

者における抗血小板薬の反応性と再発予防効果を検討するための観察集団を登録した。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と関連する因子の基礎検討を行った。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ルを確立したことを認めた。さらに今回、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観察により検討した結果、血小板産生にアポトーシスが関与すること、血小板産生時に巨核球の global fragmentation が起きることを認めた。

#### 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

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata, Kiyooki Watanabe, Ikuo Saito, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Mie Ishikawa, Kenichi Matsushita, Shiro Iwanaga, Satoshi Ogawa, Yasuo Ikeda: Coronary artery disease and a functional polymorphism of hTERT. *Biochem*

*Biophys Res Commun.* 348: 669-672, 2006.

Mariko Yabe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Gentaro Watanabe, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda: Identification of ADRA2A polymorphisms related to shear-mediated platelet function. *Biochem Biophys Res Commun*, 347: 1001-1005, 2006.

Hiroko Nishida, Mitsuru Murata, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Kiyooki Watanabe, Yasuo Ikeda : Gorog Thrombosis Test:analysis of factors influencing occlusive thrombus formation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 17 : 203-207, 2006

Rina Kimura, Shigenori Honda, Tomio Kawasaki, Hajime Tsuji, Seiji Madoiwa, Yoichi Sakata, Tetsuhito Kojima, Mitsuru Murata, Kazuhiro Nishigami, Masaaki Chiku, Tokio Hayashi, Yoshihiro Kokubo, Akira Okayama, Hitonobu Tomoike, Yasuo Ikeda, Toshiyuki Miyata. Protein S K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese. *Blood* 107: 1737-1738, 2006

Shinichi Takahashi, Miho Ushida, Risa

Komine, Aya Shimizu, Toshihiro Uchida, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru Mitara. Increased basal platelet activity, plasma adiponectin levels, and diabetes mellitus are associated with poor platelet responsiveness to in vitro effect of aspirin. *Thromb Res*, 119: 517-524, 2007

Hidenori Hattori, Akira Sonoda, Hideki Sato, Daisuke Ito, Norio Tanahashi, Mitsuru Murata, Ikuo Saito, Kiyooki Watanabe, Norihiro Suzuki : G501C polymorphism of oxidized LDL receptor gene(OLR1)and ischemic stroke. *BRAIN RESEARCH*, 11121: 246-249, 2006

Iizuka T, Sakai F, Yamakawa K, Suzuki K, Suzuki N: Vasogenic leakage and the mechanism of migraine with prolonged aura in Sturge-Weber syndrome. *Cephalalgia* 24:767-770, 2004.

Kosakai A, Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Suzuki N: Activation of ERK1/2 is associated with neural survival after focal cerebral ischemia in the rat. *Cerebral Blood Flow Metab* 16: 276-287, 2004.

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* 374: 132-135, 2005.

Suzuki S, Yamashita T, Tanaka K, Hattori H, Sawamoto K, Okano, Suzuki N: Activation of cytokine signaling through leukemia inhibitory factor receptor (LIFR)/gp130 attenuates ischemic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 685-693, 2005.

Tomita M, Schiszler I, Tomita Y, Tanahashi N, Takeda H, Osada T, Suzuki N: Initial oligemia with capillary flow stop followed by hyperemia during K+-induced cortical spreading depression in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 742-747, 2005.

Suzuki S, Shimoda M, Kawamura M, Sato H, Nogawa S, Tanaka K, Suzuki N, Kuwana M: Myasthenia gravis accompanied by alopecia areata: clinical and immunogenetic aspects. *Eur J Neurol* 12: 566-570, 2005.

Ogihara T, Matsuzaki M, Matsuoka H, Umemoto S, Shimada K, Rakugi H, Umemoto S, Kamiya A, Suzuki N, Kumagai H, Ohashi Y, Takishita S, Abe K, Saruta T: The combination therapy of

- hypertension to prevent cardiovascular Events (COPE) trial: rationale and design. *Hypertens Res* 28: 331-338, 2005.
- Tanaka K, Kujuro Y, Suzuki S, Tanahashi N, Hamada J, Nogawa S, Suzuki N: Clinical and laboratory features of in-patients with multiple sclerosis in a University Hospital in Tokyo from 1988-2002. *Intern Med* 44:560-6. 2005
- Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, Mihara M, Ohsugi Y, Okano H: Blockade of interleikin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J Neurochem* 94:459-468, 2005.
- Suzuki S, Satoh T, Yasuoka H, Hamaguchi Y, Tanaka K, Kawakami Y, Suzuki N, Kuwana M: Novel autoantibodies to a voltage-gated potassium channel Kv1.4 in a severe form of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 170: 141-149, 2005.
- Nagata E, Luo HBR, Saiardi A, Bae BI, Suzuki N, Snyder SH: Inositol hexakisphosphate kinase-2, a physiologic mediator of cell death. *J Biol Chem* 280:1634-40, 2005.
- Abe T, Takahashi S, Suzuki N: Oxidative metabolism in cultured rat astroglia: effects of reducing the glucose concentration in the culture medium and of D-aspartate or potassium stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 153-160, 2006.
- Iizuka T, Sakai F, Suzuki K, Igarashi H, Suzuki N: Implication of augmented vasogenic leakage in the mechanism of persistent aura in sporadic hemiplegic migraine. *Cephalalgia* 26:332-335, 2005.
- Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Schiszler I, Osada T, Unekawa M, Suzuki N: Capillo-venous flow in the brain: Significance of intravascular RBC aggregation for venous flow regulation. *Clin Hemorheol Micro* 34 (1-2): 51 – 57, 2006.
- Osada T, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Nagai T, Suzuki N: Astroglial swelling for removed rat brain enlargement incubated in deoxygenated mock cerebrospinal fluid. *Clin Hemorheol Micro* 34 (1-2): 223 – 226, 2006.
- Tomita M, Tanahashi N, Takeda H,

Schiszler I, Osada T, Unekawa M, Suzuki N: Capillo-venous flow in the brain: significance of intravascular RBC aggregation for venous flow regulation. *Clin Hemorheol Micro* 34:51-57, 2006.

Osada T, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Nagai T, Suzuki N: Astroglial swelling for removed rat brain enlargement incubated in deoxygenated mock cerebrospinal fluid. *Clin Hemorheol Micro* 34:223-226, 2006.

Ito Y, Takaoka R, Ohira M, Abe T, Tanahashi N, Suzuki N: Reactive oxygen species generated by mitochondrial injury in human brain microvessel endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc.*;34:163-168, 2006.

Nagata E, Shibata M, Hamada J, Shimizu T, Katoh Y, Gotoh J, Suzuki N: Plasma 5-hydroxytryptamine (5-HT) in migraine during an attack-free period. *Headache* 46:592-596, 2006.

Abe T, Takahashi S, Suzuki N: Metabolic properties of astrocytes differentiated from rat neurospheres. *Brain Research* 1101:5-11, 2006.

Hattori H, Sato H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, watanabe K, Suzuki

N: A561C polymorphism of E-selectin is associated with ischemic cerebrovascular diseases in Japanese population without diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Brain Research* 2006.

Osada T, Tomita M, Suzuki N: Spindle-shaped constriction and propagated dilation of arterioles during cortical spreading depression. *NeuroReport* 17:1365-1368, 2006.

Tomita M, Ohtomo M, Suzuki N: Contribution of the flow effect caused by shear-dependent RBC aggregation to NIRS spectroscopic signals. *NeuroImage* 33:1-10, 2006.

Ishiko A, Shimizu A, Nagata E, Takahashi K, Tabira T, Suzuki N: Notch3 ectodomain is major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol* 112:333-339, 2006.

Takao M, Tsuchiya K, Mimura M, Momoshima S, Kondo H, Akiyama H, Suzuki N, Mihara B, Takagi Y, Koto A: Corticobasal degeneration as cause of progressive non-fluent aphasia: Clinical, radiological and pathological study of an autopsy case. *Neuropathology* 26:569-

578, 2006.

## 2. 学会発表

松原由美子、村田満、吉田正、渡邊清明、斎藤郁夫、宮木幸一、大前和幸、池田康夫：白血球テロメア長に關係するヒトテロメラゼ逆転写酵素 (hTERT) の遺伝子多型：2006 68 回日本血液学会

松原由美子、鈴木英紀、清水綾、横山健次、村田満、池田康夫：超微細構造像が示す *in vitro* 巨核球分化・血小板産生：2006 29<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

牛田美穂、松原由美子、高橋信一、石原宏朗、芝野俊郎、渡辺巖太郎、池田康夫、村田満：コラーゲン受容体遺伝子多型とアスピリンによる血小板機能抑制：2006 29<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

磯部浩二、松原由美子、高橋信一、内田敏弘、石原宏朗、芝野俊郎、石川美江、松下健一、岩永史郎、小川聡、渡辺巖太郎、池田康夫、村田満：P2Y<sub>12</sub> 受容体遺伝子多型は冠状動脈疾患リスクと関連する：2006 29<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

矢部麻里子、松原由美子、高橋信一、

石原宏朗、芝野俊郎、宮木幸一、大前和幸、渡辺巖太郎、村田満、池田康夫：Alpha 2A adrenergic receptor 遺伝子多型と血小板機能：PFA-100® による検討：2006 29<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

Miho Ushida, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata: Enhancing effect of collagen receptor polymorphisms on *in vitro* platelet reactivity to aspirin in healthy subjects: 2006 48<sup>th</sup> The American Society of Hematology. Blood (supl) 327a.

Mariko Yabe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Gentaro Watanabe, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda: Identification of ADRA2A polymorphisms related to shear-mediated platelet function by the PFA-100® system: 2006 48<sup>th</sup> The American Society of Hematology. Blood (supl) 55b.

Koji Isobe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Toshihiro Uchida, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Mie Ishikawa, Kenichi Matsushita, Shiro Iwanaga, Satoshi Ogawa, Gentaro Watanabe,

Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata: The genotype combination of the P2Y12 gene might confer greater risk for coronary artery disease: 2006 48<sup>th</sup> The American Society of Hematology. Blood (supl) 424a.

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

<研究成果の刊行に関する一覧>

「雑誌」

松原由美子、村田満:危険因子としての遺伝的背景、成人病と生活習慣病 36: 230-233, 2006.

Yasuo Ikeda, Toshiki Sudo, Yukio Kimura: PLATELETS Second Edition  
Editor: Alan D Michelson, MD,  
Academic Press, 2007 Part 5  
Pharmacology: Antiplatelet Therapy  
Chapter 64. Cilostazol Pg 1181-1191

横山健次, 池田康夫: 特発性血小板減少性紫斑病のステロイド治療—適応症と使用法. ステロイドの使い方を—コツと落とし穴 (編集: 水島 裕), 中山書店, p49, 2006 (3).

横山健次, 池田康夫: アスピリンの

抗血栓作用と問題点—適応症と使用法. NSAIDs の使い方を—コツと落とし穴 (編集: 水島 裕), 中山書店, p66-67, 2006 (4).

横山健次, 池田康夫: 新しい抗血小板薬, 抗凝固薬—アスピリン, ワルファリン, ヘパリンとの違い. 別冊 医学のあゆみ 脳卒中—基礎研究と臨床の最前線 (編集: 篠原幸人), 医歯薬出版, p17-22, 2006 (6).

後藤信哉, 山崎力, 池田康夫: 日本人のアテローム血栓症の特徴を国際前向き調査研究 REACH Registry への参加により明らかにする. 日本循環器学会専門医誌 14 (1): 83-87, 2006 (3).

池田康夫: 血栓・止血学入門—出血と梗塞の両方を減らす方向へ研究がシフト Nikkei Medical: 108-110, 2006 (2).

池田康夫: はじめに—血液病学. 日本医事新報 4272: 1, 2006 (3).

横山健次, 池田康夫: メタボリックシンドロームと深部静脈血栓症. 最新医学 61 (6 月増刊号): 1355-1362, 2006 (6).

横山健次, 池田康夫: メタボリック  
シンドロームにみられる血栓, 炎症  
とそのメカニズムを探る. *Vascular  
Medicine* 2 (4): 312-317, 2006 (10).

村田 満: 遺伝子多型検査は医療に  
貢献するか?、日本臨床検査専門医  
会 24: 97-101, 2006

横山健次, 池田康夫: 最近の大規模  
臨床試験の概要 JPPP. *日本臨床* 64  
(7):496-500, 2006 (10).

横山健次, 池田康夫: 血小板, 凝固  
異常における遺伝子診療. *循環器科*  
60 (3): 235-241, 2006 (11).

池田康夫: クロピドグレル (プラビ  
ックス) -欧米で評価の高い抗血小板  
薬. *Nikkei Medical* 468: 204-206, 2006  
(11).

村田 満: アスピリンレジスタンス  
の臨床的意義とその分子基盤 炎症と  
免疫vol.14 no.3 2006

村田 満: アスピリン抵抗性  
*International Review of Thrombosis*  
Vol.1 No.3,2006

横山 健次、村田 満: 大規模臨床  
試験で示されたアスピリンの有用性  
3 日本人におけるアスピリンのエビ  
デンスの構築「治療学」Vol.40 no.3 ,  
2006

## 分担研究報告書



動脈血栓症と関係する因子の研究

主任研究者 池田康夫 慶應義塾大学医学部内科教授

研究要旨 抗血小板薬は冠状動脈疾患や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いる。しかし抗血小板薬の効果には個体差が報告されており、その感受性が低いことは心血管イベントのリスクとされている。したがって抗血小板薬の効果に対する個体差の原因を見いだすことは今後の医療に必須と考えられている。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、(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ーゼ逆転写酵素 (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について検討した。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に関与することを見いだした。以上、今年度の研究成果から動脈血栓症に関連する因子を見いだした。

#### A. 研究目的

心筋梗塞や脳梗塞は我が国の死亡原因の上位を占め、その予防や有用性の高い治療法に対する取り組みは今後の医療に課せられた最重要課題のひとつである。これら血小板血栓により発症する血栓症の頻度は加齢とともに増加する。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ことは間違いない。血栓症のマネジメント、抗血小板療法で用いられる抗血小板薬の効果には個体差が報告されている。この反応性の

差異を規定する因子はいくつか提唱されているが、まだ不明点は数多い。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。今回の研究では「動脈血栓症の疾患感受性と遺伝子多型」に着目した研究を行った。

(1) Case-control study : 血栓形成能に遺伝的要因の関与が示唆されている。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

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した。平成 18 年度は本解析の患者数を増やして解析を行った。

(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：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、テロメア長に影響を及ぼす。また、この多型は冠状動脈疾患の疾患感受性に関連する。今回、この多型と白血球テロメア長の関係を冠状動脈疾患患者において検討した。

## 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与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 を行った。白血球 DNA テロメア長は 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。

### (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。

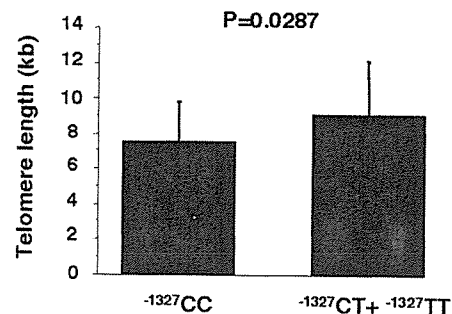
## C. 研究結果

(1) Case-control study: 本検討では約11,000種類の遺伝子多型を検出できるmicroarrayを用いて、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。平成17年度、18年度の解析でともに各群で

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 metabotropic 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 を行った結果、-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)。

図 1. hTERT 遺伝子多型と白血球テロメア長



#### 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 を用いての網羅的解析を特徴とする 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  $\eta$ 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、内皮細胞の機能発現に重要な 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も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。

## 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  
メア長に關与することを見いだした。

#### 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

##### 1. 論文発表

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata,  
Kiyooki Watanabe, Ikuo Saito, Koichi  
Miyaki, Kazuyuki Omae, Mie Ishikawa,  
Kenichi Matsushita, Shiro Iwanaga,  
Satoshi Ogawa, Yasuo Ikeda: Coronary  
artery disease and a functional  
polymorphism of hTERT. *Biochem  
Biophys Res Commun.* 348: 669-672,  
2006.

Mariko Yabe, Yumiko Matsubara,  
Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara,  
Toshiro Shibano, Koichi Miyaki,  
Kazuyuki Omae, Gentaro Watanabe,  
Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda:  
Identification of ADRA2A  
polymorphisms related to shear-mediated

platelet function. *Biochem Biophys Res  
Commun,* 347: 1001-1005, 2006.

Hiroko Nishida, Mitsuru Murata, Koichi  
Miyaki, Kazuyuki Omae, Kiyooki  
Watanabe, Yasuo Ikeda : Gorog  
Thrombosis Test:analysis of factors  
influencing occlusive thrombus formation.  
*Blood Coagul Fibrinolysis,* 17 : 203-207,  
2006

Rina Kimura, Shigenori Honda, Tomio  
Kawasaki, Hajime Tsuji, Seiji Madoiwa,  
Yoichi Sakata, Tetsuhito Kojima, Mitsuru  
Murata, Kazuhiro Nishigami, Masaaki  
Chiku, Tokio Hayashi, Yoshihiro Kokubo,  
Akira Okayama, Hitonobu Tomoike,  
Yasuo Ikeda, Toshiyuki Miyata. Protein S  
K196E mutation as a genetic risk factor  
for deep vein thrombosis in Japanese.  
*Blood* 107: 1737-1738, 2006

Shinichi Takahashi, Miho Ushida, Risa  
Komine, Aya Shimizu, Toshihiro Uchida,  
Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano,  
Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru  
Mitara. Increased basal platelet activity,  
plasma adiponectin levels, and diabetes  
mellitus are associated with poor platelet  
responsiveness to in vitro effect of aspirin.  
*Thromb Res,* 119: 517-524, 2007

## 2. 学会発表

松原由美子、村田満、吉田正、渡邊清明、斎藤郁夫、宮木幸一、大前和幸、池田康夫：白血球テロメア長に關係するヒトテロメラゼ逆転写酵素(hTERT)の遺伝子多型：2006 68回日本血液学会

松原由美子、鈴木英紀、清水綾、横山健次、村田満、池田康夫：超微細構造像が示す *in vitro* 巨核球分化・血小板産生：2006 29<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

牛田美穂、松原由美子、高橋信一、石原宏朗、芝野俊郎、渡辺巖太郎、池田康夫、村田満：コラーゲン受容体遺伝子多型とアスピリンによる血小板機能抑制：2006 29<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

磯部浩二、松原由美子、高橋信一、内田敏弘、石原宏朗、芝野俊郎、石川美江、松下健一、岩永史郎、小川聡、渡辺巖太郎、池田康夫、村田満：P2Y<sub>12</sub> 受容体遺伝子多型は冠狀動脈疾患リスクと関連する：2006 29<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

矢部麻里子、松原由美子、高橋信一、石原宏朗、芝野俊郎、宮木幸一、大前和幸、渡辺巖太郎、村田満、池田

康夫：Alpha 2A adrenergic receptor 遺伝子多型と血小板機能：PFA-100® による検討：2006 29<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

Miho Ushida, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata: Enhancing effect of collagen receptor polymorphisms on *in vitro* platelet reactivity to aspirin in healthy subjects: 2006 48<sup>th</sup> The American Society of Hematology. Blood (supl) 327a.

Mariko Yabe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Gentaro Watanabe, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda: Identification of ADRA2A polymorphisms related to shear-mediated platelet function by the PFA-100® system: 2006 48<sup>th</sup> The American Society of Hematology. Blood (supl) 55b.

Koji Isobe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Toshihiro Uchida, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Mie Ishikawa, Kenichi Matsushita, Shiro Iwanaga, Satoshi Ogawa, Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata: The genotype combination of the P2Y<sub>12</sub> gene

might confer greater risk for coronary artery disease: 2006 48<sup>th</sup> The American Society of Hematology. Blood (supl) 424a.

## 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

<研究成果の刊行に関する一覧>

Yasuo Ikeda, Toshiki Sudo, Yukio

Kimura: PLATELETS Second Edition

Editor: Alan D Michelson, MD,

Academic Press, 2007 Part 5

Pharmacology: Antiplatelet Therapy

Chapter 64. Cilostazol Pg 1181-1191

横山健次, 池田康夫: 特発性血小板減少性紫斑病のステロイド治療—適応症と使用方法. ステロイドの使い方—コツと落とし穴 (編集: 水島 裕), 中山書店, p49, 2006 (3).

横山健次, 池田康夫: アスピリンの抗血栓作用と問題点—適応症と使用方法. NSAIDs の使い方—コツと落とし穴 (編集: 水島 裕), 中山書店, p66-67, 2006 (4).

横山健次, 池田康夫: 新しい抗血小板薬, 抗凝固薬—アスピリン, ワル

ファリン, ヘパリンとの違い. 別冊 医学のあゆみ 脳卒中—基礎研究と臨床の最前線 (編集: 篠原幸人), 医歯薬出版, p17-22, 2006 (6).

後藤信哉, 山崎力, 池田康夫: 日本人のアテローム血栓症の特徴を国際前向き調査研究 REACH Registry への参加により明らかにする. 日本循環器学会専門医誌 14 (1): 83-87, 2006 (3).

池田康夫: 血栓・止血学入門—出血と梗塞の両方を減らす方向へ研究がシフト Nikkei Medical: 108-110, 2006 (2).

池田康夫: はじめに—血液病学. 日本医事新報 4272: 1, 2006 (3).

横山健次, 池田康夫: メタボリックシンドロームと深部静脈血栓症. 最新医学 61 (6月増刊号): 1355-1362, 2006 (6).

横山健次, 池田康夫: メタボリックシンドロームにみられる血栓, 炎症とそのメカニズムを探る. Vascular Medicine 2 (4): 312-317, 2006 (10).

横山健次, 池田康夫: 最近の大規模臨床試験の概要 JPPP. 日本臨床 64 (7):496-500, 2006 (10).

横山健次, 池田康夫: 血小板, 凝固異常における遺伝子診療. 循環器科 60 (3): 235-241, 2006 (11).

池田康夫: クロピドグレル (プラビックス) -欧米で評価の高い抗血小板薬. Nikkei Medical 468: 204-206, 2006 (11).



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 分担研究報告書

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

研究要旨 血小板血栓が主体となり発症する冠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、(2)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、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、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、(2) 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、以上、最終年度である今年度の研究成果から抗血小板薬の反応性に関連する因子を見いだした。

#### A. 研究目的

抗血小板療法は冠動脈疾患や虚血性脳血管障害など動脈血栓症に対する再発予防、一次予防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。その一因として、抗血小板薬に

対する「不応症」なる状態が少なからず認められることがあげられている。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。また、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。最近では血小板機能の個体差に関与する遺伝子多型が抗血小板薬の反応性に影響を及ぼす、という報告もみられるがその数はまだ少なく good responder、poor responder の原因となる因子の検出データの蓄積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。今年度は以下について検討した。

(1) 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。平成 17 年度、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 (good responder と poor responder) に分け microarray を用いた網羅的解析からその感受性に関与する遺伝子多

型を検出した。平成 18 年度は抗血小板薬服用者を対象に同 microarray を用いた解析を行い抗血小板薬の反応性に関与する遺伝子多型を検出した。

(2) 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：候補因子アプローチとして GPIb alpha に着目した。健常人の血小板に *in vitro* で抗血小板薬を直接添加した際の血小板反応性と GPIb alpha 遺伝子多型の関係を検討した。

## B. 研究方法

(1) 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。

(2) 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：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  $\mu$ M）後、血小板機能評価機器 PFA-100<sup>®</sup>（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  $\mu$ 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。

#### （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) 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<sup>®</sup>（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であったので、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。

(2) 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。

#### D. 考察