

- 松本雅則、藤村吉博: 血栓性血小板減少性紫斑病における、各種測定方法による ADAMTS13 測定、第 68 回日本血液学会第 48 回日本臨床血液学会合同総会、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
33. 坂井薫、松本雅則、藤村吉博: 病理腎からは血管内皮障害がはっきりしなかった塩酸チクロピジン関連血栓性血小板減少性紫斑病の症例、第 68 回日本血液学会第 48 回日本臨床血液学会合同総会、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
34. 白鹿正通、釜江 剛、秋山正夫、田所誠司、柏木浩和、本田繁則、富山佳昭、倉田義之、金倉 讓: インテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  活性化における P2Y<sub>12</sub> の重要性 - 巨核球系細胞株 CMK を用いた解析、第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 合同開催、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
35. 釜江 剛、富山佳昭、清井映男、田所誠司、本田繁則、秋山正夫、白鹿正通、柏木浩和、倉田義之、金倉 讓: 本邦における血小板無力症の遺伝子異常: 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 合同開催、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
36. 秋山正夫、柏木浩和、白鹿正通、田所誠司、釜江 剛、倉田義之、富山佳昭、金倉 讓: Semaphorin 3A は PI3 kinase 系を介して血小板機能を抑制する: 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 合同開催、平成 18 年 10 月 6 日、福岡市
37. 松山友美、植村正人、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、石川昌利、森岡千恵、田村信宏、櫻井伸也、藤本正男、小嶋秀之、吉治仁志、瀧村力、藤村吉博、福井博: 健常人における中等量エタノール摂取後の ADAMTS13 活性と VWF 抗原の動態、DDW-JAPAN 2006、平成 18 年 10 月 11 日、札幌市
38. 佐藤有希子、小亀浩市、木村利奈、竹下 聡、末久悦次、川崎富夫、巽 純子、宮田敏行: 深部静脈血栓症患者におけるプロテイン S 遺伝子の解析、第 51 回日本人類遺伝学会、平成 18 年 10 月 17 日-20 日、米子市
39. Bandarenko N, Zakarija A, Kim B, Kwaan HC, McKoy JM, Pandey DK, Hay SN, Sarode R, Tevar AD, Cursio JF, Raife TJ, Kiss JE, Davidson C, Sadler JE, Ortel TL, Zheng XL, Kato S, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y, Bennett CL: Two Mechanistic Pathways of Ticlopidine- and Clopidogrel-associated TTP: Results From the Surveillance, Epidemiology, and Risk Factors for Thrombotic Thrombocytopenic

- Purpura (SERF-TTP) Research Group, 59<sup>th</sup> AABB Annual Meeting, October 21, 2006, Miami Beach, Florida, USA.
40. 小亀浩市、宮田敏行: VWF73 を利用した ADAMTS13 活性測定 の原理と応用. 第 53 回日本臨床検査医学会学術集会. 平成 18 年 11 月 9-11 日、弘前市
41. Kim B, Davidson C, Kwaan HC, Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Sarode R, McKoy JM, Tevar AD, Cursio JF, Raife TJ, Kiss JE, Raisch DW, Sadler JE, Ortel TL, Zheng XL, Kato S, Matsumoto M, Uemura M, Fujimura Y, Bennett CL: Characteristics of Two Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) Syndromes Associated with Ticlopidine and Clopidogrel: Results From the Surveillance, Epidemiology, and Risk Factors for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (SERF-TTP) Research Group, AHA Scientific Sessions 2006, November 12, 2006, Chicago, Illinois, USA.
42. 松本雅則、松山友美、加藤誠司、石西綾美、八木秀男、日裏久英、藤村吉博: ADAMTS13 の臨床応用-測定とその解釈 適正な血小板輸血医療を行うのに必須の ADAMTS13 活性と HIT 抗体の測定、第 29 回血栓止血学会学術集
- 会 学術推進 SPC シンポジウム、平成 18 年 11 月 16 日、宇都宮市
43. 加藤誠司、今野武津子、田中亮二郎、石指宏通、松本雅則、石西綾美、松山友美、八木秀男、日裏久英、藤村吉博: 新規 ADAMTS13act-ELISA の応用、第 29 回血栓止血学会学術集会、平成 18 年 11 月 16 日、宇都宮市
44. 白鹿正通、釜江 剛、秋山正夫、田所誠司、柏木浩和、本田繁則、倉田義之、富山佳昭、金倉 譲: 培養巨核球におけるインテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  活性化は一過性である: 第 29 回日本血栓止血学会学術集会、平成 18 年 11 月 16 日、宇都宮市
45. 秋山正夫、柏木浩和、白鹿正通、田所誠司、釜江 剛、本田繁則、倉田義之、富山佳昭、金倉 譲: Semaphorin 3A は PI3 kinase 系を介して血小板機能を抑制する: 第 29 回日本血栓止血学会学術集会、平成 18 年 11 月 16 日、宇都宮市
46. 小亀浩市、小久保喜弘、岡山明、宮田敏行: 日本人一般住民における ADAMTS13 の遺伝子多型と活性、第 29 回日本血栓止血学会学術集会、平成 18 年 11 月 16 日-18 日、宇都宮市
47. 阪田敏幸、岡本 章、小久保喜弘、

- 佐藤 清、岡山 明、森田隆司、宮田敏行：血漿中プロトロンビン活性の加齢による変動とその性差、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
48. 坂野史明、小亀浩市、宮田敏行：ADAMTS13をC末端ドメイン欠損型に置換したコンジェニックマウスの作製と解析、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
49. 石川淳子、木村利奈、本田繁則、川崎富夫、末久悦次、辻 肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田 満、竹下 聡、池田康夫、宮田敏行：「日本人静脈血栓症における関連遺伝子の変異解析」、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
50. 宮田敏行：日本血管生物医学会とのジョイントシンポジウム、ワルファリン感受性の個人差を規定する遺伝子、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月18日、宇都宮市
51. Banno F: Generation and characterization of Adamts13-knockout mice. 第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
52. Uemura M, Kato S, Matsumoto M, Isonishi A, Ishizashi H, Hiura H, Matsuyama T, Yagi H, Ishikawa M, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Fujimura Y, Fukui H: Increased plasma VWF antigen over decreased ADAMTS13 activity in patients with liver disturbance and clinical features, The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 9, 2006, Orlando, Florida, USA.
53. Matsumoto M, Kawa K, Yagi H, Park YD, Takeshima Y, Kosaka Y, Hara H, Kai S, Yamamoto M, Kanemaru A, Fukuhara S, Hino M, Sako M, Hiraoka A, Ogawa H, Hara J, Fujimura H: Infusions of fresh frozen plasma to the patients with a high-risk group for hepatic VOD associated with stem cell transplantation reduce its occurrence, The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 9, 2006, Orlando, Florida, USA.
54. 松本雅則、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、結石杏奈、丹羽欣正、藤村吉博、杉山幸正、谷奥正俊：当院におけるアルブミン製剤使用削減の取り組みについて、第50回日本輸血学会近畿支部総会 シンポジウム、平成18年12月2日、大阪市

55. Shiraga M, Kamae T, Akiyama M, Tadokoro M, Kashiwagi H, Oritani K, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: P2Y<sub>12</sub>-independent transient activation and P2Y<sub>12</sub>-dependent prolonged activation of platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ : The American Society of Hematology 48th Annual meeting, December 9-12, 2006, Orlando, USA.

56. 宮田敏行: 抗血小板薬並びに抗凝固薬の標準化に関する遺伝子解析研究、シンポジウム、脳卒中

発症の遺伝的要因、第32回日本脳卒中学会総会、平成19年3月22日、福岡市

57. 木戸慎介、久下裕司、横田千晶、井上裕康、原田晃名、生野雄二、堀田真理子、小亀浩市、峰松一夫、佐治英郎: 脳虚血障害後の環境刺激による神経機能回復に関する検討. 第32回日本脳卒中学会総会、平成19年3月22-23日、福岡市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金

## Ⅱ. 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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定の分野に関する研究

分担研究者 宮田敏行 国立循環器病センター研究所 部長

#### 研究要旨

血小板凝集は、血漿接着蛋白質フォンビルブランド因子（VWF）の重合度による調節をうけており、通常、超高分子量 VWF は VWF 切断酵素によってその重合度を制御されている。近年、血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子として同定されたメタロプロテアーゼ ADAMTS13 が VWF 切断酵素である事が明らかとなった。この酵素は他のタンパク質との相互作用により活性が制御されていると考えられるが、そのメカニズムは不明である。前年度、ADAMTS13 と相互作用し、その活性を制御するタンパク質をゲノム網羅的に探索した結果、ADAMTS13 結合タンパク質の候補遺伝子として 165 個の既知遺伝子と 24 個の新規遺伝子が得られていた。今回、幾つかの候補遺伝子について、精製蛋白質を入手し結合実験を行った。その結果、血漿蛋白質（プロテイン X）と ADAMTS13 が結合する事を試験管内で確認した。さらに、（プロテイン X）は試験管内で ADAMTS13 の VWF 切断活性を阻害する事が明らかとなった。

#### A. 研究目的

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈閉塞性疾患では血小板は中心的な役割を果たしている。血小板は動脈の血流下では、血漿タンパク質であるフォンビルブランド因子（VWF）依存性にコラーゲン上で凝集反応を起こす。血小板凝集は、

血漿接着蛋白質 VWF の重合度による調節をうけ、超高分子量 VWF 重合体は微小血管内で血小板凝集を誘導する。通常、生体内では超高分子量 VWF は VWF 切断酵素によってその重合度を制御されている。切断酵素の実体は長い間、不明であったが、近年血栓性血小板減少性紫

斑病の原因遺伝子として同定されたメタロプロテアーゼ ADAMTS13 が VWF 切断酵素である事が明らかとなった。この酵素は他のタンパク質との相互作用により活性が制御されていると考えられるが、相互作用するタンパク質は明らかになっておらず、活性調節メカニズムは全く不明である。そこで本研究では ADAMTS13 と相互作用するタンパク質をゲノム網羅的に探索し同定する事、さらに当該蛋白質による ADAMTS13 活性への影響を調べる事を目的とした。

## B. 研究方法

前年度までに、100を超える ADAMTS13 と相互作用するタンパク質の候補を得ていた。各候補遺伝子の塩基配列情報を解析し、分泌型蛋白質あるいは細胞膜蛋白質をコードしている遺伝子のみを選別した。幾つかの候補遺伝子について、精製蛋白質を入手し結合実験を行った。また、ADAMTS13 の VWF 切断活性に ADAMTS13 結合蛋白質が及ぼす影響を試験管内で調べた。

## C. 研究成果

前年度までの研究から、ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリット法により、100を超える

ADAMTS13 と相互作用するタンパク質の候補を得ていた。ADAMTS13 が分泌型蛋白質である事から、結合蛋白質が分泌型蛋白質あるいは細胞膜蛋白質である可能性が高いと考えられた。各候補遺伝子の塩基配列の情報から、分泌型蛋白質あるいは細胞膜蛋白質のみに限定すると、候補遺伝子数は 48 となった。幾つかの候補遺伝子について、精製蛋白質を入手し結合実験を行った。96穴のプレートに固定化した候補蛋白質と ADAMTS13 溶液を混合し、室温で一定時間放置した。その後、固相化した候補蛋白質に結合した ADAMTS13 を抗 ADAMTS13 抗体によって検出した。この方法により血漿蛋白質（プロテイン X）と ADAMTS13 が結合する事が示された。

さらに、溶液中での ADAMTS13 と（プロテイン X）との相互作用を確認するため、免疫沈降法を用いた。まず、ADAMTS13 とプロテイン X を混合し、一定時間室温に放置した後、抗（プロテイン X）抗体を加えた。抗体認識能を有するプロテイン G を共有結合したアガロースを用い、抗体と（プロテイン X）さらに（プロテイン X）に結合した蛋白質を遠心法により回収した。抗（プロテイン X）抗体及び抗 ADAMTS13 抗体を

用いた Western blotting 法により、(プロテイン X) と ADAMTS13 が複合体を形成している事を確認した。さらに、FLAG タグをカルボキシ末端に付加した組換え ADAMTS13 と(プロテイン X) が溶液中で結合する事を、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により確認した。

次に、ADAMTS13 の VWF 切断活性に(プロテイン X) が及ぼす影響を試験管内で調べた。まず、ADAMTS13 による切断が可能な VWF の部分ペプチドを用いた測定系に(プロテイン X) を加えた。その結果、(プロテイン X) は容量依存的に ADAMTS13 活性を阻害した。さらに超高分子量 VWF を用いた ADAMTS13 活性の測定系に(プロテイン X) を加えた。血中濃度と同程度の(プロテイン X) は、ADAMTS13 活性に抑制的に作用した。

#### D. 考察

ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリット法により、得た ADAMTS13 と相互作用するタンパク質の候補蛋白質のうち、試験管内で ADAMTS13 と結合する蛋白質(プロテイン X) を同定した。ADAMTS13 が基質である VWF 以外の血漿蛋白質と結合する事が初めて示された。又、(プロテ

イン X) は容量依存的に ADAMTS13 活性を阻害する事が、蛍光基質を用いた解析から明らかとなった。抗 ADAMTS13 抗体以外の蛋白質が ADAMTS13 活性を阻害する最初の報告である。今回、同定した ADAMTS13 結合蛋白質(プロテイン X) は血漿蛋白質である事から、(プロテイン X) は ADAMTS13 活性を抑制し過度の VWF 切断を阻害する事によって、血中の VWF の血小板凝集能を維持していると考えられる。今後、生体内での(プロテイン X) の ADAMTS13 活性への影響を調べる必要ある。

#### E. 結論

血漿蛋白質(プロテイン X) と ADAMTS13 が結合する事を試験管内で確認した。さらに、試験管内で(プロテイン X) は ADAMTS13 の VWF 切断活性を阻害する事が明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Complete deficiency in



- ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2006; 107(8):3161-3166.
2. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T: Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 2006; 107(4):1737-1738.
  3. Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Tomoike H, Miyata T: Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* 2006; Oct 16: Epub.
  4. Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, Okamoto A, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost* 2006; 4(9):2010-2013.
  5. Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T: Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* 2006; 83(3):217-223.
  6. Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, Fujita T: Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5):1289-1292.
  7. Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Sakata T, Nagura J, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Sato K, Tomoike H, Miyata T: Polymorphisms in vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in general population. *Int J Hematol* 2006; 84(5):387-397.
  8. Sugiyama S, Hirota H, Kimura R, Kokubo Y, Kawasaki T, Suehisa E, Okayama A, Tomoike H, Hayashi T, Nishigami K, Kawase I, Miyata T: Haplotype of thrombomodulin gene associated with plasma

thrombomodulin level and deep vein thrombosis in the Japanese population. *Thromb Res* 2007; 119(1):35-43.

#### 学会発表

1. 宮田敏行: 血栓症の遺伝子素因、ビタミン K サイクル遺伝子多型とワルファリン療法の今後の動向、第9回ビタミンKフォーラム、第16回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会、平成18年6月9日、甲府市
2. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: ADAMTS13-deficient mice have potential risks for thrombosis but do not spontaneously develop thrombotic thrombocytopenic purpura. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
3. Kokame K, Kikuchi T, Okuda T, Yanamoto H, Miyamoto S, Miyata T: Enhanced susceptibility to glucose load and cerebral ischemia in mice lacking ER-stress protein Herp. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.
4. Miyata T: ADAMTS13: Deficiency, assay method, and mouse model, Lecture at University of Michigan, July 7, 2006, Ann Arbor, USA.
5. Miyata T: ADAMTS13 and its related issues, Invited lecture, Gordon Research Conference Hemostasis, July 11, 2006, Colby College, Waterville, ME, USA.
6. Miyata T: Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese, Symposium 2: Thrombophilia and some related factors. Invited lecture. The 4<sup>th</sup> Asian-Pacific Congress on Thrombosis Hemostasis, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.
7. Sugiyama S, Hirota H, Kimura R, Kokubo Y, Kawasaki T, Suehisa E, Okayama A, Tomoike H, Hayashi T, Nishigami K, Kawase I, Miyata T: Haplotype of thrombomodulin gene associated with plasma thrombomodulin level and deep vein thrombosis in the Japanese population. (Poster presentation) The 4<sup>th</sup> Asian-Pacific Congress on Thrombosis Hemostasis, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.
8. Miyata T: Genetic risk factors for thrombosis in Japanese, The Second Sweden-NCVC Symposium on

- Cardiovascular Disease and Metabolic Syndrome, September 26, 2006, Stockholm, Sweden.
9. 宮田敏行: 日本血管生物医学会とのジョイントシンポジウム、ワルファリン感受性の個人差を規定する遺伝子、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月18日、宇都宮市
  10. 小亀浩市、小久保喜弘、岡山明、宮田敏行: 日本人一般住民におけるADAMTS13の遺伝子多型と活性、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
  11. 阪田敏幸、岡本章、小久保喜弘、佐藤清、岡山明、森田隆司、宮田敏行: 血漿中プロトロンビン活性の加齢による変動とその性差、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
  12. 坂野史明、小亀浩市、宮田敏行: ADAMTS13をC末端ドメイン欠損型に置換したコンジェニックマウスの作製と解析、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
  13. 石川淳子、木村利奈、本田繁則、川崎富夫、末久悦次、辻肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田満、竹下聡、池田康夫、宮田敏行: 「日本人静脈血栓症における関連遺伝子の変異解析」、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市
  14. 佐藤有希子、小亀浩市、木村利奈、竹下聡、末久悦次、川崎富夫、巽純子、宮田敏行: 深部静脈血栓症患者におけるプロテインS遺伝子の解析、第51回日本人類遺伝学会、平成18年10月17日-20日、米子市
  15. 宮田敏行: 抗血小板薬並びに抗凝固薬の標準化に関する遺伝子解析研究、シンポジウム、脳卒中発症の遺伝的要因、第32回日本脳卒中学会総会、平成19年3月22日、福岡市
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定も含む)  
プロテインXの知的財産権の出願を検討中

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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

## 分担研究報告書

血小板膜蛋白質と情報伝達タンパク質の心筋梗塞や脳梗塞に関する研究

分担研究者 森崎隆幸 国立循環器病センター研究所 部長

### 研究要旨

血小板凝集能が心筋梗塞や脳梗塞に関与することは広く知られている。本研究では、血小板凝集にかかわる遺伝子の多型を収集し、血小板凝集能や心筋梗塞・脳梗塞に寄与するかどうかを明らかにするため、トロンボキサン A2 受容体と血小板凝集シグナル伝達因子 CalDAG-GEF1 の全エクソン領域をシーケンスにより遺伝子多型を収集した。

### A. 研究目的

心筋梗塞や脳梗塞といった動脈閉塞症の遺伝的背景として、血小板凝集に関する膜受容体やアゴニスト刺激を伝える細胞内情報伝達因子が候補遺伝子と考えられる。しかし、血小板凝集能に影響を与える遺伝子多型に関する報告はあまり多くない。その理由として、一般住民を対象に血小板凝集能を測定し、収集されたデータに基づいて遺伝子多型の寄与を明らかにする研究デザインが取られていないことが考えられた。そこで私達は、地域一般住民を対象に血小板凝集能を測定し、血小板凝集能にかか

わる遺伝子の多型の寄与を明らかにすることを計画した。遺伝子多型は人種によりその頻度が異なることが明らかとなっている。また、5%以下の頻度を持つ多型でも、機能に影響を与えるのであれば重要である。ここでは、日本人を対象に、DNA シーケンスを行い、血小板膜タンパク質および情報伝達タンパク質の遺伝子の多型を収集した。これらの中で、機能にかかわる可能性が高いミスセンス変異に着目した。

### B. 研究方法

日本人 48 人の DNA を用いて、エクソ

ンとプロモーター領域のシークエンスを行い、遺伝子多型を収集した。DNAシークエンスは、ABI3730 シークエンサーおよび ABI3100 シークエンサーで行った。遺伝子多型は Sequencher (Gene Code 社)で同定した。

(倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」にしたがう。遺伝子解析に関して十分な説明を行い、主旨を理解していただいたうえで書面にて同意を表明した方を対象に研究を行った。

## C. 研究成果

### 1) トロンボキサン A2 受容体、TBXA2R

TBXA2R は、強力な血小板凝集アゴニストであり血管平滑筋細胞の収縮機能を持つトロンボキサン A2 の受容体である。本受容体は 369 アミノ酸残基の 7 回膜貫通領域を持つ G 蛋白質共役型受容体である。TBXA2R の機能不全をおこす R60L 変異などの遺伝子変異は、血小板凝集能の低下により優性遺伝形式をとる出血症状を呈する。一方、機能を亢進させる変異は、血栓症のリスクになると考えられる。本遺伝子のエクソンとプロモーター領域をシークエンスすることにより 4 個の変異を同定した。そのうち

3 個はコーディング領域内にあるアレル頻度が 5 % 以上の一塩基多型であった。しかし、いずれの変異もアミノ酸は変化しなかった。

### 2) CalDAG-GEF1、RASGRP2

細胞内の情報伝達のセカンドメッセンジャーであるカルシウムとジアシルグリセロール (DAG) は、タンパク質キナーゼ C に結合し情報を伝達することが知られている。これ以外の経路として、CalDAG-GEF / RasGRP 群が関与することが示された。このファミリー蛋白質のなかで、CalDAG-GEF1 / RasGRP2 (スプライシングの違いにより、609、662、671 アミノ酸から成る、染色体 11q13 に位置する) は血小板凝集のシグナル伝達に極めて重要な役割を果たしていることが、2004 年に報告された。血小板凝集のアゴニストであるトロンビン、ADP、トロンボキサン A2 はそれぞれの受容体を介してホスホリパーゼ C $\beta$  を活性化し、またアゴニストであるコラーゲンはその受容体を介してホスホリパーゼ C $\gamma$  を活性化し、細胞内のカルシウムと DAG の濃度を上昇させ、CalDAG-GEF1 を介して血小板インテグリンである  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を活性化し血栓形成へと導く。本遺伝子のエクソンとプロモーター領域をシークエ

ンスすることにより 21 個の変異を同定した。このうち、2 個はアレル頻度が 5%以上であったが、いずれもアミノ酸は変化しなかった。ミスセンス変異は 2 個 (T3A, G555A) 同定できたが、いずれも 48 人中 1 人に見い出され、その頻度は低かった。

#### D. 考察

昨年に引き続き、本年度も血小板凝集にかかわる候補遺伝子をシーケンスすることにより多型を収集し、心筋梗塞・脳梗塞の遺伝的背景を探るための基盤を整えることができた。

#### E. 結論

日本人を対象に、血小板凝集にかかわ

る 2 つの遺伝子をシーケンスし、25 個の遺伝子変異を同定した。このうち、機能の変化にかかわると考えられるミスセンス変異は 2 つあった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

### 分担研究報告書

#### 血小板血栓能評価のための地域一般住民を対象にした血小板凝集能の検討

|       |       |                 |    |
|-------|-------|-----------------|----|
| 分担研究者 | 岡山 明  | 国立循環器病センター予防検診部 | 部長 |
| 研究協力者 | 小久保喜弘 | 国立循環器病センター予防検診部 | 医師 |
| 研究協力者 | 阪田 敏幸 | 国立循環器病センター検査部   | 技師 |

#### 研究要旨

脳梗塞や虚血性心疾患の発症に、血小板が大きく関与することは周知であり、その予防として抗血小板薬が広く用いられている。近年、血栓能は個人差があると認識され、その一部は遺伝子多型で説明されている。しかし、これらの多くは患者対照研究から得られたものであり、一般住民を対象にした研究は極めて少ない。本研究は、地域一般住民（約1,500名）を対象に、コラーゲンとADPをアゴニストとして、血小板凝集能を測定し、心血管疾患患者の凝集能と比較するためのデータを収集する。本年度は、男性で284名、女性で412名の血小板凝集能の測定結果から、血小板数、血小板凝集能の正常高値域であっても、動脈硬化と関連のある可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

血小板は、脳梗塞や虚血性心疾患の発症に大きく関与している。高ずり応力下の病的血管では、露出したコラーゲン依存性、もしくはコラーゲンに結合したフォンビルブランド因子依存性に、血小板の活性化が起こり、その時、ADPやトロンボキサンが放出され、更に強固に

血小板は活性化される。活性化された血小板では、血小板インテグリンが活性化され、これにフィブリノーゲンやフォンビルブランド因子が結合し、血小板血栓が形成される。血小板の機能は、検査室では凝集による透過光の変化で測定される。即ち、多血小板血漿がアゴニスト刺激により凝集すると、透過光が減少す

る。この血小板の機能測定は、大規模な集団を対象とする研究にはあまり用いられていない。その理由として、1) 多血小板血漿の調製に手間がかかる、2) 測定に用いる機種により結果に差が見られ標準化されていない、3) 血小板凝集能は種々の薬剤で影響を受けるので十分な問診が必要、が考えられる。私達はこれまで、都市部の地域一般住民を対象に、血液凝固能、血液凝固制御因子能、線溶因子能の研究を進めてきた。これらの研究により、日本人の血栓症の背景として、性・年齢による凝固制御因子の変動、欧米人にはみられない日本人の特徴などが明らかにした。

本研究では、これまで行ってきた問診などの経験に基づき、これまでと同じ地域一般住民を対象として、正確な血小板凝集能を測定し、生活習慣病との関係を解析することを目的とする。

## B. 研究方法

吹田市一般住民から性・年齢で層別抽出した対象者のうち、平成17年11月～平成18年12月に国立循環器病センターで健診を受診した方のうち、69歳までの受診者で、研究に同意した者(696名)を対象とした。血小板凝集は、1.7 mg/ml コラーゲンと 1.7 mM ADPを用いて測定した。これらのアゴニスト濃度は、

国立循環器病センター検査部で患者検体の測定に用いている濃度と同じである。

**解析方法:**血小板凝集能の判定は、ADP > 92%またはコラーゲン(COLL) > 94%で高値、ADP < 51%または COLL < 59%で低値とした(院内の判定と同じもの)。四分位別による血小板数および血小板凝集能と検査値との関係は、性別に年齢調整の共分散分析を用いて解析した。

**倫理面への配慮:**健診受診時に、書面にて本研究の同意の得られた受診者を対象者とした。データは集団の特徴として取り扱うので、個人名が特定できるような形式でデータを公表することはない。

## C. 研究結果

本研究の男女別対象者の主要な健診結果を表1に示した。平均年齢は、男性  $59.7 \pm 7.3$  歳、女性  $59.0 \pm 7.1$  歳で、血小板数の平均値は、男性で  $248.4 \pm 67.8 \times 10^3$  ml、女性で  $255.8 \pm 61.2 \times 10^3$  mlであった。血小板凝集能ADPは、男性で  $65.2 \pm 13.3\%$ 、女性で  $70.0 \pm 11.4\%$ 、COLLは男性で  $73.8 \pm 12.6\%$ 、女性で  $77.1 \pm 10.7\%$ であった。



表 1. 男女別対象者健診結果

|  | 男性         | 女性         |
|--|------------|------------|
| 人数, 人                                  | 284        | 412        |
| 年齢, 歳                                  | 59.7±7.3   | 59.0±7.1   |
| 収縮期血圧, mmHg                            | 123.8±15.9 | 116.5±16.4 |
| 拡張期血圧, mmHg                            | 80.3±9.7   | 72.8±10.2  |
| 総コレステロール, mg/dL                        | 198.4±30.6 | 215.8±32.2 |
| HDLコレステロール, mg/dL                      | 55.9±14.5  | 65.6±15.6  |
| BMI, kg/m <sup>2</sup>                 | 23.7±2.8   | 22.3±3.4   |
| 血小板, ×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> | 248.4±67.8 | 255.8±61.2 |
| 血小板凝集能 ADP, %                          | 65.2±13.3  | 70.0±11.4  |
| COLL, %                                | 73.8±12.6  | 77.1±10.7  |
| 喫煙率, %                                 | 30.4       | 6.3        |
| 飲酒率, %                                 | 71.9       | 31.3       |

表 2. 性年代別血小板数および血小板最大凝集率

|    |         | 40代        | 50代        | 60代        |
|----|---------|------------|------------|------------|
| 男性 | 血小板     | 256.9±59.3 | 250.1±55.8 | 245.8±75.4 |
|    | ADP, %  | 65.3±13.3  | 66.8±13.0  | 64.3±13.4  |
|    | COLL, % | 75.8±8.2   | 75.0±9.9   | 72.6±14.5  |
| 女性 | 血小板     | 275.4±64.8 | 261.7±65.1 | 246.7±56.1 |
|    | ADP, %  | 71.1±8.3   | 69.4±11.5  | 70.1±12.1  |
|    | COLL, % | 76.5±5.9   | 77.6±9.4   | 76.9±12.4  |

表 3. 血小板凝集能高値・低値の割合

|    |         |  | 低値   | 基準値  | 高値 |
|----|---------|--|------|------|----|
| 男性 | ADP, %  |  | 15.9 | 84.2 | 0  |
|    | COLL, % |  | 8.1  | 91.9 | 0  |
| 女性 | ADP, %  |  | 7.3  | 92.7 | 0  |
|    | COLL, % |  | 4.1  | 95.9 | 0  |

高値: ADP>92, COLL>94

低値: ADP<51, COLL<59

性年代別の血小板数、血小板凝集能 ADP と COLL を表 2 に示した。血小板数は女性で年代が進むと減少していた(p<0.05)。血小板凝集能 ADP および COLL の低値の割合は、男性でそれぞれ 15.9%、8.1%、女性でそれぞれ 7.3%、4.1%であった。高値のものはこの対象者ではみられなかった。

表4. 性別年齢調整血小板数四分位別成績

|                        | Q1        | Q2                | Q3               | Q4                | トレンド p |
|------------------------|-----------|-------------------|------------------|-------------------|--------|
| 男性                     | - 209     | 210 - 243         | 244 - 276        | 277 -             |        |
| SBP, mmHg              | 121.8±1.8 | 123.2±1.8         | 124.9±1.7        | 125.4±2.0         | 0.514  |
| DBP, mmHg              | 79.4±1.1  | 80.4±1.1          | 81.0±1.0         | 80.3±1.2          | 0.773  |
| BMI, kg/m <sup>2</sup> | 24.0±0.3  | 23.6±0.3          | 23.7±0.3         | 23.2±0.3          | 0.372  |
| TC, mg/dL              | 194.3±3.5 | 197.0±3.6         | 194.5±3.3        | <b>210.4±3.8*</b> | 0.007  |
| HDL, mg/dL             | 54.3±1.7  | 56.1±1.7          | 55.9±1.6         | 57.5±1.8          | 0.667  |
| 女性                     | - 215     | 216 - 248         | 249 - 290        | 291 -             |        |
| SBP, mmHg              | 113.9±1.5 | 115.1±1.6         | 117.2±1.5        | <b>119.4±1.4*</b> | 0.066  |
| DBP, mmHg              | 71.2±1.0  | 72.3±1.0          | 73.3±1.0         | <b>74.2±0.9*</b>  | 0.179  |
| BMI, kg/m <sup>2</sup> | 21.7±0.3  | 22.1±0.3          | <b>22.8±0.3*</b> | 22.6±0.3          | 0.122  |
| TC, mg/dL              | 209.7±3.2 | <b>219.2±3.2*</b> | 213.0±3.1        | <b>220.8±2.9*</b> | 0.040  |
| HDL, mg/dL             | 67.4±1.5  | 66.9±1.5          | 63.8±1.5         | 64.6±1.4          | 0.265  |

†:p<0.05(Q1と比較)

表5. 性別年齢調整血小板最大凝集能ADP四分位別成績

|                        | Q1        | Q2        | Q3        | Q4        | トレンド p |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| 男性                     | - 56      | 57 - 67   | 68 - 73   | 74 -      |        |
| SBP, mmHg              | 125.0±1.6 | 122.1±1.7 | 123.9±1.9 | 124.0±2.0 | 0.710  |
| DBP, mmHg              | 80.7±1.0  | 79.7±1.1  | 80.8±1.2  | 79.8±1.3  | 0.883  |
| BMI, kg/m <sup>2</sup> | 24.1±0.3  | 23.5±0.3  | 23.5±0.3  | 23.4±0.3  | 0.477  |
| TC, mg/dL              | 200.5±3.2 | 195.0±3.5 | 199.7±3.8 | 198.1±4.1 | 0.696  |
| HDL, mg/dL             | 58.1±1.5  | 54.4±1.6  | 54.6±1.7  | 55.8±1.9  | 0.350  |
| 女性                     | - 63      | 64 - 72   | 73 - 77   | 78 -      |        |
| SBP, mmHg              | 116.4±1.7 | 116.7±1.6 | 117.5±1.6 | 115.8±1.3 | 0.882  |
| DBP, mmHg              | 73.2±1.1  | 73.0±1.0  | 73.0±1.0  | 72.3±0.8  | 0.920  |
| BMI, kg/m <sup>2</sup> | 22.6±0.3  | 22.3±0.3  | 22.5±0.3  | 22.1±0.2  | 0.685  |
| TC, mg/dL              | 219.1±3.5 | 213.1±3.3 | 216.1±3.3 | 215.3±2.6 | 0.731  |
| HDL, mg/dL             | 66.7±1.7  | 65.9±1.5  | 65.5±1.6  | 64.8±1.2  | 0.850  |

表6. 性別年齢調整血小板最大凝集能COLL四分位別成績

|                        | Q1        | Q2               | Q3               | Q4               | トレンド p |
|------------------------|-----------|------------------|------------------|------------------|--------|
| 男性                     | - 70      | 71 - 76          | 77 - 80          | 81 -             |        |
| SBP, mmHg              | 123.4±1.6 | 121.7±1.7        | 126.2±1.9        | 124.4±2.0        | 0.375  |
| DBP, mmHg              | 79.7±1.0  | 79.0±1.1         | 82.1±1.1         | 80.7±1.2         | 0.257  |
| BMI, kg/m <sup>2</sup> | 24.0±0.3  | 23.7±0.3         | 23.2±0.3         | 23.6±0.3         | 0.400  |
| TC, mg/dL              | 197.8±3.3 | 199.3±3.5        | 201.7±3.8        | 194.7±3.9        | 0.636  |
| HDL, mg/dL             | 58.2±1.5  | 58.2±1.6         | 53.8±1.7         | <b>52.0±1.8†</b> | 0.023  |
| 女性                     | - 74      | 75 - 78          | 79 - 82          | 83 -             |        |
| SBP, mmHg              | 116.6±1.7 | 116.7±1.7        | 113.6±1.4        | 119.0±1.3        | 0.068  |
| DBP, mmHg              | 73.3±1.1  | 73.1±1.1         | 71.4±0.9         | 73.6±0.8         | 0.338  |
| BMI, kg/m <sup>2</sup> | 23.0±0.3  | <b>21.8±0.3†</b> | <b>21.6±0.3†</b> | 22.9±0.2         | 0.002  |
| TC, mg/dL              | 214.9±3.5 | 214.7±3.5        | 218.0±2.9        | 215.1±2.8        | 0.555  |
| HDL, mg/dL             | 69.1±1.7  | 67.7±1.6         | 65.5±1.3         | <b>62.2±1.3†</b> | 0.008  |

†:p<0.05(Q1と比較)

血小板数を性別に四分位にして、各検査値の年齢調整平均と標準誤差を解析した(表 4)。男女とも血小板数の一番少ない群(第 1 四分位; Q1)を基準にして、一番多い群(第 4 四分位; Q4)で総コレステロールが有意に高く( $p < 0.05$ )、傾向 P 値も有意であった。女性では血小板数の一番少ない群(第 1 四分位; Q1)を基準にして、一番多い群(第 4 四分位; Q4)で収縮期・拡張期血圧が有意に高かった。また、血小板凝集能 ADP では有意なものがみられなかった。さらに、血小板凝集能 COLL を性別に四分位にして、各検査値の年齢調整平均と標準誤差を解析した(表 6)。男女とも COLL の一番低い群(第 1 四分位; Q1)を基準にして、一番高い群(第 4 四分位; Q4)で HDL コレステロール値が有意に低かった。

#### D. 考察

**地域一般住民**の血小板凝集能の測定を開始し、平成 18 年 12 月までに男性 284 名、女性 412 名の測定を終了した。男女とも血小板数と総コレステロールが正相関であり、女性では血小板数と収縮期・拡張期血圧が正相関であった。また、男女とも COLL と HDL コレステロール値との間に逆

相関がみられた。

#### E. 結論

血小板数、血小板凝集能が正常範囲内であっても正常高値では、動脈硬化を促進させることが示唆された。平成 19 年度も同じプロトコール(十分な問診と正確な凝集能測定)で研究を進め、サンプル数を増やして生活習慣との関係も合わせて解析予定である。

#### F. 健康危険情報

本研究においては、健康危険情報に該当するものはなかった。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に記述すべきものはなかった。

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）

血小板血栓形成を制御する遺伝子の同定と

その成果を用いた予防と治療の個別化

分担研究報告書

インテグリン活性化にかかわるシグナル伝達分子に関する研究

分担研究者 本田繁則 国立循環器病センター研究所 室長

#### 研究要旨

血小板血栓形成には血小板の凝集反応が必須であり、その反応過程において血小板インテグリン、ことに $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の活性化が重要な役割を担っている。しかしながら、 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の活性化のメカニズムの詳細は明らかではない。本年度は化学変異原によりゲノムワイドに変異を導入し、活性化した血小板キメラインテグリンが不活性となるクローン細胞を用いて発現クローニングを行い、活性化にかかわるシグナル伝達分子を1つ同定した。

#### A. 研究目的

動脈血栓の形成は血小板の障害血管内皮下組織への接着で始まり、血小板凝集反応、続いてフィブリンの形成が起こり生じる。この一連の過程に血小板インテグリンの活性化が深く関与している。インテグリンは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の2量体を形成する1回膜貫通型の接着受容体である。血小板では主としてフィブリノーゲンやフォンビルブランド因子の受容体である $\alpha\text{IIb}\beta 3$ およびコラーゲンの受容体として機能する $\alpha 2\beta 1$ が発現しており、血小板の接着、凝集、および血栓形成に重要な

役割を果たしている。現在、欧米を中心にインテグリンの研究が進められているが、インテグリンの機能発現にかかわるシグナル伝達機構の詳細は不明である。本研究は活性化状態にある血小板キメラインテグリンを発現する有核細胞株にゲノムワイドに変異を導入し、非活性状態となるインテグリンを発現するクローン細胞を獲得した後、発現クローニングの手法を用いてインテグリン活性化にかかわるシグナル伝達分子の同定を目的としている。