

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
(H16-ゲノム-002)

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 康夫
慶應義塾大学医学部内科学 教授

平成 19 (2007) 年 3 月

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 18 年度
総括・分担研究報告書

平成 19 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

鈴木則宏 慶應義塾大学医学部内科（神経内科）教授

松原由美子 慶應義塾大学医学部内科 講師

(研究協力者)

星野晴彦 慶應義塾大学医学部内科（神経内科）専任講師

別添 2

目 次

抗血小板薬の反応性に関連する因子の同定

- I. 総括研究報告** 池田 康夫

- II. 分担研究報告**
 - 1. 動脈血栓症と関係する因子の研究 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. 慢性期脳梗塞における抗血小板薬の検討と前向き調査研究の確立
鈴木 則宏
星野 晴彦
 - 4. マウス ES 細胞・ヒト造血幹細胞から *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・
血小板産生システムを用いた抗血小板薬の反応性に関連する因子の基礎検討
松原 由美子

- 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 18 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 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。しかし抗血小板薬の効果は個人差が大きいことが指摘されており、薬剤に対する反応性が乏しい「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大規模研究において示されている。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)脳血管障害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、(2)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ゼ逆転写酵素 (hTERT) の遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長に及ぼす影響、(3)抗血小板薬服用者に対する good responder、poor responder における microarray 解析結果に基づいた遺伝子多型解析、(4)血小板膜受容体のひとつである glycoprotein (GP) Ib alpha の遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性に及ぼす影響、(5)慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能、(6)マウス ES 細胞・ヒト造血幹細胞から *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生システムの確立、(7)造血幹細胞から血小板産生の各過程を電子顕微鏡観察ならびに免疫電子顕微鏡による観察、を検討した。その結果、(1)脳血管障害の疾患感受性に関与する遺伝子多型を検出した、(2)hTERT の-1327T/C 遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長への関与を認めた、(3)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網羅的解析により検出した、(4)GP Ib alpha の 145Thr/Met 遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性に関連することを見いだした、(5)慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の関係を詳細に解析した、(6)ヒト造血幹細胞を用いた際の遺伝子改変巨核球・血小板を得るプロトコールを確立した、(7)血小板産生機序の解明に迫った。

分担研究者

村田 満 慶応義塾大学医学部
中央臨床検査部 教授
鈴木則宏 慶応義塾大学医学部
内科 教授
松原由美子 慶応義塾大学医学部
内科 講師

A. 研究目的

抗血小板療法の冠状動脈疾患や虚血性脳血管障害など動脈血栓症は血小板が主体となる血栓により発症する。動脈血栓症は我が国での罹患率、死亡率の上位を占めており、これら疾患に対する再発予防、一次予防に抗血小板薬が頻用されている。この動脈血栓症に対する抗血小板薬の効果は多くの大規模臨床研究により示されている。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。抗血小板薬の効果には個体差があり、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患者約 30% 存在する。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ため、抗血小板薬の効果には個体差の原因解明が急がれているが、まだほとんど分っていない。本研究では、「抗血小板薬の効果には個体差」と「遺伝子」の関係に着目した。血小

板機能、あるいは動脈血栓症の疾患感受性に遺伝的要因が強く関与していることが示唆されているため、今回「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」ことを目的とした研究を行った今年度は「動脈血栓症に関連する因子の遺伝子多型の検出」、「抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子多型の検出」、について網羅的解析と候補因子アプローチを行った。また、慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の解析を行った。基礎検討として、マウス ES 細胞・ヒト造血幹細胞から *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生システムの確立を目的とした研究を行った。具体的には、(1) 脳血管障害患者群とコントロール群における microarray を用いた Case-control study、(2) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長に及ぼす影響の検討、(3) 抗血小板服用者に対する good responder、poor responder における microarray 解析結果に基づいた遺伝子多型解析、(4) 血小板膜受容体 glycoprotein (GP) Ib alpha の遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性に及ぼす影響の検討、(5) 慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の

検討、(6) マウス胚性幹細胞(ES 細胞)、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲットング巨核球・血小板産生システムのプロトコルの確立、(7) 超微細構造像による巨核球分化と血小板産生の機序の解明、について検討を行った。

B. 研究方法

(1) Case-control study: 平成17年度、脳血管障害患者群とコントロール群における約11,000種類の遺伝子多型を検出できるmicroarrayを用いたDNA 解析により疾患感受性に関する遺伝子多型を網羅的に検索した。平成18 年度は本解析の患者数を増やして再解析を行った。脳血管障害患者80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97名において、各群で頻度の異なる因子を解析した。

(2) hTERT 遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長に及ぼす影響の検討: 104名の冠状動脈疾患患者から白血球 DNA を抽出し、hTERT-1327T/C 遺伝子多型の genotyping し、白血球 DNA テロメア長を real-timePCR 法 (TRAP 法) を用いて解析した。そして、-1327T/C 遺伝子多型とテロメア長の関係を検討した。

(3) 抗血小板服用者に対する responder、non-responder における microarray 解析結果に基づいた遺伝子多型解析: 抗血小板薬の反応性に関する遺伝子多型を検出するために、抗血小板薬服用者からの血液 (クエン酸採血) に血小板機能評価機器 PFA-100® (Date 社) collagen/ epinephrin カードリッジ および collagen/ ADP 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 collagen/ epinephrin カードリッジ使用時の閉塞時間の値を用いることで可能であることが報告されている)。本研究では collagen/ epinephrin カードリッジでの閉塞時間が 250 秒以上の群と 250 秒未満の群に分け、それぞれを good responder 群、poor responder 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、両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。

(4) 血小板膜受容体 GPIIb/IIIa の遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性に及ぼす影響: 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) 後、血小板機能評価機器 PFA-100®(Date

社) collagen/ epinephrin カードリッジおよび collagen/ ADP カードリッジの閉塞時間を測定した。本研究ではアスピリン 10 μ M 添加時に、閉塞時間が 250 秒以上の群と 250 秒未満の群に分け、それぞれを good responder 群、poor responder 群とした。両群において、GPIb alpha の-5T/C 遺伝子多型と 145Thr/Met 遺伝子多型の遺伝子型の分布の差異を検討した。

(5) 慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の検討

平成 18 年 5 月より 12 月までの間に神経内科専門外来にて通院中の脳血管障害患者のうち抗血小板薬を内服している患者を対象とし、血小板機能の測定と遺伝子多型の研究の同意を得た症例を観察集団として登録を行った。なお、血小板機能の測定のため抗凝固薬内服症例は除外した。登録された症例についてその背景と抗血小板薬の内服内容、測定された血小板機能の結果を解析した。

(6) マウス ES 細胞、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング巨核球・血小板産生システムのプロトコールの確立 : 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)と共培養し、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 日間培養する方法である。ヒト造血幹細胞としてのヒト CD34 陽性細胞は cambrex 社より購入した。CD34 陽性細胞にはトロンボポエチン存在下 Serum-free liquid culture システムを用いて巨核球分化、血小板産生のための *in vitro* 分化誘導を約 15 日間行った。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。

マウス ES 細胞を用いた OP9 培養システムにおいて、培養 5 日目 (mesodermal cells に相当)の細胞に条件検討用に市販されている FITC-GADPH-siRNA をリポフェクタミン法、エレクトロポレーション法にて導入した。導入評価は遺伝子導入細胞から 48 時間後に抽出した RNA に対するリアルタイム定量 PCR あるいはフローサイトメトリー法にて行なった。ヒト CD34 陽性細胞はトロンボポエチン存在下 Serum-free liquid culture システムにて培養 4 日目に GPIb alpha に対する siRNA、negative control siRNA、GPIb alpha の発現ベクター

(PCDNA3.1hygro(+))と PCDNA3.1hygro(+)ベクター、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の発現ベクター(pCL neo)と pCL neoベクターをエレクトロポレーション法にて導入した。導入評価は遺伝子導入細胞から 48 時間後に抽出した RNA に対するリアルタイム定量 PCR あるいはフローサイトメトリー法にて行った。

(7) 超微細構造像による巨核球分化と血小板産生の研究：マウス ES 細胞およびヒト CD34 陽性細胞をそれぞれ巨核球・血小板に *in vitro* 分化誘導を行い、その培養 5 日目、8 日目、12 日目、15 日目の細胞を電子顕微鏡観察、免疫電子顕微鏡観察した。免疫電子顕微鏡観察には抗 GPIb alpha 抗体、抗 GPIb beta 抗体、抗 GPIIb 抗体、抗 von Willebrandfactor 抗体、抗 fibrinogen 抗体を用いた。

(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

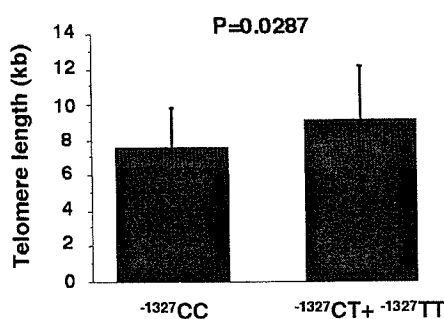
(1) Case-control study: 脳血管障害

患者80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97名において、各群で頻度の異なる因子を約11,000種類の遺伝子多型を検出できるmicroarrayを用いて解析した。平成17年度、18年度の解析とともに各群で有意に頻度の異なった因子はcoactivator associated arginine methyltransferase 1 like、ATPase Class 1、ephrin type A receptor 4、glutamate receptor methbotropic 8、F-actin binding protein、RAB11 binding protein、GDP-mannose 4-6 dehydrase であった。

(2) hTERT 遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長に及ぼす影響の検討 (図 1)：104 名の冠状動脈疾患患者から白血球 DNA を抽出し、hTERT-1327T/C 遺伝子多型の genotyping の結果、-1327TT+ -1327TC は 50 名(48.1%)、-1327CC は 54 名(51.9%) であった(この-1327CC 遺伝子型の頻度は general population のものと比べ高く、冠状動脈疾患の危険因子として報告している)。冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長を real-time PCR 法を用いて解析し、-1327T/C 遺伝子多型とテロメア長の関係を検討した結果、-1327CC では-1327CT+TT に比し有意に短いテロメア長

を示した。

図 1. hTERT 遺伝子多型と白血球テロメア長



(3) 抗血小板服用者に対するgood responder、poor responderにおけるmicroarray解析結果に基づいた遺伝子多型解析：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、抗血小板薬服用者からの血液（クエン酸採血）に血小板機能評価機器PFA-100®（Date社）collagen/epinephrinカードリッジおよびcollagen/ADPカードリッジの閉塞時間を測定し、collagen/epinephrinカードリッジでの閉塞時間が250秒以上の群と250秒未満の群に分け、それぞれをgood responder群、poor responder群とした。抗血小板薬服用者80名を対象に検討を行った結果、22名がpoor responderであった。抗血小板薬服用者のほとんどはアスピリン服用の為に詳細な解析はアスピリン服用者に着目して行った。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、両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。平成17年度の健常人サンプルに*in vitro* アスピリン添加時のcollagen/epinephrinカードリッジでの閉塞時間によりgood responder群、poor responder群とした場合に行った解析と同様の解析を行った。平成17年度、18年度いずれの解析においても有意差を認めた因子はReceptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1、Mannosidase alpha、Potassium voltage-gated channel 1、Tumor protein D52、p53-inducible protein、SLIT and NTRK-like family member 4であった。これらのなかでTumor protein D52はチクロピジンに対する感受性にも関連を示した。

(4) 血小板膜受容体 GPIb alpha の遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性に及ぼす影響(表 1A、表 1B)：GPIb alpha の 2 つの遺伝子多型-5T/C と 145Thr/Met それぞれとアスピリン good responder、poor responder の関係を検討した結果、-5T/C とアスピリン反応性の関係は認められなかった ($p=0.1831$)。一方、145Thr/Met の 145Met を有する血液サンプルは 145ThrThr のものに比

し有意に poor responder の頻度が低かった (p=0.0072)。この結果は 145Met とアスピリン good responder の関連が強い、すなわち 145Met ではアスピリンの反応性が良いことを示唆している。

表1A. -5T/C遺伝子多型とアスピリン反応性

	-5TT n (%)	-5TC+CC n (%)	p value
Good responder	72 (53.3)	63 (46.7)	0.1831
Poor responder	17 (41.5)	24 (58.5)	

表1B. 145Thr/Met遺伝子多型とアスピリン反応性

	145TT n (%)	145TM+MM n (%)	p value
Good responder	98 (72.6)	37 (27.4)	0.0072
Poor responder	38 (92.7)	3 (7.3)	

T: Thr、M: Met

今回用いた血小板機能評価法PFA-100の値は血小板数、ヘマトクリット、VWF抗原量に影響を受けることが知られているため、これら値と 145Thr/Met遺伝子多型を独立変数、good responder vs poor responder

を従属変数とした多変量解析を行った。その結果、145Thr/Met多型とVWF抗原量はアスピリン反応性に対する独立した因子であることが示された。アスピリンを添加しない場合、VWF抗原量で補正したcollagen/epinephrinカードリッジおよびcollagen/ADPカードリッジの閉塞時間は-5T/Cと145Thr/Metいずれとも関連は認めなかった。

(5) 慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の検討: 平成 18 年 5 月より 12 月までの間に血小板機能の測定と遺伝子多型の研究の同意が得られ、登録されたのは 128 例であった。

128 例の全体の臨床的背景としては、性別は男性の割合が 69.8%、平均年齢は 68.4 ±10.1 歳。慢性期脳血管障害の臨床病型は、TIA 14 例 (10.9%)、Branch Atheromatous Disease (BAD) 4 例 (3.1%)、アテローム血栓性脳梗塞 11 例 (8.6%)、ラクナ梗塞 48 例 (37.5%)、心原性脳塞栓症 1 例 (0.8%)、その他の脳梗塞 (病型不明を含む) 20 例 (15.6%)、無症候性脳梗塞 29 例 (22.7%)、血管奇形による脳静脈洞血栓症 1 例 (0.8%)であった。危険因子及び合併症の割合は、高血圧 69.0%、糖尿病 23.4%、高脂血症 60.2%、BMI 25 以上の肥満 20.3%、喫煙習慣 17.9%、飲酒

習慣 45.6%，心房細動 2.3%，冠
状動脈疾患 8.7%，閉塞性動脈硬化
症 3.2%であった。抗血小板薬の内
服状況はアスピリンとチクロピジン、
シロスタゾールの 3 者に関しては、
1 剤のみ内服例が 90.6 %、2 剤内服が
8.6%、3 剤併用が 0.8%であった。
PFA-100 による血小板機能の測定で
は CEPI 閉塞時間が正常値の上限以
下である症例は 22 例 (27.5%)、CADP
閉塞時間が正常値の上限以下である
症例は 21 例 (26.3%)であった。

(6) マウス ES 細胞、ヒト造血幹細胞
を用いた遺伝子ターゲティング巨核
球・血小板産生システムのプロトコ
ールの確立：OP9 培養システムにお
いて ES 細胞から、Serum-free liquid
culture システムにおいて ES 細胞
から、Serum-free liquid culture シ
ステムにおいてヒト CD34 陽性細胞
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。マウス ES 細胞を用いた OP9
培養システムにおいて、培養 5 日目
(mesodermal cells に相当)と 8 日目
の細胞に FITC-GAPDH-siRNA をリ
ポフェクタミン法、エレクトロポー
レーション法にて導入した。遺伝子導

入細胞から抽出した RNA に対する
リアルタイム定量 PCR あるいはフロ
ーサイトメトリー法にて行った結果、
リポフェクタミン法で遺伝子導入を
行った細胞 RNA では siRNA を導入
したものと negative-control siRNA
を導入したものではその RNA 発現
量、FITC レベルに違いを認めなかつ
た。エレクトロポレーション法で遺
伝子導入を行った細胞 RNA では
siRNA を導入したものと negative-
control siRNA を導入したものでは
その RNA 発現量は siRNA 導入のも
ので 30%から 55%減を認めた。siRNA
導入のもので FITC レベルは上がっ
ていた。これらマウス ES 細胞を用
いた実験結果をもとに、ヒト CD34
陽性細胞への遺伝子導入はエレクト
ロポレーション法を用いることとし
た。はじめに hTERT の発現ベクタ
ー(pCL neo)と pCL neo ベクターを
エレクトロポレーション法にて導入
した。hTERT はこれまで、細胞株を
用いた種々の実験で遺伝子導入、リ
アルタイム PCR を行っており自験デ
ータの蓄積があった為、今回の検討
に選んだ。導入細胞から RNA を抽
出し、hTERT 配列を認識するプライ
マーと内部コントロールとして beta
actin を認識するプライマーを用いて
リアルタイム定量 PCR を行った。
hTERT の RNA 発現量を内部コント

ロールの beta actinRNA 発現量で補正して得た結果、ベクター未導入細胞での hTERT 発現を 1 とした場合、pCL neo ベクター導入細胞では 0.717、hTERT- pCL neo ベクター導入細胞では 32516.5 であった。これら細胞をそれぞれ培養 15 日目まで、分化誘導を行なった結果、いずれの細胞においても血小板産生を認めた。これら結果はヒト CD34 陽性細胞における遺伝子導入プロトコールが適切であることを示唆している。次に GPIb alpha の発現ベクターの GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+), negative control としての PCDNA3.1hygro(+), GPIb alpha の siRNA を 2 種類 (ターゲットの配列が異なるものを作成)、negative control siRNA の導入をヒト CD34 陽性細胞に上記で用いた遺伝子導入プロトコールにて行った。GPIb alpha RNA の発現変動を確認後、細胞膜に発現している GPIb alpha の量を検討するためにフローサイトメトリー法による解析を行った。GPIb alpha の発現ベクターを導入した検討の結果、巨核球を示唆するゲートに入った細胞は PCDNA3.1hygro(+のみを導入した細胞では 5.0%であり、GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+を導入したものでは 16.2%であった。血小板を示唆するゲートに入った細胞

は PCDNA3.1hygro(+のみを導入した細胞では 0.4%であり、GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+を導入したものでは 3.8%であった。FITC の mean レベルは巨核球、血小板ともに PCDNA3.1hygro(+のみ導入と GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+を導入した細胞において違いは認めなかった。これら結果は GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+が細胞に導入されており、その結果巨核球分化と血小板産生が促進されたことを示唆している。この導入により巨核球、血小板ひとつあたりの GPIb alpha 発現量は変化していないと考えられる。巨核球の ploidy を検討した結果、PCDNA3.1hygro(+のみ導入した細胞では 2n から 16n までを認めたが GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+導入のものでは 2n から 4n までを認めた。PCDNA3.1hygro(+のみ導入した細胞と GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+導入のものでは全体の細胞数に違いは認められなかった。GPIb alpha の siRNA を導入した検討の結果、巨核球を示唆するゲートに入った細胞は negative control siRNA を導入した細胞では 20.3%であり、GPIb alpha-siRNA1 を導入したものでは 9.8%、GPIb alpha-siRNA2 を導入したものでは 18.8%であった。血小板を示唆する

ゲートに入った細胞は negative control siRNA を導入した細胞では 2.9%であり、GPIb alpha-siRNA1 を導入したものでは 1.6%、GPIb alpha-siRNA2 を導入したものでは 5.3%であった。FITC の mean レベルは巨核球、血小板ともに negative control siRNA、GPIb alpha-siRNA1、GPIb alpha-siRNA2 を導入した細胞において違いは認めなかった。これら結果は GPIb alpha-siRNA1 はこのノックダウンに有用と考えられるが GPIb alpha-siRNA2 はその有用性に乏しい、と考えられる。また、GPIb alpha-siRNA1 は細胞に導入されており、その結果巨核球分化と血小板産生が抑制されたことを示唆している。この導入により巨核球、血小板ひとつあたりの GPIb alpha 発現量は変化していないと考えられる。

(7) 超微細構造像による巨核球分化と血小板産生の研究：OP9培養システムにおいてES細胞から、Serum-free liquid culture システムにおいてヒトCD34陽性細胞から、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。マウスES細胞およびヒトCD34陽性細胞をそれぞれ

巨核球・血小板に*in vitro* 分化誘導を行い、その培養5日目、8日目、12日目、15日目の細胞を電子顕微鏡観察、免疫電子顕微鏡観察した。各過程の超微細構造像を電子顕微鏡・免疫電顕観察により検討した結果、培養8日、12日で顆粒や分画膜を有する巨核球様細胞を認めたが、それら細胞辺縁の形態を2種類 (proplatelet様と平滑辺縁)認めた。proplatelet様辺縁巨核球はfibrinogenを除く(血小板中のFibrinogenは血漿から取り込まれているものとされている)各種抗体と反応したが平滑辺縁巨核球様の細胞はいずれの抗体にも反応しなかった。培養12日、15日で巨核球細胞質の四散、いわゆるglobal fragmentationを認めた。電子顕微鏡・免疫電顕観察により巨核球分化、血小板産生に誘導されている細胞ではアポトーシスが観察された。培養8日目の細胞、未成熟の巨核球でまだ顆粒は少なく、巨核球に特有の demarcation membraneの出来始めを認めた。核の観察ではtypicalな early apoptosisを示すchromatinのcondensationを認めた。培養12日目の細胞、成熟巨核球では顆粒の存在がはっきりと数多く見え、apoptosis に関しては nuclear materialのcondensationが多くなり apoptotic body を認めた。この培

養 12 日目の細胞は培養 8 日の細胞よりも apoptosis は進んでいると考えられた。

D. 考察

(1) 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 (脳血管障害患者群 vs コントロール群) 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。また最近の報告では染色体 14q22-23、14q21-24 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。その報告では protein kinase C η と因子が特定されている。本研究におけるハプロタイプ解析で 14q23 に疾患に関与する遺伝子が存在することを認めたが因子の特定には至らなかった。今後、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。今回検出された疾患関連因子のなかで ephrin type A receptor 4 と glutamate receptor metabotropic 8 は脳血管障害に関与する因子であるため、今後これら因子に着目した大規模な研究に進みたい。

(2) hTERT 遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長に及ぼす影響の検討: 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 に着目した研究を続けている。テロメラーゼの活性サブユニットである hTERT は細胞老化に深く関与することが知られている。本研究ではこれまでに、hTERT のプロモーターに存在する -1327T/C 遺伝子多型が内皮細胞における hTERT 転写活性に影響を及ぼすこと、この多型が健常人白血球のテロメア長やテロメア短縮、テロメラーゼ活性に影響を及ぼすことを見いだしている。そして、高い hTERT 転写活性や長いテロメア長、高いテロメラーゼ活性を示す -1327T を有する遺伝子型では冠状動脈疾患の有病率が低いことを認めている。さらに基礎検討の *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ことが知られている。アスピリンは内皮細胞に対し抗老化作用、テロメラーゼ活性増加作用が報告されている。内皮細胞と白血球のテロメア長は相関していることから、本研究で認められた白血球テロメア長と hTERT 遺伝子多型の関係は内皮細胞においても認められる可能性が高いと考えている。そして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は hTERT 遺伝子多型が関与する個体差が存在し、この多型が内皮細胞のアスピリン作用に影響を及ぼす可能性が考察される。

(3) 抗血小板薬に対する responder、non-responder における

microarray 解析：前年度までの検討結果は *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、そのアスピリンに対する good responder 群と poor responder 群に分け microarray を用いた約 11,000 種類の遺伝子多型を網羅的に解析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。今回は対象を抗血小板薬服用者とした。同様の網羅的解析を行い平成 17 年度、18 年度のいずれの解析においてもアスピリンの感受性との関連を示したのは Receptor

tyrosine kinase-like orphan receptor 1、Mannosidase alpha、Potassium voltage-gated channel 1、Tumor protein D52、p53-inducible protein、SLIT and NTRK-like family member 4 であった。これら全て、アスピリンの感受性との関連性について初めての報告であるが、アスピリンの作用機序にこれら因子が直接関連していることを示す報告はまだ無いため今後、これら関係の機序を考察するための実験検討を行いたい。

(4) 血小板膜受容体 GPIb alpha の遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性に及ぼす影響：

血小板膜受容体は血小板の機能発現において重要な役割を演じている。それらの中でも GPIa、GPIIIa、そして GPIb alpha は「血栓症の危険因子」や「血小板機能」に関連する遺伝子多型を有することが報告されている。最近では、これら多型が「抗血小板薬の有用性にも関連するのでは？」と考えられデータの蓄積が期待されている。これら多型の中で一番多数の研究報告があるのは GPIIIa の多型であるが、この多型には民族差があり、日本人ではこの多型はほとんど見られない。GPIa の遺伝子多型についても抗血小板薬の反応性との検討報告があるが結果の一致をみていない。GPIb alpha

は GPIa、GPIIIa とともに動脈血栓形成において重要な働きを有している。GPIb alpha の-5T/C、145Thr/Met とこれに連鎖する反復配列の多型はこれまでに動脈血栓症との関連や GPIb alpha 膜発現量、血小板機能との関連が示されている。本研究において平成 16 年度に 145Thr/Met とこれに連鎖する反復配列の多型の組換え蛋白を作成して流動状態下、リガンドである von Willebrand factor(VWF)との反応性を検討し、その結果この多型が VWF との反応性に関与することを示した。今回、145Thr/Met がアスピリン反応性と関係することを見いだした。これまでの報告では-5T/C とアスピリン反応性を検討し、「関連なし」と結論した報告があり、これは今回の研究結果と一致する。145Thr/Met に関しては初めての報告となる。今後、抗血小板薬服用者を対象に GPIb alpha と抗血小板療法の効果を前向き研究で検討したい。

(5) 慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の検討：神経内科専門外来に通院している慢性期脳血管障害患者のうち、抗血小板薬を内服している患者を観察集団として登録した。その臨床病型としては、無症候性脳梗塞が 22.7%を占め、脳梗塞の臨床病型としてはラク

ナ梗塞が最も多く 37.5%、アテローム血栓性脳梗塞が 8.6%、BAD が 3.1%、その他の脳梗塞が 15.6%であり、心原性脳塞栓症はわずかに 1 例 (0.8%) であった。最近の脳梗塞の臨床病型の報告では、ラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞、心原性脳塞栓症がほぼ同じ程度の割合を占めていることが報告されている¹が、今回は抗血小板薬を内服している症例のみであることから、心原性脳塞栓症がほとんど含まれていない特徴があった。脳梗塞の危険因子は脳卒中データバンク約 13000 例の報告からは、高血圧 61.9%、糖尿病 25.9%、高脂血症 24.3%と報告されている²が、今回の対象症例では、高脂血症の割合が高く、心房細動の割合が低かった。心原性脳塞栓症の症例が少ないこと、大都市圏の大学病院通院中の症例であることが関連しているものと考えられた。臨床病型別の背景では、その他の脳梗塞例で明らかに若年であったが、この中には若年者脳梗塞の重要な要因である動脈解離などが含まれているためと考えられた。今回の対象集団では脳出血既往例が 3 例しか含まれていないが、脳出血の既往例における脳梗塞再発予防に抗血小板療法が有効かどうかは明らかなデータがないことから症例を蓄積することが

必要と考えられる。

抗血小板薬の内服状況は 1 剤のみが 90%と圧倒的に多く、併用されている症例は比較的少なかった。また、薬剤選択としてはアスピリンが最も多く、100mg の内服症例が多かった。チクロピジンとシロスタゾールは併用で用いられる傾向があり、単剤で投与される率は低く、そのため、用量も少ない症例が多かった。抗血小板薬の選択に際して臨床背景や病型との関連では、閉塞性動脈硬化症合併例では用量が多く、虚血性心疾患合併例にはシロスタゾールが用いられない傾向が認められたが、それ以外には明らかな傾向は認められなかった。

PFA-100 は shear stress 下での血小板機能、特に adhesion と aggregation を評価できるとされている。今回の検討ではアスピリン投与群の 9.3%で CEPI-CT が延長せず、いわゆる「アスピリン抵抗性」であることが示唆された。CEPI-CT の延長しない症例は脳血栓症を対象とした症例（アスピリン 75mg あるいは 150mg 内服）の 16.1%³、冠状動脈疾患例（アスピリン 325mg 内服）の 9.5%⁴に認められた事が報告されている。今回の結果では内服用量が多い症例の方が延長する割合が高いことから、CEPI-CT の延長しないという意味での「アス

ピリン抵抗性」の場合にその用量を検討する事が必要と考えられる。

チクロピジンに関しては、ADP 受容体拮抗薬であることから CADP-CT での延長が期待されるが、85%の症例では延長を認めなかった。クロピドグレルでの検討でも 31 例の crossover study で 2 例に CADP-CT の延長が認められたのみであり³、測定のカートリッジ内の ADP の濃度が高いためではないかと考えられている。今回の結果からは用量の差による延長も明らかではなかった。

シロスタゾールに関しては単独投与症例も少なかったが、用量が増加すると CEPI-CT と CADP-CT はいずれも上限をわずかに越える数値を示していた。PFA-100 がシロスタゾールの抗血小板作用の指標となるかどうかは症例数を蓄積する事が必要と考えられる。

併用に関しては、これまでにアスピリンとクロピドグレルの併用により約 1/4 の症例で CADP-CT の著明な延長が認められている³。今回の検討からはアスピリンとチクロピジンの併用例では症例数が少ないが 3 例中 2 例では明らかな延長が認められており、両者の併用は抗血小板機能として明らかな相乗効果があるものと考えられた。これまでの報告と同様に両者の併用により一部の症例では

明らかな延長が認められているが、同時に他の症例では明らかな延長は認められていない。PFA-100 の closing time は von Willebrand factor の濃度に関連しており、炎症による反応でも変化する事が報告されている⁵。今後、我々に症例でも vWF の測定を行う予定であり、これによって新たな知見が得られるものと考えている。

PFA-100 は測定方法が簡便であり、血小板機能を定量的に測定できるが、その臨床的な有用性に関してはまだ十分な検討がなされてはいない。

PFA-100 の結果を元に抗血小板薬の選択や用量を調整する事が臨床的に再発予防に有効かどうかを検討して行くことが必要である。

(6) マウス ES 細胞、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング巨核球・血小板産生システムのプロトコルの確立: 本研究では抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定のために検診受診者(抗血小板薬非服用者)や抗血小板薬服用者の血液サンプルを用いた血小板機能検査や遺伝子解析(網羅的解析および候補因子アプローチ)を行っている。これら検討により得られた結果は、遺伝子改変の実験検討による検証が必要とされるが血小板は無核であるため、遺伝子改変ができない。これは血小板研究の主要な問題点とされている。そ

こで本研究では幹細胞に対して遺伝子改変を行い、それを *in vitro* で分化誘導を行うことにより、遺伝子改変された巨核球・血小板を得る実験システム樹立することに着手した。マウス ES 細胞は強い増殖能を有するため、実験プロトコルの検討に適している。一方、ヒト造血幹細胞を個体から得るためにはドナーの負担が大きいため、再現性が要求される実験には適していない。したがって平成 17 年度までは、マウス ES 細胞を用いた基礎検討を行ってきた。本年度はこれまでの成果から、ヒト造血幹細胞を用いた実験システムの構築を行った。ヒト造血幹細胞を 4 日間 Serum-free liquid culture システムで培養後、エレクトロポレーション法により遺伝子導入を行うプロトコルを作成した。遺伝子導入効率の条件検討の結果から、ヒト造血幹細胞を 4 日間 Serum-free liquid culture システムで培養後の細胞を導入に用いているが内在している因子の干渉を受けることが考えられる。Preliminary な実験で内在する GPIIb/IIIa とは異なる遺伝子多型の配列を有する発現ベクターを導入した結果、RNA の多くは外来遺伝子の多型配列を示していた。しかし内在している因子の干渉を受ける可能性を出来る限り少なくするための条件検討

は今後も続ける必要がある。

(7) 超微細構造像による巨核球分化と血小板産生の研究: アスピリンは血小板のみならず、巨核球に対しても有用性があることが報告されている。我々の平成17年度の研究においても、マウスES細胞、アスピリン存在下での *in vitro* 分化誘導により得られた巨核球と血小板はそれぞれ血小板活性化の刺激に対して抑制作用を示した。アスピリンは細胞アポトーシスに関与していることが報告されているが「巨核球のアポトーシスにアスピリンが関与しているかどうか?」

は不明であることに加え、「巨核球分化や巨核球からの血小板分離にアポトーシスに関与しているかどうか?」についても議論中である。

巨核球からの血小板分離には proplatelet theory や explosive fragmentation theory が提唱されているが未だ議論が分かれ、その詳細は十分に解明されていない。今回の結果は巨核球分化、血小板産生にアポトーシスに関与していることを形態観察により認めた。さらに幹細胞から血小板産生までを経時的に検討できるシステムの利点を活かし、巨核球からの血小板分離の機序を研究した。その結果、巨核球からの血小板分離における中期から後期は

global fragmentation の関与が示唆された。

E. 結論

抗血小板薬の反応性と関連する因子の研究として、動脈血栓症に関連する因子に着目した検討を行った。網羅的検討を行った結果、脳血管障害の疾患感受性に関与する遺伝子多型を coactivator associated arginine methyltransferase 1 like、ATPase Class 1、ephrin type A receptor 4、glutamate receptor methbotropic 8、F-actin binding protein、RAB11 binding protein、GDP-mannose 4-6 dehydrase において検出した、hTERT の-1327T/C 遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長に関与することを見いだした。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網羅的解析により検討した結果、Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1、Mannosidase alpha、Potassium voltage-gated channel 1、Tumor protein D52、p53-inducible protein、SLIT and NTRK-like family member 4 の遺伝子多型を検出した、GP Ib alpha の 145Thr/Met 遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性と関連することを見いだした。慢性期脳血管障害患