

還元（レドックス）状態によることが明らかとなった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により DSP-X は、多量体形成することが示された。次に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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

一を構築し、各々HeLa細胞に発現後、0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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。

(2) hTERT 遺伝子多型の機能解析、冠状動脈疾患との関係：17人の白血球から抽出したDNAを対象にhTERTのプロモーター領域約1.6kbの全遺伝子配列の解読を行った結果、翻訳開始より1375塩基上流のC/T塩基置換を2検体から検出した。さらに解析検体数を46としてこの遺伝子置換の頻度を検討した結果、<sup>-1327</sup>C/C型45.8%、<sup>-1327</sup>C/T型39.0%、<sup>-1327</sup>T/T型15.2%であった。<sup>-1327</sup>C/T置換は集団の1%以上に存在するため遺伝子多型であることが認められた。<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のルシフ

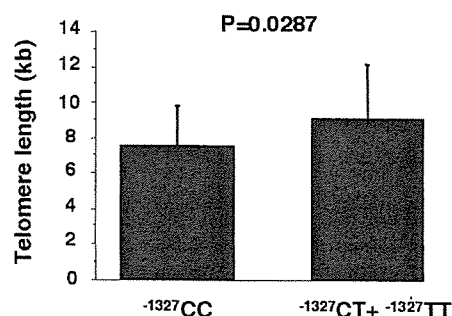
エラーゼアッセイの結果、 $-1327T/T$ 型は $-1327C/C$ 型に比し転写活性が高かった ( $p=0.00026$ )。

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 $-1327T/T$ 型と $-1327C/C$ 型から24人、22人をそれぞれ選び白血球より抽出したDNAのテロメア長は $-1327C/C$ 型群ではテロメア長と年齢の逆相関が認められた( $R=0.48$ ,  $p=0.0245$ )が、 $-1327T/T$ 型群ではその逆相関は認められなかった( $R=0.14$ ,  $p=0.529$ )。したがって解析を50才以上の集団とした結果、 $-1327T/T$ 型群でのテロメア長 (kb) ( $8.96\pm 1.45$ )は $-1327C/C$ 型群でのそれ( $7.60\pm 0.71$ )に比し有意差をもって長いことが認められた( $p=0.0470$ )。

$-1327C/T$ 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名での $-1327C/C$ 型の遺伝子型頻度(51.9%)は健常人115名でのそれ(36.5%)に比し高いことが示された( $p=0.0218$ )。また、患者群において重症度別に遺伝子型の頻度を検討した結果、重症度が高くなるほど $-1327C/C$ 型の遺伝子型頻度が高くなることが認められた。

さらにCAD患者におけるテロメア長の解析を行った。50才以上のCAD患者の白血球DNAのテロメア長( $6.93\pm 1.19$ )を解析して年齢がマッチ

する健常人群のテロメア長( $8.28\pm 1.31$ )を比較解析した結果、患者群で有意に短かった( $p=0.0137$ )。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)について、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のものとは比べ高く、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。



(3) Case-control study: 平成17年度の検討でCVD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。

(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。

(4) 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) glycophorin 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。

#### D. 考察

(1) 新規 dual specificity phosphatase (DSP)の同定とその機能解析 : 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。

(2) hTERT 遺伝子多型の機能解析、冠状動脈疾患との関係：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(CAD)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<sup>-1327</sup>T 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 CAD に対して低い有病率を示していると考察している。

(3) 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 (CVD 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  $\eta$  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まし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

(4) 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。

## E. 結論

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。hTERT <sup>-1327</sup>C/T 遺伝子多型の<sup>-1327</sup>T は高い転写活性と長いテロメア、そして CAD の有病率が低いことを示した。、hTERT の<sup>-1327</sup>T/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。動脈血栓症に関連する因子を見いだした。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。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 解析により示した。

#### 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 , Tomohiro Hayashi, Keiichiro 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. Br J Haematol 128(4):533-9,

2005

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata , Tadashi Yoshida , Kiyooki Watanabe, Ikuo Saito, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Yasuo Ikeda. Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. Biochem Biophys Res Commun. 341 (2006) 128-131.

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,

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、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  
に關与する GPIIb/IIIa の遺伝子多型 日

本血栓止血学会誌 第 15 卷 第 15  
号 437 頁 2004

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.

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

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: P2Y12 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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>

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).

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

抗血小板薬の薬効評価の為の血小板機能検査の研究と

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

研究協力者 西田 浩子 慶應義塾大学医学部内科助手

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。平成 16 年度は抗血小板薬に対して responder と non-responder を定義するのに最適な血小板機能の評価方法の比較検討を行い、抗血小板薬不応を評価する為の血小板機能検査の評価方法を確立した。また、血小板分子研究の為の microarray を用いた血小板の RNA プロファイリングを行った。In vitro 実験検討として、不応と関連する可能性がある血小板 VWF 受容体 (GPIIb/IX/V 複合体) の遺伝的多型と血小板機能の関連を検討した結果、GPIIb $\alpha$  の <sup>145</sup>Thr/Met と繰り返し配列の遺伝的多型の <sup>145</sup>Met と 4 repeat (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) が流動状態下で高い VWF との反応することを認めた。平成 17 年度は、抗血小板薬に対する responder、non-responder (健康人血液サンプルに in vitro アスピリン添加時) に関連する遺伝子多型を網羅的に検討するための microarray を用いた解析を行い、血小板機能評価機器 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検出した。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連する遺伝子多型を検出した。基礎検討としては、血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討、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) の冠状動脈内皮細胞における役割の検討、マウス ES 細胞から in vitro 分化誘導にて得た巨核球・血小板を用いて、アスピリン存在下での機能検討、微量サンプルにおける microarray 解析の技術的改良、そして血小板の産生機構に対するアポトーシスの関与、についてそれぞれ検討を行い、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、hTERT の正常冠状動脈内皮細胞への遺伝子導入は intercellular adhesion molecule2 や von Willebrand factor の発現低下への関与、マウス ES 細胞から得られた巨核球

と血小板のアスピリンによる機能抑制、微量サンプルにおける microarray 解析のプロトコルの確立、巨核球分化と血小板の産生機構へのアポトーシス、caspase 活性化の関与をそれぞれの検討において認めた。平成 18 年度は、これまでに収集された血小板機能評価データと遺伝子多型データを総括的に解析した。遺伝子解析において、網羅的解析を行った結果、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。候補因子アプローチでは、これまでの基礎検討により蓄積されたデータを基に着目した因子、GP Ib alpha が有する 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、これら研究成果から抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子多型を見いだした。

## 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。抗血小板薬が十分に効かない状態、例えば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、いわゆる「アスピリン不応症」なる状態が健常者のなかに少なからず認められることが近年判明している。同一個体では経時的に再検しても同様の結果が得られることから遺伝的要因が指摘されている。本研究は、抗血小板薬の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ている。

抗血小板薬の効果の個体差の原因は

殆ど分かっていないことに加え、「抗血小板薬に対する不応症」の定義はまちまちで、不応を評価する為の血小板機能検査法も十分に検討されていないのが現状である。したがって本研究において、研究初年度の平成 16 年度は (1) 抗血小板薬に対して responder と non-responder を定義するのに最適な血小板機能の評価方法の比較検討、(2) 不応と関連する血小板分子研究の為の microarray を用いた血小板の RNA プロファイリング、(3) 不応と関連する可能性がある血小板 VWF 受容体 (GPIb/IX/V 複合体) の遺伝的多型と血小板機能の関連、について検討を行った。平成 17 年度は (4) 健常人血液サンプルに in vitro アスピリン添加を行い、responder、non-responder に関連する遺伝子多型を網羅的に検討するための microarray を用いた解析、

(5) 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、(6) 抗血小板薬不応に関連する可能性のある血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討、(7) 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) の冠状動脈内皮細胞における役割の検討、(8) 基礎検討としてマウス ES 細胞から in vitro 分化誘導にて得た巨核球・血小板を用いて、アスピリン存在下での機能検討、微量サンプルにおける microarray 解析の技術的改良、そして血小板の産生機構に対するアポトーシスの関与、について検討を行った。平成 18 年度は (9) 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、(10) 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、について検討を行った。

## B. 研究方法

(1) 抗血小板薬不応の評価法の最適化：responder, non-responder の評価は患者だけでなく、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。従って、対象者は(a) 抗血小板薬服用者、(b) 健常人、である。血小板機能の評価として(a)PFA-100、(b) Gorog Thrombosis Testの2つを用いた。前者では、クエン酸採血後、ASA (vehicle, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) を in vitro で添加し、PFA-100<sup>®</sup> (Dade) Collagen/Epinephrin カードリッジの閉塞時間を測定した。ASA 10  $\mu$ M 添加時に、閉塞時間が300秒(カットオフ時間)のグループと300秒未満のグループに分け、それぞれを感受性グループ、低感受性グループとした。後者 Gorog Thrombosis Test (GTT, Montrose Diagnostics, UK) は、抗凝固剤無添加 native blood を用いた血栓形成能評価法の一つである。GTTにおいて高ずり応力で活性化された血小板は下流の低ずり条件下で凝集塊を形成、凝集塊は更に下流の間隙を閉塞し血流を停止させる。その後、線溶の活性化に伴う血栓溶解により血流の再開が得られる。よって、閉塞時間は流動状態下での血小板血栓形成能の指標とされる。採血直後の全血を用いて GTT による閉塞時間を測定した。

(2) 血小板の transcriptome 解析：健常人の血液65mLから遠心分離により得た血小板多血漿を白血球除去フィルターに通した。白血球は多量のRNAを含むため、はじめに白血球除去の

検討を行なった。フィルター処理無し、フィルター処理1回、フィルター処理2回、のそれぞれのサンプルの血小板数とRNA量を検討後、それぞれのRNAが含む血小板、白血球の解析を特異マーカーのCD41、CD20の解析用プライマーを用いてリアルタイム定量PCR解析を行った。さらに白血球については、細胞 $10^6$ 個から分離したRNA $1\mu\text{g}$ が100%の効率でcDNAになったと考え、そのcDNAの1/2順次希釈系列サンプルとCD20を検出プローブとして行なったリアルタイム定量PCRの結果から鑄型サンプル(RNA 100ng)が含む白血球数の計算を行なった。赤血球の混在を検討するため、上記法のフィルター処理1回、2回のサンプルに加えて赤血球特異マーカーCD71を用いた磁気ビーズ・negative selection法を行なった。Microarray解析は白血球除去フィルター2回血小板と白血球から抽出した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行なった。

(3) 血小板 VWF 受容体 GPIb 多型と血小板機能の関連：血栓形成能に関与する因子のひとつとして、血小板の膜糖蛋白(GP; glycoprotein)  $\text{Ib}\alpha\beta/\text{IX}/\text{V}$  複合体に着目した。フォンウィルブランド因子(VWF; von Willebrand factor)の受容体であるこ

の複合体の  $\text{GP Ib}\alpha$ サブユニットはその細胞外の N 末端から 45kDa(アミノ酸 1-300)の中に VWF との結合部位を有している。 $\text{GP Ib}\alpha$ と VWF の反応は必ず応力依存性に血小板の活性化を引き起こす。したがって速い血流状態下の血栓である動脈血栓の形成時において  $\text{GP Ib}\alpha$ は重要な役割を演じていると考えられている。in vitro において静止下状態では生体内物質とは異なる反応惹起剤の 1 種であるリストセチンの存在下で  $\text{GP Ib}\alpha/\text{VWF}$  反応が認められる。 $\text{GPIb}\alpha$ は  $^{145}\text{Thr}/\text{Met}$ 、それと連鎖不均衡の  $^{397}\text{Pro}-^{409}\text{Gln}$  の 1-4repeat(R)の繰り返し配列の遺伝子多型を有している ( $^{145}\text{Thr}$  と 1 R、2 R の連鎖・ $^{145}\text{Met}$  と 3R、4R の連鎖)。これまでに我々や他の研究グループは  $^{145}\text{Met}$  と 4R 遺伝子多型が冠状動脈疾患の有病率や重症度・脳血管障害の危険因子であることを疫学研究結果により示している。本研究では  $\text{GPIb}\alpha$ 遺伝子多型の血小板機能、すなわち VWF 反応への影響を検討するために遺伝子組換えたんぱくを用いた実験研究を行った。 $\text{GPIb}\alpha$ 遺伝子多型の血小板機能、すなわち VWF 反応への影響を検討するために 2 つの実験研究を行った。1 つめは、 $\text{GPIb}\alpha$ の N 末端 45kDa を含むアミノ酸 1-302 番までの組み換え蛋白 2 種(145T と 145M)

それぞれが培養上清中に分泌されるための培養細胞株を樹立し、培養上清中に分泌された GPIb $\alpha$ の断片蛋白をウエスタンブロット法とドットブロット法を用いてその発現確認と発現量の定量解析を行った後、GPIb $\alpha$ を固相化したニトロセルロースメンブレンにアイソトープ ( $^{125}\text{I}$ ) 標識 VWF をリストセチン存在下で反応させ、その放射活性カウントによる定量解析を行った。2つめの実験研究では 145T と 145M の比較に加え繰り返し配列の比較、さらに  $^{145}\text{Thr}/\text{Met}$  と繰り返し配列のどちらが VWF 反応と関係するかを検討するために 4 種の GPIb $\alpha$ 配列(実在する; 145T/1R、145M/4R、実在しない;145T/4R、145M/1R)を有する組み替え蛋白を GPIb $\beta$ /IX とともに複合体として発現させた細胞と VWF の反応を血管内の血流速度を想定した流動状態下で解析した。GPIb $\alpha$ 発現をフローサイトメトリー法で確認、同程度に発現している GPIb $\alpha\beta$ /IX 複合体を FACS 法にて得た後、さらに EIA 法による発現量の定量解析を行った。その定量解析後、流動状態下において、ガラス板に固相化した VWF と細胞の反応を細胞の回転速度(rolling velocity ; この値が低いほど vWF との反応性は高い)で評価するためにリアルタイム画像処理による検討を行

った。

(4) 抗血小板薬に対する responder、non-responder における microarray 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、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  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ ）後、血小板機能評価機器 PFA-100 $^{\circ}$ （Date 社）collagen/ epinephrin 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可能であることが報告されている）。本研究ではアスピリン 10  $\mu\text{M}$  添加時に、閉塞時間が 300 秒（カットオフ時間）の群と 300 秒未満の群に分け、それぞれを感受性群、低感受性群とした。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、感受性群と低感受性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。

(5) case-control study : CVD 患者群とコントロール群における microarray 解析による疾患関連遺伝子多型の検索：CVD と関連する遺伝子多型を検出するための研究を行った。CVD 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い各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。

(6) 血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討：ヘパリン処理をした血液から遠心分離法を用いて得た血小板多血漿 (PRP) を白血球除去フィルターに通した。その PRP からミトコンドリア DNA の抽出はアルカリ変成・環状 DNA 抽出法に基づきデザインされた市販のキットを用いた。血小板ミトコンドリア DNA を鋳型とした PCR による増幅反応 (全長 16kb) を行った。

(7) hTERT の冠状動脈内皮細胞における役割：正常冠状動脈内皮細胞に hTERT 遺伝子導入を行った後、2.5h から 168h の間で細胞から RNA を抽出し real-time 定量 PCR を施行した。その結果 5h と 48h で hTERT の RNA 量に変化が認められたため、hTERT 遺伝子導入された正常冠状動脈内皮細胞の 5h 後と 48h 後からのそれぞれの RNA を対象にマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を網羅的に行った。

(8) 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：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 (フィブリノーゲン) との結合試験をアスピリン存在下、あるいは非存在下で行った。細胞を血小板活性化物質の トロンビンあるいは ADP 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。

微量サンプル (従来量の約 1/130) を用いての microarray 解析は array の販売元である affymetrix のプロトコルに従い、ES 由来血小板 RNA から PCR 増幅を行い microarray 解析を行った。

アポトーシスに関しては各分化誘導過程から得たサンプルに対して TUNEL 法による検討、caspase の活性化を種々の抗体 (caspase 3、6、7、9、10、12) を用いるウエスタンブロットにて検討した。また caspase 阻害剤添加の条件で分化誘導を行い血

小板産生に与える影響を検討した。

(9) 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。

(10) 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®

（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) 抗血小板薬不応の評価法の最適化：PFA-100：検診受診者73人を調べた結果、感受性グループは60人（82%）、低感受性グループは13人（18%）であった。低感受性グループではvehicle添加時のPRP比濁法（コラーゲン刺激）での凝集率が高く、TXB<sub>2</sub>産生量も多い傾向があった。GTT：閉塞時間は年齢、性別、BMI、血圧、喫煙、飲酒とは有意に関連しなかった。又、血小板数やフィブリ

ノーゲンとも有意な相関を認めなかった。一方、フォンビルブランド因子 (VWF:AgおよびVWF:RC<sub>0</sub>)、ヘマトクリット、及びHbA<sub>1c</sub>と負の相関を認めた(p<0.05, 単回帰分析)。重回帰分析ではVWF:RC<sub>0</sub>とヘマトクリットがOTと有意に関係していた。その他の動脈硬化危険因子と閉塞時間間に有意な相関は認められなかった。

(2) 血小板のtranscriptome解析 :

白血球混在についての検討結果は表(1)に示すように分離の精製度を1ランク上げると血小板数は約1/2ずつ、混在白血球の数は約1/2000、約1/15と減少を示した。RNA量は遠心分離のみに比べるとフィルター1回で約3/4量、フィルター2回で1/8量となったがこれらはいずれも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量と質(たんぱく混入の量)を満たしていた。この方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。また本検討から鑄型サンプル中、白血球 48.8 個以下の混在で本定量 PCR での検出限界となることが分かった。

表(1)

	血小板数(/ $\mu$ l)	✧RNA量( $\mu$ g)	白血球数/RNA 100ng
遠心分離のみ (血小板多血漿)	34.1 x 10 <sup>4</sup>	8	3.2x 10 <sup>6</sup>
* フィルター 1回	17.2x 10 <sup>4</sup>	6.6	1.5x 10 <sup>3</sup>
* フィルター 2回	7.9 x 10 <sup>4</sup>	1	97

\*フィルター: 白血球除去フィルター処理、✧各条件 30mL 使用の場合  
赤血球混在の検討結果はフィルター処理 1 回のサンプルにこの方法を加えた時、血小板数は変化なし、フィルター処理 2 回のサンプルにこの方法を加えると血小板数は約 1/200 減少となった。RNA に関しては、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。赤血球は減少を示したがリアルタイム定量 PCR による値は一定しなかった。Microarray 解析は白血球除去フィルター2回血小板と白血球を対象に行なった。約 20,000 因子搭載の

microarray 解析の結果、白血球サンプルに対して血小板サンプルで増加している既知因子の上位 15 は (1) myosin、(2) H2B histone family member N、(3) truncated alpha IIb protein、(4) CD9 antigen (p24)、(5) platelet glycoprotein IIIa (GPIIIa)、(6) calcium binding protein 5、(7) homogentisate 1,2-dioxygenase、(8) H2B histone family member A、(9) ATP-binding cassette sub-family C (CFTRMRP), member 3、(10) HYA22 protein、(11) sodium calcium exchanger、(12) H2A histone family member A、(13) glycoprotein Ib beta、(14) beta tubulin 1, class VI、(15) H3 histone family member K であり、血小板に特異的に発現している因子や血小板機能に重要な役割を有する因子の発現を認めた。

(3) 血小板 VWF 受容体 GPIb 多型と血小板機能の関連 : 145T と 145M を固相化したニトロセルロースメンブレンに  $^{125}\text{I}$  標識 VWF をリストセチン存在下で反応させ、その放射活性カウントによる定量解析を行った結果、 $^{125}\text{I}$  標識 VWF と組み換え蛋白の反応は 145T と 145M の比較検討において有意差は認められなかった。結合親和性(Kd)の検討においても 145T と 145M の比較検討における有意差

は認められなかった。2 つめの実験研究、流動状態下において、ガラス板に固相化した VWF と細胞の反応を細胞の rolling velocity の検討結果は、145M/4R が 145T/1R に比し有意差をもって VWF と高い反応を示した ( $p=0.00042$ )。145T/4R、145M/1R は前述 2 つの中間の値を示し、これらに VWF 反応の差異は認めなかった。

(4) 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。各群あわせて 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 ( $p \text{ value} < 0.001$ ) 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。