

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

*ALOX5*は14個のエクソンをもつ遺伝子である。本研究ではエクソンのタンパク質コード領域を日本人48名のDNAを用いてシーケンスを行い変異を収集した。その結果、24の1塩基変異と2つの小欠失変異、1つの小挿入変異を同定した。アミノ酸置換やフレームシフトを起こす変異などのタンパク質の機能に影響を与えられとされる変異は存在しなかった。マイナーアレル頻度が0.19の3多型、0.05の4多型、0.26の3多型、0.08の2多型は、それぞれ連鎖不平衡していた。*ALOX5*遺伝子には連鎖不平衡を示す変異が存在したことから、こういった変異が遺伝子発現に影響を与えることが考えられた。

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

日本人を対象に血栓症の候補遺伝子の1つのタンパク質コード領域のDNAシーケンスを行い多型を同定した。

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(創薬基盤推進研究事業)

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 小久保喜弘 国立循環器病センター 予防検診部 医長
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 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。男性661名、女性で907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都市部一般住民を対象とした研究で示唆された。また、血小板凝集能検査ではADPと脂質値との関連はみられず、COLLのみLDLコレステロール LDL/HDL 比で関連がみられた。

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19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、40歳から69歳までの受診者で、本研究に同意した者(男性661名、女性907名)を対象とした。採血は空腹時採血で、翼状針を使用して、血清採血管3ml、EDTA採血管2ml、クエン酸採血管4.5mlを採血した。血小板凝集は、1.7mg/mlコラーゲンと1.7mM 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。血圧は

自動血圧計を用いて、2回計測の平均値を使用した。

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。男女別四分位別による血小板数および血小板凝集能(ADP、COLL)と検査値(収縮期・拡張期血圧、Body mass index、総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、LDL/HDLコレステロール比)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。また、血小板凝集は、服薬の影響を受けるため、服薬のない者のみを対象にした解析を行った。

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59.5±6.8歳、女性58.8±6.9歳で、血小板数の平均値は、男性で $246 \pm 60 \times 10^3$ ml、女性で $254 \pm 60 \times 10^3$ mlであった。血小板凝集能ADPでは、男性で $66.4 \pm 12.8\%$ 、女性で $71.3 \pm 11.3\%$ 、COLLでは男性で $74.7 \pm 13.5\%$ 、女性で $78.2 \pm 11.3\%$ であった。

表 1. 男女別対象者健診結果

	男性	女性
人数, 人	661	907
年齢, 歳	59.5±6.8	58.8±6.9
収縮期血圧, mmHg	125.1±17.5	118.7±17.8
拡張期血圧, mmHg	80.5±10.5	73.5±10.9
総コレステロール, mg/dL	200.3±29.9	217.8±32.6
HDL コレステロール, mg/dL	56.0±14.8	66.4±15.3
LDL コレステロール, mg/dL	120.0±28.3	132.8±30.2
LDL/HDL 比	2.28±0.82	2.12±0.73
BMI, kg/m ²	23.6±2.8	22.3±3.4
血小板, ×10 ³ /mm ³	246±60	254±60
血小板凝集能 ADP, %	66.4±12.8	71.3±11.3
COLL, %	74.7±13.5	78.2±11.3
喫煙率, %	29.4	6.2
飲酒率, %	62.7	37.3

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の値は年代が変わってもあまり変化が認められなかった。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 12.9%、7.1%、女性でそれぞれ 6.4%、4.1%であった。血小板凝集能ADPおよびCOLLの高値の割合は、男性でそれぞれ 0.2%、0.2%、女性でそれぞれ 0.4%、0.3%であった(表 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	血小板数	259±62.1	251.5±62.7	240.1±64.2
	ADP, %	66.5±12.7	67.7±12.6	65.6±12.9
	COLL, %	75.7±11.1	75.7±11.2	74.0±15.0
女性	血小板数	281.1±68.6	258.2±64.0	244.7±53.3
	ADP, %	72.3±8.8	70.7±10.7	71.4±12.3
	COLL, %	78.1±7.6	78.4±9.6	78.1±13.1

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, %	12.9	87.0	0.2
	COLL, %	7.1	92.7	0.2
女性	ADP, %	6.4	93.2	0.4
	COLL, %	4.1	95.6	0.3

高値: ADP>92, COLL>94
 低値: ADP<51, COLL<59

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。さらに、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 HDL コレステロール値が低く、LDL コレステロール値が有意に高かった。

その結果、LDL/HDL コレステロール比が、血小板数の一番少ない群から多い群にかけて、それぞれ、1.91±0.04、2.07±0.04、2.22±0.04、2.24±0.04 と値が高くなっていた。(トレンド P 値<0.001)

表 4. 性別年齢調整血小板数四分位別の血圧、BMI、脂質

	Q1	Q2	Q3	Q4	トレンド p
男性	39-210	211-244	245-283	284-824	
SBP, mmHg	125.1±1.2	125.9±1.3	125.0±1.2	124.1±1.4	0.840
DBP, mmHg	80.4±0.8	81.3±0.8	80.4±0.7	79.6±0.8	0.546
BMI, kg/m ²	23.9±0.2	23.8±0.2	23.6±0.2	23.0±0.2†	0.041
TC, mg/dL	194.8±2.2	201.4±2.2	201.3±2.2	204.5±2.4†	0.029
HDL, mg/dL	54.7±1.1	56.1±1.1	57.3±1.1	56.2±1.2	0.431
LDL, mg/dL	116.4±2.1	122.0±2.2	120.5±2.1	121.6±2.3	0.260
LDL/HDL 比	2.28±0.06	2.31±0.06	2.22±0.06	2.32±0.06	0.648
女性	75-210	211-244	245-283	284-569	
SBP, mmHg	118.3±1.1	116.6±1.1	118.7±1.1	120.8±1.0	0.078
DBP, mmHg	73.3±0.7	72.4±0.7	73.4±0.7	74.9±0.6	0.093
BMI, kg/m ²	21.6±0.2	22.2±0.2	22.4±0.2	22.7±0.2	0.005
TC, mg/dL	213.7±2.2	217.2±2.1	216.6±2.1	222.9±2.0†	0.022
HDL, mg/dL	70.0±1.0	66.8±1.0	63.9±1.0†	65.3±0.9†	<0.001
LDL, mg/dL	127.1±2.0	132.4±1.9	133.0±1.9†	138.0±1.8†	0.002
LDL/HDL 比	1.91±0.04	2.07±0.04†	2.22±0.04†	2.24±0.04†	<0.001

†: p<0.05(Q1 と比較)

また、血小板凝集能 ADP では有意なものが男女ともにみられなかった(表 5)。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。さらに女性では、

表 5. 性別年齢調整最大凝集能 ADP 四分位別の血圧、BMI、脂質

	Q1	Q2	Q3	Q4	トレンド p
男性	23-62	63-71	72-77	78-93	
SBP, mmHg	127.5±1.1	123.8±1.2	124.8±1.3	123.2±1.5	0.085
DBP, mmHg	81.4±0.7	80.2±0.7	80.0±0.8	80.0±0.9	0.469
BMI, kg/m ²	23.8±0.1	23.5±0.2	23.4±0.2	23.6±0.2	0.545
TC, mg/dL	201.5±2.0	198.4±2.2	201.7±2.4	199.2±2.7	0.667
HDL, mg/dL	57.4±1.0	56.4±1.1	55.3±1.2	54.1±1.3	0.225
LDL, mg/dL	119.1±1.9	118.8±2.1	122.6±2.3	120.1±2.6	0.604
LDL/HDL 比	2.20±0.05	2.26±0.06	2.35±0.06	2.36±0.07	0.249
女性	29-62	63-71	72-77	78-96	
SBP, mmHg	120.1±1.2	117.6±1.2	118.5±1.1	118.5±0.9	0.560
DBP, mmHg	74.2±0.8	72.8±0.7	73.9±0.7	73.3±0.6	0.566
BMI, kg/m ²	22.5±0.2	22.0±0.2	22.2±0.2	22.4±0.1	0.483
TC, mg/dL	219.5±2.4	214.8±2.3	218.2±2.1	218.6±1.8	0.513
HDL, mg/dL	66.0±1.1	68.8±1.0	66.1±1.0	65.4±0.8	0.095
LDL, mg/dL	134.1±2.2	128.8±2.1	133.4±2.0	134.3±1.7	0.199
LDL/HDL 比	2.14±0.05	1.98±0.05	2.14±0.04	2.18±0.04	0.024

†:p<0.05(Q1 と比較)

表 6. 性別年齢調整最大凝集能 COLL 四分位別の血圧、BMI、脂質

	Q1	Q2	Q3	Q4	トレンド p
男性	8-73	74-78	79-82	83-95	
SBP, mmHg	126.4±1.2	124.30±1.2	126.2±1.3	123.1±1.4	0.257
DBP, mmHg	80.4±0.7	80.2±0.7	81.3±0.8	80.1±0.8	0.750
BMI, kg/m ²	23.9±0.2	23.5±0.2	23.4±0.2	23.4±0.2	0.285
TC, mg/dL	199.2±2.2	201.5±2.2	200.7±2.4	199.6±2.5	0.887
HDL, mg/dL	56.9±1.0	58.4±1.0	55.3±1.1	52.7±1.2†	0.005
LDL, mg/dL	118.3±2.1	120.3±2.0	120.4±2.3	121.5±2.4	0.789
LDL/HDL 比	2.24±0.06	2.19±0.06	2.32±0.06	2.41±0.07	0.111
女性	7-73	74-78	79-82	83-97	
SBP, mmHg	120.4±1.3	117.0±1.2	118.6±1.1	118.8±0.9	0.334
DBP, mmHg	74.3±0.8	73.0±0.7	73.9±0.7	73.2±0.6	0.590
BMI, kg/m ²	22.7±0.2	21.8±0.2	21.8±0.2	22.6±0.1	0.003
TC, mg/dL	214.0±2.5	212.4±2.3	220.1±2.1	221.6±1.8†	0.004
HDL, mg/dL	69.0±1.1	67.3±1.0	65.9±1.0†	64.9±0.8†	0.035
LDL, mg/dL	127.3±2.3	127.4±2.1	135.6±1.9†	137.2±1.6†	<0.001
LDL/HDL 比	1.94±0.05	2.01±0.05	2.15±0.04†	2.25±0.04†	<0.001

†:p<0.05(Q1 と比較)

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)で総コレステロール値、LDLコレステロール値が高値で、その結果、LDL/HDLコレステロール比は、血小板凝集能COLLの一番小さい群から大きい群にかけて、それぞれ、 1.94 ± 0.05 、 2.01 ± 0.05 、 2.15 ± 0.04 、 2.25 ± 0.04 であり、大きくなっていた(トレンド $P < 0.001$)。

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17年11月から平成19年12月までに男性661名、女性907名の一般住民が同意した。男女とも血小板数の一番多い群で総コレステロールが有意に高く、女性では血小板数の一番多い群でHDLコレステロール値が低く、LDLコレステロール値が有意に高く、LDL/HDLコレステロール比も高くなっていた。血小板凝集能では、ADPでは、血圧、脂質値との関連性は見られなかった。男女ともCOLLの一番高い群でHDLコレステロール値が有意に低く、女性では、COLLの一番高い群で総コレステロール値、LDLコレステロール値、LDL/HDLコレステロール比が高くなっていた。

血小板数が $284 \times 10^3/\text{mm}^3$ 以上の群では、男女とも総コレステロールや女性のLDLコレステロール、LDL/HDL比との正相関がみられ、動脈硬化を進展させることがわかった。また、血小板凝集能COLL83%以上の群では、男女のHDLコレステロール低値、女性のLDLコレステロールLDL/HDL

比高地と関連があり、動脈硬化を進展させることがわかった。血小板凝集能のこれらの関係は、服薬ありと回答された対象者を除いて解析しても、同様の結果が見られた。

以上のことから、血小板数、血小板凝集能が基準範囲内であっても正常高値では、動脈硬化を促進させる可能性があることが今回の断面研究からわかった。今後、他の頸部エコー検査や脈波伝搬速度などのサブクリニカル研究を行い、同様の関連がみられるかどうか検討をする必要がある。

E. 結論

血小板数、血小板凝集能が基準範囲内であっても正常高値では、動脈硬化を促進させる可能性があることが都市部一般住民を対象とした研究で示唆された。また、血小板凝集能検査ではADPと脂質値との関連はみられず、COLLのみ脂質値との関連がみられた。

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(創薬基盤推進研究事業)

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関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

血小板血栓形成は凝集反応など血小板の機能発現が不可欠であり、ことに血小板インテグリンの活性化が重要なステップになっている。本年度は発現クローニングにより同定したシグナル分子(Integrin-linked kinase: ILK)の解析を行い、本分子がインテグリン活性化に関与することを明らかにした。

A. 研究目的

血小板血栓形成は血管障害部位への血小板の粘着、伸展、および凝集反応など一連の過程により構成されている。この反応過程には血小板の接着受容体に分類されるインテグリンの働きが重要である。血小板上のインテグリンには β_3 インテグリン($\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_3$) および β_1 インテグリン($\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$)の発現が知られている。なかでも、血液流動下の血栓形成にはフォンビルブランド因子(VWF)やフィブリノーゲン(FBG)受容体である $\alpha_{IIb}\beta_3$ およびコラーゲン受容体の $\alpha_2\beta_1$ が重要な役割を担っている。欧米を中心にインテグリンの機能発現メカニズムに関する研究が進行しているが未だその全容は明らかでない。

本研究では、インテグリン活性化分子を探索するため、ゲノムワイドに変異を導入し、細胞内の障害により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樹立した。それにより cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングを行い、インテグリン活性化に必要な遺伝子の同定を目指した。

B. 研究方法

前年度は化学変異原(EMS)の暴露により非活性状態となるキメラインテグリン $\alpha_{IIb}\alpha_{6B}\beta_3$ (α_{IIb} 鎖の細胞内領域を α_{6B} の同じ領域で置換、 β_3 鎖は野生型)を発現するミュータントクローン細胞(CHO 細胞)を用いて発現クローニングを行い、インテグリン活性化に関わるシグナル分子(ILK)を同定した。本年度は以下の手順により実験を行った。発現クローニングに用いたミュータント細胞の内在性 ILK 遺伝子のシーケンスを解析した。ミュータント細胞より RNA を抽出精製し、RT-PCR により ILK を増幅した。次に、増幅した PCR 産物のダイレクトシーケンスを行

い ILK 全翻訳領域の塩基配列を解析した。また、一部の領域においては ILK のゲノム遺伝子を用いたダイレクトシーケンスを行った。ILK 蛋白発現はイムノブロットにより解析した。ILK mRNA のノックダウンは short interfering RNA (siRNA)により実施した。インテグリン活性化の解析は PAC-1 ($\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化状態を特異的に認識する抗体)を用いたフローサイトメーターで行った。

C. 研究結果

ミュータント細胞内 ILK mRNA の全翻訳領域に関してシーケンス解析を行なった結果、キナーゼドメイン内に Arg317Stop および Trp383Stop の2種類のナンセンス変異をヘテロ接合型で確認できた。変異が存在する領域の ILK ゲノム遺伝子を PCR で増幅し、ベクターにサブクローニングした後、シーケンスを解析したところ、両変異は異なる対立遺伝子上に存在しており、複合ヘテロ接合型であると判明した。ミュータント細胞内の ILK 蛋白の発現をイムノブロットで解析した結果、用いた2種類の抗 ILK 抗体は細胞内 ILK を検出しなかった。次に、EMS 暴露していない活性化状態のキメラインテグリン $\alpha_{11b}\alpha_{6B}\beta_3$ を発現する親株細胞を用いて ILK mRNA のノックダウンを行った。ILK mRNA のノックダウンは細胞内 ILK 蛋白の発現を減じるとともにインテグリン活性化状態を抑制した。

D. 考察

ILK は β_1 および β_3 インテグリンの細胞内ドメ

インに結合するセリン/スレオニンキナーゼとして同定された。これまで、有核細胞における接着斑の構成蛋白として報告されており、細胞接着伸展、増殖生存シグナルに重要な分子と考えられている。しかしながら、インテグリンの機能発現との関連は不明であり、今回、新たに ILK がインテグリンの活性化に関与していることが明らかとなった。今後、巨核球系細胞を用いた遺伝子ノックダウンあるいはノックアウトマウスの作製により血小板および生体内血栓止血系における ILK の役割を明らかにしたい。

E. 結論

ILK がインテグリンの活性化に関与することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 120(2) 181-186, 2007

2. Yin T, Takeshita S, Sakata T, Shin Y, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Kojima T, Madoiwa S, Sakata Y, Murata M, Ikeda Y, Miyata T: A large deletion of the PROSI gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 98(4) 783-789, 2007

2. 学会発表

1. Tong Yin、竹下 聡、佐藤有希子、阪田敏幸、辛 英哲、本田繁則、川崎富夫、辻 肇、小嶋哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田 満、池田康夫、宮田敏行: A large deletion of the PROS1 gene in a DVT patient with protein S deficiency. **第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月、三重市
2. 石川淳子、加藤久雄、岡田浩美、竹下 聡、本田繁則、川崎富夫、末久悦次、辻 肇、小嶋哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田 満、池田康夫、小久保喜弘、岡山 明、友池仁暢、宮田敏行: 日本人の深部静脈血栓症患者における TFPIbAsn221Ser 変異の頻度. **第 30 回日本血栓止血学会学術集会**、平成 19 年 11 月、三重市

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(創薬基盤推進研究事業)

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

血栓性血小板減少性紫斑病の新規原因遺伝子変異の同定

分担研究者 小 亀 浩 市 国立循環器病センター研究所 室長

研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)は、血漿中の異常高分子量フォンビルブランド因子(von Willebrand factor, VWF)が過剰な血小板凝集を引き起こすことで発症する。異常高分子量 VWF が血漿中に生じる主な原因は、VWF 切断酵素である ADAMTS13 の活性低下である。我々はこれまで、先天性 TTP 患者家系の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、活性低下をもたらす遺伝子変異を多数同定してきた。また、日本人一般住民における ADAMTS13 遺伝子の多型を探索し、アレル頻度 1%以上の多型を 25 個同定した。本研究では、これらのうちミスセンス多型 6 個(T339R, Q448E, P475S, P618A, S903L, G1181R)のアレル頻度を算出し、さらに血漿 ADAMTS13 との関連を明らかにした。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)は、血小板減少と細小血管障害性溶血性貧血を主徴とする重篤な全身性疾患であり、しばしば腎機能障害、動揺性精神神経症状、発熱を併発する。常染色体劣性遺伝を示す先天性(家族性、遺伝性)の症例と、孤発的に現れる後天性の症例が存在する。

正常な止血反応の一部である血小板凝集において、血漿タンパク質フォンビルブランド因子(von Willebrand factor, VWF)は重要な役割を果たす。VWF は主に血管内皮細胞で合成され、分泌直後には数十個の

VWF ポリペプチド鎖が互いに共有結合した超高分子量ホモマルチマーを形成している。VWF マルチマーの重合度が大きいほど、すなわち分子量が大きいほど、その血小板凝集活性は高い。

今から約 20 年前、TTP 患者の血漿に異常高分子量の VWF が存在することが明らかにされた。この異常高分子量 VWF は種々の臓器の細小血管で過剰な血小板凝集を起こすため、全身性の症状をもたらす。2001 年、高分子量 VWF を適度に切断して血小板凝集活性を調節する酵素 ADAMTS13 が同定された。つまり、ADAMTS13 の活性欠如が TTP の主因であることが明らかになっ

た。

我々は、奈良県立医科大学輸血部と共同で、日本における先天性 TTP 患者家系の ADAMTS13 遺伝子を解析し、原因変異を同定するとともに、それらの VWF 切断酵素活性に対する影響を調べてきた。これまで 21 家系の解析で、20 個のミスセンス変異 (I178T, R193W, G227R, H234R, H234Q, R268P, Y304C, R312C, C322G, T323R, F324L, R349C, G385E, C508Y, G525D, G550R, A606P, I673F, C908Y, R1123C)、4 個のナンセンス変異 (Q449X, Q929X, R1206X, Q1302X)、3 個のフレームシフト変異 (372insGT, 3198delCT, 3220delTACC)、3 個のスプライシング変異 (414+1G>A, 686+1G>A, 1244+2T>G) を同定した。これらのうち一部の変異については、組換えタンパク質の発現実験を行い、ADAMTS13 の分泌異常や機能損失をもたらすことを明らかにした。

さらに、日本人一般住民 346 人を対象にして ADAMTS13 遺伝子の多型を探索し、アレル頻度 1% 以上の 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) を 25 個同定した。これらのうち、エキソンに同定された 10 個はいずれもタンパク質コーディング領域に位置しており、アミノ酸残基レベルで変異を伴うミスセンス多型が 6 個 (T339R, Q448E, P475S, P618A, S903L, G1181R) 含まれていた。

本研究では、日本人一般住民における、これら 6 個のミスセンス多型の頻度を求めるため、約 10 倍の人数を対象にした遺伝子型タイピング解析を行った。

B. 研究方法

一般住民の末梢血液から調製されたゲノム DNA を鋳型にしたタックマン解析を行った。6 個のミスセンス多型 (T339R, Q448E, P475S, P618A, S903L, G1181R) を判別するために、それぞれの塩基配列 (T339R: CCCTCTCCTGCCACA[C/G]AGACCCGCTGGACCA, Q448E: CTGGAGTTCATGTCG[C/G]AACAGTGCGCCAGGA、P475S: TGGGGTGCTGCTGTA[C/T]CACACAGCCAAGGTG、S903L: CCCCTGCGGCAGGGT[C/T]GTGCTCCGTCTCCTG、G1181R: CGGCGGCTCCTGCC[C/G/A]GGCCCAGGAAACT) を基にプローブを製作した。なお、P618A においては、T339R とほぼ完全な連鎖不平衡を示すことが前年度の成果で明らかになっていることから、今回のタックマン解析から除外した。

(倫理面への配慮) 本研究の実施は、試料採取施設および国立循環器病センターの倫理委員会で承認された。遺伝子解析研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日)」を遵守して行った。

C. 研究結果

日本人一般住民 3600 人を対象に、ADAMTS13 遺伝子のミスセンス多型 5 個をタックマン解析したところ、T339R: 野生型ホモ接合体 3,397 人、ヘテロ接合体 192 人、変異型ホモ接合体 2 人、Q448E: 野生型ホモ接合体 2,325 人、ヘテロ接合体 1,148 人、変異型ホモ接合体 117 人、P475S: 野生型ホモ接合体 3,269 人、ヘテロ接合体 330 人、変異型ホモ接合体 17 人、S903L: 野生型ホモ接合体 3,254 人、ヘテロ接合体 332 人、

変異型ホモ接合体 8 人、G1181R: 野生型ホモ接合体 3,446 人、ヘテロ接合体 152 人、変異型ホモ接合体 2 人という結果が得られた。

これらの値から、それぞれのアレル頻度は、T339R: 2.7%、Q448E: 19.2%、P475S: 5.0%、S903L: 4.8%、G1181R: 2.2%と算出された。いずれも Hardy-Weinberg 分布との有意差は見られなかった。解析対象者の血漿 ADAMTS13 活性との関連を分析した結果、従来の研究成果から予想された通り、P475S 保持者は活性が低下していることが明らかになった(ヘテロ接合体で約 15%の低下)。一方、これまで活性と無関係と考えられていた Q448E では、若干の活性上昇が見られた(ヘテロ接合体で約 6%の上昇)。P475S および Q448E 以外のミスセンス多型では、ADAMTS13 活性との有意な相関は見られなかった。

D. 健康危険情報

なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Shinozaki S, Chiba T, Kokame K, Miyata T, Ai M, Kawakami A, Kaneko E, Yoshida M, Shimokado K: Site-specific effect of estradiol on gene expression in the adipose tissue of ob/ob mice. *Horm Metab Res.* 39(3) 192-196. 2007.
2. Truettner JS, Hu B, Alonso OF, Bramlett HM, Kokame K, Dietrich

WD: Subcellular stress response after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 24(4) 599-612. 2007.

3. Taketomi Y, Sunaga K, Tanaka S, Nakamura M, Arata S, Okuda T, Moon TC, Chang HW, Sugimoto Y, Kokame K, Miyata T, Murakami M, Kudo I: Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in Ndr1-deficient mice. *J Immunol.* 178(11) 7042-7053. 2007.
4. Okuda T, Kokame K, Miyata T: Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. *J Histochem Cytochem.* 56(2) 175-182. 2008.
5. Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mouse. *Curr Opin Hematol.* 14(3), 277-283. 2007.
6. Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: Inherited and de novo mutations of ADAMTS13 in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost.* 6(1) 213-215. 2008.
7. 小亀浩市: ADAMTS13 の測定. *日本血栓止血学会誌.* 18(3) 234-240. 2007.

2. 学会発表

1. Shinozaki S, Hatori K, Kokame K, Chiba T, Miyata T, Shimokado K: Deficiency of Herp, an ER stress protein, suppresses atherosclerosis in apoE deficient mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2007**, Chicago, April, 2007.
2. 石川昌利、植村正人、松山友美、松本雅則、石指宏通、加藤誠司、坂野史明、小亀浩市、辻本達寛、北澤利幸、森岡千恵、藤本正男、宮田敏行、藤村吉博、福井博: マウス急性肝不全モデルにおける ADAMTS13 活性の動態. **第 43 回日本肝臓学会総会**、平成 19 年 5 月 31~6 月 1 日、東京都
3. Shouno Y, Kuge Y, Yokota C, Kido S, Kokame K, Inoue H, Hotta M, Minematsu K, Saji H: Analysis of gene expression related to enrich environment after ischemic stroke in rats. **The 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain'07)**, Osaka, 2007.
4. 小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病と ADAMTS13. **第 8 回 Pharamaco-Hematology シンポジウム**、平成 19 年 6 月 8 日、金沢市
5. 武富芳隆、須永剛平、田中智之、中村雅典、荒田悟、奥田知彦、杉本幸彦、小亀浩市、宮田敏行、村上誠、工藤一郎: マスト細胞の成熟に伴って発現誘導される NDRG1 の解析. **第 8 回 Pharamaco-Hematology シンポジウム**、平成 19 年 6 月 8 日、金沢市
6. Kokame K, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: Activities and polymorphisms of ADAMTS13 in the Japanese general population. **XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**, Geneva, Switzerland, 2007.
7. Banno F, Kokame K, Yang J, Miyata S, Miyata T: The distal domains of ADAMTS13 are required in vivo for efficient cleavage of von Willebrand factor under prothrombotic conditions. **XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**, Geneva, Switzerland, 2007.
8. Ishikawa J, Sato Y, Takeshita S, Kokame K, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y, Miyata T: One-third of Japanese patients with deep vein thrombosis carried the genetic mutations in proteins S, C and antithrombin genes: the sub-group study of blood coagulation abnormality,

the study group of research on measures for intractable diseases in Japan. *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*, Geneva, Switzerland, 2007.

9. 篠崎昇平、羽鳥薫、小亀浩市、川上明夫、金子英司、宮田敏行、下門顕太郎：小胞体ストレスと動脈硬化：小胞体ストレス蛋白 Herp 欠損は動脈硬化進展を抑制する。第 39 回日本動脈硬化学会総会学術集会、平成 19 年 7 月 14 日、大阪市
10. 篠崎昇平、千葉剛、小亀浩市、宮田敏行、藍真澄、金子英司、吉田雅幸、下門 顕太郎：ob/ob マウス脂肪組織におけるエストラジオールの部位特異的な作用の解明。第 39 回日本動脈硬化学会総会学術集会、平成 19 年 7 月 14 日、大阪市
11. 佐藤有希子、石川淳子、木村利奈、小亀浩市、本田繁則、竹下聡、末久悦次、川崎富夫、辻肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田満、池田康夫、巽純子、宮田敏行：日本人の深部静脈血栓症における遺伝的素因。第 27 回近畿循環器疾患治療研究会、平成 19 年 8 月 25 日、大阪市
12. 佐藤有希子、石川淳子、木村利奈、小亀浩市、本田繁則、竹下聡、末久悦次、川崎富夫、辻肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田満、池田康夫、巽純子、宮田敏行：深部静脈血栓症患者における抗凝固因子の遺伝子解析。日本人類遺伝学会第 52 回大会、平成 19 年 9 月 13 日～15 日、東京都
13. 小亀浩市：血栓性血小板減少性紫斑病と ADAMTS13。第 7 回岡山循環器勉強会、平成 19 年 9 月 21 日、岡山市
14. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Effects of complete deficiency and C-terminal deletion of ADAMTS13 on hemostatic function in mice. *21st International Mammalian Genome Conference*, Kyoto, Japan, 2007.
15. 根木玲子、池田智明、石川淳子、佐藤有希子、本田繁則、小亀浩市、宮田敏行、藤田富雄：わが国の妊産婦における静脈血栓塞栓症および関連周産期疾患と遺伝的素因についての解析。第 30 回日本血栓止血学会学術集会、平成 19 年 11 月 15 日～17 日、志摩市
16. 江浦由佳、小亀浩市、宮田敏行：Herp 欠損は小胞体ストレス誘導性の ERAD 複合体形成を抑制する。第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同年会、平成 19 年 12 月 11 日～15 日、横浜市

17. 坂野史明、小亀浩市、楊進、宮田茂樹、宮田敏行: ADAMTS13 の C 末端ドメイン欠失はマウスに潜在的な血栓性リスクをもたらす. **第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同年会**、平成 19 年 12 月 11 日～15 日、横浜市

18. 辛英哲、小亀浩市、秋山正志、副島見事、宮田敏行: ADAMTS13 は Lys-plasminogen に結合する. **第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同年会**、平成 19 年 12 月 11 日～15 日、横浜市

19. 奥田智彦、辻井知美、山田佐知子、小亀浩市、宮田敏行、北徹、柳田素子: ストレス誘導タンパク質 NDRG1 は腎臓および水晶体において組織保護機能を有する. **第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同年会**、平成 19 年 12 月 11 日～15 日、横浜市

F. 知的財産権の出願・登録状況

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(創薬基盤推進研究事業)

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

In vivo 血栓モデルを用いた ADAMTS13 変異マウスの表現型解析

分担研究者 坂野史明 国立循環器病センター研究所 室員

研究要旨

ADAMTS13 はフォンビルブランド因子 (VWF) の断片化を担う血漿プロテアーゼであり、触媒ドメインを含む複数のドメインから構成されている。本酵素活性の欠乏は、血中に超高分子量 VWF マルチマーの残存を引き起こし、血栓性血小板減少性紫斑病の発症につながる。我々は ADAMTS13 研究におけるモデル動物として、ADAMTS13 の完全欠損マウス、C 末端ドメイン欠損マウスを樹立した。本年度は、生体顕微鏡を用いてこれら 2 系統の ADAMTS13 変異マウスの表現型を解析し、ADAMTS13 本体および C 末端ドメインの生理的重要性を検証した。その結果、ADAMTS13 完全欠損マウスでは活性化血管内皮細胞上への血小板の接着、血管損傷部位での血小板血栓形成がいずれも顕著に亢進していることが判明した。したがって、ADAMTS13 は生体内で血小板の接着、凝集反応を負に制御する機能を有し、その欠損は著しい易血栓傾向をもたらすことが確認された。一方、C 末端ドメイン欠損マウスでは、活性化血管内皮細胞上に血小板の過剰接着は認められなかったことから、C 末端ドメインを欠く ADAMTS13 は生体内で活性をもつことが示唆された。しかし、血管損傷部位での血栓形成は、C 末端欠損マウスでも亢進していたため、C 末端ドメインは血栓惹起状況下に VWF を効率的に捕捉、切断する上で生理的に重要と考えられる。

A. 研究目的

ADAMTS13 はフォンビルブランド因子 (VWF) の断片化を介して、過剰な血小板凝集を抑制しており、本酵素活性の欠乏は血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の発症につながる。我々は ADAMTS13 の生理機能を追究する上でのモデル動物として、

ADAMTS13 完全欠損マウスおよび C 末端ドメイン欠損マウスを樹立した。完全欠損マウスの血中には超高分子量 VWF (UL-VWF) マルチマーが蓄積しており、in vitro 血小板血栓形成能およびコラーゲン-エピネフリン溶液の静注により惹起される血小板減少の亢進が認められた。一方、C 末端ドメイン欠

損マウスの VWF マルチマー、in vitro 血栓形成能は正常であったが、コラーゲン-エピネフリン惹起血小板減少は野生型マウスに比べて顕著であった。本研究では、ADAMTS13 本体およびその C 末端ドメインの生理的意義をより明確にするため、ADAMTS13 変異マウスの in vivo 血栓形成過程を生体顕微鏡にて経時的に観察、解析した。

B. 研究方法

野生型 129/Sv マウス、129/Sv 遺伝的背景をもつ ADAMTS13 完全欠損マウス、C 末端ドメイン欠損マウスより採血し、洗浄血小板を調製後、カルセイン AM を用いて血小板を蛍光ラベルした。蛍光ラベル血小板を各マウス(野生型、C 末端ドメイン欠損、完全欠損)に静注後、トリプロモエタノール麻酔下に腹部を切開、腸間膜を露出させて、蛍光顕微鏡にて動静脈を経時観察した。活性化内皮上での VWF-血小板接着は、ヒスタミン溶液を腹腔内投与し、投与 15 分後の腸間膜静脈内皮上に紐状の血小板接着像が観察されるか否かにより評価した。また、血管障害部位での血栓形成能は、10%塩化鉄溶液に浸漬した濾紙を腸間膜動脈上に 5 分間静置することにより生じた内皮障害部位にて、直径 30 μm 以上の血栓が形成されるまでの時間(血栓初発時間)および血管が完全閉塞するまでの時間(血管閉塞時間)を測定、評価した。

(倫理面への配慮)

実験は、国立循環器病センター研究所・実験動物委員会の承認を得て実施した。また、

動物に与える苦痛を最小限にするよう配慮して進めた。

C. 研究結果

ヒスタミン投与後、ADAMTS13 完全欠損マウスの血管内皮細胞上には、血流と同方向に紐状に連なった血小板が観察されたが、野生型マウス、C 末端欠損マウスの活性化内皮細胞上には同様の接着は認められなかった。ADAMTS13 欠損では、内皮細胞上にて UL-VWF マルチマーと血小板の接着が起こったと考えられ、UL-VWF マルチマー依存性の血小板接着、凝集が TTP 発症の背景となることが示唆された。しかし、内皮細胞上の接着血小板が凝集塊へと進展することはなかったことから、TTP における血栓形成は UL-VWF マルチマーの活性のみで生じる訳ではないと考えられる。一方、C 末端ドメイン欠損マウスの活性化内皮上への血小板接着は認められなかった。このマウスでは血漿 VWF マルチマー、in vitro 血栓形成能も正常であり、C 末端欠損型 ADAMTS13 は、生体内で活性を保持すると考えられる。

ADAMTS13 完全欠損マウスにおいて、塩化鉄血管障害部位での血栓初発時間、血管閉塞時間は著明に短縮しており、本欠損マウスは強い易血栓形成傾向にあると考えられる。一方、C 末端ドメイン欠損マウスの血栓初発時間は野生型マウスと同等であったが、血管閉塞時間は有意な短縮が認められた。このマウスでは、コラーゲン-エピネフリン誘発血小板減少の亢進も見られることから、C 末端欠損型 ADAMTS13 では、生体

内でのVWF切断活性が部分的に損なわれていると考えられる。欠損したドメインはVWF中の特定配列または血小板や内皮細胞、内皮下組織中の分子との結合に関わっている可能性が考えられる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 坂野史明: ADAMTS13の欠損は血栓性血小板減少性紫斑病の十分条件か?: モデルマウスからの知見. **日本血栓止血学会誌** 18(1) 36-45. 2007.

2. Miyata T, Kokame K, Banno F, Shin Y, Akiyama M: ADAMTS13 assays and ADAMTS13 deficient mouse. **Curr Opin Hematol.** 14(3) 277-283. 2007.

3. Banno F, Miyata T: Biology of an anti-thrombotic factor ADAMTS13. **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis.** in press.

2. 学会発表

1. Banno F, Kokame K, Yang J, Miyata S, Miyata T: The Distal Carboxyl-Terminal Domains of ADAMTS13 are Required In Vivo for Efficient Cleavage of von Willebrand Factor under Prothrombotic

Conditions. **The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXI Congress**, July 6-12, 2007, Geneva, Switzerland.

2. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Effects of complete deficiency and C-terminal deletion of ADAMTS13 on hemostatic function in mice, **21st International Mammalian Genome Conference**, October 28-November 1, 2007, Kyoto.

3. Banno F, Kokame K, Yang J, Miyata S, Miyata T: Deletion of the C-terminal domains of ADAMTS13 brings a potential risk for thrombosis in mice, **第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、平成19年12月11日-15日、横浜市

F. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
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

ADAMTS13 非依存 TMA 症例における factor H 遺伝子解析

分担研究者 松本雅則 奈良県立医科大学輸血部 准教授

研究要旨

奈良医大輸血部では、ADAMTS13 活性測定を通じて全国の医療機関から 783 例の血栓性微小血管障害症(TMA)患者を集積し、これらの 1/3 の症例で ADAMTS13 活性が著減していることを明らかにした。しかし、残りの 2/3 の症例では ADAMTS13 活性が著減しておらず、病因は同定できていない。そこで、これらの患者群において、海外で TMA の病因として報告されている factor H, factor I, MCP などの補体調節因子のうち、最も頻度の高い factor H について検討を行い、家族性 TMA1 家系において同遺伝子解析を行った。

A. 研究目的

血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy, TMA)は、細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、細血管内血小板血栓を特徴とする。元来は病態を表すものであったが、神経症状優位とされる血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)と腎症状優位とされる溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome, HUS)が、臨床的に明確に鑑別できないことから、両者を包括する疾患名として使用されるようになった。2001 年に、止血因子である von Willebrand 因子(VWF)を特異的に切断する VWF 切断酵素(VWF-cleaving protease, VWF-CP) 、 別 名 ADAMTS13 (a

disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13)、が発見され、定型的 TTP では同酵素活性が著減しているが、HUS ではこのような所見は見られないことから、両者を客観的に鑑別できる指標として有用であることが判明した。

奈良医大輸血部は、1998 年から ADAMTS13 活性測定を開始し、日本国内の TMA 解析センターとしての役割を果たしてきた。2006 年 12 月末段階で集積した TMA 患者は 783 例となった。これらの中で ADAMTS13 活性が著減している症例は 261 例で全体の 33%に過ぎず、残りの 2/3 の症例は ADAMTS13 以外の機序が予想された。欧米ではこのような症例で factor H, factor I, MCP などの補体調節因子の遺伝子異常が