

(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。

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。

(11) case-control study: 平成17年度の検討で脳血管障害患者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。平成18年度の検討では、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。

(12) LOX-1遺伝子多型解析：虚血性脳卒中と高血圧($P < 0.01$)、喫煙歴($P < 0.01$)、糖尿病($P < 0.01$)との間で相関関係が認められたが、C alleleの存在と虚血性脳卒中や古典的危険因子の間に相関関係は認められなかった。

(13) 新規 dual specificity phosphatase (DSP)の同定：新規ヒト dual specificity phosphatase (DSP)である DSP-X が、ヒト組織において、心臓、骨格筋、骨髄、および精巣に発現していることを示した。また、その脱リン酸化酵素活性依存的に心筋細胞の分化を調節することを示し、現在までに PI3 kinase-Akt 経路における関与を明らかとした。

(14) 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 H_2O_2 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、 H_2O_2 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 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。

(15) 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。

(16) 脳梗塞患者の臨床像の解析：

一側上肢遠位部に限局した運動麻痺のみを呈する症例の頭部MRIでは大脳皮質運動野の中心前回にあるprecentral knobと呼称される領域の他、皮質下白質にも梗塞巣を認める症例が観察された。

(17) 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。

(18) 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。

(19) マウスES細胞を用いた血小板機能解析：巨核球・血小板へ分化誘導を行なうためのOP9培養システムにおいて、培養8日で未成熟巨核球、培養12日で成熟巨核球に分化したことが形態観察とCD41陽性細胞のDNA ploidyが増加したことにより示された。培養15日で血小板サイズのCD41陽性細胞を認めた。この細胞はトロンビン刺激でフィブリノーゲンとの結合を示した。したがって、これら結果はES細胞からin vitro分化誘導により機能を有する血小板が得られたことを示唆している。

培養12日と培養15日の細胞から抽出したRNAの発現profilingの比較の差をmicroarray解析で検討した結果、既知因子の上位15は (1) glycoprotein A, (2) pro-platelet basic protein, (3) cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2alpha, (4) hemogen, (5) coagulation factor V, (6) glycoprotein Ib beta, (7) solute carrier family 4, (8) cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2alpha, (9) Kruppel-like factor 1, (10) erythroid associated factor, (11) carbonic anhydrase, (12) Rhesus blood group-associated A glycoprotein, (13) integrin alpha 2b, (14) aquaporin, (15) colony stimulating factor 2 receptor, beta

2であった。血小板に特異的に発現している因子の他に赤血球や白血球に発現が報告されている因子の発現が認められた。

(20) 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反応が抑制された。

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ェ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。

(21) 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：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った。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

オ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。

(22) 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) 抗血小板薬不応の評価法の最適化：抗血小板薬不応の評価法の最適化に関する検討では、PFA-100を用いた検討から、in vitroでASAを添加し血中濃度を担保した条件下でも、感受性にはバラつきがあることがわかった。低感受性の原因として元々の血小板機能が亢進している可能性が示唆された。またGTTによって、VWF:Ag、VWF:RCo、ヘマトクリット、HbA_{1c}高値による血小板血栓形成能の促進が検出された。今回の研究により閉塞時間が血漿VWF値と逆相関することが初

めて明らかにされ、主にズリ応力依存性の血小板機能を反映することが裏付けられた。しかし病的状態における診断意義については今後の研究を待たねばならない。

(2) 血小板の transcriptome 解析：Microarray 解析を行う際、そのサンプル調整が結果に与える影響は大きい。サンプル RNA の量と質についての規定は Microarray 購入先のプロトコールに定められているが細胞の分離法や RNA の抽出法はそれぞれの実験により異なるため独自のプロトコールを確立する必要がある。我々は高純度血小板分離による血小板サンプルから microarray 解析に用いる RNA 抽出法のプロトコールをすでに有しているが今後本研究課題を行うためにはそのサンプルの白血球や赤血球の混在の定量データを得ることが必要であると考え、今回報告の検討を行った。白血球の除去法と混在率の定量解析法による結果は同一個体での再現性と異なる個体での再現性を示した。白血球は多量の RNA を含むためこれら方法の確立ができた意義は大きい。赤血球については、その RNA 計測に用いる波長測定の際、含有たんぱく量に相当する 280nm での数値が高く、本課題研究に用いる microarray 解析サンプルの条件として決められている RNA 中のたんぱく

混入の規定に達しなかった。これは、磁気ビーズ・negative selection 法により赤血球は減少を示したがリアルタイム定量 PCR による値が一定せず、その定量値が得られなかったことの原因のひとつと考えられる。今後、赤血球からの RNA 抽出方法の再検討が必要と考えられる。

(3) 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。

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

array 解析：本検討前までの検討結果は *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。

(5) 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。

(6) 血小板 VWF 受容体 GPIbalpha 多型と血小板機能の関連：冠状動脈疾患・脳血管障害の大きな原因となる動脈血栓の形成において GP Ibalpha と VWF の反応は血小板活性化を引き起こすという点で重要である。GP Ibalpha はこれまでに血栓症の危険因子となる遺伝子多型を有するが疫学研究で報告されていた。したがって今回はその関連の分子学的機序を解明するために遺伝子組換えたんぱくを作成して実験研究を行った。疫学研究により冠状動脈疾患・脳血管障害の危険因子と報告されている遺伝子型 (¹⁴⁵Met と 4R) が流動状態下で高いVWFとの反応性を示したことから、血流内では ¹⁴⁵Met と 4R を有する血小板は VWF との反応性が高いため血小板を活性化方向へと導き、動脈血栓形成を招来しやすいと考察している。

(7) hTERT：冠状動脈疾患は加齢とともにそのリスクは増大する。そして加齢と細胞老化は密接な関係がある。これまでにテロメア長は白血球や血管内皮細胞では年齢と逆相関していること、またその長さは遺伝的に規

定されていることが報告されている。さらにテロメアシステムは血管細胞の老化や冠状動脈疾患にも深く関与していることが報告されている。そこで本研究では血栓形成能に関与する因子のひとつとして、細胞老化の機序に深く関与しているテロメアシステムにおいて重要な役割を有する hTERT、特にその発現調節部位であるプロモーター領域の遺伝子多型に着目した。高い hTERT 転写活性と長いテロメア長に関係する^{-1327T}は細胞老化に対して防御的にはたらく機序を有することから、血管の細胞老化に深く関与する冠状動脈疾患に対して低い有病率を示していると考えられている。

(8) 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。

(9) 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関連していることから、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。

(11) 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 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。

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と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

(12) LOX-1 遺伝子多型解析 : LOX-1 に関しては aspirin が酸化 LDL を介した LOX-1 の発現を抑制する作用を有し、虚血性疾患の発症抑制にこれが働いていると考え、ミスセンス一遺伝子多型は動脈硬化性脳梗塞の発症リスクを減少させる方向に働くと考えられる。今のところ、aspirin の LOX-1 発現抑制は結果として生ずる現象であり、機能的意味を有さないとの考え方が支配的であるが、本研究の結果から虚血性脳梗塞においては両方の作用が働き、ミスセンス一遺伝子多型の発症への影響を減弱しているとも考えられる。

(13、14) 新規 dual specificity phosphatase (DSP) の同定と機能解析 : DSP-X のヒトにおける疾患との関連を調べるために、その遺伝子座を調べたところ第 10 染色体上、10q22.3 にあることが明らかとなった。次に、この染色体上の位置を原因遺伝子座とし、なおかつ DSP-X の発現組織である心臓、骨格筋を侵す

疾患を調べたところ、心筋症の一つである arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia (ARVD) type7 が挙げられた。この疾患は、心臓および骨格筋に限局して侵され、若年発症し、原因遺伝子が未だに同定されていない心筋症の一つである。現在、この疾患との関連性を明らかにするために、欧米において報告がある罹患患者の genomic DNA を request しており、ヒト DSP-X 遺伝子を調べる予定である。また、in vivo における DSP-X の生理的意義の解析のため DSP-X を発現した transgenic mouse を現在作製中であり、これを用いて、DSP-X の心臓、骨髄における発生過程ならびに生後における機能を検討する。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。

(15) 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。

(16) 脳梗塞患者の臨床像の解析：Pure motor strokeによりPMMを呈した症例では病変が不明な場合も多いとされていたが、近年拡散強調画像により病巣が明らかにされる症例が報告されてきている。拡散強調画像は本来FLAIR画像で描出困難な超急性期の梗塞巣の検出に有用であり、上肢のPMMを超急性期に診断した症例が報告されている。一方、すでにFLAIR画像で多発性脳梗塞を認めどの病巣が今回発症の病巣であるかを特定困難な時にも拡散強調画像が有用であり例示した症例もそれに該当している。

手の運動に関与する部位として中心前回のprecentral knobと呼ばれる部位が考えられており、上肢遠位部に限局したPMMを呈し拡散強調画像でprecentral knobに梗塞巣を認め多症例も数例報告されている。しかし上肢遠位部に限局したPMMで皮質下白質のみを責任病巣とする報告は少なく、例示した症例でもprecentral knobに病変はなく、皮質下白質を主な病巣としていることはきわめて興味深い。が、症例の均一性や遺伝因子の検討を推進する際には他因子の関与を最小限に留めるためには問題となると

考えられる。

いずれにしても病巣の診断には拡散強調画像が有用であり、上肢のPMMにおいては従来報告されているような中心前回のprecentral knobを責任病巣とするだけではなく、皮質下白質でも同様の症状を呈する可能性がある。

従って類似の臨床症状を呈していても梗塞巣がいくつかの部位に認められることから、脳梗塞の原因となる責任血管は1つとは限らない可能性があると考えられる。

(17) 文献・データベース検索：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、抗血小板機能が増強されるが、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 にみるように、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。

(18) 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ベース約 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%、冠状動脈疾患例（アスピリン 325mg 内服）の 9.5%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 cossover study で 2 例に CADP-CT の延長が認められたのみであり、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剤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。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。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必要がある。

(19) マウスES細胞を用いた血小板機能解析：核の無い血小板は遺伝子改変が出来ないため、疫学検討やDNA、RNAを用いた解析により検出した血小

板機能 や薬物感受性に関与する因子の機能検討を行うための遺伝子改変を行うことが出来ない。そこで我々はES細胞に着目した。ES細胞は多分化能を有するため巨核球や血小板を in vitroでの分化誘導により得ることが可能である。また、ES細胞は増殖能力に優れているため種々の解析の際も十分量のサンプルを安定に得られる。したがって、遺伝子改変ES細胞を増殖させた後、in vitro分化誘導により産生した(遺伝子改変)巨核球や血小板を用いて実験検討を行なうことが可能と考えた。最初の検討として行った今回の結果はES細胞からin vitro分化誘導により機能を有する血小板が得られたことを示唆している。分化誘導により得られた細胞RNAの microarray解析では血小板に特異的に発現している因子の他に赤血球や白血球に発現が報告されている因子の発現が認められた。これはトロンボポエチンが他の血球細胞への分化にも関与しているという既報に適合する結果と考えられるが今後、本解析を行う際のコントロール細胞として赤血球分化誘導細胞や白血球分化誘導細胞の必要性が考えられた。

(20) 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caspase3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。

(21) 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