

200926035A

(別添 1)

厚生労働科学研究費補助金
循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド
治療確立に関する研究

研究代表者 河野 雄平

(国立循環器病センター)

平成 22(2010)年 3 月

(別添 1)

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド
治療確立に関する研究

研究代表者 河野 雄平

(国立循環器病センター)

平成 22(2010)年 3 月

(別添2)

目 次

I. 総括研究報告書

- 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究
..... 1
国立循環器病センター 内科高血圧腎臓部門 部長 河野雄平

II. 分担研究報告書

1. 抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究
..... 7
国立循環器病センター 内科脳血管部門 医長 長束一行
国立循環器病センター 内科脳血管部門 医師 田中智貴
2. ワルファリンの標的酵素、ビタミンKエポキシド還元酵素の立体構造に基づく
ワルファリン抵抗性に関する研究..... 9
国立循環器病センター研究所 病因部 部長 宮田敏行
国立循環器病センター研究所 病因部 室長 秋山正志
3. 抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究
.....13
国立循環器病センター 輸血管理室 医長 宮田茂樹
4. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究
.....18
大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 講師 神出 計
5. 抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究
.....21
国立循環器病センター 心臓血管内科 部長 鎌倉史郎
6. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究
.....24
国立循環器病センター 臨床研究開発部 室長 山本晴子

7. SmartAmp 法によるワルファリン関連遺伝子タイピングに関する研究	……………27
理化学研究所 上級研究員	レジャバ・アレキサンダー
理化学研究所 研究員	片山敦子
8. 抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究	……………30
国立循環器病センター 内科脳血管部門 医師	古賀政利
9. ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響に関する研究	……………33
国立病院機構九州医療センター 脳血管内科 科長	矢坂正弘
10. ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討に関する研究	……………35
国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター長	是恒之宏
11. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究	
脳梗塞急性期バイオマーカーに関する研究 ……………	38
聖マリアンナ医科大学 神経内科 教授	長谷川泰弘
聖マリアンナ医科大学 神経内科 講師	平山俊和
聖マリアンナ医科大学 神経内科 助教	高石 智
12. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究	……………42
国立循環器病センター研究所 循環分子生理部 室員	花田裕典
13. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究	……………45
国立循環器病センター研究所 病因部 室員	嘉田晃子
14. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究	……………48
大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 教授	楽木宏実
15. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究	……………51
日本大学 医学部内科学系総合内科学分野 教授	相馬正義

16. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究	……………55
国立病院機構九州医療センター 高血圧内科 医長	土橋卓也
17. 降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究	
高齢者における脳卒中後血圧高値に対する危険因子の解明 ……………57	
金沢医科大学 高齢医学 教授	森本茂人
18. 血圧異常日内変動および開眼片足立ち時間と軽度認知機能障害との関連	……………60
愛媛大学プロテオ医学研究センター抗加齢制御ゲノム部門 教授	三木哲郎
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	63
IV. 研究成果の刊行物・別刷り ……………	69

(別添3)

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
総括研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究代表者 河野雄平 国立循環器病センター内科高血圧腎臓部門 部長

研究要旨 降圧薬や抗凝固薬の効果や副作用には個人差が大きく、個人の特性に応じた薬剤の選択と使用が重要と考えられる。降圧薬に関しては、効果ならびに副作用に関する遺伝子多型を同定、応用することより、テーラーメイド診療が可能になることが期待される。本年度は、降圧薬感受性遺伝子を用いた前向き多施設臨床試験（GEANE2 研究）を計画し、研究開始のための基礎情報を集積した。先行研究の GEANE 研究の再解析により、3種の降圧薬についてそれぞれ複数の降圧効果関連 SNP が認められた。さらに、他の研究において再現性を検証している。

抗凝固薬ワルファリンに関しては、個人の体質や食習慣に応じた使用法の確立が、塞栓症および出血を予防するために重要である。本年度は、ワルファリン服用患者における投与量決定に関わる諸因子を継時的に検討することを目的とした、多施設共同前向き観察研究（Godward Multi Study）を推進した。電子データ収集システムを構築し、多数の症例登録がなされた。

研究分担者名

長束一行 国立循環器病センター 内科脳血管部門 医長
宮田敏行 国立循環器病センター研究所 病因部 部長
宮田茂樹 国立循環器病センター 輸血管理室 医長
神出 計 大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 講師
鎌倉史郎 国立循環器病センター 心臓血管内科 部長
山本晴子 国立循環器病センター 臨床研究開発部 室長
レジャバ・アレキサンダー 理化学研究所 上級研究員
古賀政利 国立循環器病センター 内科脳血管部門 医師
矢坂正弘 国立病院機構九州医療センター 脳血管内科 科長
是恒之宏 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター長
長谷川泰弘 聖マリアンナ医科大学 神経内科 教授
花田裕典 国立循環器病センター研究所 循環分子生理部 室員
嘉田晃子 国立循環器病センター研究所 病因部 室員
楽木宏実 大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 教授
相馬正義 日本大学 日本大学 医学部内科学系総合内科学分野 教授

土橋卓也 国立病院機構九州医療センター 高血圧内科 医長

森本茂人 金沢医科大学 高齢医学 教授

三木哲郎 愛媛大学 プロテオ医学研究センター 教授

A. 研究目的

高血圧治療において、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬(ARB), カルシウム拮抗薬(CCB), サイアザイド系利尿薬(TD)は広く用いられており、ガイドラインでも使用が推奨されているが、降圧薬の効果には個人差が存在する。我々はこれまで、ARB, CCB, TD の降圧効果に関連する一塩基多型(SNP)を候補遺伝子アプローチで見出し、またそれらの効果や副作用に関連するSNPをGEANE (Gene Evaluation for ANtihypertensive Effect of Drugs) 研究でゲノム網羅的に明らかにした。次の段階としてこれらの降圧薬関連SNPを実臨床現場でタイピングすることにより降圧薬を選択することの有用性の証明が必要となる。そのために全国の約20の高血圧専門施設の参加のもと前向きに降圧薬関連SNPによる降圧薬選択の有用性を証明するGEANE2研究を計画した。GEANE2によりSNP情報からの降圧薬選択の有用性が確認されれば、高血圧テーラーメイド医療の実現が可能になると考えられる。

心原性脳塞栓症の一次予防、二次予防にはワルファリンが現在のところ唯一有効性が確認された薬剤である。しかし、至適投与量に大きな個人差があり、かつ初期投与量が決定した後も効果が変動し投与量の微調整が必要で、投与量が過剰となった場合の出血などの副作用も多い。ワルファリン投与量の個人差には遺伝子

多型が大きく関与し、遺伝子多型の寄与により、大きく低用量、中用量、高用量群に層化できることが報告されている。我々の予備的研究においては、本邦での遺伝子多型とワルファリンの維持投与量の関連を検討した結果、欧米と比して中等量のワルファリン投与群が多くその中でばらつきが大きいことが分かった。さらに維持量が決まった後も効果の変動、季節変動を示す症例もあり、欧米人に比べて野菜の摂取量が多く、かつ季節によって摂取する野菜の種類が大きく変わるという日本人の食習慣を考えると、食事によるビタミンK摂取量の寄与が推測される。これまで遺伝子多型と身長体重、性別などで至適投与量の推測が行われているが、ビタミンK摂取量の因子を加えた研究はない。本研究によりさらに正確に至適投与量を推測でき、維持期の効果変動に対する影響を突き止めることができると考えられる。また、遺伝子多型検出型超高速等温増幅法を用いて短時間(15分以内に)にチップ化することによりベッドサイドで測定可能なCYP2C9ならびにVKORC1の遺伝子多型を正確に測定しうるシステムを開発する。これらを用いることで、より簡便にワルファリン投与量に影響する因子を明確にでき、それらを含んだ予測値を基に個人の至適投与量を推定する方法の開発が可能となると考えられる。

B. 研究方法

降圧薬関連研究については、本研究で施行予定の GEANE2 研究を行うために、先行研究である GEANE 研究でゲノムワイドに解析した SNP につき、降圧判定基準を変えて再解析を試みた。さらに、上記 SNP の降圧薬効果への関与の再現性を、他の研究にて ARB, CCB, TD を服用した高血圧患者より得られた降圧効果の情報から検証している。

ワルファリン関連研究は、ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (The Study on the Contribution of Genetic Factors or Dietary Vitamin K Intake to Individual Warfarin Dosage [Godward Study]) で、外来患者を対象に、VKORC1 および CYP2C9 の遺伝子多型と、食事調査票を用いてビタミン K を含む各種栄養摂取量を調べるとともに、3 ヶ月間のワルファリン投与量と PT-INR の推移等について調査した。さらに症例数を増やした前向き研究を行うために多施設共同研究の体制を構築し、研究を進めた。(ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討: 多施設共同研究 Godward-Multi Study)

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守している。

C. 研究結果

降圧治療

先行研究の GEANE 研究ではアンジオテ

ンシン II 受容体拮抗薬 (ARB), カルシウムチャンネル拮抗薬 (CCB), サイアザイド系利尿薬 (TD) に関連する SNP を 50 万 SNP 対応の DNA チップを用いゲノム網羅的遺伝子型決定を行った。本研究では GEANE 研究で得られた 50 万 SNP 遺伝子型情報と各降圧薬の降圧効果ならびに副作用情報から関連解析 (GWAS) を行い、複数の 3 種降圧薬の降圧効果関連 SNP ならびに副作用関連 SNP を明らかにする目的で解析を進めた。本年度は最もエビデンスがあり、コンセンサスの得られた方法として、「降圧薬の臨床評価法に関するガイドライン」を参考にし、全 SNP を再解析した。統計的有意水準 $p < 10^{-5}$ を示す SNP が ARB:1 個、CCB:2 個、TD:1 個存在した。 $p < 10^{-4}$ を示す SNP は ARB:23 個、CCB:32 個、TD:19 個存在した。これらの SNP は量的形質 (降圧度) を年齢、性別、BMI といった交絡因子を補正した解析にてもすべて遺伝子型間で有意な降圧度の差を認めた。また、薬物代謝関連遺伝子の SNP、ならびに既に報告のある遺伝子多型の上記 3 種降圧薬の降圧効果との関連性を明らかにするため、GEANE 研究で得られた SNP 情報を用いて解析を行った。有意水準を 1% とした場合、ARB は 3 遺伝子 4SNP、CCB は 3 遺伝子 7SNP、TZD は 2 遺伝子 2SNP が有意だった。そのうち CCB と ARB の両薬剤では 1 遺伝子 2 多型が、TZD と ARB の両薬剤では 1 遺伝子 1 多型が共通していた。さらに、GEANE 2 研究に向け上記 SNP の降圧薬効果への関与の再現性を確認する必要があるため、他の研究にて ARB, CCB, TD を服用した高血圧患者より得られた降圧効果の情報から再現性を検証中である。

抗凝固療法

本研究は、ワルファリン服用患者における投与量決定に関わる諸因子、特に遺伝子多型に加えてビタミンK摂取量を含む環境因子の影響を継続的に検討することを目的とした多施設共同前向き観察研究である。2年目となる本年度は、主として症例登録の推進と確実なデータ収集、更に観察期間が1年間の長期研究であるため、研究参加者の脱落を最小限に留めるための活動を行った。

症例登録進捗状況については、今年度は参加全施設で症例登録が行われた。症例登録状況は、11月20日現在で、284例となった。一部施設で症例登録開始時期が当初予定よりも遅れたため、症例登録期間の期限を当初予定のH21年11月末からH22年2月末に延長することとし、各施設において登録期間延長の手続きが行われた。

データ収集に関しては、データマネジメント活動を円滑かつ迅速に実施するためにはインターネット経由によるEDC (electric data capture: 電子データ収集システム)が必須であることが認識されたため、今年度はその導入を図ることとした。国立循環器病センター臨床研究センターのデータマネジメント部門と協力しつつ、自主臨床研究向けのEDCを有するCRO (contract research organization: 受託臨床試験機関)に委託してe-CRF (electric case report form: 電子症例報告書)を作成するとともに、e-CRF記載マニュアル、データマネジメントに関する手順書等を作成し、紙のCRFからe-CRFへと移行した。

D. 考察

降圧薬は大変処方数の多い薬剤であり、本研究によりSNPから、ARB, CCB, TDといった主要降圧薬の選択するテーラーメイド医療に応用できる基礎情報が集積してきた。今後はこれまでに集積した降圧薬感受性遺伝子素因の妥当性、再現性をGEANE2研究に用いて確認、証明することが必要である。GEANE2研究の結果、SNPによる降圧薬の選択が可能になれば、ゲノム情報を用いた高血圧テーラーメイド診療を実臨床の現場で開始することが可能になるであろう。また、副作用の軽減により服薬継続率の向上にも寄与すると考えられる。

ワルファリンの効果に関しては、遺伝子多型のみでワルファリンの投与量が規定できるわけではなく、残る45%は未だ説明のつかない部分として残されている。その主因として、食事の影響(ビタミンK摂取量)が示唆されるが、それを詳細に検討した報告は少ない。今回、季節変動や、食事調査票を用いたビタミンK摂取量の推定、その季節変動、ビタミンK血中濃度の測定による、詳細な検討は、遺伝子多型情報を合わせて、ワルファリンの至適投与量の推定に重要な情報をもたらすものと期待できる。今後さらに、患者登録を進め、詳細な検討を行うことにより、患者個人に最適なワルファリン投与量を事前に推測し、より有効な抗凝固効果を示し、出血の副作用の最小化を可能とするワルファリン療法のテーラーメイド医療の確立を目指したい。

E. 結論

降圧療法については、SNP より主要降圧薬を選択できる方法を模索した。本年度の解析によって得られた3種降圧薬の感受性遺伝子多型の妥当性、再現性を確認するためにGEANE2研究を施行する予定である。これにより、これらの遺伝子多型の降圧薬への効果が確認できれば高血圧テーラーメイド医療の確立の実現が可能になると考えられる。

抗凝固療法に関しては、CYP2C9、VKORC1の遺伝子多型、食事調査票によるビタミンK摂取量や、患者背景情報などがワルファリン必要投与量に与える影響について詳細に検討を行っている。これらの研究結果の解析により、患者個人に最適なワルファリン投与量を事前に推測し、より有効な抗凝固効果を示し、出血の副作用の最小化を可能とするワルファリン療法のテーラーメイド医療の確立が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miwa Y, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Horio T, Tanaka C, Banno M, Miyata T, Kawano Y. Association of PLA2G7 polymorphisms with carotid atherosclerosis in hypertensive Japanese. *Hypertens Res* 2009;32:1112-1118.
- 2) Horio T, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Miwa Y, Matayoshi T, Yoshihara F, Nakamura S, Tokudome T, Miyata T, Kawano Y. Association of insulin-like growth factor-1 receptor gene polymorphisms with left ventricular mass and geometry in essential hypertension. *J Hum Hypertens* (in press)
- 3) Kamide K, Yang J, Matayoshi T, Takiuchi S, Horio T, Yoshii Y, Miwa Y, Yasuda H, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Miyata T, Kawano Y. Genetic polymorphisms of L-type calcium channel $\alpha 1C$ and $\alpha 1D$ subunit genes are associated with sensitivity to the antihypertensive effects of L-type dihydropyridine calcium-channel blockers. *Circ J* 2009;76:732-740.
- 4) Kokubo Y, Nakamura S, Okamura T, Yoshimasa Y, Makino H, Watanabe M, Higashiyama A, Kamide K, Kawanishi K, Okayama A, Kawano Y. Relationship between blood pressure category and the incidence of stroke and myocardial infarction in an urban Japanese population with and without chronic kidney disease. *Stroke* 2009;40:2674-2679.
- 5) Tanaka H, Munakata M, Kawano Y, Ohishi M, Shoji T, Sugawara J, Tomiyama H, Yamashina A, Yasuda H, Sawayama T, Ozawa T: Comparison between carotid-Femoral and brachial-ankle pulse wave velocity as measures of arterial stiffness. *J Hypertens* 2009;27:2022-2027.

- 6) 河野雄平: 各種降圧薬の中心動脈圧の低下効果. 血圧 2009:16: 777-781. 2009年10月、大津.
- 7) 富田誠, 藤田利治, 神出 計, 花田裕典, 宮田敏行, 河野雄平: 大規模なゲノムデータにおける関連解析の手法とソフトウェア
計算機統計学 (in press)
- 8) 神出 計, 宮田敏行, 花田裕典, 河野雄平: 高血圧テーラーメイド医療の展望 血圧 2009:16:691-694.
- 9) 神出 計, 宮田敏行, 河野雄平, 友池仁暢: 高血圧テーラーメイド治療を目指した薬理遺伝学的アプローチ 循環器専門医 17:62-67, 2009.
2. 学会発表
- 1) Yasuda H, Kamide K, Iwashima Y, Horio T, Nishida H, Yoshihara F, Nakamura S, Kawano Y. The usefulness of estimated carotid systolic blood pressure using Form PWV/ABI in blood pressure lowering therapy. The Pulse of Asia 2009, Daegu, Korea, 2009 (April).
- 2) 松本幸子、神出計、宮田敏行、花田裕典、友池仁暢、河野雄平、GEANE 研究グループ: 降圧薬感受性遺伝子多型同定のための前向き多施設臨床試験 (GEANE 研究). 第 32 回日本高血圧学会総会. 2009 年 10 月、大津.
- 3) 河野雄平、堀尾武史, 神出計, 岩嶋義雄, 吉原史樹, 中村敏子: 高血圧患者におけるロサルタンまたはアムロジピンによる家庭血圧の厳格あるいは緩和な降圧が尿アルブミンと腎機能に及ぼす長期効果: HOSP サブスタディ 5 年間の結果. 第 32 回日本高血圧学会総会.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(別添4)

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 長束一行 国立循環器病センター内科脳血管部門 医長
研究協力者 田中智貴 国立循環器病センター内科脳血管部門 医師

研究要旨：先行研究で得られたワルファリンの投与量と遺伝子多型、ビタミンK摂取量に関する解析を行いながら、ビタミンK摂取量における季節の影響についての研究を進めている。先行研究では183名の症例においてCYP2C9とVKORC1の遺伝子多型、背景因子、食事調査が終了し、データ固定が行われた。その後臨床データと遺伝子情報の突合を行い、データ解析を行っている。多施設共同研究に関しては、4施設ともに倫理委員会の承諾を得て、2010年2月10日の時点で310例が登録され、食事調査票も順調に回収されている。

A. 研究目的

ワルファリンは至適投与量に大きな個人差があり遺伝子多型との関連が確認されている。しかしそれ以外に、食事（ビタミンK摂取量）との関連等の関与が推測される。本研究では遺伝子多型やビタミンK摂取量などワルファリン投与量に影響する因子を明確にするとともに、それらを含んだ予測値を基に個人の至適投与量を推定する方法を開発し、ワルファリン治療による有害事象の減少を目的とする。

B. 研究方法

血栓症の予防目的でワルファリンを服用している外来通院患者を対象に、ワルファリンの作用に大きな影響を与えるCYP2C9とVKORC1の遺伝子多型の決定と四季のビタミンK摂取量の変動を食事調査票で調査する。それぞれの季節の調査

期間は1ヶ月で、最初の季節は同時にビタミンKの血中濃度を測定する。背景因子としてはこれまで関連が認められている、身長、体重、性別、肝機能、腎機能、併用薬の調査を行う。

（倫理面への配慮）

（1）医学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

説明を十分に行い、同意を得た患者のみを対象とする。また、匿名化を行うので遺伝情報が外部に漏れない。個人を特定できる情報は連結可能匿名化を用いて管理する。

（2）医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

対象となる患者は、すでにワルファリンを服用しているので、本研究への参加により治療方針が変わることはない。食事調査に御参加いただくことで、普段の食事内容の分析結果を提供することが可

能であり利益となる可能性がある。前向き介入試験についてはワルファリン服用が必要な症例が対象であるので、治療方針は変わらない。入院期間の短縮につながれば利益となる。初期投与量が高容量となる場合には、慎重に止血検査を繰り返し、過剰投与にならないように注意を払う。

C. 研究成果

国立循環器病センターでは2008年10月25日、九州医療センターでは2008年11月26日、大阪医療センターでは2008年12月26日、聖マリアンナ医大では2009年1月にそれぞれの施設の倫理委員会で承認が得られた。2010年2月19日の時点で、国立循環器病センター181例、大阪医療センター50例、九州医療センター30例、聖マリアンナ医科大学65例と合計326例が登録され、国立循環器病センターでは67例がすでに1年間のスケジュールが終了している。これまで中止例28例、中断例が4例発生しているが、一年間脱落例が出ないようにCRCが支援を行っている。WEB登録も順調に進み、登録例の大半の症例がすでにWEB登録開始されている。

D. 考察

多施設前向き研究の症例登録は順調に症例数が増え、WEB登録により随時データクリーニングが行われている。国立循環器病センターでは先行研究からの移行例は脱落が少なく、すでに約3分の1に症例が1年間の調査を終了している。登録締め切りが2010年2月末であるが冬のスタートとなるので、2011年11

月には全例調査が終了し、結果の解析が可能となる。これまでWEB登録で逐次データチェックを行っており、欠損データも少ないため調査終了後短期間で解析が可能と考えている。

E. 結論

研究実施計画は計画通りに進行し、来年度中に解析が可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawase K, Okazaki S, Toyoda K, Toratani N, Yoshimura S, Kawano H, Nagatsuka K, Matsuo H, Naritomi H, Minematsu K. Sex difference in the prevalence of deep-vein thrombosis in Japanese patients with acute intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* 2009;27:313-319.
- 2) Yoshimura S, Koga M, Toyoda K, Mukai T, B.-H. Hyun, Naganuma M, Nagatsuka K, Minematsu K. Frontal bone window improves the ability of transcranial color-coded sonography to visualize the anterior cerebral artery of Asian patients with stroke. *Am J Neuroradiol* 2009;30:1268-1269.

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

ワルファリンの標的酵素、ビタミンKエポキシド還元酵素の立体構造に基づく
ワルファリン抵抗性に関する研究

研究分担者 宮田敏行 国立循環器病センター研究所病因部 部長
研究協力者 秋山正志 国立循環器病センター研究所病因部 室長

研究要旨：ビタミンKは血液凝固因子の生合成に必須である。食物から摂取されたビタミンKは凝固因子の生合成過程で使用されエポキシド型となる。このビタミンKエポキシドをヒドロキシキノロン型のビタミンKへと還元する酵素が、ビタミンKエポキシド還元酵素（VKOR）である。ワルファリンはVKORの作用を阻害することによりビタミンKの還元型への変換を阻害し、凝固因子の生合成の抑制を通して抗凝固機能を発揮する。ヒトの先天性出血性疾患であるビタミンK依存性凝固因子欠損症2型（VKCFD2）は、VKORの先天性欠損症である。また、ヒトおよび齧歯類に見られるワルファリン抵抗性は、ワルファリンによる凝固因子量の低下作用が弱く、VKORに遺伝子変異が認められる。ごく最近、バクテリアVKORホモログの立体構造が報告された。そこで、この立体構造にVKORのミスセンス変異をマップし、VKCFD2とワルファリン抵抗性に関して立体構造から考察を試みた。

A. 研究目的

先天性疾患であるVKCFD2とワルファリン抵抗性は、VKOR遺伝子に変異が同定されている。2010年1月にバクテリアVKORホモログの立体構造が決定された(1)。VKCFD2とワルファリン抵抗性を示す患者および齧歯類に同定されているミスセンス変異をバクテリアVKORの立体構造にマップし、変異によって生じる影響を考察した。

B. 研究方法

VKCFD2およびワルファリン抵抗性を示すミスセンス変異は文献より収集した(2, 3)。バクテリアVKORホモログの立体

構造の座標、3KP9はProtein Data Bank (<http://www.pdb.org/>)から引き出し、立体構造表示ソフトPyMOL (DeLano Scientific LLC)でグラフィック表示した。(倫理面への配慮)

本研究はVKORタンパク質の立体構造に基づく研究なので倫理面の問題がない。

C. 研究結果

立体構造が決定されたSynechococcus sp.のVKORは、N末端側にVKOR様ドメインがあり、C末端側にチオレドキシシン様ドメインが位置している(1)。ヒトVKORはチオレドキシシン様ドメインを持たない。VKOR様ドメインはヒトなどのVKORとア

ミノ酸配列上相同性を示し、特に電子の伝達に必要とされる4つのCys残基は完全に保存されている。本VKORドメインは4本の α ヘリックス(図、TM1~TM4)から成る膜貫通領域をもち、この領域にユビキノロンが結合していた(ユビキノロンは図中に黄色で示した)。ビタミンKおよびそのアンタゴニストであるワルファリンは、ユビキノロンが結合するポケットに結合すると予想された。バクテリアVKORの立体構造から、本酵素は新生タンパク質のSH基がSS結合を形成する際に生じる電子をキノロンに渡す酵素であると理解される。この電子の伝達は、新生タンパク質のSH基から、本酵素のチオレドキシシン様ドメイン内のCXXC配列、VKOR様ドメインのループ1/2上の2つのCys残基、VKOR様ドメインの膜貫通領域内のCXXC配列を介して、最終的にユビキノロンへ渡される。電子伝達に関わるこれら6つのCys残基は図中に赤字で示した。ワルファリン抵抗性は、INRのコントロールに多量のワルファリンを必要とする患者に見られる。ワルファリン類はラット・マウスの齧歯類の殺鼠剤として用いられるが、齧歯類のなかには、ワルファリン類で死なないラットなどが報告されており、齧歯類でワルファリン抵抗性が知られている。ワルファリン抵抗性を示すヒトおよび齧歯類の遺伝子解析が行われ、VKOR遺伝子に責任変異が同定されている(2,3)。それらの変異のうち、バクテリアVKORに相当する残基が存在するものを表にまとめた。ヒト・マウスVKORの8つの残基に変異が生じるとワルファリン抵抗性を獲得する。これらの残基をバクテリアVKORの立体構

造にマップした(図中の青字の残基)。ワルファリン抵抗性を示すアミノ酸変異は電子伝達に関与する6つのCys残基(赤字の残基)やユビキノロン(黄色)の近傍に位置する。

VKORの先天性欠損症は出血性疾患のCKCFD2となる。CKCFD2はVKOR遺伝子変異によりVKORタンパク質が欠損することによりビタミンKエポキシドが還元型ビタミンへ変換されず、凝固因子の生合成が障害を受け出血を示すものと考えられる。これまでにヒトVKOR遺伝子にR98W変異が報告されており、この残基に相当するバクテリアVKORのP90を図中に緑色で示した。

私達は以前、VKOR遺伝子の多型を調べるためタンパク質をコードする領域をシーケンスしたところ、H68R変異を同定した(4)。この変異は地域一般住民3,285人中24人にヘテロ接合体として存在した(137人に1人、アレル頻度、0.00365)。本変異はTM1とTM2をつなぐループ(図中には1/2 segmentと表示)内にあるが、バクテリアVKORにはH68に相当する残基がないので図には示していない。本変異がVKORの機能にどのような影響を与えるかは今のところ不明であり、今後の研究が待たれる。

D. 考察

バクテリアVKORの立体構造が2010年1月号に発表され、その座標を用いてヒトおよび齧歯類でワルファリン抵抗性として報告されているミスセンス変異の位置を図示した。日本人の約140人に1人の割合に見られるH68R変異は、活性残基が

集まる内腔側のループに位置すると考えられ、機能解析の重要性が示唆された。

E. 結論

バクテリア VKOR の立体構造をもとに、ヒト VKOR のアミノ酸変異をマップした。ワルファリン抵抗性を示すアミノ酸変異の頻度は極めて低いが、私達は日本人にアレル頻度 0.00365 で H68R 変異を同定しており、本変異は活性に重要な残基が集まる内腔のループに位置することが明らかとなった。

参考文献

1. Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, Rapoport TA. Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2010; 463: 507-12.
2. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427: 537-41.
3. Rost S, Pelz HJ, Menzel S, MacNicol AD, Leon V, Song KJ, Jakel T, Oldenburg J, Muller CR. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice---a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet* 2009;

10: 4.

4. 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 the general population. *Int J Hematol* 2006; 84: 387-97.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
宮田敏行「血栓症の遺伝的素因と抗血栓薬の効き目にかかわる遺伝子」*Animus* 2009 夏、30-33 頁 (2009)
2. 学会発表
宮田敏行、「遺伝子情報を用いる血栓症の個別化医療」第 12 回日本栓子検出と治療学会 教育講演 2、2009 年 10 月 10 日、大阪市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

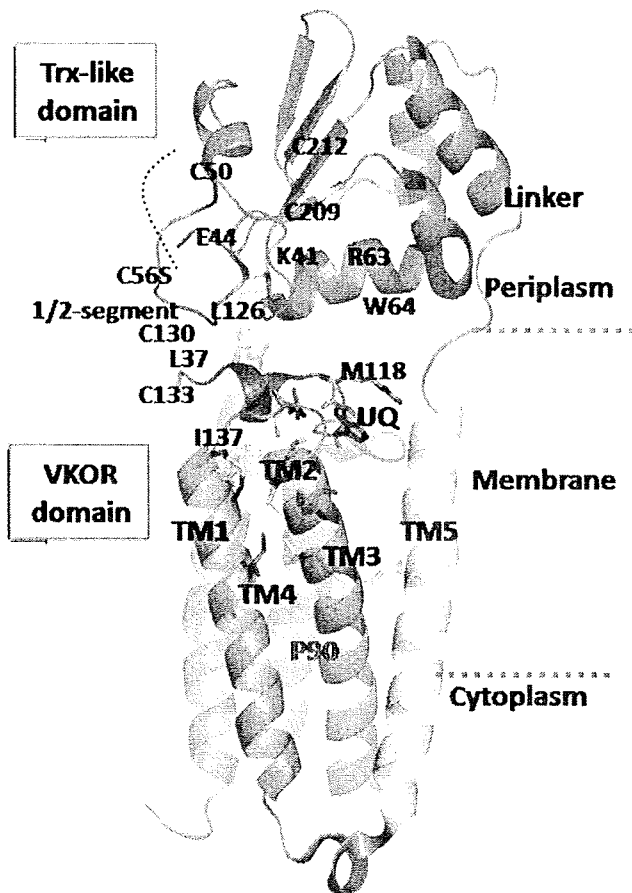


表. ワルファリン抵抗性および VKCFD2に見いだされている変異

<i>Synechococcus</i>	ヒトと齧歯類で同定された変異
	(ワルファリン抵抗性)
L37	V29L
K41	R33P
E44	D36Y
R63	R58G
W64	W59R
M118	L120Q
L126	L128R/Q/S
I137	Y139F/C/S
	(VKCFD2)
P90	R98W

図の説明

Synechococcus sp. の VKOR の立体構造。Protein Data Bank に納められた accession code 3KP9 から作成した。N 末端側の VKOR ドメインは 4 本の膜貫通 α ヘリックスから成る (マゼンタで表示)。ユビキノン (UQ、黄色で表示) はこのヘリックスにはさまれている。TM1 と TM2 をつなぐグループ (1/2 segment) には、ユビキノンの入口に蓋をする様に α ヘリックスが 1 つ存在する。C 末端側にはチオレドキシシン (Trx) 様ドメインが存在する。新生タンパク質からユビキノンへの電子の伝達にかかわる 6 つの Cys 残基は赤で示した。電子伝達に必要な残基は全て内腔側に存在した。ワルファリン抵抗性を示す変異は青で示した。VKCFD2 を示す変異は緑で示した。

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 宮田茂樹 国立循環器病センター輸血管理室 医長

研究要旨：ワルファリン必要投与量の個人差に対して、ワルファリンの主な代謝酵素であるCYP2C9ならびに標的分子であるVKORC1の遺伝子多型の関与を検討した報告が増加している。最近の報告では、これらの遺伝子多型、年齢、性別、体表面積、体重等の要因でワルファリンの1日投与量の個人差の約55%が説明可能とされるものの、残る45%は説明つかないとされる。

本研究では、CYP2C9ならびにVKORC1の遺伝子多型、食事調査票によるビタミンKを主とした栄養摂取状況などがワルファリンの投与量に与える影響について前向き横断研究を実施した。さらに、今年度は、その季節変動等の検討を加えた多施設共同研究を開始した。

前向き横断研究では、176名について解析を行なっている。CYP2C9, VKORC1の遺伝子多型を検討した結果、CYP2C9*1/*1を保有しかつVKORC1ホモ変異型を保有する遺伝子型を持つ患者は、約80%存在することが判明し、過去の日本人における検討とほぼ同様の結果であった。ワルファリン維持投与量の平均(±SD)は 3.3 ± 1.2 mg/dayであった。年齢、性別、体表面積(BSA), リスク因子(高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙、飲酒、血栓塞栓症の既往、併用薬)等の背景情報や、肝腎機能検査データ、ビタミンK摂取量、遺伝子多型がワルファリン維持投与量にどの様に影響を与えているか、現在、多変量解析等にて詳細な解析を実施している。

さらに、現在、季節変動等の検討を加えた多施設共同前向き研究を実施中であり、今後、これらの解析をさらに進め、患者個人に最適なワルファリン投与量を事前に推測し、より有効な抗凝固効果を示し、出血の副作用の最小化を可能とするワルファリン療法の個別化医療の確立を目指す。

A. 研究目的

抗凝固療法は、血栓塞栓症患者の予後改善に対し重要な治療であるが、血栓塞栓症の予防効果と、主に出血という副作用のリスクとのバランスの上に成立している。したがって、予防効果を最大限に発揮し、出血というリスクをいかに低減

するかが、抗凝固療法確立のための重要な鍵となる。そのため、広く一般的に用いられている経口抗凝固薬であるワルファリンでは、その止血効果をPT-INR (Prothrombin Time-International Normalized Ratio: プロトロンビン時間-国際標準化比) を用いて評価し、投与