

分担研究報告書

抗血小板薬の反応性と関係する分子の機能研究

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 座間 猛 慶應義塾大学医学部講師
松原由美子 慶應義塾大学医学部助手
青木亮子 慶應義塾大学大学院

研究要旨 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。抗血小板薬効果の個人差の原因となる因子を見つけだすことは今後の医療に欠かす事の出来ないものと考えられる。本研究は抗血小板薬の反応性と関係する可能性のある分子を同定し、それら分子の基礎的機能研究を行うことを目的としている。血小板研究の問題点のひとつに、血小板は無核のため遺伝子改変が出来ないことが挙げられる。そこで多分化能を有する胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて血小板前駆細胞の段階で遺伝子改変を行う為の基礎検討を行った。今年度の研究からマウス ES 細胞から *in vitro* 分化誘導法により巨核球と機能を有する血小板を得られたことを形態観察、発現解析、機能解析、microarray 解析により示した。また我々は、抗血小板薬不応状態の原因の一つとして個体のもともとの血栓形成能の亢進を提唱してきたが、今回、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) に着目し、hTERT⁻¹³²⁷C/T 遺伝子多型の⁻¹³²⁷T は高い転写活性と長いテロメア、そして CAD の有病率が低いことを示し、抗血小板薬による治療を考える上で貴重な知見を得た。さらに心血管病・動脈硬化の発生・進展において重要な役割を演じる dual specificity phosphatase (DSP) に注目し、新規ヒト 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。

A. 研究目的

血小板血栓によって発症する心筋

梗塞や脳梗塞は我が国の死亡原因の第一位を占め、その予防は 21 世紀の

医療に課せられた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。血小板機能の亢進と心血管死との関係も疫学的に明らかにされている。アスピリンなどの抗血小板薬に対する反応性を規定する分子は多くが提唱されており、これらの基礎的機能を同定する事は、今後の心血管病の予防に甚だ重要である。ここでは幾つかの分子に的を絞り、それらの機能を遺伝子構造との関連において検討した。

(1) マウス ES 細胞を用いた血小板機能解析

血小板研究の問題点のひとつは、血小板は無核のため遺伝子改変が出来ないことである。そこで多分化能を有する胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて遺伝子改変を行う、すなわち研究ターゲット(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)の遺伝子改変を ES 細胞に行なった後、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を最終目的に本研究をデザインした。

(2) hTERT：本研究では血栓形成能に関与する因子のひとつとして、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) に着目した。hTERT は染色体末端の

テロメア伸長反応の逆転写酵素・テロメラーゼの活性サブユニット(逆転写酵素成分)であり、hTERT 発現量はテロメラーゼの活性を規定している。テロメアシステムの最終産物であり細胞老化に関与する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が報告されている。その白血球のテロメア長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。そこで今回はテロメアシステムにおいて重要な働きを有する hTERT、特にその発現を調節しているプロモーター領域の遺伝子多型と血栓症の関係を実験研究と疫学研究により検討した。

(3)新規 dual specificity

phosphatase (DSP)の同定：リン酸化シグナルは、真核生物に保存され、多彩な生理過程に重要な役割を果たす。serine/threonine phosphatase、tyrosine phosphatase、そしてそれらの活性を併せ持つ dual specificity phosphatase (DSP)は、このリン酸化シグナル経路における、ある特定部位での脱リン酸化によりその経路を不活化する。現在までに、Tyr 残基のリン酸化異常が、多くの遺伝的ならびに後天的疾患の発症に重要な

役割を担っていることが知られており、また、tyrosine phosphatase が、多くの生理過程の調節に特異的、主体的にその機能を果たしていることが明らかとなっている。例えば、自己免疫疾患、糖尿病、遺伝性疾患、および筋疾患の原因遺伝子として同定された tyrosine phosphatase は、これまでに 14 種、また癌発症との関連についても少なくとも 30 種が知られている。しかしながら、現在、多くの protein tyrosine kinase の阻害剤が臨床応用される中、DSP を含む tyrosine phosphatase の阻害剤の開発は、未だ未発達な状況である。現実には、低分子阻害剤の開発は、in silico docking、NMR-based methods、high-throughput crystallization を利用した手法が、最も合理的である。そして、前述の疾患における tyrosine phosphatase の分子機構、および関与するリン酸化シグナル経路の調節を明らかにした上での、阻害剤の開発は臨床応用に適用できると考えられる。我々は、現在までに tyrosine phosphatase の一種である DSPs をいくつか同定し、その生理的機能および疾患との関連において解析しており、今回、このうち新規ヒト DSP である SKRP4 について報告する。

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(大理石病マウスのストロマ細胞)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、⁻¹³²⁷C/T 遺伝子多型を検出した(研究結果、参照)。

⁻¹³²⁷C/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⁻¹³²⁷T/T型と⁻¹³²⁷C/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³²P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。

⁻¹³²⁷C/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 (Amersham Biosciences) および pET-32b (Novagen) 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 (Amersham Biosciences) および Ni-アガロース (Qiagen) を用いてアフィニティ精製した。哺乳動物細胞培養において、HeLa 細胞株は、10%仔ウシ血清と L-グルタミン、抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン) を添加した ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で培養した。ヒト骨格筋衛星細胞 Human Skeletal Muscle Cell (SkMC)ならびにラット胎児心筋細胞 H9c2 細胞株は、各々20%および10%ウシ胎仔血清と L-グルタミン、抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン) を添加した DMEM で培養した。尚、血清除去による分化培地としては、各々2%ウマ血清あるいは1%ウシ胎仔血清を添加した DMEM で培養した。また、これらの細胞への遺伝子導入には、リポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を用いた。免疫沈降には、細胞溶解バッファーによる細胞懸濁液を調整し、適切な抗体を結合したプロテイン G-セファロース (Amersham Biosciences)を用いた沈降反応を行い、SDS-PAGE 後、

Western blotting により解析した。細胞溶解バッファーには、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、12mM beta-glycerophosphate、1mM sodium orthovanadate、2mM EGTA、3mM dithiothreitol、そして protease inhibitor mixture (Complete, Roche Diagnostics)を含むバッファーを用いた。また、in vitro phosphatase assay は、50mM imidazole (pH 7.5)、5mM dithiothreitol、そして基質として20mM p-nitrophenyl phosphate (pNPP)を含むバッファーを用い、37℃、1時間にて反応を行い、反応終了後、phosphataseによるpNPPの加水分解反応は405nmにおける吸光度で計測した。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 (Panomics) 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 (Promega)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 (Promega)により行った。

(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。この細胞はトロンビ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の比較の結果を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、⁻¹³²⁷C/C型45.8%、⁻¹³²⁷C/T型39.0%、⁻¹³²⁷T/T型15.2%であった。⁻¹³²⁷C/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。

⁻¹³²⁷C/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ェラーゼアッセイの結果、⁻¹³²⁷T/T型は⁻¹³²⁷C/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⁻¹³²⁷T/T型と⁻¹³²⁷C/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¹³²⁷C/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、⁻¹³²⁷T/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、⁻¹³²⁷T/T型群でのテロメア長(kb)(8.96±1.45)は¹³²⁷C/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)。

⁻¹³²⁷C/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⁻¹³²⁷C/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⁻¹³²⁷C/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±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 :

我々は、2002年に報告した dual

specificity phosphatase (DSP)である SKRP1 と family を形成する DSP を、degenerate PCR により HeLa 細胞より cloning した。これらは、各々 SKRP2、SKRP3、SKRP4 とし、その生化学的解析ならびに生理的解析をすすめてきた。SKRP4 は全長 198a.a. からなる分子で、その phosphatase catalytic domain はこれまでに報告されて来た DSP 同様、保存されている。SKRP4 の wild type ならびに、その活性中心である Cys を Ser に置換した SKRP4 C138S を大腸菌で発現させ、その培養後、精製した組換えタンパクを pNPP を基質として phosphatase 活性を測定した。結果、wild type において、時間ならびに量依存的に検出された phosphatase activity は、C138S 変異体においては検出されず、このことは SKRP4 C138S が phosphatase inactive mutant として dominant negative として機能し得ることを示唆した。次に、SKRP4 の細胞内局在を調べるために、我々は、EGFP-SKRP4 および EGFP-SKRP4 C138S を発現した安定発現細胞株 SKRP4/HeLa、SKRP4 C138S/HeLa を、そのコントロールとしての EGFP を安定発現した Vector/HeLa と共に作製した。作製後、各々の細胞抽出液を cytosol,

membrane/organelle、nucleus、cytoskeleton にて分画し SDS-PAGE 後、抗 GFP 抗体を用いた Western blotting にて局在を検出した。結果は、SKRP4 は cytosol および membrane/organelle に存在することが明らかとなった。尚、同時に行った EGFP-SKRP3 の安定発現細胞株 SKRP3/HeLa においては、その局在は cytoskeleton であり、このことは、SKRP4 の細胞内局在が tag である EGFP の影響を反映しないことを意味した。次に、SKRP4 が細胞内においても phosphatase 活性を持ち得るかどうかを調べるために、我々は、上記の安定発現細胞株より抗 SKRP4 抗体にて細胞内 SKRP4 を免疫沈降し、その phosphatase 活性を pNPP を基質として測定した。結果は、SKRP4/HeLa からの抗 SKRP4 抗体による免疫沈降物の phosphatase 活性は、Vector/HeLa および SKRP4 C138S/HeLa からの免疫沈降物と比較して phosphatase 活性を認め、このことは SKRP4 が細胞内においても活性を有することを示唆した。

組織における SKRP4 の発現においては、各組織の cDNA を SKRP4 特異的な primers にて PCR 増幅し、G3PDH を内部標準として検出した。結果、マウスにおいては、SKRP4 は

骨格筋および精巢にのみ認められたが、ヒトにおいては、それらに加え心臓、骨髄に発現されていることが mRNA レベルで明らかとなった。さらに、ヒト心臓においては、胎児よりも成人において発現が増すこと、また、左右の心房、心耳、心室、ならびに心室間中隔、房室結節においても発現が認められた。一方で、これまでに報告された DSP である SKRP1、JSP-1/VHX および MKP-6 においては、ヒト組織において、ほぼ全般的に認められた。次に、SKRP4 のタンパクレベルでの発現を確認するために、mRNA レベルにて発現が確認されたヒト心臓およびヒト骨格筋衛星細胞 Human Skeletal Muscle Cell (SkMC) の抽出液を SDS-PAGE 後、抗 SKRP4 抗体にて Western blotting を行った。結果は、予測された分子量 23kDa 付近に SKRP4 の発現を検出したが、ヒト脳、ヒト冠状動脈内皮細胞においては認められなかった。一方で、JSP-1/VHX においては、ヒト脳、心臓、骨格筋細胞、冠状動脈内皮細胞のいずれにおいても抗 JSP-1/VHX 抗体を用いた同 membrane での Western blotting によって発現を認めた。抗体は、ヒト SKRP4 の N 末端 17a.a. からなるペプチドをウサギに免疫し、血清を IgG 精製後、作製したもので、大腸

菌で発現、精製した各 DSP 組換えタンパクに対し、SKRP4 にのみ特異的に反応することを認めている。また、筋肉細胞の分化過程における SKRP4 の発現変化を調べるために、ヒト骨格筋衛星細胞 SkMC を用いて、分化後の mRNA およびタンパクレベルを、各々 RT-PCR、Western blotting を用いて検出した。結果は、mRNA においては、分化後 1 日目より増加を認め、3 日目より減少し、同様の結果がタンパクレベルにおいても得られた。

SKRP4 が、リン酸化 Tyr ならびにリン酸化 Ser/Thr のリン酸基を脱リン酸化できる dual specificity phosphatase (DSP) であるかどうかを調べるために、in vitro において活性化型 MAPK (Mitogen Activated Kinase)s と SKRP4 の組換えタンパクを混合し、活性化型 MAPKs の TXY motif のリン酸化を Western blotting にて検出した。MAPKs は、その活性化型において TXY motif の Thr および Tyr がリン酸化されることが知られているが、実験においては、tag を付加した MAPKs を哺乳動物細胞に発現し適切な刺激を加え、その細胞抽出液から tag に対する抗体を用いてリン酸化 MAPKs を得た。得られたリン酸化 MAPKs に、SKRP4 タンパクを加え、37°C、1 時間にて両者を

反応させ、反応後、抗リン酸化 Thr 抗体および抗リン酸化 Tyr 抗体を用いて Western blotting によりリン酸化の程度を検出した。結果は、in vitro においては、MAPK family member である ERK2、JNK2 および p38 α のいずれに対しても、リン酸化 Thr、リン酸化 Tyr のリン酸基を脱リン酸化することが示された。同様に、リン酸化 Ser の脱リン酸化においては、活性型が特定の Ser のリン酸化を受ける MAPK Kinase (MAPKK)s を基質として用いて、同様の実験により、SKRP4 がリン酸化 Ser のリン酸基を脱リン酸化することを示した。以上の結果より、SKRP4 はリン酸化 Tyr ならびにリン酸化 Ser/Thr のリン酸基を脱リン酸化する DSP であることが明らかとなった。

SKRP4 が骨格筋及び心臓において発現していることから、その生理的意義を調べるために、ラット胎児心筋細胞 H9c2 を用いた。H9c2 は、その分化過程において、心筋細胞としての性質に加え骨格筋細胞としての性質も表現してくることが知られている。次に、H9c2 においても、EGFP-SKRP4、EGFP-SKRP4 C138S を導入し、安定発現細胞株 SKRP4/H9c2 および SKRP4 C138S/H9c2 を得た。また、control としては EGFP を用いて、安定発現

細胞株を作製し、Vector/H9c2 とした。これらの細胞における発現は、抗 EGFP 抗体を用いて Western blotting にて確認し、いくつかの clone を得た。次に、SKRP4 の細胞内酵素活性を、前述同様に、抗 SKRP4 抗体による各々の免疫沈降物を用いて、pNPP を基質として測定したところ、H9c2 においても SKRP4 が脱リン酸化酵素活性を有すること、そして、その酵素活性に活性中心である Cys を必要とすることを認めた。次に、上記安定発現細胞株における筋分化の転写制御を各々調べるために、最初に、親株である H9c2 の分化シグナルの制御を確認することにした。そのため、まず、骨格筋細胞である SkMC ならびに H9c2 を用いて、その分化過程における既知の転写因子の発現を、RT-PCR を用いて、経時的に追った。また、同時に、筋分化の指標である Troponin T、Myogenin や MyHC (Myosin Heavy Chain) に対する抗体にて、経時的に Western blotting を行った。結果は、両細胞の分化過程において、MEF2 mRNA の上昇を認め、同時に行った Western blotting においても上記分化指標の発現上昇を認めることが確認できた。また、これらは、光学顕微鏡を用いた形態学的変化に基づく結果と一致した。そこで、筋分化を

調節する転写因子 MEF2 の転写活性を検出するために、MEF2 の DNA 結合部位の下流に Luciferase 遺伝子をつないだ plasmid pMEF2-Luc を各々の安定発現細胞株に導入し、その後分化させた。MEF2 活性の指標となる Luciferase の発現は、Luciferin を基質とした Luciferase 活性によって検出され (Dual Luciferase Assay System、Promega)、結果は、SKRP4 C138S/H9c2>Vector/H9c2>SKRP4/H9c2 の順に reporter 活性、つまりは転写因子 MEF2 の転写活性を検出した。これらのことは、DSP である SKRP4 が、その活性依存的に、筋分化を転写制御する MEF2 経路の活性を制御し、結果として、その分化に関与する可能性を示唆した。

次に、SKRP4 が筋分化に関与し得ることから、その標的となる生理的基質を求めることにした。ここで、これまでに分化シグナルとして報告のある p38 MAPK 経路、PI3 kinase-Akt 経路、ERK 経路が H9c2 における分化においても関与しているかをまず調べた。作製した安定発現細胞株と共にその親株である H9c2 に、各々の阻害剤である SB203580、LY294002、U0126 を分化培地に加え、vehicle である DMSO を control として分化させた。分化の指標とし

ては、前述の通り、顕微鏡による形態学的観察、ならびに Western blotting による分化 marker の検出により行い、その結果、いずれの阻害剤も DMSO と比較して、親株を含むすべての細胞株の分化を抑制することが示された。このことは、p38 MAPK 経路、PI3 kinase-Akt 経路、ERK 経路のいずれもが H9c2 ならびに上記安定発現細胞株の分化に必要であることを意味した。したがって、SKRP4 がこれらの経路のシグナル分子を脱リン酸化することで、上記 MEF2 経路を抑制し、結果的に分化制御に関与する可能性を考え、各経路のシグナル分子に対する SKRP4 の影響を調べることにした。そこで、各安定発現細胞株を分化させ、各経路に関与する分子の活性を Western blotting にて確認することにした。結果、Akt の活性型を認識する抗 P-Akt(Ser473) および抗 P-Akt(Thr308) を用いた Western blotting において、Vector/H9c2 と比較して、SKRP4/H9c2 はいずれのリン酸化においても各時系列において抑制されており、また一方で SKRP4 C138S/H9c2 は促進していることが示された。このことは、SKRP4 が Akt 経路の調節に関与していることを示唆し、Akt を含めその経路のシグナル分子を脱リン酸化す

る可能性を示した。現在、分化制御への関与、及びPI3 kinase-Akt 経路におけるシグナル分子のいずれを、SKRP4 が直接脱リン酸化できるかを、in vitroにおいて詳細に検討している。

D. 考察

(1) マウスES細胞を用いた血小板機能解析：

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。

(2) hTERT：

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^{-1327T}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。

(3)新規 dual specificity

phosphatase (DSP)の同定:

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。

E. 結論

マウス ES 細胞から in vitro 分化誘導法により巨核球と機能を有する血小板を得られたことを形態観察、

発現解析、機能解析、microarray 解析により示した。hTERT^{-1327C/T} 遺伝子多型の^{-1327T}は高い転写活性と長いテロメア、そしてCADの有病率が低いことを示した。また新規ヒト 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。

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

なし

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

抗血小板薬の薬効評価の為の血小板機能検査

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部内科専任講師

研究協力者 松原由美子 慶應義塾大学医学部助手

西田浩子 慶應義塾大学医学部助手

研究要旨 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いる。しかしその定義はまちまちで、不応を評価する為の血小板機能検査法も十分に検討されていないのが現状である。今年度は(1)抗血小板薬に対して responder と non-responder を定義するのに最適な血小板機能の評価方法の比較検討、(2)不応と関連する血小板分子研究の為に microarray を用いた血小板の RNA プロファイリング、(3)不応と関連する可能性がある血小板 VWF 受容体 (GPIb/IX/V 複合体) の遺伝的多型と血小板機能の関連、の 3 点について検討した。その結果、(1)血小板機能検査法の一つである PFA-100 で評価した場合のアスピリンに低感受性を示す個体の特徴が明らかになった。また Gorog thrombosis test (GTT) の閉塞時間に影響する因子が同定された。(2)血小板の transcriptome 解析におけるサンプル(白血球除去フィルター処理による血小板 RNA サンプル)に混在する白血球の定量解析法と microarray 解析法のプロトコルの確立が示された。また(3) GPIb α の ¹⁴⁵Thr/Met と繰り返し配列の遺伝的多型の ¹⁴⁵Met と 4 repeat (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 との反応を示した。以上、本年度の研究結果から、抗血小板薬不応を評価する為の血小板機能検査と血小板に発現する分子の評価方法が確立された。

A. 研究目的

抗血小板薬が十分に効かない状態、例えば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。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。今年度は以下の3点について検討した。(1) 抗血小板薬に対して responder と non-responder を定義するのに最適な血小板機能の評価方法の比較検討。(2) Microarray を用いた血小板の RNA profiling の解析プロトコールの確立のための基礎検討。(3) 血小板 VWF 受容体である GPIb 多型と血小板機能の関連。

B. 研究方法

(1) 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 μ M, 30 μ M) を in vitro で添加し、PFA-100[®] (Dade) Collagen/Epinephrin カードリッジの閉塞時間を測定した。ASA 10 μ 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。

(2) 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10⁶個から分離したRNA1 μ 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リアルタイム定量PCRの結果から鋳型サンプル(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、そのビオチン標識後にfragment化したサンプルを対象に行なった。

(3) 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) $Ib\alpha\beta/IX/V$ 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の反応はずり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。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GP

$Ib\alpha/VWF$ 反応が認められる。GPI α は $^{145}Thr/Met$ 、それと連鎖不均衡の $^{397}Pro-^{409}Gln$ の1-4repeat(R)の繰り返し配列の遺伝子多型を有している(^{145}Thr と1R、2Rの連鎖・ ^{145}Met と3R、4Rの連鎖)。これまでに我々や他の研究グループは ^{145}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。本研究ではGPI α 遺伝子多型の血小板機能、すなわち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。GPI α 遺伝子多型の血小板機能、すなわちVWF反応への影響を検討するために2つの実験研究を行った。1つめは、GPI α 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GPI α 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、GPI α 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

返し配列の比較、さらに $^{145}\text{Thr}/\text{Met}$ 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 GPIIb α 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 GPIIb β /IX とともに複合体として発現させた細胞と VWF の反応を血管内の血流速度を想定した流動状態で解析した。GPIIb α 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 GPIIb $\alpha\beta$ /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。その定量解析後、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。

(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) 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、TXB₂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_o)、ヘマトクリット、及び HbA_{1c} 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_o 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られなかった。

(2) 血小板の transcriptome 解析:

白血球混在についての検討結果は表(1)に示すように分離の精製度を 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。

表(1)

	血小板数(/ μ l)	❖RNA量(μ g)	白血球数/RNA 100ng
遠心分離のみ (血小板多血漿)	34.1 x 10 ⁴	8	3.2x 10 ⁶
* フィルター 1回	17.2x 10 ⁴	6.6	1.5x 10 ³
* フィルター 2回	7.9 x 10 ⁴	1	97

*フィルター: 白血球除去フィルター処理、❖各条件 30mL 使用の場合
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の上位 15 は (1) myosin、(2) H2B histone family member N、(3) truncated alpha IIb protein、(4) CD9 antigen (p24)、(5) platelet glycoprotein IIIa (GPIIIa)、(6) calcium binding protein 5、(7) homogentisate 1,2-dioxygenase、(8) H2B histone family member A、(9) ATP-binding cassette sub-family C (CFTRMRP), member 3、(10) HYA22 protein、(11) sodium calcium exchanger、(12) H2A histone family member A、(13) glycoprotein Ib beta、(14) beta tubulin 1, class VI、(15) H3 histone family member K であり、血小板に特異的に発現している因子や血小板機能に重要な役割を有する因子の発現を認めた。

(3) 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 ¹²⁵I 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、¹²⁵I 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、これらの間に VWF 反応の差異は認めなかった。

D. 考察

(1) 抗血小板薬不応の評価法の最適化：

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。

GTTによって、VWF:Ag、VWF:RC₀、ヘマトクリット、HbA_{1c}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。

(2) 血小板のtranscriptome解析：

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 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。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。

(3) 血小板 VWF 受容体 GPIb 多型と血小板機能の関連：

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 (¹⁴⁵Met 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 ¹⁴⁵Met 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。

E. 結論

抗血小板薬不応症の評価の為の血小板機能検査法について検討した。

PFA-100 で評価した際、アスピリン低感受性個体の特徴が明らかになった。GTT 閉塞時間に影響する因子を同定した。

血小板の transcriptome 解析におけるサンプル（白血球除去フィルター処理による血小板 RNA サンプル）に混在する白血球の定量解析法と microarray 解析法のプロトコールの確立が示された。

また GPIba の ¹⁴⁵Thr/Met と繰り返し配列の遺伝子多型の ¹⁴⁵Met 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) が流動状態で高い VWF との反応を示した。

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

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.