

る遺伝子多型を網羅的解析により検出した。CVD の疾患感受性に関与する遺伝子多型を網羅的解析により検出した。血小板ミトコンドリア遺伝子多型を検出するための予備検討を行い、そのプロトコール作成に着手した。hTERT の正常冠状動脈内皮細胞への遺伝子導入は ICAM2 と VWF の発現低下に関与していた。マウス ES 細胞から *in vitro* 分化誘導法により得られた巨核球と血小板はアスピリン存在下で ADP あるいはトロンビン刺激によるフィブリンノーゲン結合が抑制された。微量サンプルから microarray 解析を行うプロトコールを得た。巨核球分化と血小板の産生機構にアポトーシス、caspase 活性化の関与が示唆された。紫外線や活性酸素などによる酸化ストレスは、チロシン脱リン酸化酵素を不活化すること、また、その特異的システイン残基を酸化修飾することで、分子内結合及び分子間結合を生じさせた。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。文献検索により大規模臨床試験は抗血小板薬の動脈血栓症の有用性を示していた。

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, Yoshida T, Watanabe K, Saito I, Miyaki K, Omae K, Ikeda Y. Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. *Biochem Biophys Res Commun.* **341**: 128-131, 2006

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. *Thrombosis Research* 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.

Neuroscience Letters 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.
Brit J Haematol 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: *in vitro*
expression study identified
Gly366Ser substitution as the
molecular basis of the
dysfunctional factor X. *Blood
Coagulation and Fibrinolysis*
16: 9-16, 2005

Miyaki K, Sutani S, Kikuchi H,
Takei I, Murata M, Watanabe K, Omae
K, Increased risk of obesity
resulting from the interaction
between high energy intake and the
Trp64Arg polymorphism of the

beta3-adrenergic receptor gene in
healthy Japanese men. *J Epidemiol*
5(6): 203-10, 2005.

Miyaki K, Murata M, Kikuchi H,
Takei I, Nakayama T, Watanabe K,
Omae K. Assessment of tailor-made
prevention of atherosclerosis
with folic acid supplementation:
randomized, double-blind,
placebo-controlled trials in each
MTHFR C677T genotype. *J Hum Genet*
50(5): 241-8. Epub 2005

Tamiya G, Shinya M, Imanish T,
Ikuta T, Okamoto K, Matsumoto T,
Mano S, Nozaki Y, Ishibashi H,
Yonekura M, Nakami Y, Endo T, Oka
A, Gojobori T, Bahram S, Inoko H:
Whole genome association study of
rheumatoid arthritis using 27,039
microsatellites. *Hum Mol
Genetics* 14: 2305-2321, 2005.

Kulski JK, Kenworthy W, Bellgard M,
Taplin R, Okamoto K, Oka A, Mabuchi
T, Ozawa A, Tamiya G, Inoko H: Gene
expression profiling of Japanese
psoriatic skin reveals an
increased activity in molecular
stress and immune response signals.
J Mol Med 83: 964-975, 2005.

Matsuzaka Y, Okamoto K, Mabuchi T, Iizuka M, Ozawa A, Oka A, Tamiya G, Kulski JK, Inoko H: Identification and characterization of novel variants of the thioredoxin reductase 3 new transcript TXNRD3NT1. *Mamm Genome* **16**: 41-49, 2005.

Fukami-Kobayashi K, Shiina T, Anzai T, Sano K, Yamazaki M, Inoko H, Tateno Y: Genomic evolution of MHC class I region in primates. *Proc Nat Acad Sci USA* **102**: 9230-9234, 2005.

Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Watanebe S, Hanzawa K, Beck S, Kulski JK, Inoko H: Comparative genome analysis of two avian (Quail and Chicken) MHC regions. *J Immunol* **172**: 6751-6763, 2004.

Matsuzaka Y, Okamoto K, Yoshikawa Y, Takaki A, Oka A, Mabuchi T, Iizuka M, Ozawa A, Tamiya G, Kulski JK, Inoko H: hRDH-E2 gene polymorphisms, variable transcriptional start sites, and psoriasis. *Mam Genome* **15**: 668-675, 2004.

Kulski JK, Anzai T, Shiina T, Inoko H: Rhesus Macaque Class I Duplicon Structures, Organization and Evolution within the Major Histocompatibility Complex. *Mol Biol Evol* **11**: 2079-2091, 2004.

Hui J, Oka A, Tomizawa M, Tay GK, Kulski JK, Penhale WJ, Isachi SPA, Tamiya G, Inoko H: 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.

2. 学会発表

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata, Hidenori Suzuki, Tamihiro Kamata, Aya Shimizu, Andrew D Leavitt, Yasuo Ikeda. Ultrastructural evidences of caspase-dependent platelet generation in ES cell-differentiation system. 2005 47th The American Society of Hematology.

松原由美子、村田満、池田康夫. ヒトテロメラーゼ逆転写酵素の正常ヒト冠状動脈内皮細胞における役割:

2005 28th 日本血栓止血学会

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

<研究成果の刊行に関する一覧>

「書籍」

松原 由美子 血栓症と遺伝子多型

池田康夫 血栓症ナビゲーター メディカルレビュー社 東京 (2006)

202-203

「雑誌」

松原 由美子 血栓症と遺伝子型について 血栓と循環 13: 53-55 (2005)

松原 由美子、村田 満 アテローム破綻に血小板はどこまで関与しているのか? Vascular Medicine 1: 58-64 (2005)

松原 由美子、村田 満 総説—血栓形成の分子機構 血栓と循環 13: 12-16 (2005)

椎名隆、猪子英俊: T細胞への抗原提示機構-HLA 遺伝子領域とその多様性、日本臨床、63: 293-298 (2005)

池脇信直、猪子英俊: Aureobasidium pululans から産生され β -1.3-1.6 グルカン免疫して得られたマウス腹腔産渗出細胞、臨床免疫 43: 467-471 (2005)

猪子英俊: 21世紀COEプログラム「ヒト複合形質の遺伝要因とその制御分子探索」、蛋白質核酸酵素 50: 1014-1015 (2005)

鬼塚真仁、成瀬妙子、猪子英俊: HLAと移植、日本臨床、63: 653-658 (2005)

岡晃、猪子英俊: 多因子遺伝病としての乾癬、最新医学(増刊臨床遺伝学05'), 60: 2180-2190 (2005)

鬼塚真仁、吉川枝里、猪子英俊: 臓器移植とHLAタイピング(血清学的検査法と遺伝子検査)、日本臨床、63: 1945-1949 (2005)

分担研究報告書

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 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特別研究教員講師
青木亮子 慶應義塾大学大学院

研究要旨 抗血小板薬は、冠動脈疾患及び脳血管障害に対して世界中で非常に多くの患者に投与されており、その薬剤効果における個人差の原因因子を見出すことは今後の医療に必須と考えられる。本研究は抗血小板薬の反応性を規定し得る機能分子を同定し、それらの基礎的機能研究を行うことを目的としている。今回、我々は、心血管病・動脈硬化の発生ならびに進展に関与する酸化ストレスと、これらの疾患の成立に重要な働きを担っていると考えられるチロシン脱リン酸化酵素 dual specificity phosphatase (DSP) に注目し、酸化ストレスによる DSPs の構造機能変化について明らかとした。

A. 研究目的

冠動脈疾患、脳血管障害、糖尿病のような多くの老化関連疾患は、その病態成立に血管病変が重要な位置を占めており、また加齢と共に血栓症あるいは心血管病の頻度は増加することが知られている。現在、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、それ故、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と考えられる。また、これまでに血小板機能の亢進と心血管死との関係について疫学的に明らかにされており、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の基礎的機能を解析することは、今後の心血管病の予防に非常に重要と思われる。このような観点から、昨年、冠動脈疾患と老化に関与するテロメアシステムとの疫学的報告、ならびに心血管系におけるチロシン脱リン酸化酵素 dual specificity phosphatases (DSPs) の生理的機能について報告した。今回、我々は、心血管病・動脈硬化などの老化関連疾患の原因あるいは増悪因子として作用する酸化ストレスと、これらの疾患の成立に重要な働きを担っ

ていると考えられる DSP との関与から、酸化ストレスによる DSPs の構造機能変化について解析した。

酸化ストレスは、生体内で生成する活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) の酸化損傷力と生体内の抗酸化能力との差として定義される。活性酸素種 ROS は、本来、エネルギー生産、侵入異物攻撃、不要な細胞処理、ならびに細胞情報伝達などに際して生産される有用なものである。しかしながら、ROS が生体内の抗酸化能力で捕捉しきれず余剰に生じる場合、それらは、生体内の脂質、タンパク質、及び遺伝子 DNA を酸化修飾し、その構造ならびに機能変化を引き起こす。また、動脈硬化等の心血管病や癌をはじめとする老化関連疾患の成立、発症ならびに進展過程において、酸化ストレスが関与していることがこれまでに明らかとなっている。

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が、脱リン酸化酵素 phosphatases は、このリン酸化シグナル経路において、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、チロシン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、チロシン脱リン酸化酵素 tyrosine

phosphatases 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。我々は、これまで、チロシン脱リン酸化酵素の一種である dual specificity phosphatases (DSPs) を、degenerate polymerase chain reaction (PCR) 及び expression sequence tag (EST) data search を用いて同定あるいはクローニングし、そのうち、ヒトの心血管系ならびに凝固系に発現している DSPs をその生理的機能及び疾患との関連を明らかにすべく解析をしてきた。多くのチロシン脱リン酸化酵素は、その生理的役割が未だ明らかではなく、また酸化ストレスによるその構造機能変化ならびに心血管病との関連について知られていないが、今回、我々は、酸化ストレスにおける DSPs の構造機能変化を明らかにすることを目的として以下の研究を行った。

B. 研究方法

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 (pNPP) 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。

C. 研究結果

我々は、これまで、チロシン脱リン酸化酵素の中で、ヒトの心血管系ならびに凝固系に発現している DSPs をその生理的機能及び疾患との関連において解析をしてきた。また、動脈硬化等の心血管病や癌をはじめとする老化関連疾患の成立、発症ならびに進展過程において、酸化ストレスが関与することが明らかとなっているが、以下に、酸化ストレスと DSPs との関連について、その構造機能変化の観点から

研究を行った。

まず、我々がクローニングした 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、H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ の濃度依存的であった。さらに、H₂O₂ 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 H₂O₂ 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。H₂O₂ 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、H₂O₂ 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にのみ、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、H₂O₂ により DSP-X は、多量体形成することが示された。次に、H₂O₂ 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。

D. 考察

以上より、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。

E. 結論

上記の研究により、紫外線や活性酸素などによる酸化ストレスは、我々のクローニングならびに同定したチロシン脱リン酸化酵素を不活化すること、また、その特異的システイン残基を酸化修飾することで、分子内結合及び分子間結合を生じさせることが明らかとなった。これらは、酸化ストレスが脱リン酸化酵素の活性中心であるシステイン残基を介して分子内結合及び分子間結合を引き起こすことで、その不活化を生じさせることを示唆した。

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

抗血小板薬の反応性と関係する分子の解析

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

研究協力者 松原由美子 慶應義塾大学医学部特別研究教員講師

研究要旨 血小板血栓が主体となり発症する冠状動脈疾患や虚血性脳血管障害は我が国の死亡原因の上位を占めており、これら疾患に対する再発予防や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。したがって抗血小板薬に対する感受性の原因となる因子の検出が急務となっている。今年度は(1)抗血小板薬に対する responder、non-responder に関連する遺伝子多型を網羅的に検討するための microarray を用いた解析、(2)脳血管障害(CVD)の疾患感受性に関連する遺伝子多型を網羅的に解析するための microarray を用いた case-control study、(3)不応に関連する可能性のある血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討、(4)アスピリンの作用発現に関連の可能性がある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の検討、(5)基礎検討としてマウス ES 細胞から in vitro 分化誘導にて得た巨核球・血小板を用いて、アスピリン存在下での機能検討、微量サンプルにおける microarray 解析の技術的改良、そして血小板の産生機構に対するアポトーシスの関与、の5点について検討した。その結果、(1)PFA-100[®]で評価したアスピリン感受性に関連する遺伝子多型を検出した。(2)CVDの疾患感受性に関与する遺伝子多型を検出した。(3)血小板ミトコンドリア遺伝子多型を検出するための予備検討を行った。(4)hTERTの正常冠状動脈内皮細胞への遺伝子導入は intercellular adhesion molecule や von Willebrand factor の発現低下に関与していた。(5)マウス ES 細胞から得られた巨核球と血小板はアスピリン存在下で ADP あるいはトロンビン刺激によるフィブリノーゲン結合が抑制された。微量サンプルにおける microarray 解析のプロトコルを確立した、巨核球分化と血小板の産生機構にアポトーシス、caspase 活性化の関与が示唆された。以上、今年度の研究成果から抗血小板薬の反応性と関係する候補分子が検出された。また次年度のための新しいプロトコルが確立された。

A. 研究目的

冠状動脈疾患や虚血性脳血管障害など動脈血栓症に対する有用性が示されている抗血小板薬は多くの患者に投与されている。抗血小板薬はこれら疾患の再発予防、一次予防においてもその効果が示されている。しかし一方では抗血小板薬の動脈血栓症に対する予防効果は必ずしも十分でないことが問題視されている。抗血小板薬の臨床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、凝集惹起物質に対し非常に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。これは臨床的によく経験される事実であり、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。この血小板機能の個体差には遺伝的要因が想定されている。

世界中で非常に多く使用されている抗血小板薬であるチクロピジンあるいは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「不応症」なる状態が存在する。大規模研究でもこの不応の患者では血栓症の再発率が高いことが示されて

いる。これら抗血小板薬に対する反応性の個体差が動脈血栓症における予防効果に影響している可能性はきわめて高い。従って抗血小板薬に対する responder、non-responder の原因となる因子の検出は今後のオーダーメイド医療に欠かす事の出来ないものである。

そこで本研究は抗血小板薬に対する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する。今年度は以下の5点について検討した。(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の評価は患者のみならず、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。この検討により抗血小板薬に対する感受性の高い群と低い群

(responder と non-responder) に分け microarray を用いた網羅的解析からその感受性に強く関与する遺伝子多型の検出する、(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。その血栓形成能に遺伝的要因の関与が示唆されている。今回、脳血管障害患者 (CVD) 群とコントロール群における microarray を用いた DNA 解析により疾患感受性に関与する遺伝子多

型を網羅的に検索する、(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。今回、その遺伝子解析の予備検討を行う、(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。これまでに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。そのテロメラーゼ活性を主要に規定するテロメラーゼの活性サブユニットhTERTのプロモーターに存在する遺伝子多型はそのプロモーター活性やテロメラーゼ活性に影響を及ぼす。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。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網羅的に解析し、hTERTにより発現影響を受ける因子を同定する。今後、アスピリン添加時の細胞が示す遺伝子プロファイリングを検討する際の基礎データとして用いる。

(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：血小板研究の主要な問題点は無核であるため遺伝子改変が出来ないことである。そして本研究課題の目的に関連する問題点はRNA発現解析を行うために得られるサンプル量が僅かであること、アスピリンの巨核球に対する有用性が報告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である。そこで多分化能を有する胚性幹細胞(ES細胞)からin vitro分化誘導により巨核球・血小板を産生させる。ここでES細胞は遺伝子改変が可能であり、非常に強い増殖能を有するため多くの造血幹細胞、巨核球、血小板を得ることができる。また、種々の因子の影響を受けやすいヒト血小板に比べ、ES細胞由来血小板の比較検討の際に実験条件をコントロールすることが可能である。今回はこれまでの検討結果(in vitro分化誘導の各過程におけるmicroarray遺伝子発現解析や血小板機能解析)をも

とにアスピリン添加時の巨核球、血小板の機能を解析する。そしてヒト血小板を解析するための予備検討として、微量サンプルを用いて microarray 解析を行うプロトコルを確立する。また、アスピリンや NSAIDs の細胞アポトーシスに及ぼす影響が報告されているが「巨核球のアポトーシスや血小板の細胞死にアスピリンや NSAIDs が関与しているかどうか」は不明であることに加え、「巨核球分化や血小板産生においてアポトーシスが関与しているかどうか」についてもまだ議論中である。したがって、今回は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を検討する。

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、健常人からの血液（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(caspase3、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。

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30uM添加30分後に血小板活性化物質であるADP20uM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。

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