

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 17 年度
総括・分担研究報告書

平成 18 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中央臨床検査部 教授

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

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 抗血小板薬の反応性と関係する分子の解析 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 脳梗塞再発予防における抗血小板薬のエビデンスの検討 鈴木 則宏

- 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

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 17 年度 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 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。

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。研究初年度の 16 年度に行った「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、全ゲノムスキニングの基礎検討」を基盤として今年度(17 年度)は「抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子を検出するための網羅的解析、アスピリンとの関連が報告されている因子に着目した候補因子アプローチ」を主な目的とした。健常人血液に *in vitro* でアスピリンを添加した際の反応性に関連する遺伝子多型をマイクロアレイを用いた検討により検出した。脳血管障害に関連する遺伝子多型をマイクロアレイを用いた検討により検出した。候補因子アプローチとしてヒトテロメラーゼ逆転写酵素、ミトコンドリア、dual specificity phosphatase に着目してそれらの機能検討や予備検討を行った。抗血小板薬反応性を指標にした QTL マッピングの基礎検討を行った。本研究の基礎実験としてマウス ES 細胞から *in vitro* で分化誘導した巨核球や血小板機能のアスピリンによる抑制やそれら細胞を用いて微小サンプルにおけるマイクロアレイ解析のプロトコルの確立を行った。

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

村田 満 慶應義塾大学医学部中央臨床検査部教授

猪子英俊 東海大学医学部分子生命科学教授

A. 研究目的

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動脈疾患に代表される動脈血栓

症に対して世界中で非常に多くの患者に投与されている。数多くの大規模臨床研究においてそれらの効果が立証され、抗血小板薬は全世界で年間約 30 億錠が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ている。日本ではアスピリンが頻用され、340 万人が服用している。しかし一方では、その予防効果は不十分であることが問題視されている。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。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。チクロピジンにも同

様の現象が観察されている。前述のように血小板の機能発現にも遺伝性の存在が指摘されているが抗血小板薬の反応性の個体差にも遺伝的要因の関与が考えられる。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だ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。初年度は主に基礎検討とサンプル収集、そしてこれまでの研究成果に基づいた候補因子アプローチを行った。今年度（平成 17 年度）は（1）抗血小板薬に対する responder と non-responder におけるマイクロアレイを用いた網羅的解析、（2）脳血管障害(CVD)の疾患感受性の関連遺伝子を検出するための case-control study、（3）血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討、（4）ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）の冠状動脈内皮細胞における役割、（5）マウス ES 細胞を

用いた血小板の産生機序の解明とその血小板の機能解析、(6) チロシン脱リン酸化酵素 dual specificity phosphatase (DSP) の酸化ストレスによる構造変化、(7) 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、(8) ゲノムワイドな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、(9) 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、(10) 文献・データベース検索、についての検討を行った。

B. 研究方法

(1) 抗血小板薬に対する responder、non-responder における microarray 解析：抗血小板薬の反応性に関与する遺伝子多型を検出するために、健康人からの血液 (クエン酸採血) に in vitro でアスピリンを添加

(vehicle, 10 μ M, 30 μ M) 後、血小板機能評価機器 PFA-100[®] (Date 社) collagen/ epinephrin カードリッジの閉塞時間を測定した (血管内の血流を想定した条件下で行うこの血小板機能評価法はこれまでにアスピリン不応の検出が可能であることが報告されている)。本研究ではアスピリ

ン 10 μ M 添加時に、閉塞時間が 300 秒 (カットオフ時間) の群と 300 秒未満の群に分け、それぞれを感受性群、低感受性群とした。それぞれの群において、約 11,000 種類の遺伝子多型が検出できる microarray を用いて網羅的検討を行い、感受性群と低感受性群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型の検出を行った。

(2) case-control study : CVD 患者群とコントロール群における microarray 解析による疾患関連遺伝子多型の検索：CVD と関連する遺伝子多型を検出するための研究を行った。CVD 患者 40 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コントロール 90 名における DNA 解析を約 11,000 種類の遺伝子多型が検出できる microarray を用いて網羅的検討を行い各群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型の検出を行った。

(3) 血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討：ヘパリン処理をした血液から遠心分離法を用いて得た血小板多血漿 (PRP) を白血球除去フィルターに通した。その PRP からミトコンドリア DNA の抽出はアルカリ変成・環状 DNA 抽出法に基づきデザインされた市販のキットを用い

た。血小板ミトコンドリア DNA を鋳型とした PCR による増幅反応（全長 16kb）を行った。

（4）ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）の冠状動脈内皮細胞における役割：正常冠状動脈内皮細胞に hTERT 遺伝子導入を行った後、2. 5h から 168h の間で細胞から RNA を抽出し real-time 定量 PCR を施行した。その結果 5h と 48h で hTERT の RNA 量に変化が認められたため、hTERT 遺伝子導入された正常冠状動脈内皮細胞の 5h 後と 48h 後からのそれぞれの RNA を対象にマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を網羅的に行った。

（5）マウス ES 細胞を用いた血小板の産生機序の解明とその血小板の機能解析：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（フィブリンノーゲン）との結合試験をアスピリン存在下、あるいは非存在下で行った。細胞を血小板活性化物質のトロンビンあるいは ADP で刺激後、フィブリン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。

微量サンプル（従来量の約 1/130）を用いての microarray 解析は array の販売元である affymetrix のプロトコールに従い、ES 由来血小板 RNA から PCR 増幅を行い microarray 解析を行った。

アポトーシスに関しては各分化誘導過程から得たサンプルに対して TUNEL 法による検討、caspase の活性化を種々の抗体（caspase 3、6、7、9、10、12）を用いるウエスタンブロットにて検討した。また caspase 阻害剤添加の条件で分化誘導を行い血小板産生に与える影響を検討した。

（6）チロシン脱リン酸化酵素 dual specificity phosphatase (DPS) の酸化ストレスによる構造変化：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) ベクター発現システムにより、glutathione S-transferase (GST) 融合タンパクを発現させ、グルタチオンセファロース 4B (Amersham Biosciences) を用いてアフィニティ精製した。哺乳動物発現ベクターには、SR α プロモーターを有する pME ベクターを用い、DSPs の N 末に Myc タグあるいは HA タグが適切に付加されるようにベクター構築を行った。脱リン酸化酵素活性の測定は、50mM imidazole (pH 7.5) に DSPs の組換えタンパクを加え、基質として 20mM *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) を用いて、37°C、1 時間にて加水分解反応を行い、405nm における吸光度を計測することで行った。

哺乳動物細胞の培養においては、HeLa 細胞株を用い、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に 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) を添加し培養した。また、HeLa 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。細胞抽出液の調整は、細胞溶解バッファーとして 20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、12mM beta-glycerophosphate、1mM sodium orthovanadate、2mM EGTA、3mM dithiothreitol (DTT) 及び protease

inhibitor mixture (Complete, Roche Diagnostics) を含むバッファーを用いて調整し、その後、DC Protein Assay kit (Bio-Rad) にてタンパク濃度を測定することで解析サンプルとした。タンパク発現の確認は、還元剤である DTT あるいは β -mercaptoethanol (β -ME) を含む Laemmli バッファーにてサンプル調整し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、Western blotting にて行った。また、非還元状態のタンパクの検出は、上記 Laemmli バッファーに還元剤を加えずにサンプル調整を行い、SDS-PAGE (非還元 SDS-PAGE) 後、Western blotting にて行った。免疫沈降物の解析は、細胞溶解バッファーによる細胞抽出液に、適切な抗体を結合したプロテイン G-セファロース (Amersham Biosciences) を加え沈降反応を行い、SDS-PAGE 後、Western blotting により行った。

(7) 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。

(8) 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、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。

(9) 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。

(10) 文献・データベース検索：脳梗塞に対する抗血小板薬の臨床試験結果の報告を文献検索し、それぞれの薬剤について臨床的な有効性を調査検討した。

(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) 抗血小板薬に対する responder、non-responder における microarray 解析：検診受診者の血液を PFA-100 collagen/epinephrin カートリッジを用いてアスピリン存在下、非存在下にて検討を行い、感受性群 8 名と非感受性群 3 名を認めた。各群あわせた 11 名から得たそれぞれの DNA サンプルにおいて約 11,000 種類の遺伝子多型が検出できる microarray を用いて網羅的検討を行った。統計解析により感受性群と非感受性群の間で有意に頻度の異なる (p value < 0.001) 遺伝子多型の上位 10 位のなかで遺伝子名が記載されているものは 3 種類で 4 位の receptor tyrosine kinase-like orphan

receptor 1、8位のmannosidase alpha、9位のpotassium voltage-gated channelであった。また、この上位10位の中で染色体11に存在するものが4つ認められた。

(2) case-control study: CVD患者40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コントロール90名におけるDNA解析を約11,000種類の遺伝子多型が検出できるmicroarrayを用いて網羅的検討を行った。各群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型の解析を行った結果、p value<0.001の因子を16種類認めた。それらの中で遺伝子名の記載されているものは4位のcoactivator associated arginine methyltransferase 1-like、12位のATPase, Class I、13位のEPH A4、16位のglutamate receptor metabotropic 8であった。

(3) 血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討: 白血球除去フィルター処理をしたPRPからミトコンドリア遺伝子を抽出した。ミトコンドリアのreference sequenceにおける制限酵素BamH 1の認識配列は1カ所であるため、その抽出したミトコンドリア遺伝子が16kbを有するかどうかを検討するためにその遺伝子

に対してBamH 1制限酵素処理を行った。その結果、電気泳動にて16kbのband sizeを認めた。さらにミトコンドリア遺伝子の全長を増幅するためのPCRを行った結果、電気泳動にて16kbのband sizeとdeletionの存在が示唆される約10-11kbのband sizeを認めた。

(4) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の冠状動脈内皮細胞における役割: hTERT遺伝子導入されていない正常冠状動脈内皮細胞に比し、その遺伝子導入細胞において発現が減少の上位20位から血栓に関連する因子を検索した結果、intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2)、von Willebrand factor (VWF)を認めた。また、ICAM2とVWFそれぞれのプロモーター活性調節因子のなかでhTERT遺伝子導入とともに発現変化を示したものを検索した結果、ICAM2はcaspase 1、VWFはGATA6を認めた。さらにICAM2とVWFの遺伝子発現減少はreal-time定量PCRにより確認された。

(5) マウスES細胞を用いた血小板の産生機序の解明とその血小板の機能解析: OP9培養システムにおいてES細胞から巨核球・血小板へin vitro分化誘導を行った。形態観察、フローサイトメトリーによるCD41陽性細

胞の検出の結果から培養8日で未成熟巨核球、培養12日で成熟巨核球、そして培養15日で血小板産生が示唆された。これらES由来成熟巨核球と血小板にアスピリン30 μ M添加30分後に血小板活性化物質であるADP20 μ Mとトロンビン5U/mlをそれぞれ加えたサンプルを用いてフィブリノーゲンとの結合をフローサイトメトリーを用いて検討した結果、アスピリン添加サンプルでは非添加のものに比し巨核球と血小板ともにフィブリノーゲンとの結合が抑制された。

microarray解析をより少量のサンプルで行うための改良法と従来法を比べると発現上位10ではどちらの方法でも9つが含まれていた。

巨核球や血小板産生におけるアポトーシスの関与の有無については、最初に各分化誘導過程（未成熟巨核球、成熟巨核球、血小板）でのTUNEL法による検討を行った。その結果、分化誘導の進行とともにTUNEL陽性細胞は増加を示した。この結果は巨核球、血小板分化誘導過程にアポトーシスが関与していることを示唆している。次にアポトーシスに深く関与しているcaspaseの巨核球、血小板分化誘導過程における役割を検討した。caspase活性化経路の中心であるcaspase 3の阻害剤を用いた検討では培養5日目、8日目、12日目

の添加で培養5日目のものは血小板産生に影響を認めず、培養8日目、12日目のものは阻害剤非添加のものに比し血小板産生の減少を認めた。さらにcaspase活性化のどの経路が巨核球、血小板分化誘導過程に影響を与えるかを検討するため、その各過程からタンパク抽出したサンプルに対して種々のcaspase抗体を用いて行ったウエスタンブロット解析の結果、caspase12、10、9、そして7は培養8日目に、caspase3は培養12日目にそのレベルのピークを示した。caspase6はそれぞれの過程でのレベルの変化を示さなかった。

(6) チロシン脱リン酸化酵素 dual specificity phosphatase (DPS) の酸化ストレスによる構造変化 : DSPsの一つであるDSP-Xを大腸菌で発現させた後、精製を行い、その組換えタンパクを得た。次に、酸化ストレス存在下におけるDSP-Xの脱リン酸化酵素活性を調べるために、ROSとしての過酸化水素H₂O₂あるいは還元剤であるDTT存在下において、pNPPを基質としてin vitroにて脱リン酸化酵素活性を測定した。結果は、DTT存在下にて、DSP-Xの脱リン酸化酵素活性が、非存在下と比較して促進され、一方、H₂O₂存在下においては抑制された。また、DTT存在下にお

ける結果と一致して、他の還元剤である β -ME 存在下においても、同様に脱リン酸化酵素活性の促進が認められた。さらに、DTT 及び β -ME の量依存的に酵素活性の促進を認め、一方、 H_2O_2 の量依存的に抑制されていることが示された。同様の結果は、同じ family に属する他の DSPs 組換えタンパクを用いた解析において得られた。

次に、細胞内における DSP-X の酸化ストレスによる影響を調べるために、Myc-DSP-X を HeLa 細胞に一過性発現し、その後、0.1 mM H_2O_2 で1分間、2分間、5分間の刺激を行った。刺激後、還元剤を含まない細胞溶解バッファーにて細胞抽出液を調整し、非還元 SDS-PAGE を行った。非還元 SDS-PAGE 後、抗 Myc 抗体 (9E10) にて Western blotting を行い、その結果、DSP-X の一次構造から予想される分子量の整数倍の位置に、刺激前には認められなかった経時的に増加するバンドシグナルを認めた。これらの分子量から予測するに、DSP-X は ROS である H_2O_2 によって、二量体、三量体、四量体と経時的に多量体を形成していく可能性が示唆された。また、この多量体形成と考えられるバンドシグナルの程度は H_2O_2 の濃度依存的であった。さらに、 H_2O_2 の刺激前に、抗酸化物質である

N-acetyl-L-cysteine (NAC) を細胞培地中に添加した結果、上記に認められたバンドシグナルは濃度依存的に抑制された。これらのことから、以上の多量体形成と思われる現象は H_2O_2 による酸化ストレスによって生じ、また細胞内の酸化還元 (レドックス) 状態によることが明らかとなった。 H_2O_2 刺激による DSP-X のバンドシグナルが多量体形成と予想される位置に認められることから、 H_2O_2 刺激によって DSP-X が多量体を形成するかどうかを共沈実験を用いて調べた。ここで、HeLa 細胞に HA-DSP-X、Myc-DSP-X、そして両者を同時に発現させ、各々の細胞抽出液に抗 HA 抗体を加え、免疫沈降を行った。次に、その免疫沈降物を非還元 SDS-PAGE し、抗 Myc 抗体にて、Western blotting した。結果、HA-DSP-X 及び Myc-DSP-X を同時に発現させた際のみ、抗 Myc 抗体にてバンドシグナルが検出でき、この分子量は細胞抽出液における多量体形成と予測された位置に一致した。同様の結果は、前述の他の DSPs においても認められた。以上より、 H_2O_2 により DSP-X は、多量体形成することが示された。次に、 H_2O_2 刺激により形成された DSP-X 多量体が、いかにして細胞内で再び還元されていくのかを調べるため、細胞内還元系であるグルタチ

オン glutathione (GSH) 及びチオレドキシン thioredoxin (Trx) に対する阻害剤を用いて解析を行った。そのため、Myc-DSP-X を HeLa 細胞に発現させた後、グルタチオン生合成阻害剤であるブチオニンスルホキシミン buthionine sulfoximine (BSO)、あるいはチオレドキシンレダクターゼ thioredoxin reductase 阻害剤である 2,4-dinitro-1-chlorobenzene (DNCB) を添加し、細胞に H₂O₂ 刺激を 0.1 mM、2 分間にて行った。刺激後、細胞は洗浄及び培地交換を行い、その後 5 分おきに 30 分まで経過を追い、DSP-X の経時的挙動を Western blotting により解析した。その結果、阻害剤処理を行わない場合、及び BSO 処理を行った場合においては、DSP-X の多量体形成が経時的に減少していくことを認めた。一方、DNCB 処理においては、DSP-X の多量体形成は変化せず減少を認めなかった。以上のことから、ROS としての H₂O₂ 刺激は、DSP-X に分子間結合による多量体形成を生じさせ、それに対してチオレドキシンレダクターゼ系が還元型に保持しようとするレドックス機構が機能していると示唆された。

次に、タンパク質（システイン残基 Cys）中のチオール基が細胞内のレドックス状態の変化を受けやすいことから、DSP-X 中のシステイン残

基が、多量体形成において果たす役割を調べた。そこで、DSP-X 中に存在する三カ所のシステイン残基をセリンに変異させるため、これらの変異体を発現する哺乳動物発現ベクターを構築し、各々 HeLa 細胞に発現後、0.1 mM H₂O₂、5 分で刺激を行った。結果、DSP-X の活性中心であるシステイン以外をセリンに変化させた場合においては、H₂O₂ 刺激後の多量体形成は認められ、一方、活性中心のシステイン残基を変異させた際には多量体形成は検出されなかった。また、H₂O₂ 刺激を 120 分まで追った際においても、野生型と比較して、上記活性中心の変異体における多量体形成は認められなかった。さらに、活性中心のシステイン以外の二つのシステイン残基を同時にセリンに変異させた際においては、二量体形成のみ認められることから、二量体以上の多量体形成には、活性中心のシステイン残基が必要であること、また三量体以上の多量体形成には、活性中心以外のシステイン残基が必要であること、が示唆された。現在、これらを飛行時間型質量分析法 Time of Flight Mass Spectrometry (TOF/MS) を用いて調べている。次に、他の DSPs についても非還元 SDS-PAGE を用いて、ROS である H₂O₂ による影響を調べたところ、MAP

Kinase Phosphatase (MKP) に属する Pyst1 が多量体を形成していかない一方で、DSP-X を含む非定型 DSPs が同様に多量体形成していくことが示された。これらは、経時的に調べられ、また非定型 DSPs における活性中心システインがその多量体形成に必要であることが認められた。また、他の酸化ストレスにおいても同様の結果を得られるかどうかを調べるために、細胞にとって代表的な酸化ストレスである紫外線を照射させることで、DSP-X の多量体形成の検出を Western blotting にて行った。その結果、紫外線照射によっても DSP-X は多量体を形成し、その形成が NAC によって阻害されることが示された。このことは、紫外線照射による DSP-X の多量体形成が、その ROS としての働きによって生じ、また細胞内のレドックス状態によることを示唆した。

(7) 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。

(8) 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。健康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で審査を受け、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康者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ーの多型有無を判定した。多型有りと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。

(9) 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: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。

(10) 文献・データベース検索: 脳梗塞に対する抗血小板薬の臨床試験結果の報告を文献検索し、それぞれの薬剤について臨床的な有効性を調査検討した。抗血小板薬全体のメタアナリシスでは TIA と脳梗塞に関して、抗血小板薬は平均 29 ヶ月の観察で虚血性脳卒中、心筋梗塞、血管死亡の 22%軽減する。しかし絶対値 (1000 例中 3 年間の治療で非致死性脳卒中の再発が 25 例) からすると十分な有効性ではない。

D. 考察

(1) 抗血小板薬に対する responder、non-responder における microarray 解析: 前年度の検討結果は in vitro アスピリン添加の条件下における PFA-100®を用いた解析でその感受性にバラつきが認められることを示していた。今回はそのアスピリンに対する感受性の高い群と低い群に分け microarray を用いた網羅的解析を施

行することによりその感受性に強く関与する遺伝子多型を検出した。約 11,000 種類の遺伝子多型の中から receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1、mannosidase alpha、potassium voltage-gated channel の遺伝子多型がアスピリンに対する responder と non-responder に非常に強く関与していることが統計解析により示唆された。今後これら因子に着目し、候補遺伝子アプローチを行う必要がある。また今回は健常人からのサンプルを用いて検討をおこなったが血栓症患者からのサンプルを用いた網羅的解析や候補遺伝子アプローチを行う必要がある。

(2) case-control study: 抗血小板薬に対する不応状態の原因のひとつとして個体の元々の血栓形成能の亢進が提唱されている。その血栓形成能の遺伝的要因を網羅的に検出するために今回の検討、すなわち microarray を用いての case-control study (CVD vs コントロール) を行った。これまでに「stroke に関与する遺伝子の網羅的解析」は genome-wide linkage analysis によるものが報告されている。その報告では染色体 5p13、染色体 4 (4cM)、染色体 17 (95cM)、染色

体 2p31-36、染色体 6p12-22、染色体 13q31-33 に疾患に関与する遺伝子が存在することが示されている。今回、各群で有意に頻度の異なる遺伝子多型の上位では 23 位に染色体 13q31 に位置する遺伝子多型(遺伝子名は不明)と 47 位に染色体 6p22 に位置する遺伝子多型(遺伝子名は不明)があった。6p22 はハプロタイプ解析においても疾患との関与を示した。

genome-wide scan によるアプローチに比べ microarray を用いる本解析はサンプル量が約 1/40 と少量であること、遺伝子多型の位置が特定できることが利点である。これら利点を活かして今後、今回の解析で検出した遺伝子多型を候補遺伝子として、疫学研究や実験研究による更なる検討を行う必要がある。また今回の検討で遺伝子名の不明なものについてはその近傍遺伝子の探索による候補遺伝子の決定を行う必要がある。

(3) 血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討: 候補遺伝子アプローチとして血小板のミトコンドリア遺伝子に着目した。これまでにアスピリンが NADPH の低下の機序に関与することが血管内皮細胞において報告されている。血小板内での NADPH の低下は血小板機能に影響を与える。ミトコンドリア遺伝子には

NADPH に関与する塩基配列の欠失による遺伝子多型の報告がある。血小板はミトコンドリア遺伝子を有するがこの欠失による遺伝子多型の有無やその欠失の正確な配列についての詳細な報告はないため本研究では血小板ミトコンドリア遺伝子の塩基配列の欠失による遺伝子多型の同定とその多型と血小板機能や血栓性疾患との関連を検討する。今回はその予備検討を行った。前年度に行った血小板サンプル処理法の検討の結果から従来行われている遠心分離法による PRP の分離では白血球の混在が多いことを認め、その混在は白血球除去フィルターの使用で約 1/2000、血小板は約 1/2 となることから今回の検討では白血球除去フィルター処理により得た PRP を用いた。したがって今回の検討で認めたミトコンドリア遺伝子は血小板由来と考えられる。今後、ミトコンドリア遺伝子の塩基配列の欠失による遺伝子多型が既に報告されている細胞をコントロールとしての遺伝子解析や機能解析を進める予定である。

(4) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の冠状動脈内皮細胞における役割：血栓症に対するアスピリンの効果に関与する因子として hTERT に着目した。アスピリンによる内皮

細胞の抗老化作用、テロメラーゼ活性増加作用が報告されている。テロメラーゼ活性サブユニットの hTERT の遺伝子多型はテロメラーゼ活性に影響を及ぼす。これはこれはアスピリンによる内皮細胞のテロメラーゼ活性増加作用において個体差が存在する可能性を示唆していると考え、今回は基礎検討の *in vitro* 実験として正常冠状動脈内皮細胞に hTERT 遺伝子を導入した際の遺伝子プロファイリングを解析した。その結果、ICAM2 や VWF の発現減少を認めた。これら粘着タンパクは血栓形成において重要な役割を演じている。さらにこれらの発現調節に caspase1、GATA6 がそれぞれ関与していることが推察された。今後 caspase1 や GATA6 を阻害する条件下での検討、そしてアスピリン添加時の内皮細胞が示す遺伝子プロファイリングを検討する必要がある。

(5) マウス ES 細胞を用いた血小板の産生機序の解明とその血小板の機能解析：本課題研究における基礎検討として ES 細胞由来の巨核球・血小板を用いる研究である。前年度に確立した ES 細胞から巨核球・血小板産生の *in vitro* 分化誘導系を用いて今回はアスピリン添加時のそれら細胞の機能を検討した。その添加は巨核

球、血小板いずれにおいても機能抑制をもたらした。これまでの報告においてアスピリンは巨核球にも作用することが示されているがこれを検討するための造血幹細胞を個体から得るためにはドナーへの負担が大きいことに加え、検討の再現性を得ることが困難である。この問題を解決するために増殖能の高いES細胞を用いることは好都合である。今後、アスピリンの巨核球や血小板の機能抑制に関与する因子の検出、アスピリンの巨核球の機能に影響を及ぼす機序の解明が必要と考えられる。また実験の検証をヒト造血幹細胞やヒト血小板を用いたmicroarray解析を行うためには少量のサンプルで行う必要がある。今回この予備検討のひとつとして、microarrayの販売元であるaffymetrixのプロトコールに従い、ES由来血小板を用いて従来の約1/130量のRNAからPCR増幅を行いmicroarray解析を試み新しいプロトコールを得ていることは今後の検討を容易に行える可能性が高いと考えられる。今回、ES細胞から巨核球・血小板産生のin vitro分化誘導系を用いた検討において血小板産生機構にはアポトーシスが関与していることを示した。この関与にはcaspaseが重要な役割を演じていることを示唆する結果を得た。ここで

分化誘導の培養5日目でcaspase阻害剤添加した場合には血小板産生への影響が見られず、培養8日、12日目ではその影響が著明に観察されたこと、さらに血小板産生に関与するcaspaseの活性化経路の検討ではcaspase3を中心としたその経路の上流であるcaspase12、9の活性が培養8日目でピークを示したこと、caspase3は培養12日目でピークを示したことから、血小板産生機構に対するアポトーシスの関与はその各分化過程において特徴的な機序を有していると考えられている。そして今回の結果はこれまで血小板産生機構に対するアポトーシスの関与について、報告により一致をみなかった理由のひとつとして提唱できる可能性がある。

(6) チロシン脱リン酸化酵素 dual specificity phosphatase (DPS) の酸化ストレスによる構造変化：種々の条件下で生体内に発生したROSが、酸化ストレスとしてチロシン脱リン酸化酵素の活性中心であるシステイン残基を酸化修飾することで分子内及び分子間結合を引き起こし、その構造変化により酵素活性の不活化を生じさせることが示唆された。また、このことは、それら酵素の生体内における生理的標的物質のチロシン残

基のリン酸化を促進させ、本来制御すべきシグナル伝達経路の活性化あるいは不活化を生じ、動脈硬化等の心血管病を引き起こす一因となる可能性が示された

(7) 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:これまでの問題点であった PCR の増幅効率低下が改善されたことにより約 30000 個の多型マイクロサテライト検索のための検討条件が整った。

(8) ゲノムワイドな多型マイクロサテライト 30000 個の設定と各対立遺伝子の頻度の検索に関する研究: Human genome project の成果を使用してマイクロサテライトを検索した結果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していると考えられる。

(9) 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: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。

(10) 文献・データベース検索:本研究で得られた結果を考察するうえで重要であると考え本検索を行った。本邦の脳卒中ガイドラインにおいては、脳梗塞急性期のアスピリン投与と慢性期の抗血小板薬投与は、臨床的なエビデンスのあるグレード A で推奨されている。統計学的に有意な有効性ではあるが、これまで述べてきたように絶対値からすると決して十分な効力とはいえない。アスピリン以外の抗血小板薬に関してはアスピリンを上回る有効性が認められているものもあるが、その有効性もわずかである。血小板への作用機序は、各薬剤でそのターゲットとなる部分が異なっていることから、併用により、抗血小板機能が增強されるが、併用療法に関しては臨床的なエビデンスは不十分であり、MATCH にみるよう、むしろ出血性合併症が増加した結果、臨床的な有用性が示されていないのが現状である。

E. 結論

抗血小板薬の反応性と関係する分子について網羅的検討あるいは候補因子アプローチを行った。PFA-100®で評価したアスピリン感受性に関連す