

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

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 GPIb α の遺伝子多型 日
本血栓止血学会誌 第 15 卷 第 15
号 437 頁 2004

H. 知的所有權の取得

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・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

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

分担研究者 猪子 英俊 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

研究要旨

抗血小板薬への反応性の個体差の遺伝的要因を調べる為、我々が開発した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により、抗血小板薬反応性(凝集能など定量的値)を指標にしたQTL (quantitative trait locus)マッピングを予定している。そのため、本年度はマイクロサテライトによるゲノムワイドなマッピングの基盤技術を完成させることを、目的とした。すなわち、1) 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、2) 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、3) 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、を遂行し、疾患関連遺伝子をマッピングするための方法論を確立し、ゲノムワイドな解析に向けて一貫した流れの構築・システム化を行った。

A. 研究目的

抗血小板薬への反応性の個体差(responder と non-responder)を規定している責任遺伝子を全ゲノムアプローチによるマッピング・同定することを計画している。具体的には、我々がヒトゲノム塩基配列より収集した、3万個の多型マイクロサテライト(1個/100kbの密度)を用いた相関解析によるマッピングを行い、責任遺伝子候補領域を100kb以内に絞り込む。この候補領域についてSNP(single nucleotide polymorphism)解析および発現解析

により責任遺伝子の同定を行い、抗血小板薬への反応性の機構を解明することが本研究の最終的な目的である。

このヒトゲノム多様性解析研究遂行のために、まず設定した多型マイクロサテライトマーカーを利用して、ゲノム上の組換え頻発部位、ハプロタイプ、多型のホットスポット、連鎖不平衡をしめす距離、脆弱部位、物理的距離と遺伝的距離との関係、日本人集団の遺伝的均質性などといった、マッピングの基礎となるゲノム上の遺伝学的知見を集積する。次

にミニゲノム領域モデルとして 3.6Mb からなる HLA 領域を選び、同領域に関連遺伝子を有する遺伝的複合性疾患のマッピングを行う。これにより疾患関連遺伝子をマッピングするための方法論を確立し、ゲノムワイドな解析に向けて一貫した流れの構築・システム化を目指す。

B. 研究方法

1. 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) の開発に関する研究:

マイクロサテライトの PCR 産物について、MALDI-TOFMS を用いて質量測定を行った。高密度 DNA チップの開発のため、インクジェット方式のスポットティングを行った。

2. 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:

本研究への参加について同意を得られた日本人健常者 100 人 (男性 45 人、女性 55 人) のボランティアより各 10~20 ml 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。これらを鋳型にし、蛍光標識したプライマーセットによって PCR 増幅を行い、自動シークエンサ

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、相関解析のための日本人集団の遺伝的均一性に関する統計学的研究を行った。

3. 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:

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。それらをもとに、多型マイクロサテライトデータベースの構築を試みみた。

(倫理面への配慮)

試料提供者には全て遺伝子研究に対する同意を得た上で、採血を行った。

C. 研究結果と考察

1. 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) の開発に関する研究:

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。現在、これら高密度MSチップ搭載時の測定を自動的に行うにあたって、サンプルプレート動作制御を行う試作機器の開発を行っている。MALDI-TOFMS の手法によってマイクロサテライトの多型を識別するために重要な、分解能向上のために、イオン化時に発生するフラグメンテーションを抑制する生化学的手法の検討をさらに推し進めた。これまで、同手法ではPCR増幅効率の低下が問題となる場合が認められたが、アニーリング温度の検討、使用酵素の検討により、通常の70%程度と、分子量測定に十分な増幅量が得られる温度条件を見出した。

2. 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：

マイクロサテライトを検索するものとなる整列化ゲノム配列には、Human Genome Project の成果による

も の (GoldenPath (<http://genome.ucsc.edu/>)) を使用した。昨年度までに多型マイクロサテライトが設定できていない領域を検索し、それらのゲノム領域についてマイクロサテライトの検出、PCR増幅を行うためのプライマー設計を行った。

健常人血液サンプルを用いて遺伝子解析を実施するにあたっては、東海大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて審査を受け、研究実施の承認を受けた上で、研究開発を行った。本研究への参加について同意を得られた日本人健常者 100 人（男性 45 人、女性 55 人）のボランティアより各 10-20 mL 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。次に、昨年度と同様の手順にて DNA 定量及び混合 DNA (Pooled DNA) 溶液の調製を行った。この DNA サンプルについて、設計したプライマーセットによって PCR 増幅を行い、自動シーケンサーABI 3700 DNA analyzer にて電気泳動に供した。得られた蛍光シグナルの波形パターンから、各マイクロサテライトマーカの多型有無を判定した。多型有りとして判定されたマーカーについては、検出されたピーク数より対立遺伝子数をカウントし、

全ピークの高さの和に対する各ピークの高さの比率から、推定対立遺伝子頻度及びヘテロ接合率を算出した。

これらの多型マイクロサテライトについては、随時整列化ゲノム配列上での位置を検索することによって、最新のゲノム配列における設定状況を反映しつつ新規設定作業を行えるものとした。現在、34,270個を収集することができた。

現在、ヒトゲノム上に多くの遺伝的多型マーカーが同定され、これを利用したゲノムワイド連鎖不平衡マッピングによって、多遺伝子性疾患関連遺伝子の同定が試みられようとしている。一方で、そのような解析に必須となる人類集団のゲノムワイドな遺伝的特性に関する知見は少なく、特に日本人など東アジア人は比較的均質な遺伝的背景を持つとされているが、詳細な情報は非常に少ない。そこで、本研究では、日本人、韓国人、ハルハモンゴル人、ヨーロッパ系アメリカ人の4集団について、Y染色体から26個、X染色体上から9個、常染色体上から24個の多型マイクロサテライトを用いて対立遺伝子頻度分布の比較を行い、集団の遺伝的特性に関する調査を行った。4集団間の対立遺伝子頻度分布の比較から、Y染色体26マーカーに関しては、日本人-韓国人集団間で有

意差を示すマーカーが8座位(30.8%)であったのに対し、他の集団ペア間では61.5-88.5%の座位で有意差が認められた。また、常染色体24マーカーにおいては、日本人-韓国人集団間で有意差を示すマーカーは1座位(4.2%)に過ぎなかったのに対し、他の集団ペア間では12.5-62.5%で有意差が認められた。これらの結果は、日本人集団と韓国人集団が互いによく似た遺伝的組成を持つことを示唆する。

さらに、Y染色体マーカーを用いた系統解析から、日本人集団には、遺伝的に異なる複数の系統が含まれていることが示唆された。そこで、日本人集団についてはY染色体を用いた系統解析に基づいて集団をグループ分けし、常染色体マーカーの対立遺伝子頻度分布の違いを調べることで、集団内部の階層化の有無を検討した。その結果、日本人内部で観察されたY染色体の2系統間では、常染色体マーカー全てにおいて対立遺伝子頻度分布に有意差が認められなかった。このことは、少なくとも現在の日本人集団では遺伝的混合が十分になされており、集団の階層化は生じていないことを示唆する。

3. 多型マイクロサテライトの抽出プログラム作成とデータベースの構

築に関する研究：

平成 14 年度では、随時更新され、公開されている整列済みヒトゲノム配列データ (Human Genome Project の成果) 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、再び解析を行った。また、アルゴリズム改良により、これまでと比較して効率的かつ正確にマイクロサテライトの配列をゲノム配列上から抽出できるようになった。さらに、疾患解析時の実験情報、タイピング結果を格納し、統計的な解析手法が導入されたデータベースの構築を進めており、このようなシステムのデータベースによって大量のデータを効率的に管理・利用することが可能となっている。

D. 結論

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。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Matsuzaka Y, Kulski JK, Inoko H, *et al*: hRDH-E2 gene polymorphisms, variable transcriptional start sites,

- and psoriasis. *Mamm Genome*. 15: 668-675, 2004.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Matsumoto T, Yukawa W, Inoko H, *et al*: Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. *Nucleic Acids Res* 32: 6069-6077, 2004.
22. 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.
23. Gourraud PA, Mano S, Inoko H, *et al*: Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens* 64: 543-555, 2004.
24. 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

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

multi-factorial diseases by
association analysis with
microsatellites. Plenary Lecture,
29th International Conference on
Animal Genetics, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) EP 03103543.9、Gene mapping
method using microsatellite genetic
polymorphism markers.

2) 2004-97934、関節リウマチ検査用
マーカー遺伝子

2. 実用新案登録

登録はなし

「脳梗塞患者の臨床像の解析」

分担研究者 鈴木 則宏 慶應義塾大学医学部内科教授

研究要旨

抗血小板薬の脳梗塞再発予防効果につき遺伝因子の関与を検討する上で臨床症状と梗塞巣の関係を解析した。上肢に局限した運動障害のみを呈する症例の頭部MRIで大脳皮質運動野の中心前回にある precentral knob の他に、皮質下白質にも梗塞巣を認める症例が観察された。類似の臨床症状を呈しても病巣が異なる可能性を示し、研究を推進する上で頭部MRIによる病巣の確認の必要性を証明した。

A. 研究目的

脳梗塞の再発予防には抗血小板薬が投与されるがその効果は症例間で異なっている。脳梗塞の再発には環境因子や遺伝因子関与の可能性もある。

本研究では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の有無を解析した。

B. 研究方法

当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た。

一肢に局限した感覚障害を伴わない運動麻痺は pure motor monoparesis

(PMM) と呼ばれており、症状が特徴的のため診断に偏りが無い。また手の運動に関与する部位として大脳皮質中心前回の

precentral knob と呼ばれる領域に局限すると考えられており、この症状を呈した患者の、頭部MRIについて病巣の比較検討を行った。

〈倫理面への配慮〉

本研究に用いた症例の年齢、性別、名前、患者番号などの個人情報については厳重に保護した。

C. 研究結果

一側上肢遠位部に局限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。以下に症例を1例提示する。

症 例

患者：68歳，女性

既往歴：50歳高血圧（losartan 50mg/日内服）.
54歳高脂血症・糖尿病（食事療法）.

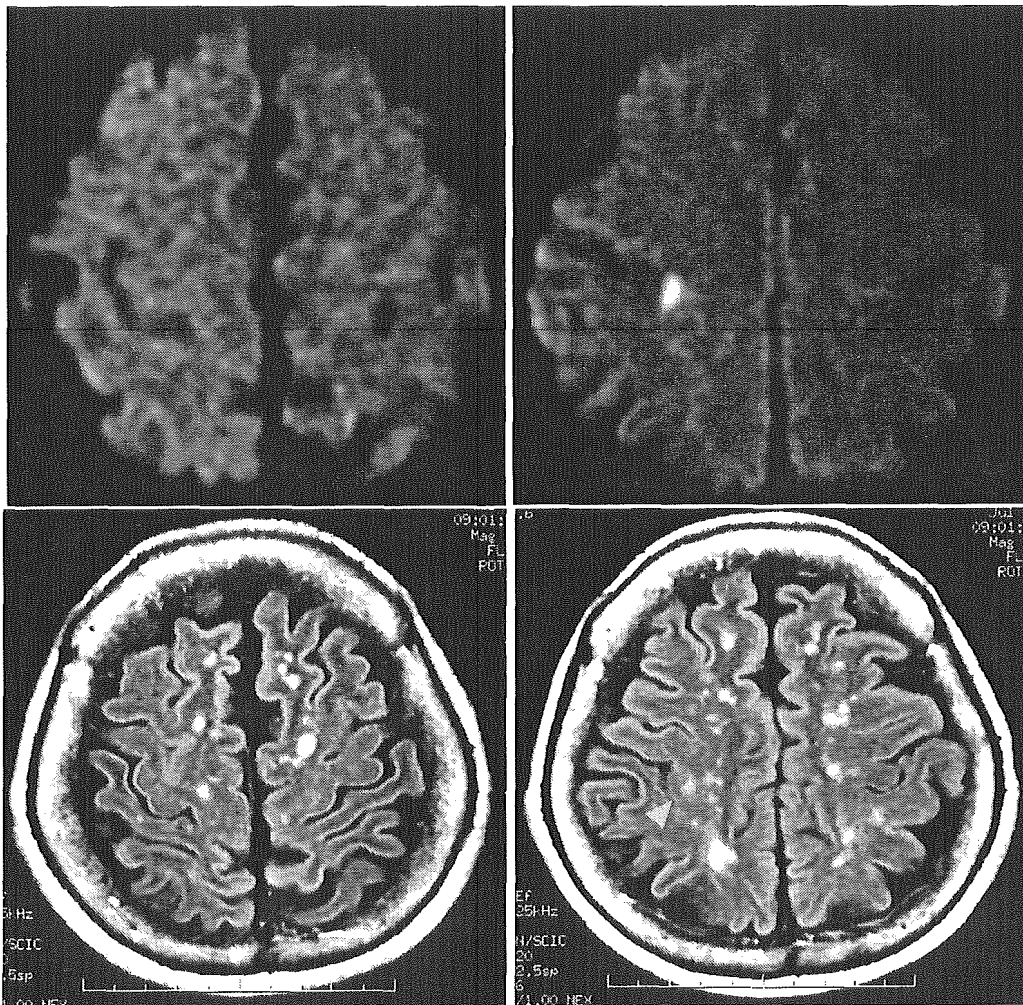
家族歴：兄，糖尿病。

家族歴：兄，糖尿病。

現病歴：2003年7月夕食の準備中に皿を落とし，左上肢の筋力低下を自覚し，翌日当科外来を受診した。手首の伸展が困難で橈骨神経麻痺様症状を呈していたが，明らかな圧迫のエピソードもなく，神経学的診察で手首の屈曲力も減弱し，橈骨神経麻痺としては非特異的と考え頭部CTを施行したが陳旧性脳梗塞を認めるのみであった。発症4日後施行された筋電図は正常で，頭部MRI（ T_1 T_2 およびFLAIR）は陳旧性と思われる多発性脳梗塞が見られただけであったが症状の改善がないことから同日入院した。

入院時検査所見：一般身体所見にて血圧135/90mmHg，神経学的所見では徒手筋力テストで左三角筋・上腕三頭筋・上腕二頭筋は5だったが，手根屈筋群4，手根伸筋群3，対立筋4，また握力も右24kg，左4kgと左上肢の筋力低下を認めた。右上肢および両下肢筋力を含めその他の異常を認めず，血液検査で，総コレステロール264mg/dl，中性脂肪266mg/dl，Hb-A_{1c} 5.8%であった。

入院後経過、検査所見：入院翌日施行したMRI拡散強調画像で主に右前頭葉運動野の皮質下白質に径8mmの高信号を認め（下図），脳梗塞と診断し点滴による補液，



図：本症例のMRI 拡散強調画像（上段）およびFLAIR 画像（下段）。FLAIR 画像で主に皮質下白質に相当する部位に（矢印），拡散強調画像で高信号を呈す梗塞巣を認める。

aspirin100mg の内服およびリハビリテーション開始した。

MRA では軽度の径不整を認める以外主幹動脈の途絶・狭窄を認めず，頸動脈超音波検査でも両側の中内膜複合体を認めたが有意な狭窄はなかった。心臓超音波検査では異常無く，ホルター心電図上発作性心房細動を認めなかった。その後左握力も4kg から10kg と改善し症状の悪化もなく独歩退院した。

D. 考察

Pure motor strokeによりPMMを呈した症例では病変が不明な場合も多いとされていたが，近年拡散強調画像により病巣が明らかにされる症例が報告されてきている。拡散強調画像は本来FLAIR画像で描出困難な超急性期の梗塞巣の検出に有用であり，上肢のPMMを超急性期に診断した症例が報告されている。一方，すでにFLAIR画像で多発性脳梗塞を認めどの病巣が今回発症の病巣であるかを特定困難な時にも拡散強調画像が有用であり例示した症例もそれに該当している。

手の運動に関与する部位として中心前回のprecentral knobと呼ばれる部位が考えられており，上肢遠位部に限局したPMMを呈し拡散強調画像でprecentral knobに梗塞巣を認め多症例も数例報告されている。しかし上肢遠位部に限局したPMMで皮質下白質のみを責任病巣とする報告は少なく，例示した症例でもprecentral knobに病変はなく，皮質下白質を主な病巣としていることはきわめ

て興味深い。症例の均一性や遺伝因子の検討を推進する際には他因子の関与を最小限に留めるためには問題となると考えられる。

いずれにしても病巣の診断には拡散強調画像が有用であり，上肢のPMMにおいては従来報告されているような中心前回のprecentral knobを責任病巣とするだけではなく，皮質下白質でも同様の症状を呈する可能性がある。

従って類似の臨床症状を呈していても梗塞巣がいくつかの部位に認められることから，脳梗塞の原因となる責任血管は1つとは限らない可能性があると考えられる。

E. 結論

臨床症状に対し病巣の多様性が認められたことから，脳梗塞の再発予防に関する遺伝因子の検討を推進する際には他因子の関与を最小限に留めるため頭部MRIによる病巣確認が必要である。

F. 健康危険情報

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。

G. 研究発表

1. 学会発表

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

2. 論文発表

中山荘平, 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.

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・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

「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」

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】酸化 LDL はマクロファージを泡沫細胞に変化させ、血管内皮細胞の NO 産生を抑制し白血球-血管内皮接着分子や平滑筋成長因子を誘導することにより動脈硬化を促進すると考えられている。近年、酸化 LDL のスカベンジャーレセプターである Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) のミスセンス一遺伝子多型が発見され、心筋梗塞発症リスクと関連することが示された。ここでは我々は動脈硬化性虚血性脳卒中と LOX-1 ミスセンス一遺伝子多型との関連につき検討を加えた。【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 274 名より静脈血採血を行った。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 SNaP 法にてタイピングした。【成績】ロジスティック解析の結果、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。虚血性脳卒中と高血圧・高脂血症・糖尿病・喫煙歴・脳卒中家族歴との間にはそれぞれ統計学的に有意な相関関係が認められた。患者群とコントロール群で GC+CC の頻度はそれぞれ 10.6 % vs. 9.1 % (P=0.568) と統計学的有意差を認めなかった。【結論】LOX-1 のミスセンス一遺伝子多型は日本人虚血性脳卒中発症に与える影響は少ないと考えられた。

A. 研究目的

抗血小板薬である aspirin は従来血小板凝集を抑制することにより、脳梗塞や心筋梗塞といった虚血性疾患の発症を予防すると考えられてきた。しかしながら、近年 aspirin 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 の発現と

metalloproteinase-1 の発現を抑制するという新しい作用を持つことがわかった。酸化 LDL は LOX-1 と結合することにより、マクロファージを泡沫細胞に変化させ、血管内皮細胞の NO 産生を抑制し白血球-血管内皮接着分子や平滑筋成長因子を誘導することにより動脈硬化を促進すると考えられている。一

方、LOX-1は酸化LDLのスカルベンジャーレセプターとして働くことが知られており、そのミスセンス一遺伝子多型は、心筋梗塞発症リスクを上昇させることが示されている。ここでは我々はLOX-1ミスセンス一遺伝子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。

B. 研究方法

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、 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ ）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。

〈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や古典的危険因子の間に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GC+CCの頻度はそれぞれ10.6% vs. 9.1% ($P=0.568$)

と統計学的有意差を認めなかった。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。

D. 考察

LOX-1が酸化LDLのスカルベンジャーレセプターとして機能する場合、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上昇させるように作用すると考えられる。一方、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れば、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

LOX-1のミスセンス一遺伝子多型は日本人虚血性脳卒中発症の増減に与える影響は少ないと考えられた。

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

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.

2. 学会発表

第三十回日本脳卒中学会総会（平成
17年4月21日、盛岡）

虚血性脳卒中患者における LOX-1 遺
伝子多型の解析と検討

服部英典¹⁾、棚橋紀夫¹⁾、村田満³⁾、渡
辺清明³⁾、斎藤郁夫²⁾、鈴木則宏¹⁾
慶應義塾大学神経内科¹⁾、同保健管理セ
ンター²⁾、同中央臨床検査部³⁾

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
Miyaki K, Omae K, Murata M, Tanahashi N, Saito I, Watanabe K	High throughput multiple combination extraction from large scale polymorphism data by Exact Tree Method.	<i>J Hum Genetics</i>	49	455-462	2004
Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M	Identification of novel mutations in <i>ADAMTS13</i> in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura	<i>Blood</i>	104 (7)	2081-2083	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.	<i>Blood Coagulation and Fibrinolysis</i>	15	1-7	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	<i>Diabetic Medicine</i>	21(8)	837-44	2004
Oguchi S, Ishii K, Moriki T, Takeshita E, Murata M, Ikeda Y, Watanabe K	Factor XII Shizuoka, a novel mutation (Ala392Thr) identified and characterized in a patient with congenital coagulation factor XII deficiency	<i>Thrombosis Research</i>	115(3)	191-197	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	<i>Neuroscience Letters</i>	374	132-135	2005
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	<i>Brit J Haematol</i>	128	533-539	2005
Isshiki I, Favier R, Moriki T, Uchida T, Ishihara H, Van Dreden P, Murata M, Ikeda Y	Genetic analysis of hereditary factor X deficiency in a French patient of Sri Lankan ancestry: <i>in vitro</i> expression study identified Gly366Ser substitution as the molecular basis of the dysfunctional factor X	<i>Blood Coagulation and Fibrinolysis</i>	16	9-16	2005
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	<i>Diabetes Care</i>	27(2)	303-307	2005
村田 満	血栓性素因遺伝子の網羅的検索と脳卒中リスク	分子脳血管病	3(2)	143-148	2004

研究成果の刊行物・別冊

Koichi Miyaki · Kazuyuki Omae · Mitsuru Murata
Norio Tanahashi · Ikuo Saito · Kiyooki Watanabe

High throughput multiple combination extraction from large scale polymorphism data by exact tree method

Received: 15 March 2004 / Accepted: 18 May 2004 / Published online: 11 August 2004
© The Japan Society of Human Genetics and Springer-Verlag 2004

Abstract Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are increasingly becoming important in clinical settings as useful genetic markers. For the evaluation of genetic risk factors of multifactorial diseases, it is not sufficient to focus on individual SNPs. It is preferable to evaluate combinations of multiple markers, because it allows us to examine the interactions between multiple factors. If all the combinations possible were evaluated round-robin, the number of calculations would rapidly explode as the number of markers analyzed increased. To overcome this limitation, we devised the exact tree method based on decision tree analysis and applied it to 14 SNP data from 68 Japanese stroke patients and 189 healthy controls. From the obtained tree models, we succeeded in extracting multiple statistically significant combinations that elevate the risk of stroke. From this result, we inferred that this method would work more efficiently in the whole genome study, which handles thousands of genetic markers. This exploratory data mining method will facilitate the extraction of combinations from large-scale genetic data and provide a good foothold for further verifactory research.

Keywords Multifactorial disease · Genetic polymorphism · SNP · Interaction · Multiple factor · Combination · Data mining · Exact tree

K. Miyaki (✉) · K. Omae
Department of Preventive Medicine and Public Health,
School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi,
Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
E-mail: miyaki@sc.itc.keio.ac.jp

M. Murata · N. Tanahashi
Department of Internal Medicine, School of Medicine,
Keio University, Tokyo, Japan

I. Saito
Health Center, Keio University, Tokyo, Japan

K. Watanabe
Department of Laboratory Medicine, School of Medicine,
Keio University, Tokyo, Japan

Introduction

Biological researchers face an explosion of data arising from human genome projects and recent high throughput experiments. There are many traditional techniques for analyzing data, including statistics and epidemiological approaches. Data mining methods, however, offer new approaches to data analysis by using techniques based on machine learning that has been developed in research on artificial intelligence. These techniques work by learning patterns in data, and then sometimes discover new information overlooked by conventional analyses.

The amount of single nucleotide polymorphism (SNP) data as useful genetic polymorphism markers in clinical settings has been increasing, because SNPs are widespread and frequent in the human genome and high throughput typing technology has become established. To evaluate the risk of multifactorial diseases in detail, the information of single polymorphism alone is insufficient. It is preferable to evaluate combinations of multiple markers, since they reflect interactions between multiple factors. If all the combinations were evaluated round-robin, the amount of computation would easily explode as the number of markers analyzed increased at an exponential rate. To overcome this limitation, we developed the exact tree method based on decision tree analysis (Kass 1980), which we previously used and evaluated in another epidemiological study (Miyaki et al. 2002). The decision tree analysis is the popular classification method in data mining algorithms. This method evaluates all predictor variables and stratifies the study population with the best variable to contrast the high risk group and the low risk group as much as possible. This process is repeated, and the obtained “only one” tree, which is multiply stratified by best variables, becomes an empirical rule for predicting the class of an object from values of predictor variables.

On the other hand, the “exact tree” we devised aims not for constructing the best classification model but for