

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 GPIb alpha 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。

(22) 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が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

初年度である平成 16 年度は対象者からの検体と臨床情報の蒐集、血小板期の評価、血小板発現遺伝子プロファイリング、全ゲノムスキュンの基礎検討を行った。抗血小板薬服用者の ex vivo 血小板機能評価法、健常人血液に in vitro で抗血小板薬を添加した際の血小板機能評価法を確立した。対象者の DNA を抽出するとともに whole genome 解析の予備検討を行った。microarray による RNA 発現プロファイリングについても、血小板での実験の至適条件が見いだされた。

平成 17 年度は抗血小板薬の反応性と関係する分子について網羅的検討あるいは候補因子アプローチを行った。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出した。CVD の疾患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。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。平成 18 年度は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連する遺伝子多型を 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。平成 16 から 18 年度にわたり、基礎実験としてマウス 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

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.

Br J Haematol 128(4):533-9, 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. Neurosci Lett. 2005; 374: 132-135.

Shigenari A, Yasue H, Inoko H, *et al*: Nucleotide sequencing analysis of the swine 433-kb genomic segment located between the non-classical and classical SLA class I gene clusters. Immunogenetics 55: 695-705, 2004.

Hui J, Tamiya G, Inoko H, *et al*: 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.

Li S, Naruse T, Inoko H, *et al*:  
Association of polymorphic MHC  
microsatellites with GVHD, survival, and  
leukemia relapse in unrelated  
hematopoietic stem cell transplant  
donor/recipient pairs matched at five  
HLA loci. *Tissue Antigens* 63: 362-368,  
2004.

Koishi S, Inomata J, Inoko H, *et al*:  
Notch4 gene polymorphisms are not  
associated with autism in Japanese  
population. *Am J Med Genet* 125B: 61-  
62, 2004.

Ohtsuka M, Ozato K, Kimura M, *et al*:  
Rapid screening of a novel arrayed  
medaka (*Oryzias latipes*) cosmid library.  
*Mar Biotechnol (NY)* 4: 173-178, 2004.

Hurt P, Inoko H, Himmelbauer H, *et al*:  
The genomic sequence and comparative  
analysis of the rat major  
histocompatibility complex. *Genome  
Research* 4: 631-639, 2004.

Imanishi T, Sumio Sugano, *et al*:  
Integrative Annotation of 21,037 Human  
Genes Validated by Full-Length cDNA  
Clones. *PLoS Biology* 2: 1-20, 2004.

Shiina T, Kulski JK, Inoko H, *et al*:  
Comparative genome analysis of two  
avian (Quail and Chicken) MHC regions.  
*J Immunol* 172: 6751-6763, 2004.

Mano S, Tamiya G, Gojobori T, *et al*:  
Notes on the maximum likelihood  
estimation of haplotype frequencies.  
*Annals of Human Genetics* 68: 257-264,  
2004.

Ohtsuka M, Inoko H, Kimura M, *et al*:  
Comparative analysis of a 229 kb medaka  
genomic region, containing that *zic1* and  
*zic4* genes, with Fugu, and mouse.  
*Genomics* 83: 1063-1071, 2004.

Ohtsuka M, Kimura M, Inoko H, *et al*:  
CHOP: Visualization of 'wobbling' and  
isolation of highly conserved regions  
from aligned DNA sequences. *Nucleic  
Acids Research* 32: W53-W58, 2004.

Shimizu S, Kulski JK, Inoko H, *et al*:  
MHC class IIB gene sequences and  
expression in quails (*Coturnix japonica*)  
selected for high and low antibody  
responses. *Immunogenetics* 56: 280-191,  
2004.

Ohtsuka M, Inoko H, Kimura M, *et al*:  
Possible roles of *zic1* and *zic4*, identified  
within the medaka Double anal fin (Da)

locus, in dorsoventral patterning of the trunk-tail region (related to phenotypes of the Da mutant). *Mech Dev* 121: 873-882, 2004.

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

Niizeki H, Inoko H, Streilein JW, *et al*: The MICA5.1 allele is not associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. *J Dermatol Sci.* 35: 221-223, 2004.

Matsuzaka Y, Kulski JK, Inoko H, *et al*: hRDH-E2 gene polymorphisms, variable transcriptional start sites, and psoriasis. *Mamm Genome.* 15: 668-675, 2004

Romphruk AV, Inoko H, Leelayuwat C, *et al*: Major histocompatibility complex class I chain-related gene A in Thai psoriasis patients: MICA association as a part of human leukocyte antigen-B-Cw haplotypes. *Tissue Antigens* 63: 547-554, 2004.

Farjadian S, Bahram S, Inoko H, *et al*:

Molecular analysis of HLA allele frequencies and haplotypes in Baloch of Iran compared with related populations of Pakistan. *Tissue Antigens* 64: 581-577, 2004

Yasuoka H, Okazaki Y, Inoko H, *et al*: Autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related gene A in patients with Behcet's disease. *Arthritis & Rheumatisms* 50: 3658-3662, 2004

Shiina T, Inoko H, Kulski JK: An update of the HLA genomic region, locus information and disease Associations: 2004. *Tissue Antigens* 64: 631-649, 2004

Matsumoto T, Yukawa W, Inoko H, *et al*: Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. *Nucleic Acids Res* 32: 6069-6077, 2004

International Chicken Genome Sequencing Consortium (Hillier LW, Fulton LA, Inoko H *et al*): Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432: 695-716, 2004

Gourraud PA, Mano S, Inoko H, *et al*: Integration of microsatellite

- characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens* 6 P 4: 543-555, 2004
- Matsuzaka Y, Okamoto K, Inoko H, *et al*: Identification, expression analysis and polymorphism of a novel RLTPR gene encoding a RGD motif, tropomodulin domain and proline/leucine-rich regions. *Gene* 343: 291-304, 2004
- 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
- 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.
- 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.
- 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
- 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<sup>+</sup>-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 interleukin-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

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata, Tomohiro Hayashi, Keijiro Suzuki,

Yosuke Okamura, Makoto Handa, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Yasuo Ikeda. Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions: 2004 2nd UK-Japan Platelet Conference

松原 由美子、村田 満、林 朋博、鈴木 啓二郎、岡村 陽介、半田 誠、石原 宏明、芝野 俊郎、池田 康夫. von Willebrand 因子との反応性に関する GPIb $\alpha$ の遺伝子多型: 2004 27th 日本血栓止血学会

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 28<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

Koji Isobe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Miho Iwashita, Risa Komine, Aya Shimizu, Toshihiro Uchida, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata. The genotype combination of homozygous carriers of both H1 haplotype and 34C shows a significantly lower responsiveness to ADP-induced platelet aggregation than others in healthy volunteers. 2005 47th The American Society of Hematology. *Blood* (supl) 99:3a.

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata, Hidenori Suzuki, Tamihiko 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. Blood (supl) 1009a.

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ーゼ逆転写酵素(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 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)

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—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—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).

## 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 16～18 年度 総合研究報告書

抗血小板薬の反応性と関係する分子の機能研究・

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

研究協力者 座間猛 慶應義塾大学医学部内科講師

青木亮子 慶應義塾大学大学院

研究要旨 抗血小板薬は虚血性脳血管障害や冠状動脈疾患に対して世界中で非常に多くの患者に投与されている。抗血小板薬効果の個人差の原因となる因子を見つけだすことは今後の医療に欠かす事の出来ないものと考えられる。本研究は抗血小板薬の反応性と関係する可能性のある分子を同定し、それら分子の機能研究を行うことを目的としている。また、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。

心血管病・動脈硬化の発生・進展において重要な役割を演じる dual specificity phosphatase (DSP) に注目し、新規ヒト 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、PI3 kinase-Akt 経路における関与を明らかとした。そして、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。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) に着目し、hTERT<sup>-1327C/T</sup> 遺伝子多型の<sup>-1327T</sup>は高い転写活性と長いテロメア、そして冠状動脈疾患の有病率が低いことを示し、抗血小板薬による治療を考える上で貴重な知見を得た。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 を行い、その疾患感受性に関与する遺伝子多型を検出した。血小板研究の問題点のひとつに、血小板は無核のため遺伝子改変が出来ないことが挙げられる。そこで多分化能を有する胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて血小板前駆細胞の段階で遺伝子改変を行う為の基礎検討を行い、マウス ES 細胞から in vitro 分化誘導法により巨核球と機能を有する血小板を得られたことを形態観察、発現解析、機能解析、microarray 解析により認めた。以上、本研究により抗血小板薬の反応性と関係する可能性のある分子の機能検討と動脈血栓症に関連する遺伝子多型の検出、そして ES 細胞から血小板を得るためプロトコールの確立を行った。

A. 研究目的

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上

位を占め、その予防は 21 世紀の医療に課せられた最重要課題の一つである。加齢とともに血栓症の頻度は増

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。血小板機能の亢進と心血管死との関係も疫学的に明らかにされている。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は多くが提唱されており、これらの基礎的機能を同定する事は、今後の心血管イベントの対策に甚だ重要である。ここでは分子に的を絞り、それらの機能を遺伝子構造との関連において検討した。また、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。血小板研究の問題点のひとつは、血小板は無核のため遺伝子改変が出来ないことである。そこで多分化能を有する胚性幹細胞(ES細胞)を用いて遺伝子改変を行う、すなわち研究ターゲット(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)の遺伝子改変をES細胞に行なった後、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を最終目的とした研究をデザインした。平成16~18年度に行った具体的な研究内容は、(1)、新規 dual specificity

phosphatase (DSP)の同定とその機能解析、(2) hTERT 遺伝子多型の機能解析、冠状動脈疾患との関係、(3) Case-control study (脳血管障害患者群 vs control 群)、(4) マウス ES細胞を用いた血小板機能解析、である。

## B. 研究方法

### (1) 新規 dual specificity

phosphatase (DSP)の同定とその機能解析：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) および pET-32b (Novagen) ベクター発現システムにより、glutathione S-transferase (GST) および His tag タンパクを発現させ、各々グルタチオンセファロース 4B (Amersham Biosciences) および Ni-アガロース (Qiagen) を用いてアフィニティ精製した。哺乳動物細胞培養において、HeLa 細胞株は、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) を添加した ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で培養した。ヒト骨格筋衛星細胞 Human Skeletal Muscle Cell (SkMC) ならび



にラット胎児心筋細胞 H9c2 細胞株は、各々20%および10%ウシ胎仔血清とL-グルタミン、抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）を添加した DMEM で培養した。尚、血清除去による分化培地としては、各々2%ウマ血清あるいは1%ウシ胎仔血清を添加した DMEM で培養した。また、これらの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。免疫沈降には、細胞溶解バッファーによる細胞懸濁液を調整し、適切な抗体を結合したプロテイン G-セファロース (Amersham Biosciences) を用いた沈降反応を行い、SDS-PAGE 後、Western blotting により解析した。細胞溶解バッファーには、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、12mM beta-glycerophosphate、1mM sodium orthovanadate、2mM EGTA、3mM dithiothreitol、そして protease inhibitor mixture (Complete, Roche Diagnostics) を含むバッファーを用いた。また、in vitro phosphatase assay は、50mM imidazole (pH 7.5)、5mM dithiothreitol、そして基質として 20mM p-nitrophenyl phosphate (pNPP) を含むバッファーを用い、37℃、1時間にて反応を行い、反応終了後、

phosphatase による pNPP の加水分解反応は 405nm における吸光度で計測した。レポーターアッセイは、MEF2 の転写活性に基づいた遺伝子発現を、レポーターとしてホタル由来ルシフェラーゼ発現ベクター pMEF2-Luc (Panomics) を用い、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ発現ベクター pRL-TK (Promega) を共発現させトランスフェクション効率を補正する dual-luciferase assay system (Promega) により行った。DPS の機能解析において、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 $\alpha$  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 $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -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。

(2) hTERT 遺伝子多型の機能解析、冠動脈疾患との関係 : hTERT のプロモーター領域約 1.6kb の全遺伝子配列の解読を 17 人の白血球から抽出した DNA を対象に行い、<sup>-1327</sup>C/T 遺伝子多型を検出した(研究結果、参照)。<sup>-1327</sup>C/T 遺伝子多型が hTERT の転写活性に与える影響を検討するためにルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイ用ベクター (それぞれの遺伝子多型を有する hTERT のプロモーター配列を組み込んだルシフェラーゼ発光ベクター) を遺伝子導入効率を補正するためのベクターとともに正常ヒト臍帯静脈内皮細胞に導入し 48 時間培養後、そのルシフェラーゼ発光を定量解析した。次にこの多型のテロメア長に対する影響を検討した。年齢がマッチするように<sup>-1327</sup>T/T 型と<sup>-1327</sup>C/C 型から 24 人、22 人をそれぞれ選り白血球より抽出した DNA を対象にサザンブロット法(Hinf I 制限酵素処理 DNA に

<sup>32</sup>P 標識-テロメア配列をハイブリダイゼーション)にてテロメア長の算出を行った。

<sup>-1327</sup>C/T 遺伝子多型と CAD の関係を検討するための疫学研究を行った。CAD 患者 104 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健常人 115 名における遺伝子型の頻度を検討した。さらに CAD 患者におけるテロメア長の解析を行った。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、<sup>-1327</sup>T/C 遺伝子多型とテロメア長の関係を検討した。

(3) 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。

(4) マウス ES 細胞を用いた血小板機能解析: 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 (フィブリノゲン)との結合試験を行なった。細胞を血小板活性化物質のトロンピンで刺激後、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。

分化誘導により得られた細胞から抽出したRNAからcRNAを作成し、そのビオチン標識後にfragment化したサンプルを対象にmicroarray解析を行なった。

#### (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) 新規 dual specificity

#### phosphatase (DSP)の同定とその機

能解析：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。

また、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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $H_2O_2$  の濃度依存的であった。さらに、 $H_2O_2$  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  $H_2O_2$  による酸化ストレスによって生じ、また細胞内の酸化