

ロテイン S K196E 変異とプロテイン S 活性値との相関. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡, 11 月, 2005.

松本雅則、石西綾美、石指宏通、秋山暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村豊、井上信正、小亀浩市、宮田敏行、藤村吉博: 妊娠経過中に診断された Upshaw-Schulman 症候群の 4 家系 7 症例. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡, 11 月, 2005.

古小路英二、田中直子、山下篤、松本雅則、八木秀男、櫻井嘉彦、丸塚浩助、畠山金太、藤村吉博、山本隆一、浅田祐士郎: 胎盤由来 ecto-NTP Diphosphohydrolase 1 は ADP, ATP による障害動脈の収縮を抑制する. **第 28 回日本血栓止血学会学術集会**. 福岡, 11 月, 2005.

小宮山豊、吉賀正亨、北澤康秀、中谷寿男、小亀浩市、宮田敏行、高橋伯夫: FRETS-VWF73 による ADAMTS13 活性測定と臨床検査—プレートおよび標準血漿—. **第 52 回日本臨床検査医学会総会**. 福岡, 11 月, 2005.

松山友美、植村正人、石川昌利、松本雅則、石指宏道、森岡千恵、加藤誠司、櫻井伸也、浪崎正、藤本正男、小寫秀之、石井禎暢、安辰一、瀧村

力、藤村吉博、福井博: アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性と血漿サイトカインの動態. **第 36 回日本肝臓学会西部会**. 鈴鹿, 11 月, 2005.

Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Critical role of endogenous ADP via P2Y12 receptor in maintenance of I1bβ3 activation. *The American Society of Hematology 47th Annual Meeting*. Atlanta, USA, December, 2005.

Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Hiura H, Fujimura Y: Monoclonal antibodies to a VWF -A2 decapeptide with the C-terminal residue Tyr1605, generated by ADAMTS13 cleavage, develop a highly sensitive ELISA for its activity and characterize Upshaw-Schulman syndrome. *The American Society of Hematology 47th Annual Meeting*. Atlanta, USA, December, 2005.

Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuraishi K, Imamura Y, Inoue N, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y: Upshaw-Schulman syndrome: a masqueraded thrombocytopenia during pregnancy. *The American Society of Hematology 47th Annual Meeting*.

Atlanta, USA, December, 2005.

木村利奈、阪田敏幸、岡本章、小久保喜弘、岡山明、友池仁暢、本田繁則、川崎富夫、辻 肇、小嶋哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田満、池田康夫、宮田敏行: 日本人の静脈血栓症の危険因子プロテイン S K196E 変異. **第 12 回関西血栓フォーラム**. 大阪, 1 月, 2006.

木村利奈、小久保喜弘、宮下光太郎、大坪亮一、長東一行、大槻俊輔、峰松一夫、成富博章、岡山明、友池仁暢、本田繁則、宮田敏行: 日本人におけるビタミン K サイクル関連遺伝子

の多型とワーファリン投与量との関連. **日本血栓止血学会学術標準化委員会 2006 シンポジウム**. 東京, 2 月, 2006.

宮田敏行: 日本人のプロテイン S 欠損症患者の現状とスクリーニングの重要性. **日本血栓止血学会学術標準化委員会 2006 シンポジウム**. 東京, 2 月, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金

Ⅱ. 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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定に関する研究

主任研究者 宮田 敏行 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

血小板凝集は、血漿接着蛋白質フォンビルブランド因子（VWF）の重合度による調節をうけており、通常、超高分子量 VWF は VWF 切断酵素によってその重合度を制御されている。近年、血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子として同定されたメタロプロテアーゼ ADAMTS13 が VWF 切断酵素である事が明らかとなった。この酵素は他のタンパク質との相互作用により活性が制御されていると考えられるが、そのメカニズムは不明である。そこで ADAMTS13 と相互作用し、その活性を制御するタンパク質をゲノム網羅的に探索した。その結果、ADAMTS13 結合タンパク質の候補遺伝子として 165 個の既知遺伝子と 24 個の新規遺伝子が得られた。

A. 研究目的

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈閉塞性疾患では血小板は中心的な役割を果たしている。血小板は動脈の血流下では、血漿タンパク質であるフォンビルブランド因子（VWF）依存性にコラーゲン上で凝集反応を起こす。血小板凝集は、血漿接着蛋白質 VWF の重合度による調節を受け、超高分子量 VWF 重合体は微小血管内で血小板凝集を誘導する。通常、生体内では超高分子量 VWF は VWF 切断酵素によってその重合度

を制御されている。切断酵素の実体は長い間、不明であったが、近年血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子として同定されたメタロプロテアーゼ ADAMTS13 が VWF 切断酵素である事が明らかとなった。この酵素は他のタンパク質との相互作用により活性が制御されていると考えられるが、相互作用するタンパク質は明らかになっておらず、活性調節メカニズムは全く不明である。そこで本研究では ADAMTS13 と相互作用し、その活性を制御するタン

パク質をゲノム網羅的に探索し同定する事を目的とした。

B. 研究方法

マルチドメイン構造を持つ ADAMTS13 のシステインリッチドメインとスペーサドメインに相互作用するタンパク質を、ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリー (Clontech 社) を用い、酵母ツーハイブリッド法により探索した。得られた陽性クローンから抽出した cDNA の塩基配列解析は、ABI3730 シークエンサーおよび ABI3100 シークエンサーで行った。

C. 研究成果

計 3.4×10^7 個のクローンを用いてスクリーニングを行った結果、558 個の陽性クローンを得た。全てのクローンから直接候補遺伝子を PCR 法により増幅し、塩基配列の解析を行った。得た塩基配列情報から候補遺伝子が既知の遺伝子であるかを調べるため、遺伝子データベースを用いて相同性検索を行った。その結果、候補遺伝子には 165 個の既知遺伝子、24 個の新規遺伝子が含まれることが明らかとなった。一方、ADAMTS13 は肝星細胞から分泌され、血管内で働くことが知られている。そこで 165 個の既知遺伝子について文献を基に蛋白質の局在位置を調べた結果、57 個の遺伝子が分泌蛋白質あるいは細胞形質膜に局在する蛋白質をコードしていた。

D. 考察

これまでの報告から、ADAMTS13 のスペーサドメインは VWF の切断に必須なドメインであり、またシステインリッチドメインはインテグリンとの結合に重要なアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列を含んでいる。今回のスクリーニングの結果から、この 2 つのドメインに結合する候補遺伝子として 189 個の遺伝子を得た。これら遺伝子のうち、57 個の遺伝子が分泌蛋白質あるいは細胞膜に局在する蛋白質をコードすることが明らかとなった。ADAMTS13 が分泌蛋白質であることから、57 の遺伝子の中に ADAMTS13 と生体内で結合する蛋白質をコードするものがあると考えられる。今後、これらの遺伝子産物と ADAMTS13 との相互作用を、遺伝子特異的抗体を用いた免疫沈降法等で確認する必要があると考える。

E. 結論

酵母ツーハイブリッド法を用いたゲノム網羅的なスクリーニングの結果、ADAMTS13 に結合する候補遺伝子を 189 個得た。このうち、分泌蛋白質あるいは細胞膜に局在する蛋白質をコードしている 57 個の遺伝子を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, Fujita T: Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the *ADAMTS13* gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* Advance Access published online on January 31, 2006.
2. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Complete deficiency in *ADAMTS13* is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, First Edition Paper, prepublished online December 20, 2005.
3. Miyata T, Kokame K, Banno F: Measurement of *ADAMTS13* activity and inhibitors. *Curr. Opin. Hematol.* 12(5) 384-9. 2005.
4. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for *ADAMTS13* assay. *Br. J. Haematol.* 129(1) 93-100. 2005.

2. 学会発表

1. 宮田敏行、シンポジウム 2、脳卒中と血液凝固異常、「血栓性素因の遺伝的背景」、第 30 回日本脳卒中学会総会、平成 17 年 4 月 21 日、盛岡市、
2. Toshiyuki Miyata, *ADAMTS13*: patient analysis, assay method, and knockout mouse, “5th BIC 2005 Fifth Bari International Conference on Hemophilia and Allied Disorders, von Willebrand factor (including *ADAMTS-13*) and Platelet Glycoproteins”, Invited speaker, May 22–25, 2005 Pizzomunno, Italy
3. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T, Role of *ADAMTS13* in platelet thrombus formation under flow conditions in mice (poster presentation), Aso International Meeting, June 21-22, 2005, Kumamoto
4. 小亀浩市、宮田敏行「血栓性血小板減少性紫斑病」シンポジウム：凝固異常を引き起こす疾患の病態と検査、日本臨床検査医学会・近畿支部例会、平成 17 年 6 月 11 日、神戸市
5. 宮田敏行「凝固異常症研究の進展」第 28 回シスメックス血液学

- セミナー、血液疾患の分子生物学的基礎、平成 17 年 6 月 18 日、神戸市
6. Kokame K, Miyata T: Oral presentation, New ADAMTS13 assay, Von Willebrand Factor subcommittee session, The International Society on Thrombosis and Haemostasis 51st Annual Scientific and Standardisation Committee, August 6-7, 2005, Sydney, Australia
 7. Miyata T. Assays for ADAMTS13, Symposium: Regulation of von Willebrand Factor Function (invited speaker), The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXth Congress, August 6-12, 2005, Sydney, Australia
 8. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T. Oral presentation, Generation and Characterization of ADAMTS13-Deficient Mice (oral presentation), The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXth Congress, August 6-12, 2005, Sydney, Australia
 9. 松本雅則、藤村吉博、小亀浩市、宮田敏行「TTP/HUS 患者における ADAMTS13 解析」第 42 回補体シンポジウム、平成 17 年 8 月 19-20 日、名古屋市
 10. 宮田敏行「病的血栓の遺伝的背景」第 3 回血液血管オルビス、指名講演、平成 17 年 8 月 20-21 日、東京都
 11. 坂野史明、小亀浩市、奥田智彦、本田繁則、宮田茂樹、加藤恒、富山佳昭、宮田敏行「ADAMTS13 欠損マウスにおけるずり応力下壁血小板凝集の亢進」第 3 回血液血管オルビス、平成 17 年 8 月 20-21 日、東京都
 12. 小亀浩市・宮田敏行「脈管由来の生理活性物質を利用した病態診断法、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の診断と ADAMTS13 活性測定」第 48 回日本臨床化学会近畿支部例会、平成 17 年 8 月 27 日、守口市
 13. 宮田敏行、「血栓症の遺伝的背景」、第 42 回近畿 MMC 研究会、平成 17 年 9 月 17 日、大阪市
 14. 坂野史明、小亀浩市、奥田智彦、本田繁則、宮田茂樹、加藤恒、富山佳昭、宮田敏行「ADAMTS13 欠損マウスにおける血流下血栓形成の亢進」ワークショップ

35. 血栓性素因の動物モデルと臨床解析、第 67 回日本血液学会第 47 回日本臨床血液学会合同総会、平成 17 年 9 月 17-19 日、横浜市
15. 今村 豊、木村芳三、野見山敬太、長部誠志、松本雅則、藤村吉博、小亀浩市、宮田敏行「妊娠を契機に発症した Upshaw-Schulman 症候群の姉妹例」第 67 回日本血液学会第 47 回日本臨床血液学会合同総会、平成 17 年 9 月 17-19 日、横浜市
16. 小宮山豊、吉賀正亨、北澤康秀、中谷寿男、小亀浩市、宮田敏行、高橋伯夫「FRETS-VWF73 による ADAMTS13 活性測定と臨床検査—プレートおよび標準血漿—」第 52 回日本臨床検査医学会総会第 45 回日本臨床化学会年会 連合大会、平成 17 年 11 月 17-20 日、福岡市
17. 宮田敏行「病的血栓の遺伝的背景」第 28 回日本血栓止血学会学術集会、モーニングレクチャー、平成 17 年 11 月 25 日、福岡市
18. 岡本 章、阪田敏幸、小久保喜弘、岡山 明、宮田敏行「凝固・線溶系活性化マーカーの加齢による変動とその性差」第 28 回日本血栓止血学会学術集会、平成 17 年 11 月 23-25 日、福岡市
19. 松本雅則、秋山 暢、富山順治、名取一彦、倉石安庸、今村 豊、井上信正、小亀浩市、宮田敏行、藤村吉博「妊娠経過中に診断された Upshaw-Schulman 症候群の 4 家系 7 症例」、第 28 回日本血栓止血学会学術集会、平成 17 年 11 月 23-25 日、福岡市
20. Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuraishi Y, Imamura Y, Inoue N, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y, Upshaw-Schulman syndrome: a masqueraded thrombocytopenia during pregnancy (poster presentation), The American Society of Hematology, 47th Annual Meeting and Exposition, December 10-13, 2005, Atlanta, USA
21. Masunaga N, Hayashi T, Kiyoshima T, Matsuura M, Kurooka A, Taniguchi M, Kimura A, Kokame K, Miyata T, Ishikawa K. Von Willebrand factor cleaving metalloprotease (ADAMTS13) has less potent activity at acute phase in acute coronary syndrome. 第 70 回日本循環器学会総会・学術集会、2006 年 3 月 24-26 日、名古屋市
- H. 知的財産権の出願・登録状況
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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

血小板膜蛋白質と情報伝達タンパク質の心筋梗塞や脳梗塞に関する研究

分担研究者 森崎隆幸 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

血小板凝集能は心筋梗塞や脳梗塞に大きく関与する。血小板凝集にかかわる遺伝子の多型を収集し、血小板凝集能や心筋梗塞・脳梗塞に寄与するかどうかを明らかにする。本年は、インテグリン $\beta 3$ 遺伝子、細胞内情報伝達タンパク質 Rap1B を取り上げ、日本人の DNA でシークエンスを行い、遺伝子多型を収集した。

A. 研究目的

心筋梗塞や脳梗塞といった動脈閉塞症の遺伝的背景として、血小板凝集に関与する膜受容体やアゴニスト刺激を伝える細胞内情報伝達因子が候補遺伝子と考えられる。遺伝子多型は、人種によりその頻度が異なることが明らかとなっている。また、5%以下の頻度を持つ多型でも、機能に影響を与えるのであれば重要である。ここでは、日本人を対象に、DNA シークエンスを行い、血小板膜タンパク質および情報伝達タンパク質の遺伝子の多型を収集した。これらの中で、機能にかかわる可能性が高いミスセンス変異に着目した。

B. 研究方法

日本人 96 人の DNA を用いて、エクソンとプロモーター領域のシークエンスを行い、遺伝子多型を収集した。DNA シークエンスは、ABI3730 シークエンサーおよび ABI3100 シークエンサーで行った。遺伝子多型は、Sequencher (Gene Code 社) で同定した。

(倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従う。

C. 研究成果

1) インテグリン $\beta 3$ 遺伝子 (*ITGB3*)

インテグリン $\beta 3$ 鎖は αIIb 鎖と 1:1 の複合体を形成し、血小板上のフィブリノーゲン受容体であるインテグリン GPIIbIIIa を形成し、血小板凝集反応で中心的役割を果たす。本タンパク質は 788 残基から成り、遺伝子は 17q21.32 に位置する。本遺伝子のエクソン領域をシークエンスすることにより、5 つのミスセンス変異を含む 42 個の遺伝子多型を同定した。ミスセンス変異 L59P は 2 人に見出された。ミスセンス変異 R169Q と E654K はそれぞれ 1 人に同定された。ミスセンス変異 R515Q は 4 人に同定された。

2) *Rap1B*

Rap1B はアゴニスト刺激により活性化される血小板内の小 GTPase である。本因子は、インテグリン $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の上流、G タンパク質共役型受容体の下流に位置する。本遺伝子の欠損マウスは出血時間が延長し、ADP とエピネフリンによる血小板凝集能が低下する。本タンパク質は 184 残基から成り、遺伝子は 12q14 に位置する。私達は本遺伝子のエクソン領域をシークエンスすることにより、3 つの遺伝子多型を同定した。ミスセンス変異はなかった。

D. 考察

インテグリン $\beta 3$ 遺伝子 *ITGB3* には、日本人 96 人中 8 人に、ミスセンス変異 L59P, R169Q, E654K のいずれかが同定された。血小板膜上の主要なインテグリンに、高頻度 (8.3%) でミスセンス変異が見られることが明らかとなった。一方、*Rap1B* には、ミスセンス変異はなかった。ここに見いだした遺伝子多型情報に基づいて、これらの遺伝子を心筋梗塞や脳梗塞の素因遺伝子として、病態との関連を明らかにしてゆく必要がある。また、抗血小板薬であるアスピリンやチクロピジン、クロピドグレルへの、遺伝子多型による応答性の違いを明らかにする必要があると考える。

E. 結論

日本人を対象に、血小板凝集にかかわる 2 つの遺伝子をシークエンスし、45 個の遺伝子変異を同定した。このうち、機能の変化にかかわると考えられるミスセンス変異は 3 つあった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, Gruenig E, Janssen B, Koehler R, Seeger W, Eickelberg O, Olschewski

H, Gregory Elliott C, Glissmeyer E, Carlquist J, Kim M, Torbicki A, Fijalkowska A, Szewczyk G, Parma J, Abramowicz MJ, Galie N, Morisaki H, Kyotani S, Nakanishi N, Morisaki T, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O, Soubrier F, Coulet F, Morrell NW, Trembath RC: Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. Hum Mutat. 27(2) 121-132. 2006.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

血小板血栓能評価のための地域一般住民を対象にした血小板凝集能の検討

分担研究者	岡山 明	国立循環器病センター	循環器病予防検診部	部長
研究協力者	小久保喜弘	国立循環器病センター	循環器病予防検診部	医師
研究協力者	阪田 敏幸	国立循環器病センター	臨床検査部	技師
研究協力者	佐藤 清	国立循環器病センター	臨床検査部	技師長

研究要旨

脳梗塞や虚血性心疾患の発症に、血小板が大きく関与することは周知であり、その予防として抗血小板薬が広く用いられている。近年、血栓能は個人差があると認識され、その一部は遺伝子多型で説明されている。しかし、これらの多くは患者対照研究から得られたものであり、一般住民を対象にした研究は極めて少ない。本研究は、地域一般住民（約 1,500 名）を対象に、コラーゲンと ADP をアゴニストとして、血小板凝集能を測定し、心血管疾患患者の凝集能と比較するためのデータを収集する。本年度は、292 名の血小板凝集能の測定結果から、血小板数、血小板凝集能 ADP、COLL 値の高値が、動脈硬化と関連のある可能性が示唆された。

A. 研究目的

血小板は、脳梗塞や虚血性心疾患の発症に大きく関与している。高ずり応力下の病的血管では、露出したコラーゲン依存性、もしくはコラーゲンに結合したフォンビルブランド因子依存性に、血小板の活性化が起こり、その時、ADP やトロンボキサンが放出され、更に強固に血小板は活性化される。活性化された血小板では、血小板インテグリンが活性化さ

れ、これにフィブリノーゲンやフォンビルブランド因子が結合し、血小板血栓が形成される。血小板の機能は、検査室では凝集による透光度の変化で測定される。即ち、多血小板血漿がアゴニスト刺激により凝集すると、透光度が増加する。この血小板の機能測定は、大規模な集団を対象とする研究にはあまり用いられていない。その理由として、1) 多血小板血漿の調製に手間がかかる、2) 測定に用

いる機種により結果に差が見られ標準化されていない、3) 血小板凝集能は種々の薬剤で影響を受けるので十分な問診が必要、が考えられる。私達はこれまで、都市部の地域一般住民を対象に、血液凝固能、血液凝固制御因子能、線溶因子能の研究を進めてきた。これらの研究により、日本人の血栓症の背景として、性・年齢による凝固制御因子の変動、欧米人にはみられない日本人の特徴などが明らかにした。

本研究では、これまで行ってきた問診などの経験に基づき、これまでと同じ地域一般住民を対象として、正確な血小板凝集能を測定し、生活習慣病との関係を解析することを目的とする。

B. 研究方法

吹田市一般住民から性・年齢で層別抽出した対象者のうち、平成17年11月～平成18年2月に国立循環器病センターで健診を受診した方のうち、69歳までの受診者で、研究に同意した者(292名)を対象とした。血小板凝集は、1.7 μg/ml コラーゲンと 1.7 μM ADP を用いて測定した。これらのアゴニスト濃度は、国立循環器病センター検査部で患者検体の測定に用いている濃度と同じである。

解析方法: 血小板凝集能の判定は、ADP > 92% または コラーゲン(COLL) > 94% で高値、ADP < 51% または COLL < 59% で低値とした(院内の判定と同じもの)。四分位別による血小板数および血小板凝集能と検査値との関係は、性別に年齢調整の

共分散分析を用いて解析した。

倫理面への配慮: 健診受診時に、書面にて本研究の同意の得られた受診者を対象者とした。データは集団の特徴として取り扱うので、個人名が特定できるような形式でデータを公表することはない。

C. 研究結果

本研究の男女別対象者の主要な健診結果を表1に示した。平均年齢は、男性 59.6 ± 7.2 歳、女性 58.5 ± 7.4 歳で、血小板数の平均値は、男性で 244.4 ± 71.9 × 10³ ml、女性で 261.3 ± 59.9 × 10³ ml であった。血小板凝集能 ADP は、男性で 64.6 ± 14.5 %、女性で 68.1 ± 11.1 %、COLL は男性で 74.4 ± 11.5 %、女性で 76.2 ± 10.2 % であった。

表1. 男女別対象者健診結果

	男性	女性
人数, 人	121	171
年齢, 歳	59.6±7.2	58.5±7.4
収縮期血圧, mmHg	122.3±15.0	117.9±15.9
拡張期血圧, mmHg	79.7±9.9	73.2±9.9
総コレステロール, mg/dL	202.3±33.4	213.3±33.9
HDL コレステロール, mg/dL	56.7±13.8	67.7±16.5
BMI, kg/m ²	23.7±2.8	22.6±3.7
血小板, ×10 ³ /mm ³	244.4±71.9	261.3±59.9
血小板凝集能 ADP, %	64.6±14.5	68.1±11.1
COLL, %	74.4±11.5	76.2±10.2
喫煙率, %	29.8	7.6
飲酒率, %	72.7	23.4

性年代別の血小板数、血小板凝集能 ADP と COLL を表2に示した。血小板数は女

表2. 性年代別血小板数および血小板最大凝集率

		40代	50代	60代
男性	血小板	243.0±26.4	229.6±44.1	253.4±89.0
	ADP, %	62.7±17.5	66.2±14.9	64.0±13.6
	COLL, %	74.2±10.8	75.5±11.4	73.9±11.8
女性	血小板	276.3±56.9	269.5±61.3	249.4±58.2
	ADP, %	70.4±7.9	64.3±11.2	70.4±11.3
	COLL, %	75.9±6.6	74.8±11.7	77.5±9.7

表3. 血小板凝集能高値・低値の割合

		低値	基準値	高値
男性	ADP, %	19.0	81.0	0
	COLL, %	8.3	91.9	0
女性	ADP, %	7.0	93.0	0
	COLL, %	4.1	95.9	0

高値: ADP>92, COLL>94
低値: ADP<51, COLL<59

性で年代が進むと減少していた(p<0.05)。血小板凝集能 ADP および COLL の低値の割合は、男性でそれぞれ 19%、8.3%、女性でそれぞれ 7.0%、4.1%であった。高値のものはこの対象者ではみられなかった(表 3)。

表4. 性別年齢調整血小板数四分位別成績

	Q1	Q2	Q3	Q4	トレンドp
男性	- 217	218 - 239	240 - 262	263 -	
SBP, mmHg	120.7±2.5	121.5±2.3	121.3±2.7	127.8±3.2	0.324
DBP, mmHg	80.3±1.7	79.1±1.6	78.6±1.8	81.6±2.2	0.718
BMI, kg/m ²	24.6±0.5	23.0±0.4	23.2±0.5	24.0±0.6	0.078
TC, mg/dL	197.7±5.9	198.1±5.3	202.2±6.2	217.9±7.5†	0.145
HDL, mg/dL	53.3±2.4	57.5±2.2	57.9±2.6	58.9±3.1	0.424
女性	- 223	224 - 257	258 - 299	300 -	
SBP, mmHg	117.9±2.4	113.2±2.6	119.6±2.3	119.6±2.0	0.203
DBP, mmHg	72.8±1.5	70.6±1.7	73.6±1.5	74.6±1.3	0.293
BMI, kg/m ²	22.2±0.6	21.3±0.6	23.8±0.5	22.6±0.5	0.020
TC, mg/dL	205.0±5.3	217.3±5.8	208.5±5.1	220.6±4.6†	0.106
HDL, mg/dL	68.0±2.6	72.3±2.8	64.4±2.5	67.2±2.2	0.200

†:p<0.05(Q1 と比較)

表5. 性別年齢調整血小板最大凝集能 ADP 四分位別成績

	Q1	Q2	Q3	Q4	トレンドp
男性	- 53	54 - 68	69 - 74	75 -	
SBP, mmHg	122.8±2.4	122.5±2.7	120.5±2.8	123.3±2.8	0.894
DBP, mmHg	80.0±1.6	80.4±1.8	79.1±1.9	79.2±1.9	0.958
BMI, kg/m ²	23.9±0.5	24.0±0.5	23.3±0.5	23.2±0.5	0.609
TC, mg/dL	207.7±5.6	202.1±6.3	193.7±6.4	204.1±6.4	0.432
HDL, mg/dL	59.6±2.3	57.1±2.5	52.1±2.6†	57.2±2.6	0.209
女性	- 62	63 - 70	71 - 77	78 -	
SBP, mmHg	116.7±2.6	118.8±2.2	119.2±2.3	116.9±2.2	0.829
DBP, mmHg	73.4±1.7	73.5±1.4	74.1±1.5	71.8±1.4	0.691
BMI, kg/m ²	22.6±0.6	22.5±0.5	23.2±0.6	22.0±0.5	0.486
TC, mg/dL	216.3±5.9	215.1±5.1	210.3±5.2	212.0±5.0	0.856
HDL, mg/dL	69.9±2.8	65.8±2.4	68.1±2.5	67.6±2.4	0.741

†:p<0.05(Q1 と比較)

表6. 性別年齢調整血小板最大凝集能 COLL 四分位別成績

	Q1	Q2	Q3	Q4	トレンドp
男性	- 71	72 - 77	78 - 81	82 -	
SBP, mmHg	124.6±2.5	119.1±3.2	124.1±2.6	120.7±2.3	0.418
DBP, mmHg	80.4±1.7	79.6±2.2	79.0±1.8	79.7±1.6	0.954
BMI, kg/m ²	24.3±0.5	24.2±0.6	23.4±0.5	23.0±0.5	0.200
TC, mg/dL	204.6±5.8	205.8±7.3	205.6±6.2	195.7±5.5	0.555
HDL, mg/dL	58.6±2.4	57.3±3.0	55.8±2.6	55.4±2.3	0.765
女性	- 73	74 - 78	79 - 81	82 -	
SBP, mmHg	116.5±2.6	116.7±2.4	117.4±2.1	120.3±2.1	0.603
DBP, mmHg	73.8±1.7	72.6±1.6	72.9±1.4	73.4±1.4	0.955
BMI, kg/m ²	22.2±0.6	22.8±0.6	22.1±0.5	23.1±0.5	0.515
TC, mg/dL	209.7±6.0	215.7±5.5	213.5±4.9	213.6±4.9	0.906
HDL, mg/dL	73.1±2.8	66.4±2.6	69.1±2.3	63.9±2.3†	0.075

†:p<0.05(Q1 と比較)

血小板数を性別に四分位にして、各検査値の年齢調整平均と標準誤差を解析した(表 4)。男女とも血小板数の一番少ない群(第 1 値分位; Q1)を基準にして、一番多い群(第 4 四分位; Q4)で総コレステロールが有意に高かった($p < 0.05$)。また、血小板凝集能 ADP を性別に四分位にして、各検査値の年齢調整平均と標準誤差を解析した(表 5)。男性の ADP の一番小さい群(第 1 四分位; Q1)を基準にして、第 3 四分位で HDL コレステロール値が有意に低かった。さらに、血小板凝集能 COLL を性別に四分位にして、各検査値の年齢調整平均と標準誤差を解析した(表 6)。女性の COLL の一番低い群(第 1 四分位; Q1)を基準にして、一番高い群(第 4 四分位; Q4)で HDL コレステロール値が有意に低かった。

D. 考察

地域一般住民の血小板凝集能の測定を開始し、平成 17 年 3 月までに 292 名の測定を終了した。血小板数、血小板凝集能 ADP、COLL 値は総コレステロール値と正相関、HDL コレステロール値と逆相関の傾向がみられた。血小板凝集能 ADP、COLL 高値の割合はみられず、低値がみられた。

都市部の地域一般住民を対象に血小板凝集能の測定を開始した。測定は順調に進んだ。このペースでいくと、平成 18 年度末には、血小板凝集能のデータベースが完成する。

E. 結論

血小板数、血小板凝集能 ADP、COLL 値の高値は、動脈硬化を促進させることが示唆された。平成 18 年度も同じプロトコール(十分な問診と正確な凝集能測定)で研究を進める。

F. 健康危険情報

本研究においては、健康危険情報に該当するものはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に記述すべきものはなかった。

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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

インテグリン活性化に係わるシグナル伝達分子に関する研究

分担研究者 本 田 繁 則 国立循環器病センター研究所 室長

研究要旨

血小板血栓形成機構、ことに血小板インテグリンの活性化メカニズムを明らかにするとともにその制御法の開発を試みる。本年度は活性化した血小板キメラインテグリンを発現する細胞株を樹立する。次に、化学変異原を用いてゲノム網羅的に変異を導入し、活性化に係わるシグナル分子に変異が導入された細胞を獲得すべくスクリーニングを始める。

A. 研究目的

インテグリン α IIb β 3は血小板・巨核球系細胞に分布し、血小板での発現は約8万分子におよぶ主要な接着受容体として機能している。 α IIb β 3は通常非活性の状態にあるが、ひとたび細胞内のシグナル伝達分子により活性化されると、主に細胞外接着分子のフィブリノーゲンとの結合を介して血小板凝集反応、さらには血小板血栓形成といった血小板の機能発現に不可欠な要素として働いている。現在この分野の研究は欧米を中心に精力的に進められている。しかしながら、インテグリン活性化のメカニズムの全容は依

然として不明である。本研究の目的は α IIb β 3の活性化に係わる分子を同定し、心筋梗塞や脳梗塞の発症に起因する病的血小板血栓形成の細胞内分子メカニズムを明らかにするとともに、その制御法の開発を目指すことにある。

B. 研究方法

まず、シグナル依存性に活性化されたキメラインテグリン α IIb β 3を恒常的に発現するCHO細胞株を樹立する。CHO細胞は多くの遺伝子が機能的半接合体であるため、変異導入実験における表現効率に優れている。キメラインテグリンは

α IIb 鎖の細胞内領域をインテグリン α 6B の細胞内領域で置換して作製する。一方、 β 3 鎖は野生型を用いる。活性あるいは非活性の識別は α IIb β 3 の活性化状態を特異的に認識するモノクローナル抗体(PAC-1)を用いたフローサイトメトリーにより行う。次に、獲得できた細胞株は化学変異原 ethyl methanesulfonate (EMS) を用いて、1細胞当たり数個の変異導入効率となる条件で処理を行う。変異の導入により、非活性化状態となるキメラ α IIb β 3 を発現する細胞亜群をマルチカラー解析を用いた高速細胞分取装置により収穫した後、クローン化する。

C. 研究結果

キメラ α IIb β 3 を安定発現する細胞株の樹立に成功した。樹立した細胞株は PAC-1 に対して高親和性(コントロール抗体の蛍光強度 \approx 5、PAC-1 の蛍光強度 \approx 250)を示した。この結合は α IIb β 3 アンタゴニストによりほぼ完全に阻害され、特異的結合であった。さらに、PAC-1 結合は ATP 産生阻害効果を有するアジ化ナトリウムおよび 2-デオキシ-D-グルコースにより濃度依存性に抑制された。樹立した細胞株に EMS 処理を行い、PAC-1 結合能が低親和性を示す細胞亜群を分取した。次に、これら細胞を dithiothreitol(DTT)にて処理し、シグナル非依存性に PAC-1 結合が再び高親和性

となる細胞亜群を分取した。さらに、限界希釈法によりクローン化し、PAC-1 に対し低親和性(蛍光強度 \approx 10)を示す細胞を獲得した。

D. 考察

エネルギー依存性に高親和性状態のキメラ α IIb β 3 を発現する細胞株を樹立できた。次に、EMS 処理により低親和性状態となるキメラ α IIb β 3 を発現するクローン細胞を獲得した。今後、これら細胞の中でキメラ α IIb β 3 に変異のないクローンを選別し、発現クローニングを実施したい。

E. 結論

インテグリン α IIb β 3 の活性化に係わる分子を同定すべく準備を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

血栓性血小板減少性紫斑病の新規原因遺伝子変異の同定

分担研究者 小 亀 浩 市 国立循環器病センター研究所 室長

研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）では、血漿中の異常高分子量フォンビルブランド因子（VWF）マルチマーが過剰な血小板凝集を引き起こすことで重篤な全身性症状が出現する。異常高分子量 VWF マルチマーの蓄積は、VWF 切断酵素である ADAMTS13 の機能不全が主な原因である。本研究では、先天性 TTP 患者家系の遺伝子解析を行い、ADAMTS13 の機能不全をもたらす ADAMTS13 遺伝子変異を新たに 19 個同定した。この中には初の ADAMTS13 新生変異も含まれる。一方、TTP と似た臨床症状を示す先天性溶血性尿毒症症候群の責任遺伝子である CFH および MCP 遺伝子に変異は検出されなかった。典型的先天性 TTP はほぼすべて、異常 ADAMTS13 遺伝子のホモあるいは複合ヘテロ接合体として解釈することができる。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）は、血小板数減少と細小血管障害性溶血性貧血を主徴とする重篤な全身性疾患であり、しばしば腎機能障害、動揺性精神神経症状、発熱を併発する。常染色体劣性遺伝を示す先天性（遺伝性）TTP と孤発性の後天性 TTP に分類される。

血小板凝集において重要な役割を果た

す血漿タンパク質としてフォンビルブランド因子（VWF）が知られている。主に血管内皮細胞で合成され、分泌直後には数十個の VWF ポリペプチド鎖同士が共有結合した高分子量ホモマルチマーを形成している。マルチマーの大きさが大きいほど血小板凝集活性が高い。

約 20 年前、TTP 患者の血漿に異常高分子量の VWF マルチマーが存在すること

が明らかにされた。この異常高分子量マルチマーが種々の臓器の細小血管で過剰な血小板凝集を起こし、TTP の諸症状をもたらしている。そして、2001 年、VWF マルチマーを適度に断片化することで血小板凝集活性を調節している血漿酵素として、ADAMTS13 が同定された。つまり、ADAMTS13 の機能不全が TTP の原因となることが明らかになった。

我々は、古くから TTP に関する研究を積極的に推進されていた奈良県立医科大学輸血部と共同で、日本における先天性 TTP 患者家系の ADAMTS13 遺伝子を解析し、原因変異を同定するとともに、VWF 切断酵素活性に対する変異の影響を調べてきた。これまで 7 家系の解析で、7 個のミスセンス変異 (R193W, R268P, C508Y, I673F, C908Y, R1123C)、1 個のナンセンス変異 (Q449X)、3 個のスプライシング異常 (414+1G>A, 686+1G>A, 1244+2T>G) を同定し、原著論文として報告した [Kokame et al: PNAS. 99(18) 11902-11907. 2002, Matsumoto et al: Blood. 103(4) 1305-1310. 2004.]。

本研究では、先天性 TTP 患者家系の ADAMTS13 遺伝子解析をさらに進め、原因変異の特徴を明らかにすることを目的とする。さらに、TTP 様症状の発症に関与する可能性のある補体系の CFH 遺伝子および MCP 遺伝子の解析も行い、新たな原因変異の同定をめざす。

B. 研究方法

先天性 TTP 患者およびその家系構成員 (主に両親と兄弟姉妹) の末梢血液からゲノム DNA を調製し、ADAMTS13 遺伝子の全エキソン領域 (エキソンとイントロンの境界周辺を含む) を PCR 法にて増幅後、その塩基配列を決定した。また、一部の家系においては、CFH 遺伝子および MCP 遺伝子の解析も同様に行った。

[倫理面への配慮] 本研究の実施は、試料採取施設および国立循環器病センターの倫理委員会で承認されている。遺伝子解析研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日)」を遵守して行った。

C. 研究結果

先天性 TTP 患者を含む 11 家系の ADAMTS13 遺伝子解析を行った結果、すでに報告した変異に加え、新たに 13 個のミスセンス変異 (I178T, G227R, H234Q, H234R, Y304C, R312C, C322G, T323R, F324L, R349C, G385E, G525D, A606P)、3 個のナンセンス変異 (Q929X, R1206X, Q1302X)、3 個のフレームシフト変異 (372insGT, 3198delCT, 3220delTACC) を同定することができた。いずれも一般人口には検出されない稀有な変異で、先天性 TTP の原因と考えられる。

これらのうち 3 個のミスセンス変異 (C322G, T323R, F324L) は、同一患者の同一アレルに見つかった。通常、常染色体劣性遺伝病では患者の両親が患者と同一の変異を少なくとも 1 個保有しているが、

本症例においては、C322G/T323R/F324L 変異が両親ともに検出されなかったため、さらに詳細に解析した。その結果、この患者は父親由来の C908Y 変異と、母親由来のアレルに起こった新生変異 C322G/T323R/F324L の複合ヘテロ接合体であった。ADAMTS13 に新生変異を見出した世界初の知見である（論文投稿準備中）。

ADAMTS13 遺伝子解析を行った 11 家系のうち、5 家系の CFH 遺伝子および 4 家系の MCP 遺伝子を解析したところ、いずれも機能異常につながるものが予想される変異は見出されなかった。

D. 考察

これまでの成果とあわせると、計 18 の先天性 TTP 患者家系に 30 個の原因変異を同定したことになる。ほとんどの患者は両親それぞれから異なる変異を継承した複合ヘテロ接合体であったが、ホモ接合体も 2 人存在した。同一変異が複数の家系で見られることは、それらの変異がある程度の頻度で少なくとも日本国内に広がっていることを示唆する。遺伝子変異により ADAMTS13 機能が低下している人がどのくらいの頻度で存在するのか、それが種々の疾患と関連するのか、今後調査すべき課題かもしれない。

同定された変異は ADAMTS13 分子の全体に散在しており、特にホットスポットと考えられる部位は存在しないようである。TTP 原因変異を ADAMTS13 の生

合成や分泌様式、基質認識、触媒機能などに関連づけて解析することで、ADAMTS13 に関する深い洞察が可能になると思われる。

計 18 家系の解析いずれの場合も ADAMTS13 機能異常の原因となると考えられる変異が同定された。つまり、先天性 TTP 患者のほとんどは異常 ADAMTS13 遺伝子のホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体として解釈することができる。これは国外の報告とも一致する。しかし、先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析は、血漿 ADAMTS13 活性が著減している症例を対象とすることがほとんどであるため、当然の結果ともいえる。今後、ADAMTS13 活性低下だけでは説明できない、あるいは ADAMTS13 活性を保持しているにもかかわらず TTP 様の症状を示す患者の遺伝子解析も必要であろう。その場合、ADAMTS13 だけでなく、CFH や MCP といった補体系やその他の因子も解析の標的として考慮する必要がある。その際、今回の研究成果が役立つと考えられる。

E. 結論

先天性 TTP 患者 11 家系の遺伝子解析を行い、すべての症例において発症の原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子の変異が同定された。一方、CFH および MCP 遺伝子に原因変異は発見されなかった。先天性 TTP 患者のほとんどは、異常