
2) ADAMTS13のCUBドメインをベイトとしたスクリーニングから得た候補遺伝子

(1) 既知遺伝子 (26)

Aldehyde oxidase 1
Alpha 2 type I collagen
Amyloid beta precursor protein-binding protein 2
Angiotensinogen preproprotein
Ataxin 1 (ATXN1), mRNA
ATP synthase F0 subunit 6
Beta-galactoside-binding lectin precursor
Carboxylesterase 1 isoform b
Carboxypeptidase E precursor
Chimerin (chimaerin) 1
Cut-like 2
Dipeptidyl-peptidase 6 isoform 2
Guanine nucleotide-binding protein, beta-2 subunit
H factor (complement)-like 3
Heparin cofactor II precursor
Microtubule-associated protein 1B isoform 1
Nipsnap homolog 3B
Nucleoporin 98kD isoform 1
Paraoxonase 2 isoform 1
Poly A binding protein, cytoplasmic 4
Prosaposin
Ribulose-5-phosphate-3-epimerase isoform 1
Ring finger protein 2
SCF apoptosis response protein 1 isoform 1
Secernin 2
WW domain binding protein-2

(2) 新規遺伝子 (2)

cDNA FLJ38817 fis, clone LIVER2007721
KIAA1305

表2. 結合実験に用いたADAMTS13結合蛋白質の候補

α -2-グリコプロテイン 1, Zinc

コラーゲン I 型

コラーゲン III 型

デコリン

バイグリカン

ヒスチジンリッチグリコプロテイン

フィブリノーゲン

プラスミノーゲン

ラミニン

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、インテグリン $\beta 3$ 、細胞内情報伝達タンパク質 Rab1B、トロンボキサン A2 受容体、血小板凝集シグナル伝達因子 CalDAG-GEF1、5-リポキシゲナーゼをコードする遺伝子の全エクソン領域をシーケンスし、遺伝子多型を収集した。これにより、日本人の遺伝子多型情報が収集され、血小板凝集能との関連解析が可能となった。

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、血小板凝集に関与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 48-96 人の DNA を用いて、エクソンとプロモーター領域のシーケンスを行い、遺伝子多型を収集した。DNA シーケンスは、ABI3730 シーケンサーおよび ABI3100 シーケンサーで行った。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) インテグリン β_3 遺伝子 (*ITGB3*)

インテグリン β_3 は血小板インテグリンである $\alpha_{IIb}\beta_3$ の構成サブユニットであり、血小板凝集で最も重要な役割を果たす血小板膜タンパク質である。本遺伝子のシーケンスにより、5つのミスセンス変異を同定した。ミスセンス変異 L59P は2人、R169Q と E654K はそれぞれ1人、R515Q は4人に同定された。

2) Rap1B 遺伝子

Rap1B はインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の上流、Gタンパク質共役型受容体の下流に位置する小GTPase である。アゴニスト刺激により血小板で活性化されることが知られている。本遺伝子のシーケンスにより3つの遺伝子多型を同定したが、ミスセンス変異は同定しなかった。

3) トロンボキサン A2 受容体遺伝子 (*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 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ケ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。

4) 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 β 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 γ 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。本遺伝子をシーケンスすることにより 21 個の変異を同定した。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 人に見い出されただけであり、その頻度は低かった。

5) 5-リポキシゲナーゼ遺伝子 (ALOX5)

ALOX5 はアラキドン酸の 5 位に酸素を添加する酵素であり、生理活性物質であるロイコトリエン生合成の初発酵素である。この ALOX5 の活性を促進するタンパク質として 5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質 (5-lipoxygenase activating protein, FLAP) が知られている。FLAP をコードする遺伝子 *ALOX5AP* の遺伝子多型が心筋梗塞や脳梗塞のリスクを 2 倍高めると報告された (Helgadottir et al., Nat Genet, 36, 233-239, 2004)。5-リポキシゲナーゼ経路は喘息との関連が広く知られているものの、新しく虚血性疾患との関連が指摘された。そこで、本研究では FLAP により活性が促進される ALOX5 に焦点をあてて、本遺伝子と虚血性疾患との関連を調べるため、遺伝子のシーケンスを行った。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考えられる変異は存在しなかった。

D. 考察

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

血小板凝集にかかわる候補遺伝子に、ミスセンス変異を含む遺伝子変異を収集した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akutsu K, Morisaki H, Takeshita S, Sakamoto S, Tamori Y, Yoshimuta T, Yokoyama N, Nonogi H, Ogino H, Morisaki T. Phenotypic heterogeneity of Marfan-like connective tissue disorders associated with mutations in the transforming growth factor-beta receptor genes. *Circ J.* 2007;71 (8): 1305-1309.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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	医長
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、1.7 μ g/ml コラーゲンと1.7 μ M 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 \pm 6.8歳、女性58.8 \pm 6.9歳で、血小板数の平均値は、男性で246 \pm 60 $\times 10^3$ μ l、女性で254 \pm 60 $\times 10^3$ μ l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った。(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、COLL 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

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)

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、コラーゲン惹起血小板凝集能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。

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、とりわけ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。本研究はインテグリンの活性化シグナル分子を明らかにし、その制御法の開発を目指す。方法として、化学変異原により、非活性状態になるインテグリンを発現するクローン細胞を獲得し、これを用いてインテグリン活性化を誘導する遺伝子の発現クローニングを実施した。その結果、活性化に必要なシグナル分子として Integrin-linked kinase (ILK) 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達成される。この反応過程には血小板の接着受容体の一つであるインテグリンが関与している。インテグリンは通常非活性の状態にあり、活性化のシグナル伝達により機能を発現する。血小板上のインテグリンには $\beta 3$ インテグリン ($\alpha IIb \beta 3$, $\alpha V \beta 3$) および $\beta 1$ 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) やフィブリンノーゲン (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。インテグリン機能発現シグナルの研究は欧米を中心に進行しているが未だその全容は明らかではない。

本研究では、インテグリン活性化分子の探索のため、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細胞を得た。これにより 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

はじめに、シグナル依存性に活性化されたキメラインテグリン $\alpha IIb \alpha 6B \beta 3$ (αIIb 鎖の細胞内領域を $\alpha 6B$ の同じ領域で置換、 $\beta 3$ 鎖は野生型) を恒常的に発現する CHO 細胞株を樹立した。活性化したインテグリンの選別は活性化インテグリン $\alpha IIb \beta 3$ 特異的抗体 (PAC-1) を用いたフローサイトメトリーで行なった。樹立した株化細胞に化学変異原 (EMS) を暴露させ非活

性状態となるインテグリンを発現する細胞をセルソーターにより分取し、限界希釈法によりクローン化した。次に、クローン細胞に cDNA ライブラリー(大阪大学微生物研究所 前田博士から分与)をトランスフェクションし、インテグリン活性化を誘導する遺伝子の発現クローニングを行なった。活性化に関わる遺伝子は再び活性化インテグリンを発現する細胞よりプラスミドを回収し、大腸菌に導入して増幅し、スクリーニングを繰り返すことで濃縮した。目的遺伝子の同定は濃縮したプラスミドで作成したコロニー約 1000 個をスクリーニングして行なった。EMS の同定遺伝子への影響を確認するため、発現クローニングに使用したミュータント細胞を用いて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、全翻訳領域の塩基配列を決定した。一部の領域は ILK 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。

C. 研究結果

キメラインテグリンを発現する樹立細胞株は PAC-1 に対して高親和性を示した(コントロール抗体の蛍光強度: -5、PAC-1 の蛍光強度: -250)。この細胞株に EMS 処理を加え、非活性状態のインテグリンを発現する細胞群をセルソーターで分取した。分取した細胞は限界希釈によりクローン化

し、PAC-1 に対し低親和性(蛍光強度: -10)を示す細胞を得た。得られた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遺伝子、ILK を同定した。発現クローニングに用いた細胞において ILK mRNA の全翻訳領域のシーケンス解析を行い、キナーゼドメイン内に2種類のナンセンス変異をヘテロ接合型で認められた(Arg317Stop および Trp383Stop)。次に、これらの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てシーケンスを解析した。2種類の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ことが明らかとなった。ミュータント細胞の 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 暴露前の親株細胞を用いて 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 蛋白の発現を減少させ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 $\beta 1$ および $\beta 3$ 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 の役割を明らかにする必要がある。

E. 結論

ILK がインテグリンの活性化に關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

論文発表

1. Banno F, K. Kokame, T. Okuda, Honda S, H. Kato, Y. Tomiyama, Y. Miyashita: Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 107(8): 3161-3166, 2006
2. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, H. Tsuji, S. Madoiwa, Y. Sakata, T. Kojima, M. Murata, Y. Nishigami, M. Chiku, T. Hayashi, Y. Kokubo, A. Okayama, H. Tomoike, Y. Miyata: Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 107(4): 1737-1738, 2006
3. Kimura R, Y. Kokubo, K. Miyashita, R. Otsubo, K. Nagatsuka, T. Otsuki, T. Sakata, J. Nagura, A. Okayama, K. Minematsu, H. Naritomi, Honda S, K. Sato, H. Tomoike, Miyata T: Polymorphisms in vitamin K-dependent γ -carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in general population. *Int J Hematol* 84(5): 387-397, 2006
4. H. Kato, H. Kashiwagi, M. Shiraga, S. Tadokoro, T. Kamae, H. Ujiie, Honda S, S. Miyata, Y. Ijiri, J. Yamamoto, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Kurata, I. Shimomura, Y. Tomiyama, Y. Kanakura: Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(1): 224-230, 2006
5. Kimura R, K. Miyashita, Y. Kokubo, Y. Akaiwa, R. Otsubo, K. Nagatsuka, T. Otsuki, A. Okayama, K. Minematsu, H. Naritomi, Honda S, H. Tomoike, 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: 181-186, 2007
6. Yin Tong, S. Takeshita, T. Sakata, Y.

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

学会発表

1. Banno F, K. Kokame, T. Okuda, Honda S, S. Miyata, H. Kato, Y. Tomiyama, Miyata T: ADAMTA13-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.
2. 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、村田 満、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、宇都宮市
3. 富山佳昭、加藤 恒、柏木浩和、白鹿正通、田所誠司、釜江 剛、秋山正夫、宮田茂樹、本田繁則、山本順一郎、倉田義之、船橋 徹、下村伊一郎、金倉 譲. アディポネクチンの抗血栓作用、**第 43 回日本臨床分子医学会学術集会**、平成 18 年 7 月、札幌市
4. 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 譲. インテグリン α IIb β 3 活性化における P2Y12 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、福岡市
5. 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 譲. 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、福岡市
6. 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 α IIb β 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、宇都宮市
7. 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 謙。
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、宇都宮市

8. 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、志摩市

9. 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、志摩
市

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

特定疾患の一つである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。本研究では、先天性 TTP 患者家系の遺伝子解析を行い、ADAMTS13 の機能不全をもたらすADAMTS13 遺伝子変異を多数同定した。この中には初のADAMTS13 新生変異も含まれる。一方、TTP と似た臨床症状を示す先天性溶血性尿毒症症候群の責任遺伝子であるCFHおよびMCP遺伝子に変異は検出されなかった。典型的先天性 TTPはほぼすべて、異常ADAMTS13 遺伝子のホモあるいは複合ヘテロ接合体として解釈することができる。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%以上のミスセンス多型を6個同定し、血漿ADAMTS13との関連を明らかにした。TTP患者の遺伝子解析の結果を解釈する上で有益な参考情報となる。今後、ADAMTS13の遺伝子多型と種々の疾患との関連を明らかにすることも重要であろう。

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病であり、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、従来から TTP に関する研究を積極的に推進していた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、VWF 切断酵素活性に対する変異の影響を調べてきた。これまで 7 家系の解析で、7 個のミスセンス変異 (R193W, R268P, C508Y, I673F, C908Y, R1123C)、1 個のナンセンス変異 (Q449X)、3 個のスプライシング異常 (414+1G>A, 686+1G>A, 1244+2T>G) を同定し、原著論文として報告した [Kokame et al: PNAS. 99(18) 11902-11907. 2002, Matsumoto et al: Blood. 103(4) 1305-1310. 2004.]。

本研究では、先天性 TTP 患者家系の ADAMTS13 遺伝子解析をさらに進め、原因変異の特徴を明らかにすることを目的とする。さらに、TTP 様症状の発症に関与する可能性のある補体系の CFH 遺伝子および MCP 遺伝子の解析も行い、新たな原因変異の同定をめざす。また、日本人一般住民を対象にして ADAMTS13 遺伝子の多型を探索し、その出現頻度を明らかに

する。その成果により、TTP 患者の遺伝子解析結果を正しく解釈できるようになり、さらに遺伝子多型と活性との関連や、他の疾患との関連を調べるのが可能になる。

B. 研究方法

先天性 TTP 患者の遺伝子解析を行うため、患者およびその家系構成員 (主に両親と兄弟姉妹) の末梢血液からゲノム DNA を調製し、ADAMTS13 遺伝子の全エキソン領域 (エキソンとイントロンの境界周辺を含む) を PCR 法にて増幅後、その塩基配列を決定した。また、一部の家系においては、CFH 遺伝子および MCP 遺伝子の解析も同様に行った。

一方、日本人一般住民の ADAMTS13 遺伝子多型を探索するため、一般住民の末梢血液から調製されたゲノム DNA を鋳型にして、ADAMTS13 遺伝子の塩基配列を決定した。また、同定された多型の出現頻度を求めるため、タックマン解析を行った。

(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

先天性 TTP 患者を含む 11 家系の ADAMTS13 遺伝子解析を行った結果、すでに報告した変異に加え、新たに 13 個のミスセンス変異 (I178T, G227R, H234Q,

H234R, Y304C, R312C, C322G, T323R, F324L, R349C, G385E, G525D, A606P)、3 個のナンセンス変異(Q929X, R1206X, Q1302X)、3 個のフレームシフト変異(372insGT, 3198delCT, 3220delTACC)を同定することができた。いずれも一般住民には検出されない稀有な変異で、先天性 TTP の原因と考えられた。

これらのうち 3 個のミスセンス変異(C322G, T323R, F324L)は、同一患者の同一アレルに見つかった。通常、常染色体劣性遺伝病では患者の両親が患者と同一の変異を少なくとも 1 個保有しているが、本症例においては、C322G/T323R/F324L 変異が両親ともに検出されなかったため、さらに詳細に解析した。その結果、この患者は父親由来の C908Y 変異と、母親由来のアレルに起こった新生変異 C322G/T323R/F324L の複合ヘテロ接合体であった。ADAMTS13 に新生変異を見出した、世界初の例であった。

ADAMTS13 遺伝子解析を行った 11 家系のうち、5 家系の CFH 遺伝子および 4 家系の MCP 遺伝子を解析したところ、いずれも機能異常につながるものが予想される変異は見出されなかった。

日本人一般住民 346 人の ADAMTS13 遺伝子をシーケンシング解析した結果、アレル頻度 1%以上の多型が 25 個同定された。いずれも 1 塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)であった。遺伝子領域による内訳は、プロモーター領域に 2 個、エキソンに 10 個、イントロン

に 13 個で、25 個のうち 11 個は高い連鎖不平衡を示す 4 群に分類された。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変異が 6 個含まれていた。6 個のミスセンス多型は、T339R(アレル頻度 2.9%)、Q448E(19.4%)、P475S(5.6%)、P618A(2.9%)、S903L(5.9%)、G1181R(2.0%)であった。このうち T339R と P618A は、346 人中、同じ 20 人にヘテロ接合体として見出されたため、ほぼ 100%の確率で連鎖しているミスセンス多型と考えられた。一方、頻度の低い変異として、ミスセンス変異 R59H(アレル頻度、0.1%)とナンセンス Q773X(0.1%)が見出された。いずれも、346 人中 1 人にヘテロ接合体として見出されたため、多型というより稀有な変異であると考えられた。これらが ADAMTS13 の影響を及ぼすか否か、現在のところ不明である。

さらに、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. 考察

本研究開始前の成果とあわせると、計 18 の先天性 TTP 患者家系に 30 個の原因変異を同定したことになる。ほとんどの患者は両親それぞれから異なる変異を継承した複合ヘテロ接合体であったが、ホモ接合体も 2 人存在した。同一変異が複数の家系で見られることは、それらの変異が、ある程度の頻度で少なくとも日本国内に広がっていることを示唆する。遺伝子変異により ADAMTS13 機能が低下している人がどのくらいの頻度で存在するのか、それが種々の疾患と関連するのか、今後調査すべき課題であろう。

同定された変異は ADAMTS13 分子の全体に散在しており、特にホットスポットと考えられる部位は存在しないようである。TTP 原因変異を ADAMTS13 の生合成や分泌

様式、基質認識、触媒機能などに関連づけて解析することで、ADAMTS13 に関する洞察が深くなると思われる。

計 18 家系の解析いずれの場合も ADAMTS13 機能異常の原因となると考えられる変異が同定された。つまり、先天性 TTP 患者のほとんどは異常 ADAMTS13 遺伝子のホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体として解釈することができる。これは国外の報告とも一致する。しかし、先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析は、血漿 ADAMTS13 活性が著減している症例を対象とすることがほとんどであるため、当然の結果ともいえる。今後、ADAMTS13 活性低下だけでは説明できない、あるいは ADAMTS13 活性を保持しているにもかかわらず TTP 様の症状を示す患者の遺伝子解析も必要であろう。

本研究において日本人一般住民に見出された 6 個のミスセンス多型のうち、Q448E は ADAMTS13 活性に大きな影響を与えないこと、P475S は活性を減少させることがこれまでの我々の研究で示唆されていた。今回、3600 人という大規模調査を行ったことにより、Q448E が若干の活性上昇をもたらすことが明らかになった。また、P475S が活性を低下させることが再確認できた。新たに同定された 4 個のミスセンス多型 (T339R、P618A、S903L、G1181R) は、血漿 ADAMTS13 活性と関連しないことも明らかになった。

また本研究では、一般住民 346 人中 2 人に、それぞれ R59H、Q773X という変異が見つかった。現在のところ直接的証拠