

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

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 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

MRI 拡散強調画像が診断に有効であった pure motor monoparesis の 1 例。中山 荘平, 清水 利彦, 野川 茂, 天野 隆弘, 棚橋 紀夫. 第 27 回 運動障害研究会 (平成 16 年 1 月 24 日, 東京)

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

脳梗塞患者における抗血小板薬の効果判定と血小板 mRNA プロファイリング

分担研究者 棚橋 紀夫 慶應義塾大学医学部内科講師

研究要旨【目的】酸化 LDL はマクロファージを泡沫細胞に変化させ、血管内皮細胞の NO 産生を抑制し白血球-血管内皮接着分子や平滑筋成長因子を誘導することにより動脈硬化を促進すると考えられている。近年、酸化 LDL のスカベンジャーレセプターである Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) のミスセンス-遺伝子多型が発見され、心筋梗塞発症リスクと関連することが示された。そこでは我々は動脈硬化性虚血性脳卒中と LOX-1 ミスセンス-遺伝子多型との関連につき検討を加えた。**【方法】**遺伝子多型解析についてインフォームドコンセントを得た慶應義塾大学病院に通院中の虚血性脳卒中患者（心原性脳塞栓症を除く）235 名と健常人 274 名より静脈血採血を行った。LOX-1(OLR1)遺伝子の G501C のミスセンス-遺伝子多型について、末梢血リンパ球より抽出した DNA を用いて PCR 法で 453bp の遺伝子を増幅し SNU-P 法にてタイピングした。**【成績】**ロジスティック解析の結果、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。虚血性脳卒中と高血圧・高脂血症・糖尿病・喫煙歴・脳卒中家族歴との間にはそれぞれ統計学的に有意な相関関係が認められた。患者群とコントロール群で GC+CC の頻度はそれぞれ 10.6 % vs. 9.1 % (P=0.568) と統計学的有意差を認めなかった。**【結論】**LOX-1 のミスセンス-遺伝子多型は日本人虚血性脳卒中発症に与える影響は少ないと考えられた。

A. 研究目的

抗血小板薬である aspirin は従来血小板凝集を抑制することにより、脳梗塞や心筋梗塞といった虚血性疾患の発症を予防すると考えられてきた。しかしながら、近年 aspirin がヒト冠動脈血管内皮細胞において酸化 LDL を介した LOX-1 の発現と

metalloproteinase-1 の発現を抑制するという新しい作用を持つことがわかった。酸化 LDL は LOX-1 と結合することにより、マクロファージを泡沫細胞に変化させ、血管内皮細胞の NO 産生を抑制し白血球-血管内皮接着分子や平滑筋成長因子を誘導することにより動脈硬化を促進すると考えられている。

一方、LOX-1 は酸化 LDL のスカベンジャーレセプターとして働くことが知られており、そのミスセンスー遺伝子多型は、心筋梗塞発症リスクを上昇させることが示されている。ここでは我々は LOX-1 ミスセンスー遺伝子多型が動脈硬化性虚血性脳卒中の発症リスクに与える影響につき検討を加えた。

B. 研究方法

遺伝子多型解析についてインフォームドコンセントを得た慶應義塾大学病院に通院中の発症時 70 歳以下の虚血性脳卒中患者（アテローム硬化性脳梗塞、ラクナ梗塞、一過性脳虚血発作）235 名（年齢 58.7 ± 4.4 歳、 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ ）と年齢、性別を一致させた健常人 274 名（年齢 58.3 ± 7.8 歳）より静脈血採血を行った。但し、心原性脳塞栓症は対象から除外した。LOX-1(OLR1)遺伝子の G501C のミスセンスー遺伝子多型について、末梢血リンパ球より抽出した DNA を用いて PCR 法で 453bp の遺伝子を増幅し SNuP 法にてタイピングした。

〈倫理面への配慮〉

対象全例より紙面による研究参加への承諾を得た。

C. 研究結果

患者群では Control 群に比較して古典的な危険因子である高血圧・糖尿病・喫煙が統計学的に有意に高かった ($P < 0.01$)。ロジスティック解析の結果、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。患者群とコントロール群で GC+CC の頻度はそれぞれ 10.6 % vs. 9.1 %

($P=0.568$) と統計学的有意差を認めなかった。C allele の存在と虚血性脳卒中 ($P=0.566$) やその他の危険因子との間には相関関係は認められなかった。

D. 考察

LOX-1 が酸化 LDL のスカベンジャーレセプターとして機能する場合、ミスセンスー遺伝子多型は動脈硬化性脳梗塞の発症リスクを上昇させるように作用すると考えられる。一方、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、ミスセンスー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、ミスセンスー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。

E. 結論

LOX-1 のミスセンスー遺伝子多型は日本人虚血性脳卒中発症の増減に与える影響は少ないと考えられた。

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

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.

2. 学会発表

第三十回日本脳卒中学会総会（平成17年4月21日、盛岡）

虚血性脳卒中患者における LOX-1 遺伝子多型の解析と検討

服部英典¹⁾、棚橋紀夫¹⁾、村田満³⁾、渡辺清明³⁾、斎藤郁夫²⁾、鈴木則宏¹⁾
慶應義塾大学神経内科¹⁾、同保健管理センター²⁾、同中央臨床検査部³⁾

H. 知的財産権の出願・登録（予定も含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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 16~17 年度総合研究報告書

全ゲノム解析による抗血小板薬の薬効を規定する遺伝子の同定

分担研究者 猪子 英俊 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授

研究要旨

抗血小板薬への反応性の個体差の遺伝的要因を調べる為、我々が開発した3万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析により、抗血小板薬反応性(凝集能など定量的値)を指標にしたQTL(quantitative trait locus)マッピングを予定している。そのため、本年度はマイクロサテライトによるゲノムワイドなマッピングの基盤技術を完成させることを、目的とした。すなわち、1)質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のためのDNAチップ技術(MSチップ)の開発、2)ゲノムワイドな多型マイクロサテライト30,000個の設定と各対立遺伝子の頻度の検索に関する研究、3)多型マイクロサテライトの抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究、を遂行し、疾患関連遺伝子をマッピングするための方法論を確立し、ゲノムワイドな解析に向けて一貫した流れの構築・システム化を行った。

A. 研究目的

抗血小板薬への反応性の個体差(responderとnon-responder)を規定している責任遺伝子を全ゲノムアプローチによるマッピング・同定することを計画している。具体的には、我々がヒトゲノム塩基配列より収集した、3万個の多型マイクロサテライト(1個/100kbの密度)を用いた相関解析によるマッピングを行い、責任遺伝子候補領域を100kb以内に絞り込む。この候補領域についてSNP(single nucleotide

polymorphism)解析および発現解析により責任遺伝子の同定を行い、抗血小板薬への反応性の機構を解明することが本研究の最終的な目的である。

このヒトゲノム多様性解析研究遂行のために、まず設定した多型マイクロサテライトマーカーを利用して、ゲノム上の組換え頻発部位、ハプロタイプ、多型のホットスポット、連鎖不平衡をしめす距離、脆弱部位、物理的距離と遺伝的距離との関係、日本人集団の遺伝的均質性などとい

った、マッピングの基礎となるゲノム上の遺伝学的知見を集積する。次にミニゲノム領域モデルとして 3.6Mb からなる HLA 領域を選び、同領域に関連遺伝子を有する遺伝的複合性疾患のマッピングを行う。これにより疾患関連遺伝子をマッピングするための方法論を確立し、ゲノムワイドな解析に向けて一貫した流れの構築・システム化を目指す。

B. 研究方法

1. 質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のための DNA チップ技術 (MS チップ) の開発に関する研究 :

マイクロサテライトの PCR 産物について、MALDI-TOFMS を用いて質量測定を行った。高密度 DNA チップの開発のため、インクジェット方式のスポットティングを行った。

2. ゲノムワイドな多型マイクロサテライト 30,000 個の設定と各対立遺伝子の頻度の検索に関する研究 :

本研究への参加について同意を得られた日本人健常者 100 人 (男性 45 人、女性 55 人) のボランティアより各 10-20 ml の末梢血を採取し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit

(QIAGEN) を用いてゲノム DNA の抽出・精製を行った。これらを鑄

型にし、蛍光標識したプライマーセットによって PCR 増幅を行い、自動シーケンサーABI 3700 または 3730 DNA analyzer にて電気泳動により、多型検索を行った。また、相関解析のための日本人集団の遺伝的均一性に関する統計学的研究を行った。

3. 多型マイクロサテライトの抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究 :

公開されている整列済みヒトゲノム配列データ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た。それらをもとに、多型マイクロサテライトデータベースの構築を試みみた。

(倫理面への配慮)

試料提供者には全て遺伝子研究に対する同意を得た上で、採血を行った。

C. 研究結果と考察

1. 質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のための DNA チップ技術 (MS チップ) の開発に関する研究 :

ゲノムワイドに収集した約 30,000 個の多型マイクロサテライ

トについて、迅速なPCR増幅産物の分子量測定を可能とする、高密度にサンプルを搭載したMSチップ作成のため、MALDI-TOFMS用サンプルを微小スポットに搭載するためのスポットティング条件を検討した結果、1,000スポット/cm画密度をもつチップの作製に成功した。また、この高密度MSチップ（微小スポット）におけるイオン化条件の検討を行っており、一部条件下において分子量の測定が可能となった。現在、これら高密度MSチップ搭載時の測定を自動的に行うにあたって、サンプルプレート動作制御を行う試作機器の開発を行っている。

MALDI-TOFMS の手法によってマイクロサテライトの多型を識別するために重要な、分解能向上のために、イオン化時に発生するフラグメンテーションを抑制する生化学的手法の検討をさらに推し進めた。これまで、同手法では PCR 増幅効率の低下が問題となる場合が認められたが、アニーリング温度の検討、使用酵素の検討により、通常の70%程度と、分子量測定に十分な増幅量が得られる温度条件を見出した。

2. ゲノムワイドな多型マイクロサテライト 30,000 個の設定と各対立遺伝子

の頻度の検索に関する研究：

マイクロサテライトを検索するもとなる整列化ゲノム配列には、Human Genome Project の成果によるもの(GoldenPath (<http://genome.ucsc.edu/>)) を使用した。昨年度までに多型マイクロサテライトが設定できていない領域を検索し、それらのゲノム領域についてマイクロサテライトの検出、PCR増幅を行うためのプライマー設計を行った。

健康人血液サンプルを用いて遺伝子解析を実施するにあたっては、東海大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会で審査を受け、研究実施の承認を受けた上で、研究開発を行った。本研究への参加について同意を得られた日本人健康者 100 人（男性 45 人、女性 55 人）のボランティアより各 10~20 mL の末梢血を採取し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA の抽出・精製を行った。次に、昨年度と同様の手順にて DNA 定量及び混合 DNA (Pooled DNA) 溶液の調製を行った。この DNA サンプルについて、設計したプライマーセットによって PCR 増幅を行い、自動シーケンサーABI 3700 DNA analyzer にて電気泳動に供した。得られた蛍光シグナルの波形パターン

から、各マイクロサテライトマーカ-の多型有無を判定した。多型有りと判定されたマーカ-については、検出されたピーク数より対立遺伝子数をカウントし、全ピークの高さの和に対する各ピークの高さの比率から、推定対立遺伝子頻度及びヘテロ接合率を算出した。

これらの多型マイクロサテライトについては、随時整列化ゲノム配列上での位置を検索することによって、最新のゲノム配列における設定状況を反映しつつ新規設定作業を行えるものとした。現在、34,270 個を収集することができた。

現在、ヒトゲノム上に多くの遺伝的多型マーカ-が同定され、これを利用したゲノムワイド連鎖不平衡マッピングによって、多遺伝子性疾患関連遺伝子の同定が試みられようとしている。一方で、そのような解析に必須となる人類集団のゲノムワイドな遺伝的特性に関する知見は少なく、特に日本人など東アジア人は比較的均質な遺伝的背景を持つとされているが、詳細な情報は非常に少ない。そこで、本研究では、日本人、韓国人、ハルハモンゴル人、ヨーロッパ系アメリカ人の4集団について、Y染色体から26個、X染色体上から9個、常染色体上から24個の多型マイクロサテライトを用いて対立

遺伝子遺伝子頻度分布の比較を行い、集団の遺伝的特性に関する調査を行った。4集団間の対立遺伝子頻度分布の比較から、Y染色体26マーカ-に関しては、日本人-韓国人集団間で有意差を示すマーカ-が8座位(30.8%)であったのに対し、他の集団ペア間では61.5-88.5%の座位で有意差が認められた。また、常染色体24マーカ-においては、日本人-韓国人集団間で有意差を示すマーカ-は1座位(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-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-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-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。このことは、少なくとも現在の日本人集団では遺伝的混合が

十分になされており、集団の階層化は生じていないことを示唆する。

3. 多型マイクロサテライトの抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究：

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。さらに、疾患解析時の実験情報、タイピング結果を格納し、統計的な解析手法が導入されたデータベースの構築を進めており、このようなシステムのデータベースによって大量のデータを効率的に管理・利用することが可能となっている。

D. 結論

抗血小板薬反応性（凝集能など定量的値）を指標にした QTL マッピングのための、3 万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな

相関解析の準備が整った。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Matsuzaka Y, Kulski JK, Inoko H, *et al*: hRDH-E2 gene polymorphisms,

- variable transcriptional start sites, and psoriasis. *Mamm Genome*. 15: 668-675, 2004.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Matsumoto T, Yukawa W, Inoko H, *et al*: Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. *Nucleic Acids Res* 32: 6069-6077, 2004.
22. 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.
23. Gourraud PA, Mano S, Inoko H, *et al*: Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens* 6P 4: 543-555, 2004.
24. 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.
25. Ando A, Shigenari A, Kulski JK, Renard C, Chardon P, Shiina T, Inoko H. Genomic sequence analysis of the 238-kb swine segment with a cluster of TRIM and olfactory receptor genes located, but with no class I genes, at the distal end of the SLA class I region. *Immunogenetics* in press.
26. Gourraud PA, Mano S, Barnette T, Carrington M, Inoko H, Cambon-Thomsen A: Integration of microsatellite characteristics in the

- MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens* 64: 543-555, 2004.
27. Matsuzaka Y, Okamoto K, Mabuchi T, Iizuka M, Ozawa A, Oka A, Tamiya G, Kulski JK, Inoko H: 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.
 28. 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.
 29. Ando A, Ota M, Sada M, Katsuyama Y, Goto R, Shigenari A, Kawata H, Anzai T, Iwanaga T, Miyoshi Y, Fujimura N, Inoko H: Rapid assignment of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I and II genotypes in Clawn miniature swine using PCR-SSP and PCR-RFLP methods. *Xenotransplantation* 12: 121-126, 2005.
 30. Shiina T, Dijkstra JM, Shimizu S, Watanabe A, Yanagiya K, Kiryu I, Fujiwara A, Nishida-Umehara C, Kaba Y, Hirono I, Yoshiura Y, Aoki T, Inoko H, Kulski JK, Ototake M: Interchromosomal duplication of major histocompatibility complex class I regions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a species with a presumably recent tetraploid ancestry. *Immunogenetics* 56: 878-893, 2005.
 31. Katoh T, Munkhbat B, Tounai K, Mano S, Ando H, Oyungerel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H: Genetic features of Mongolian ethnic groups revealed by Y-chromosomal analysis. *Gene* 346: 63-70, 2005.
 32. Suzuki K, Tanaka H, Sahara H, Tanaka N, Tamura Y, Naruse T, Inoko H, Tsushima K, Kubo K, Abe S, Sato N: HLA class II DPB1, DQA1, DQB1, and DRB1 genotypic associations with occupational allergic cough to Bunashimeji mushroom. *Tissue Antigens* 65: 459-466, 2005.
 33. Kikkawa EF, Tsuda TT, Naruse TK, Sumiyama D, Fukuda M, Kurita M, Murata K, Wilson RP, Lemaho Y, Tsuda M, Kulski JK, Inoko H: Analysis of the sequence variations in the Mhc DRB1-like gene of the endangered Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). *Immunogenetics* 57: 99-107, 2005.

34. 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: 9230-923, 2005.
35. Tamiya G, Shinya M, Imanish T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Takayama S, Endo T, Saruwatari T, Yagura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen SEV, Giphart MJ, Kulski JK, Fukazawa T, Hashimoto H, M Kimura, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Mochida J, Minezaki T, Komai K, Shiozawa S, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T, Bahram S, Inoko H: Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27,039 microsatellites. *Hum Mol Genetics* 14: 2305-2321, 2005.
36. Kulski JK, Anzai T, Inoko H: ERVK9, transposons and the evolution of MHC class I duplicons within the alpha-block of the human and chimpanzee. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 181-192, 2005.
37. Shichi D, Kikkawa EF, Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Matsumori A, Kulski JK, Naruse TK, Inoko H: The haplotype block, NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1-MICB-MICA, within the class III - class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus-associated dilated cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 66: 200-208, 2005.
38. Katoh T, Mano S, Munkhbat B, Tounai K, Oyungerel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H: Genetic features of Khoton Mongolians revealed by SNP analysis of the X chromosome. *Gene* 357: 95-102, 2005.
39. Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, Azuma F, Itakura M, Kashiwase K, Kikkawa E, Kulski JK, Satake M, Inoko H: High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics* 57: 1-13, 2005.
40. Bahram S, Inoko H, Shiina T, Radosavljevic M: MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* 17: 505-509, 2005.
41. Kimura T, Yoshida K, Shimada A,

- Jindo T, Sakaizumi M, Mitani H, Naruse K, Takeda H, Inoko H, Tamiya G, Shinya M. Genetic linkage map of medaka with polymerase chain reaction length polymorphisms. *Gene* 363: 24– 31, 2005
42. Ogawa Y, Kodama H, Kameyama K, Yamazaki K, Yasuoka H, Okamoto S, Inoko H, Kawakami Y, Kuwana M: Donor fibroblast chimerism in the pathogenic fibrotic lesion of human chronic graft-versus-Host disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46: 4519-4527, 2005.
43. Kulski JK, Kenworthy W, Bellgard M, Taplin R, Okamoto K, Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Tamiya G, Inoko H: Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals. *J Mol Med* 83: 964-975, 2005.
44. Mizutani A, Ostuka M, Kimira M, Tanaka M, Inoko H: An EYFP insertion mutant containing a modified lox sequence for potential use as a recombination indicator. *Nucleic Acid Symposium Series* 49: 297-298, 2005
- 2 . 学会発表
- 1 . Takemoto Y, Ohono S, Inoko H, *et al*: The origin of Behcet's Disease in terms of generation of HLA-B*51. XI. International Conference on Behcet's Disease
2. Inoko H: Genome scan of multifactorial diseases by association analysis with microsatellites. the 12th Symposium on International Medical Cooperation, 2004.
3. Inoko H: Genome scan of multifactorial diseases by association analysis with microsatellites. Plenary Lecture, 29th International Conference on Animal Genetics, 2004.
3. Shiina T, Goto RM, Inoko H, Miller MM: Contigs and sequences for B and Y regions of the chicken major histocompatibility complex. Workshop on chicken genome & Development in Cold Spring Harbor Laboratory, 2005.
4. Inoko H: A comprehensive methodology for whole genome association studies using microsatellites, The 1st Annual Workshop on the Genetics, Genomics & Bioinformatics of Microsatellites & VNTRs, 2005.
5. Inoko H: Genome-wide association analysis using 30,000 microsatellites for identification of common disease genes. 21th century human being and health forum • Harping, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) EP 03103543.9、Gene mapping method using microsatellite genetic polymorphism markers.

2) 2004-97934、関節リウマチ検査用マーカー遺伝子

2. 実用新案登録

なし

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

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

分担研究者 松原由美子 慶應義塾大学医学部内科講師

研究要旨 抗血小板薬の効果に対する遺伝子を同定することが本研究の目的である。こ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を行っている。この遺伝子解析(網羅的解析および候補因子アプローチ)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、血小板研究の主要な問題点は血小板は無核であるため遺伝子改変ができないことである。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に着手した。多分化能を有する胚性幹細胞(ES 細胞)から *in vitro* 分化誘導により巨核球・血小板を産生させる。ES 細胞は遺伝子改変が可能であり、非常に強い増殖能を有する。再現性が要求される実験において、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。したがって ES 細胞を用いてのプロトコル確立後、ヒト造血幹細胞を用いた実験システムの構築を行った。今回、遺伝子改変において着目した因子は血小板膜受容体の glycoprotein (GP) Ib alpha である。GPIb alpha は血小板特異的に発現しており、その遺伝子多型と血栓症、GPIb alpha の機能、そして血小板のアスピリン反応性の関係を本研究のこれまでの検討において示している。GPIb alpha の強制発現およびノックダウンを検討した結果、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。以上、今年度の結果から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。血小板産生機序の解明に迫った。

A. 研究目的

抗血小板薬は血小板血栓により発症する心筋梗塞や脳梗塞の再発予防や疾患のハイリスク患者に対しての一

次予防に用いられている。抗血小板療法 of それら動脈血栓症に対する有用性を示す evidence が蓄積されており、事実抗血小板薬は全世界で年間

数十億錠が使用されている。特に日本ではアスピリンが繁用されている。しかし一般人口の約3割はアスピリンが効かない（不応者）といわれる。アスピリンとは異なる作用機序を有するチエノピリジン系薬剤に対しても不応者の報告がある。これら抗血小板薬を服用しているにも関わらず、血小板機能が抑制されない「不応症」の患者では血栓の予防効果が低く再発率が高いことが示されている。したがって、この原因をつきとめることは生命リスクの低減ならびに医療経済性の観点から非常に重要である。しかし抗血小板薬の効果の個体差の原因はほとんど分っていない。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することを目的としている。その研究の中で今回、マウスES細胞・ヒト造血幹細胞から*in vitro*分化誘導による巨核球分化・血小板産生システムを用いた抗血小板薬の反応性に関連する因子の基礎検討を行った。

(1) マウス胚性幹細胞(ES細胞)、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング巨核球・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

や遺伝子解析を行っている。遺伝子解析(網羅的解析および候補因子アプローチ)により得られた結果は、遺伝子改変の実験検討による検証が必要とされるが血小板は無核であるため、遺伝子改変ができない。これは血小板研究の主要な問題点とされている。そこで本研究では幹細胞に対して遺伝子改変を行い、それを*in vitro*で分化誘導を行うことにより、遺伝子改変された巨核球・血小板を得る実験システムを用いることに着手した。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。

(2) 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巨核球と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。これら議論が分かれている理由のひとつとして研究に用いられる造血幹細胞は採取量が少なく、しかも増殖能が乏しいので検討に必要なサンプルの確保が難しいことが指摘されてきた。そこで今回、高い増殖能を持つ ES 細胞を用いて巨核球・血小板へと分化誘導し、その各過程における超微細構造像を検討した。ES 細胞を用いて実験プロトコルを確立した後にヒト造血幹細胞も用いた検討を行った。

B. 研究方法

(1) マウス ES 細胞、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲットング巨核球・血小板産生システムのプロトコルの確立 : ES 細胞から *in vitro* 分化誘導により巨核球や血小板を得るために OP9 培養システムを用いた実

験を行なった。このシステムはマウス ES 細胞を OP9 細胞(大理石病マウスのストロマ細胞)と共培養し、培養 5 日目から巨核球・血小板へ分化誘導を行なうためのサイトカインである トロンボポエチンを加え 15 日間培養する方法である。ヒト造血幹細胞としてのヒト CD34 陽性細胞は cambrex 社より購入した。CD34 陽性細胞にはトロンボポエチン存在下 Serum-free liquid culture システムを用いて巨核球分化、血小板産生のための *in vitro* 分化誘導を約 15 日間行った。巨核球・血小板産生の評価は形態観察に加え、その特異マーカー(CD41)の発現や核の倍数(DNA ploidy)をフローサイトメトリー法にて行なった。

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