の至適条件が見いだされた。

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

鈴木則宏 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

猪子英俊 東海大学医学部分子生命科学教授

### A. 研究目的

血小板機能は個体差が大きく、例えば健常人の血小板凝集能を例にとっても、凝集物質に対し非常によく反応し凝集を起こす個体と、全く凝集を起こさない個体が存在する。こ

の現象は経時的に観察しても同一個体ではよく保存され再現性が良好である。血小板機能の個体差には遺伝的な要因が想定されている。

アスピリンやチクロピジンなどの抗血小板薬は虚血性脳血管障害や冠状動脈疾患に対して世界中で非常に多くの患者に投与されている。数々の大規模臨床研究においてそれらの効果が立証され、動脈血栓症の再発予防や一部ではハイリスク患者の一次予防に用いられ、抗血栓薬としての地位はEBMとして確立されたものと考えられる。しかし一方では、その予防効果は不十分であり、アスピリンによる心血管イベントの減少率は40%程度にとどまり、薬効は必ずしも満足できるものではない。抗血小板薬の効果が不十分な原因として、血小板機能の抑制作用が弱いという指摘があるが、これまでの大規模研究においては薬剤効果の個体差が考慮されていない点が問題である。

アスピリンを投与しても血小板機能が十分に抑制されない、いわゆる「アスピリン不応症」なる状態が健常者のなかに少なからず認められることが近年判明している。同一個体では経時的に再検しても同様の結果が得られることから遺伝的要因が指摘されている。チクロピジンにも同様の現象が観察されており、これら

抗血小板薬に対する反応性の個体差が、虚血性脳血管障害や冠状動脈疾患における血栓症予防効果に影響している可能性が高い。事実、アスピリン不応症患者では実際に冠状動脈疾患での再発率が高いことが最近報告された。従って抗血小板薬効果の個人差の原因となる因子を見つけ出すことは今後のテーラーメイド医療に欠かす事の出来ないものである。

本研究は、抗血小板薬の効果の個体差の原因となる遺伝子を同定することを目的として平成16年度から開始された。初年度は血小板機能の個体差と関連する可能性のある血小板受容体/シグナル分子の機能解析、血小板機能と関連する個人個人のmRNA発現プロファイリング方法、抗血小板薬不応を最適に評価する為のin vitroでの血小板機能検査方法、さらに脳梗塞再発予防に用いる抗血小板薬の効果に対する遺伝因子の関与を検討していく上で他因子の関与を最小限に留めるため同一の臨床症状を呈した症例の梗塞巣を頭部MRIで確認し病巣の均一性を評価すること、近年アスピリンがヒト冠動脈血管内皮細胞において酸化LDLを介したLOX-1の発現を抑制する事が知られたことから、LOX-1多型が動脈硬化性虚血性脳卒中の発症リスクに与える影響につき検討を加え

た。加えて抗血小板薬の効果の個体差の原因となる遺伝子同定の為、多型マイクロサテライトマーカーを利用してマッピングの基礎となるゲノム上の遺伝的知見を集積し、ゲノムワイドなマッピングの基礎技術を完成させることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) マウス ES 細胞を用いた血小板機能解析：ES 細胞から in vitro 分化誘導により巨核球や血小板を得るために OP9 培養システムを用いた実験を行なった。このシステムはマウス ES 細胞を OP9 細胞と共培養を行ない、培養 5 日目から巨核球・血小板へ分化誘導を行なうためのサイトカインであるトロンボポエチンを加え 15 日間培養を行なう方法である。巨核球・血小板産生の評価は形態観察に加え、その特異マーカー(CD41)の発現や核の倍数(DNA ploidy)をフローサイトメトリー法にて行なった。血小板の機能検討はリガンド(フィブリノゲン)との結合試験を行なった。細胞を血小板活性化物質のトロンピンで刺激後、フィブリノーゲンと反応させてフローサイトメトリーで検討した。

分化誘導により得られた細胞から抽出した RNA から cRNA を作成し、そのビオチン標識後に fragment 化したサンプルを対象に microarray 解析

を行なった。

(2) hTERT：hTERT のプロモーター領域約 1.6kb の全遺伝子配列の解読を 17 人の白血球から抽出した DNA を対象に行い、<sup>-1327</sup>C/T 遺伝子多型を検出した(研究結果、参照)。

<sup>-1327</sup>C/T 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。

次にこの多型のテロメア長に対する影響を検討した。年齢がマッチするように<sup>-1327</sup>T/T 型と<sup>-1327</sup>C/C 型から 24 人、22 人をそれぞれ選び白血球より抽出した DNA を対象にサザンブロット法(Hinf I 制限酵素処理 DNA に<sup>32</sup>P 標識-テロメア配列をハイブリダイゼーション)にてテロメア長の算出を行った。

<sup>-1327</sup>C/T 遺伝子多型と 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。さらに CAD 患者におけ

るテロメア長の解析を行った。

(3)新規dual specificity phosphatase (DSP)の同定：発現ベクターの構築と変異体の作成は polymerase chain reaction (PCR) に基づく方法で行い、DNA シークエンスによりその配列を確認した。大腸菌由来の組換えタンパクの精製には、pGEXおよび pET-32b ベクター発現システムにより、glutathione S-transferase (GST) および His tagタンパクを発現させ、各々グルタチオンセファロース4B および Ni-アガロースを用いてアフィニティ精製した。細胞への遺伝子導入には、リポフェクタミンを用いた。免疫沈降には適切な抗体を結合したプロテインG-セファロースを用いた沈降反応を行い、SDS-PAGE後、Western blottingにより解析した。レポーターアッセイは、MEF2の転写活性に基づいた遺伝子発現を、レポーターとしてホタル由来ルシフェラーゼ発現ベクターpMEF2-Lucを用い、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ発現ベクターpRL-TKを共発現させトランスフェクション効率を補正する dual-luciferase assay system により行った。

(4) 抗血小板薬不応の評価法の最適化：responder, non-responderの評価は患者だけでなく、健常人の血小板にin vitroで抗血小板薬を直接添加

してその効果の違いを直接比較する必要がある。従って、対象者は(a) 抗血小板薬服用者、(b) 健常人、である。血小板機能の評価として(a)PFA-100、(b) Gorog Thrombosis Testの2つを用いた。前者では、クエン酸採血後、ASA (vehicle, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) をin vitroで添加し、PFA-100<sup>®</sup> (Dade) Collagen/Epinephrinカードリッジの閉塞時間を測定した。ASA 10  $\mu$ M添加時に、閉塞時間が300秒(カットオフ時間)のグループと300秒未満のグループに分け、それぞれを感受性グループ、低感受性グループとした。後者Gorog Thrombosis Test (GTT, Montrose Diagnostics, UK) は、抗凝固剤無添加native bloodを用いた血栓形成能評価法の一つである。GTTにおいて高ずり応力で活性化された血小板は下流の低ずり条件下で凝集塊を形成、凝集塊は更に下流の間隙を閉塞し血流を停止させる。その後、線溶の活性化に伴う血栓溶解により血流の再開が得られる。よって、閉塞時間は流動状態下での血小板血栓形成能の指標とされる。採血直後の全血を用いてGTTによる閉塞時間を測定した。

(5) 血小板のtranscriptome解析：健常人の血液65mLから遠心分離により得た血小板多血漿を白血球除去フィルターに通した。白血球は多量のRNA



を含むため、はじめに白血球除去の検討を行なった。フィルター処理無し、フィルター処理1回、フィルター処理2回、のそれぞれのサンプルの血小板数とRNA量を検討後、それぞれのRNAが含む血小板、白血球の解析を特異マーカーのCD41、CD20の解析用プライマーを用いてリアルタイム定量PCR解析を行った。さらに白血球については、細胞 $10^6$ 個から分離したRNA $1\mu\text{g}$ が100%の効率でcDNAになったと考え、そのcDNAの1/2順次希釈系列サンプルとCD20を検出プローブとして行なったりリアルタイム定量PCRの結果から鑄型サンプル(RNA 100ng)が含む白血球数の計算を行なった。赤血球の混在を検討するため、上記法のフィルター処理1回、2回のサンプルに加えて赤血球特異マーカーCD71を用いた磁気ビーズ・negative selection法を行なった。Microarray解析は白血球除去フィルター2回血小板と白血球から抽出したRNAからcRNAを作成し、そのピオチン標識後にfragment化したサンプルを対象に行なった。

(6) 血小板VWF受容体GPIb多型と血小板機能の関連：血栓形成能に関与する因子のひとつとして、血小板の膜糖蛋白(GP; glycoprotein) Ib $\alpha$ /IX/V複合体に着目した。フォンウィルブランド因子(VWF; von

Willebrand factor)の受容体であるこの複合体のGP Ib $\alpha$ サブユニットはその細胞外の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。GP Ib $\alpha$ とVWFの反応は必ず応力依存性に血小板の活性化を引き起こす。したがって速い血流状態下の血栓である動脈血栓の形成時においてGP Ib $\alpha$ は重要な役割を演じていると考えられている。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)。これまでに我々や他の研究グループは<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いる。VWF反応への影響を検討するために遺伝子組換えたんぱくを用いた実験研究を行った。

(7) 脳梗塞患者の臨床像の解析：慶應義塾大学病院神経内科に入院した脳卒中患者のデータベースより神経学的に一側上肢遠位部の運動麻痺のみを呈した症例を抽出し頭部MRIについて病巣の比較検討を行った。

(8) LOX-1遺伝子多型解析：慶應義塾大学病院に通院中の発症時70歳以下の虚血性脳卒中患者(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名 (年齢58.7±4.4歳、mean±S.D.) と年齢、性別を一致させた健常人274名 (年齢58.3±7.8歳) より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。LOX-1(OLR1)遺伝子のG501Cのミスセンス一遺伝子多型について、末梢血リンパ球より抽出したDNAを用いてPCR法で453bpの遺伝子を増幅しSNuP法にてタイピングした。

(9) 全ゲノム解析：質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のためのDNAチップ技術 (MSチップ) の開発とゲノムワイドな多型マイクロサテライト30,000個の設定と各対立遺伝子の頻度の検索に関する研究を行った。本研究への参加について同意を得られた日本人健常人100人の末梢血を採取し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN) を用いてゲノムDNAの抽出・精製を行った。自動シーケンサーABI 3700 または3730 DNA analyzerにて電気泳動により、多型検索を行った。また多型マイクロサテライトの抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究については公開されている整列済みヒトゲノム配列データを利用して収集済み多型マイクロサテライトの位置を決定し、それまで未設定であった領域に効率よく設定が行えるよう、多型マイクロサテライ

トの抽出アルゴリズムを改良した。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム遺伝子解析研究を含み、合同指針の則り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) マウスES細胞を用いた血小板機能解析：

巨核球・血小板へ分化誘導を行なうためのOP9培養システムにおいて、培養8日で未成熟巨核球、培養12日で成熟巨核球に分化したことが形態観察とCD41陽性細胞のDNA ploidyが増加したことにより示された。培養15日で血小板サイズのCD41陽性細胞を認めた。この細胞はトロンピン刺激でフィブリノゲンとの結合を示した。したがって、これら結果はES細胞からin vitro分化誘導により機能を有する血小板が得られたことを示唆している。

培養12日と培養15日の細胞から抽出したRNAの発現profilingの比較の差をmicroarray解析で検討した結果、既知因子の上位15は (1) glycophorin A、(2) pro-platelet basic protein、(3) cytotoxic T

lymphocyte-associated protein 2alpha, (4) hemogen, (5) coagulation factor V, (6) glycoprotein Ib beta, (7) solute carrier family 4, (8) cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2alpha, (9) Kruppel-like factor 1, (10) erythroid associated factor, (11) carbonic anhydrase, (12) Rhesus blood group-associated A glycoprotein, (13) integrin alpha 2b, (14) aquaporin, (15) colony stimulating factor 2 receptor, beta 2であった。血小板に特異的に発現している因子の他に赤血球や白血球に発現が報告されている因子の発現が認められた。

## (2) hTERT :

17人の白血球から抽出したDNAを対象にhTERTのプロモーター領域約1.6kbの全遺伝子配列の解読を行った結果、翻訳開始より1375塩基上流のC/T塩基置換を2検体から検出した。さらに解析検体数を46としてこの遺伝子置換の頻度を検討した結果、<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。<sup>-1327</sup>C/T置換は集団の1%以上に存在するため遺伝子多型であることが認められた。

<sup>-1327</sup>C/T遺伝子多型がhTERTの転写活性に与える影響を検討のルシフ

エラーゼアッセイの結果、<sup>-1327</sup>T/T型は<sup>-1327</sup>C/C型に比し転写活性が高かった(p=0.00026)。

次にこの多型のテロメア長に対する影響を検討した。年齢がマッチするように<sup>-1327</sup>T/T型と<sup>-1327</sup>C/C型から24人、22人をそれぞれ選び白血球より抽出したDNAのテロメア長は<sup>-1327</sup>C/C型群ではテロメア長と年齢の逆相関が認められた(R=0.48, p=0.0245)が、<sup>-1327</sup>T/T型群ではその逆相関は認められなかった(R=0.14, p=0.529)。したがって解析を50才以上の集団とした結果、<sup>-1327</sup>T/T型群でのテロメア長(kb)(8.96±1.45)は<sup>-1327</sup>C/C型群でのそれ(7.60±0.71)に比し有意差をもって長いことが認められた(p=0.0470)。

<sup>-1327</sup>C/T遺伝子多型とCADの関係を検討するための疫学研究を行った。CAD患者104名での<sup>-1327</sup>C/C型の遺伝子型頻度(51.9%)は健常人115名でのそれ(36.5%)に比し高いことが示された(p=0.0218)。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。

さらにCAD患者におけるテロメア長の解析を行った。50才以上のCAD患者の白血球DNAのテロメア長(6.93±1.19)を解析して年齢がマッチ

する健常人群のテロメア長  
( $8.28 \pm 1.31$ )を比較解析した結果、患者群で有意に短かった( $p=0.0137$ )。

### (3)新規 dual specificity

phosphatase (DSP)の同定：

新規ヒト dual specificity phosphatase (DSP)である SKRP4 が、ヒト組織において、心臓、骨格筋、骨髄、および精巣に発現していることを示した。また、骨格筋細胞の分化過程においてその発現が調節されていることを示し、現在までに PI3 kinase-Akt 経路における関与を明らかとした。

### (4) 抗血小板薬不応の評価法の最適化：

PFA-100：検診受診者73人を調べた結果、感受性グループは60人(82%)、低感受性グループは13人(18%)であった。低感受性グループではvehicle添加時のPRP比濁法(コラーゲン刺激)での凝集率が高く、TXB<sub>2</sub>産生量も多い傾向があった。GTT：閉塞時間は年齢、性別、BMI、血圧、喫煙、飲酒とは有意に関連しなかった。又、血小板数やフィブリノーゲンとも有意な相関を認めなかった。一方、フォンビルブランド因子(VWF:AgおよびVWF:RC<sub>0</sub>)、ヘマトクリット、及びHbA<sub>1c</sub>と負の相関を認めた( $p<0.05$ , 単回帰分析)。重回帰分析ではVWF:RC<sub>0</sub>とヘマトクリ

ットがOTと有意に関係していた。その他の動脈硬化危険因子と閉塞時間間に有意な相関は認めなかった。

### (5) 血小板のtranscriptome解析：

白血球混在についての検討結果は分離の精製度を1ランク上げると血小板数は約1/2ずつ、混在白血球の数は約1/2000、約1/15と減少を示した。RNA量は遠心分離のみに比べるとフィルター1回で約3/4量、フィルター2回で1/8量となったがこれらはいずれも本課題研究に用いるmicroarray解析サンプルの条件として決められているRNA量と質(たんぱく混入の量)を満たしていた。この方法による結果は同一個体での再現性と異なる個体での再現性を示した。また本検討から鑄型サンプル中、白血球48.8個以下の混在で本定量PCRでの検出限界となることが分かった。

赤血球混在の検討結果はフィルター処理1回のサンプルにこの方法を加えた時、血小板数は変化なし、フィルター処理2回のサンプルにこの方法を加えると血小板数は約1/200減少となった。RNAに関しては、RNA計測に用いる波長測定の際、含有たんぱく量に相当する280nmでの数値が高く、本課題研究に用いるmicroarray解析サンプルの条件として決められているRNA中のたんぱく混入の規定に達しなかった。赤血球

は減少を示したがリアルタイム定量 PCR による値は一定しなかった。

Microarray 解析は白血球除去フィルター2回血小板と白血球を対象に行なった。約 20,000 因子搭載の microarray 解析の結果、白血球サンプルに対して血小板サンプルで増加している既知因子を同定した。

#### (6) 血小板 VWF 受容体 GPIb 多型と血小板機能の関連：

145T と 145M を固相化したニトロセルロースメンブレンに  $^{125}\text{I}$  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結果、 $^{125}\text{I}$  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。2つめの実験研究、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 rolling velocity の検討結果は、145M/4R が 145T/1R に比し有意差をもって VWF と高い反応を示した ( $p=0.00042$ )。145T/4R、145M/1R は前述 2つの中間の値を示し、これらの中に VWF 反応の差異は認めなかった。

#### (7) 脳梗塞患者の臨床像の解析：

一側上肢遠位部に限局した運動麻

痺のみを呈する症例の頭部MRIでは大脳皮質運動野の中心前回にある precentral knob と呼称される領域の他、皮質下白質にも梗塞巣を認める症例が観察された。

#### (8) LOX-1 遺伝子多型解析：

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や古典的危険因子の間に相関関係は認められなかった。

#### (9) 全ゲノム解析：

ゲノムワイドに収集した約 30,000 個の多型マイクロサテライトについて、迅速な PCR 増幅産物の分子量測定を可能とする、高密度にサンプルを搭載した MS チップ作成のため、MALDI-TOFMS 用サンプルを微小スポットに搭載するためのスポットティング条件を検討した結果、1,000 スポット/cm 画密度をもつチップの作製に成功した。また、この高密度 MS チップ（微小スポット）におけるイオン化条件の検討を行っており、一部条件下において分子量の測定が可能となった。

### D. 考察

核の無い血小板は遺伝子改変が出来ないため、疫学検討や DNA、RNA を用いた解析により検出した血小板

機能や薬物感受性に関与する因子の機能検討を行うための遺伝子改変を行うことが出来ない。そこで我々はES細胞に着目した。ES細胞は多分化能を有するため巨核球や血小板をin vitroでの分化誘導により得ることが可能である。また、ES細胞は増殖能力に優れているため種々の解析の際も十分量のサンプルを安定に得られる。したがって、遺伝子改変ES細胞を増殖させた後、in vitro分化誘導により産生した(遺伝子改変)巨核球や血小板を用いて実験検討を行なうことが可能と考えた。最初の検討として行った今回の結果はES細胞からin vitro分化誘導により機能を有する血小板が得られたことを示唆している。分化誘導により得られた細胞RNAのmicroarray解析では血小板に特異的に発現している因子の他に赤血球や白血球に発現が報告されている因子の発現が認められた。これはトロンボポエチンが他の血球細胞への分化にも関与しているという既報に適合する結果と考えられるが今後、本解析を行う際のコントロール細胞として赤血球分化誘導細胞や白血球分化誘導細胞の必要性が考えられた。

CADは加齢とともにそのリスクは増大する。そして加齢と細胞老化は密接な関係がある。これまでにテロメア長は白血球や血管内皮細胞では

年齢と逆相関していること、またその長さは遺伝的に規定されていることが報告されている。さらにテロメアシステムは血管細胞の老化や冠状動脈疾患(CAD)にも深く関与していることが報告されている。そこで本研究では血栓形成能に関与する因子のひとつとして、細胞老化の機序に深く関与しているテロメアシステムにおいて重要な役割を有するhTERT、特にその発現調節部位であるプロモーター領域の遺伝子多型に着目した。高いhTERT転写活性と長いテロメア長に関係する<sup>-1327</sup>Tは細胞老化に対して防御的にはたらく機序を有することから、血管の細胞老化に深く関与するCADに対して低い有病率を示していると考察している。

SKRP4のヒトにおける疾患との関連を調べるために、その遺伝子座を調べたところ第10染色体上、10q22.3にあることが明らかとなった。次に、この染色体上の位置を原因遺伝子座とし、なおかつSKRP4の発現組織である心臓、骨格筋を侵す疾患を調べたところ、心筋症の一つである arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy /dysplasia (ARVD) type7 が挙げられた。この疾患は、心臓および骨格筋に局限して侵され、若年発症し、原因遺伝子が未だに同定されていない

心筋症の一つである。現在、この疾患との関連性を明らかにするために、欧米において報告がある罹患患者の genomic DNA を request しており、ヒト SKRP4 遺伝子を調べる予定である。また、in vivo における SKRP4 の生理的意義の解析のため SKRP4 を発現した transgenic mouse を現在作製中であり、これを用いて、SKRP4 の心臓、骨髄における発生過程ならびに生後における機能を検討する。

抗血小板薬不応の評価法の最適化に関する検討では、PFA-100を用いた検討から、in vitro で ASA を添加し血中濃度を担保した条件下でも、感受性にはバラつきがあることがわかった。低感受性の原因として元々の血小板機能が亢進している可能性が示唆された。また GTT によって、VWF:Ag、VWF:RCo、ヘマトクリット、HbA<sub>1c</sub> 高値による血小板血栓形成能の促進が検出された。今回の研究により閉塞時間が血漿 VWF 値と逆相関することが初めて明らかにされ、主にずり応力依存性の血小板機能を反映することが裏付けられた。しかし病的状態における診断意義については今後の研究を待たねばならない。

Microarray 解析を行う際、そのサンプル調整が結果に与える影響は大きい。サンプル RNA の量と質についての規定は Microarray 購入先のプロ

トコールに定められているが細胞の分離法や RNA の抽出法はそれぞれの実験により異なるため独自のプロトコールを確立する必要がある。我々は高純度血小板分離による血小板サンプルから microarray 解析に用いる RNA 抽出法のプロトコールをすでに有しているが今後本研究課題を行うためにはそのサンプルの白血球や赤血球の混在の定量データを得ることが必要であると考え、今回報告の検討を行った。白血球の除去法と混在率の定量解析法による結果は同一個体での再現性と異なる個体での再現性を示した。白血球は多量の RNA を含むためこれら方法の確立ができた意義は大きい。赤血球については、その RNA 計測に用いる波長測定の際、含有たんぱく量に相当する 280nm の数値が高く、本課題研究に用いる microarray 解析サンプルの条件として決められている RNA 中のたんぱく混入の規定に達しなかった。これは、磁気ビーズ・negative selection 法により赤血球は減少を示したがリアルタイム定量 PCR による値が一定せず、その定量値が得られなかったことの原因のひとつと考えられる。今後、赤血球からの RNA 抽出方法の再検討が必要と考えられる。

冠状動脈疾患・脳血管障害の大きな原因となる動脈血栓の形成におい

て GP Iba と VWF の反応は血小板活性化を引き起こすという点で重要である。GP Iba はこれまでに血栓症の危険因子となる遺伝子多型を有するが疫学研究で報告されていた。したがって今回はその関連の分子学的機序を解明するために遺伝子組換えたんぱくを作成して実験研究を行った。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 (<sup>145</sup>Met と 4R) が流動状態で高い VWF との反応を示したことから、血流内では <sup>145</sup>Met と 4R を有する血小板は VWF との反応性が高いため血小板を活性化方向へと導き、動脈血栓形成を招来しやすいと考察している。

LOX-1 に関しては aspirin が酸化 LDL を介した LOX-1 の発現を抑制する作用を有し、虚血性疾患の発症抑制にこれが働いていると考え、ミスセンス一遺伝子多型は動脈硬化性脳梗塞の発症リスクを減少させる方向に働くと考えられる。今のところ、aspirin の LOX-1 発現抑制は結果として生ずる現象であり、機能的意味を有さないとの考え方が支配的であるが、本研究の結果から虚血性脳梗塞においては両方の作用が働き、ミスセンス一遺伝子多型の発症への影響を減弱しているとも考えられる。

## E. 結論

初年度である平成 16 年度は対象者からの検体と臨床情報の蒐集、血小板期の評価、血小板発現遺伝子プロファイリング、全ゲノムスキャンの基礎検討を主な目的とした。抗血小板薬服用者の ex vivo 血小板機能評価法、健常人血液に in vitro で抗血小板薬を添加した際の血小板機能評価法を確立した。対象者の DNA を抽出するとともに whole genome 解析の予備検討を行った。抗血小板薬反応性（凝集能など定量的値）を指標にした QTL マッピングのための、3 万個のマикроサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析の準備が整った。microarray による RNA 発現プロファイリングについても、血小板での実験の至適条件が見いだされた。

## 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

Matsubara Y, Murata M, Hayashi T, Suzuki K, Okamura Y, Handa M, Ishihara H, Shibano T, Ikeda Y.



Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions.

Br J Haematol 128(4):533-9, 2005

Hattori H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N. T280M and V249I polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1 and ischemic cerebrovascular disease. *Neurosci Lett.* 2005; 374: 132-135.

Shigenari A, Yasue H, Inoko H, *et al*: Nucleotide sequencing analysis of the swine 433-kb genomic segment located between the non-classical and classical SLA class I gene clusters. *Immunogenetics* 55: 695-705, 2004.

Hui J, Tamiya G, Inoko H, *et al*: Identification of two new C4 alleles by DNA sequencing and evidence for a historical recombination of serologically defined C4A and C4B alleles. *Tissue Antigen* 63: 263-269, 2004.

Li S, Naruse T, Inoko H, *et al*: Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell

transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. *Tissue Antigens* 63: 362-368, 2004.

Koishi S, Inomata J, Inoko H, *et al*: Notch4 gene polymorphisms are not associated with autism in Japanese population. *Am J Med Genet* 125B: 61-62, 2004.

Ohtsuka M, Ozato K, Kimura M, *et al*: Rapid screening of a novel arrayed medaka (*Oryzias latipes*) cosmid library. *Mar Biotechnol (NY)* 4: 173-178, 2004.

Hurt P, Inoko H, Himmelbauer H, *et al*: The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Research* 4: 631-639, 2004.

Imanishi T, Sumio Sugano, *et al*: Integrative Annotation of 21,037 Human Genes Validated by Full-Length cDNA Clones. *PLoS Biology* 2: 1-20, 2004.

Shiina T, Kulski JK, Inoko H, *et al*: Comparative genome analysis of two avian (Quail and Chicken) MHC regions. *J Immunol* 172: 6751-6763, 2004.

Mano S, Tamiya G, Gojobori T, *et al*: Notes on the maximum likelihood estimation of haplotype

frequencies. *Annals of Human Genetics* 68: 257–264, 2004.

Ohtsuka M, Inoko H, Kimura M, *et al*: Comparative analysis of a 229 kb medaka genomic region, containing that *zic1* and *zic4* genes, with Fugu, and mouse. *Genomics* 83: 1063–1071, 2004.

Ohtsuka M, Kimura M, Inoko H, *et al*: CHOP: Visualization of ‘wobbling’ and isolation of highly conserved regions from aligned DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 32: W53–W58, 2004.

Shimizu S, Kulski JK, Inoko H, *et al*: MHC class IIB gene sequences and expression in quails (*Coturnix japonica*) selected for high and low antibody responses. *Immunogenetics* 56: 280–191, 2004.

Ohtsuka M, Inoko H, Kimura M, *et al*: Possible roles of *zic1* and *zic4*, identified within the medaka Double anal fin (Da) locus, in dorsoventral patterning of the trunk–tail region (related to phenotypes of the Da mutant). *Mech Dev* 121: 873–882, 2004.

Kulski JK, Anzai T, Shiina T, Inoko H: Rhesus Macaque Class I

Duplicon Structures, Organization and Evolution within the Alpha Block of the Major Histocompatibility Complex. *Mol Biol Evol.* 11: 2079–2091, 2004

Niizeki H, Inoko H, Streilein JW, *et al*: The MICA5.1 allele is not associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. *J Dermatol Sci.* 35: 221–223, 2004.

Matsuzaka Y, Kulski JK, Inoko H, *et al*: hRDH-E2 gene polymorphisms, variable transcriptional start sites, and psoriasis. *Mamm Genome.* 15: 668–675, 2004

Romphruk AV, Inoko H, Leelayuwat C, *et al*: Major histocompatibility complex class I chain-related gene A in Thai psoriasis patients: MICA association as a part of human leukocyte antigen-B-Cw haplotypes. *Tissue Antigens* 63: 547–554, 2004.

Farjadian S, Bahram S, Inoko H, *et al*: Molecular analysis of HLA allele frequencies and haplotypes in Baloch of Iran compared with related populations of Pakistan.

Tissue Antigens 64: 581-577, 2004

Yasuoka H, Okazaki Y, Inoko H, *et al*: Autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related gene A in patients with Behcet's disease. *Arthritis & Rheumatism* 50: 3658-3662, 2004

Shiina T, Inoko H, Kulski JK: An update of the HLA genomic region, locus information and disease Associations: 2004. *Tissue Antigens* 64: 631-649, 2004

Matsumoto T, Yukawa W, Inoko H, *et al*: Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. *Nucleic Acids Res* 32: 6069-6077, 2004

International Chicken Genome Sequencing Consortium (Hillier LW, Fulton LA, Inoko H *et al*): Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432: 695-716, 2004

Gourraud PA, Mano S, Inoko H, *et al*: Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens* 6 P 4:

543-555, 2004

Matsuzaka Y, Okamoto K, Inoko H, *et al*: Identification, expression analysis and polymorphism of a novel RLTPR gene encoding a RGD motif, tropomodulin domain and proline/leucine-rich regions. *Gene* 343: 291-304, 2004

## 2. 学会発表

松原 由美子、村田 満、林 朋博、鈴木 啓二郎、岡村 陽介、半田 誠、石原 宏明、芝野 俊郎、池田 康夫 von Willebrand 因子との反応性に關与する GPIIb $\alpha$ の遺伝子多型 日本血栓止血学会誌 第 15 巻 第 15 号 437 頁 2004

中山 莊平、清水利彦、鈴木則宏他: 皮質下虚血性病巣が MRI 拡散強調画像により確認された pure motor monoparesis の 1 例. *神経内科* 61: 295-297, 2004

中山 莊平、清水利彦、野川 茂、天野隆弘、棚橋紀夫 MRI 拡散強調画像が診断に有効であった pure motor monoparesis の 1 例 第 27 回運動障害研究会 (平成 16 年 1 月 24 日, 東京)

Takemoto Y, Ohono S, Inoko H, *et al*: The origin of Behcet's Disease in terms of generation of HLA-B\*51. XI. International Conference on Behcet's Diseases

Inoko H: Genome scan of multi-factorial diseases by association analysis with microsatellites. the 12th Symposium on International Medical Cooperation, 2004.

Inoko H: Genome scan of multi-factorial diseases by association analysis with microsatellites. Plenary Lecture, 29th International Conference on Animal Genetics, 2004.

#### H. 知的所有権の取得

特許取得

EP 03103543.9、Gene mapping method using microsatellite genetic polymorphism markers

2004-97934、関節リウマチ検査用マーカー遺伝子

実用新案登録 なし

その他 なし