

201021013A

(別添 1)

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患・糖尿病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

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河野 雄平

(国立循環器病研究センター)

平成 23 (2011) 年 3 月

(別添 1)

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患・糖尿病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

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河野 雄平

(国立循環器病研究センター)

平成 23 (2011) 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
国立循環器病研究センター 生活習慣病部門 高血圧腎臓科 部長 河野雄平

II. 分担研究報告書

1. 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・・・ 7
国立循環器病研究センター 脳神経内科 部長 長束一行
国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 部長 山本晴子
国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 室員 嘉田晃子
2. 細菌由来ビタミンKエポキシド還元酵素 VKOR 様遺伝子ワルファリンによる殺菌に関して・・・ 10
国立循環器病研究センター研究所 分子病態部 部長 宮田敏行
国立循環器病研究センター研究所 分子病態部 博士研究員 喜多俊行
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・・・・・・・ 16
国立循環器病研究センター 臨床検査科・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・・・ 20
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・・・・・・・ 23
国立循環器病研究センター 心臓血管内科 部長 鎌倉史郎
6. 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・・・・・・・ 26
理化学研究所 ユニット・リーダー レジャバ・アレキサンダー
7. 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・・・・・・・ 29
国立循環器病研究センター 脳血管内科 医長 古賀政利
8. 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・・・・・・・ 31
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

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の検討に関する研究	33	
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	
10. 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.....	36	
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
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.....	38	
国立循環器病研究センター 研究開発基盤センター		花田裕典
バイオバンクデータセンター 研究員		
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.....	41	
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
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.....	44	
日本大学 医学部内科学系総合内科学分野	教授	相馬正義
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.....	47	
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
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.....	49	
長期療養型施設入所高齢者における抗ヒトメタニューモウイルス抗体		
保有率と高血圧の関連に関する研究		
金沢医科大学 高齢医学	教授	森本茂人
16. サルコペニア (sarcopenia) と転倒、骨折に関する研究.....	53	
愛媛大学プロテオ医学研究センター	教授	三木哲郎
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	59	
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	67	

(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・糖尿病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 国立循環器病研究センター 生活習慣病部門 部長

研究要旨：降圧薬の効果ならびに副作用に関与する遺伝子多型を同定し、臨床の現場に導入することより遺伝子情報に基づく高血圧テーラーメイド診療が可能になる。これを実現するために、正確な降圧薬感受性遺伝子の情報が不可欠である。最終年度にはこれまでに行った前向き多施設臨床試験（GEANE 研究）によって得られた降圧薬感受性遺伝子多型の情報の再現をやはり降圧薬を用いて治療効果をみた別の臨床試験において遺伝子解析を行った研究と結果の照合を行い、遺伝子多型を絞り込んだ。本成果は高血圧テーラーメイド診療実現に向けて重要な基礎情報となる。抗凝固薬ワルファリンの患者個人の体質や食習慣に応じたテーラーメイドな使用法の確立も、時に致死出血性合併を引き起こすことを予防するために必要である。本研究では遺伝子情報や患者の食習慣の是正により、患者個人の至適ワルファリン投与量を決める方法を確立することを目指した多施設共同研究を進め、臨床的に有用な知見を得た。

研究分担者名

長束一行 国立循環器病研究センター 脳神経内科 部長
宮田敏行 国立循環器病研究センター研究所 分子病態部 部長
宮田茂樹 国立循環器病研究センター 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 国立循環器病研究センター 心臓血管内科 部長
山本晴子 国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 部長
レジャバ・アレキサンダー 理化学研究所 ユニットリーダー
古賀政利 国立循環器病研究センター 脳血管内科 医長
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 国立循環器病研究センター 研究開発基盤センター 研究員
嘉田晃子 国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 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 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. 研究目的と方法

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ため、実臨床の現場ではしばしばその選択に苦慮する。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研究(厚生労働科学研究H17-19年度:H17ファーマコー003)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の再現性を確認する必要がある。最終的には臨床の現場でこれらの遺伝子多型を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できれば、直ちに世界中で未だに行われていない高血圧テーラーメイド医療を実現することが可能になる。

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。最近ワルファリン投与量の個人差に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、本邦での遺伝子多型とワルファリンの維持投与量と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ている。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く、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。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し、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。

(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、すでに降圧薬やワルファリンを服用しているため、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。

B. 研究結果

先行研究の GEANE 研究では ARB, CCB, 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。昨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 が交絡因子補正後も 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 SNPs 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。これらの薬剤感受性 SNP の再現性を確認するために、投薬法などは異なるが同じ affymetrix の 50 万 SNP DNA チップを用いて薬剤の降圧効果関連遺伝子を検討した HOMED-BP-GENE 研究のデータを共同研究とすることで入手し、初期に ARB, CCB による単剤治療が行われた対象者でのデータを用い再現性の確認作業を行った。その結果、ARB の効果に両試験で有意 ($p < 0.05$) に関連した SNP は genotype:739, allelic:590, dominant:494, recessive:207 存在し、最少 p 値は 8.26×10^{-5} を示した。同様に CCB の感受性 SNP は、genotype:716, allelic:550, dominant:501, recessive:184 で、最少 p 値は 6.7×10^{-5} を示した。これらは両薬剤の感受性遺伝子多型としてテーラーメイド診療に応用できる可能性がある。

また、GEANE では我が国で最も使用頻度の高い 3 種の降圧薬 (ARB, CCB, TD) を用いている。これらの薬剤には個人により降圧効果に差があることが知られており、それが遺伝素因に基づくであろうとの仮説が GEANE 研究では根底にあるが客観的な解析はなされていなかった。本年度、あらためて GEANE 研究で得られた 3 剤による降圧効果のデータを用いて観察期と投薬後の血圧の比較を行うと、収縮期血圧では、CCB の傾きは 0.70、TD と ARB では 1.1 と推定された。これは、CCB では観察期血圧が高いほど降圧量が大きくなるが、TD と ARB ではほぼ一定であることを

示している。つまり CCB は投薬前血圧が高いほど効果が大きく、ARB と TD では観察期の血圧値に関わらず同程度に血圧を下げる傾向にあることを示唆している。これらの結果から、3 種類の降圧薬の降圧量の平均値はほぼ同等ではあるが、観察期血圧の依存性には差があることが明らかになった。このような降圧薬による降圧効果の性質は、クロスオーバー試験ならではの知見であり、また、降圧効果と SNP との関連性の解析には、観察期および投薬前血圧を考慮して行う必要があることが明らかになった。

ワルファリン研究においては 4 施設(国立循環器病研究センター、大阪医療センター、九州医療センター、聖マリアンナ医科大学)にて、2010 年 2 月の登録期限までに 328 例が登録された。うち、71 例が観察期間中に中止された。主な中止理由は、同意撤回(56 例)、追跡不能(4 例)、有害事象の発現または死亡(5 例)であった。また、2011 年 2 月末現在で調査中の症例が 3 例あった。回収できた症例データを予備的に解析した。男性が 236 例(73%)、年齢は 25 歳から 92 歳までで中央値が 72 歳、84%がワルファリン服薬を開始して 1 年以上経過していた。また、ワルファリンの服薬理由として、心房細動が 79%、血栓塞栓症が 77% (複数回答可)であった。症例全体では、PT-INR やワルファリン服薬量の季節変動は大きくないようであった。一方、ビタミン K 摂取量(食事アンケートによる)は、夏に少なく、冬に多い傾向がみられた。ビタミン K1 血中濃度が高いほど PT-INR は低い傾向にあった。しかし、ビタミン K の

血中濃度と摂取量の関連があまり強くないことから、食事アンケートによる調査結果の精度については、今後注意深い検討が必要と思われた。また、単施設でのパイロット研究と同様、ワルファリン投与量と eGFR (推算糸球体濾過量)、年齢、体表面積は関連があると思われ、ワルファリンの効果に腎機能が影響している可能性が高い。さらに、全ての症例における VKORC1、CYP2C9 の遺伝子多型の検討が終了した。日本人の約 78%は同一の遺伝子型(VKORC1 A/A と CYP2C9*1/*1)を保有しており、日本人のワルファリン至適投与量の個人差は比較的少ないと推定される。しかし、頻度は低い(約 1.5%)ながらも、大量のワルファリンを必要とすると考えられる症例(VKORC1 G/G と CYP2C9*1/*1を持つ)も存在する。反対に、VKORC1 A/A と CYP2C9*1/*3の保有者(約 3.8%)は、少ないワルファリン量で維持できると考えられる。このような患者では、過剰投与により出血が起こらないような注意が必要であると思われる。今後、遺伝子多型や他の環境要因、ビタミン K 摂取量が極端に多いまたは少ない症例での検討等、ワルファリン至適投与量に関する因子について、さらに詳細な検討を実施していく。

C. 考察

GEANE 研究と現在も進行中の解析で 3 種降圧の降圧効果に関連性を認めた SNP の再現性が確認できれば、これらの SNP を用いて降圧薬を選択することによるテーラーメイド高血圧診療ができる可能性がある。これらの SNP を調べることは患

者にとって生涯変わることはない有用な情報が提供できることになり、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。このことにより個々の患者の薬剤感受性に合った有効性の高い治療薬の選択を必ずしも専門医からでなくとも享受できると考えられる。また副作用の軽減による服薬継続率の向上にも寄与すると考えられ、これらの総和として期待される国民の血圧レベルの低下は、国民の保健・医療・福祉の向上に大きく貢献できると思われる。

ワルファリンの効果については今回の比較的大規模な検討においても、遺伝子多型の頻度は、従来本邦において報告されている頻度と大きな相違がないことが確認された。終了した症例のみで行った予備的な解析では、ビタミンK摂取量の季節変動がみられること、ワルファリン至適投与量とeGFRに関連が見られること、ビタミンK1血中濃度が高いほどPT-INRは低い傾向にあるなど、いくつか興味深い結果が得られた。今後、全てのデータ固定後、遺伝子多型の関与やそれ以外の因子のワルファリン至適投与量に与える影響についてさらに解析を進める。これらの結果は、本邦におけるワルファリンのテーラーメイド医療実施における重要なデータとなると考えられる。

D. 結論

降圧薬、ワルファリンともに将来のゲノム情報や患者の有する特性を反映したテーラーメイド診療実現のための基礎情報が得られた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawano Y, Horio T, Kamide K, Iwashima Y, Yoshihara F, Nakamura S. Blood pressure and medication during long-term antihypertensive therapy based on morning home SBP in hypertensive patients: Hypertension Control Based on Home Systolic Pressure (HOSP) substudy. Clin Exp Hypertens 32:239-243, 2010.

2) Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Horio T, Hanada H, Ohishi M, Katsuya T, Okamura T, Miyata T, Kawano Y, Rakugi H. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension. Geriatr Gerontol Int 10:311-318, 2010.

3) 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 24:320-326:2010.

2. 学会発表

1) Tanaka T, Yamamoto H, Kada A, Ura T, Ohata N, Miyata S, Miyata T, Nagatsuka K: Influence of renal impairment and

genetic subtypes to warfarin control.

XIX. European Stroke Conference, 25-28

May, 2010, Barcelona, Spain

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・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

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

研究分担者

長束 一行 国立循環器病研究センター 脳神経内科 部長
山本 晴子 国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 部長
嘉田 晃子 国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 室員

研究要旨：ワルファリンの投与量と遺伝子多型、さらにビタミン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。先行研究において、主として食事調査票の記載と回収に様々な問題が生じることが確認されたため、本研究ではこれらの点を改善するため、臨床研究開発部の支援を受けて臨床研究コーディネーターを2名配置し、食事調査票の回収の手順確認など、円滑な研究実施のための整備を行った。研究開始後は、研究者とCRC、データマネージャーが定期的にミーティングを行い、進捗状況や問題点の確認を行い、早期解決を図るよう努めた。また、他の参加施設を積極的に訪問し、研究の目的や具体的方法等について意見交換を行い、被験者登録の促進とデータの質の向上を図った。その結果、328例が登録され、ほぼ全員の観察が終了している（平成23年2月末現在、3例のみ調査中）。調査終了した症例のみで行った予備的な解析では、ビタミンK摂取量の季節変動がみられること、ワルファリン投与量とeGFRに関連が見られることなど、いくつか興味深い結果が得られている。今後は、全症例終了後にデータを固定し、解析結果を公表していきたい。

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。先行研究として、3ヶ月間のPT-INR及びワルファリン服用量の推移と、その期間の食事調査を1回だけ行

う研究を単施設で実施した。その結果、高齢患者では食事調査票の記載に不備が多く、また持参するのを忘れるなど、回収にも非常に手間取ることが判明した。本研究では、3ヶ月毎に食事調査票を記載するため、調査票への記載の完成度を高めることと、迅速に回収することが必須となる。そのため、昨年度から当院臨床研究開発部の支援により、CRCによる患者対応やスケジュール管理支援、データマネージャーによるデータベース作成とデータマネジメント業務が実施されている。また、他の参加施設を積極的に訪問し、研究の意義の確認、研究方法の正しい理解、研究実施への動機付け等を行った。

(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。

C. 研究結果

当センターを含めた研究参加施設は、最終的に4施設で(大阪医療センター、九

州医療センター、聖マリアンナ医科大学)、2010年2月の登録期限までに当初目標症例数400名のうち、328例までが登録された。うち、71例が観察期間中に中止された。主な中止理由は、同意撤回(56例)、追跡不能(4例)、有害事象の発現または死亡(5例)などであった。また、2011年2月末現在で調査中の症例が3例あった。これらの症例データを予備的に解析した。男性が236例(73%)、年齢は25歳から92歳までで中央値が72歳、84%がワルファリン服薬を開始して1年以上経過していた。また、ワルファリンの服薬理由として、心房細動が79%、血栓塞栓症が77%(複数回答可のため)であった。症例全体では、PT-INRやワルファリン服薬量の季節変動は大きくないようであった。一方、ビタミンK摂取量(食事アンケートによる)は、夏に少なく、冬に多い傾向がみられた。しかし、ビタミンKの血中濃度と摂取量の関連があまり強くないことから、食事アンケートによる調査結果の精度については、今後注意深い検討が必要と思われた。また、単施設でのパイロット研究でもみられたが、ワルファリン投与量とeGFR、年齢、体表面積は関連があると思われ、ワルファリンの効果に腎機能が影響している可能性が高い。今後は、遺伝子による影響の特定、遺伝子と他の環境要因の影響の関連性、ビタミンK摂取量が極端に多いまたは少ない症例での検討等、詳細な検討を実施していく予定である。

D. 考察

4施設の協力のもと、当初目標症例数か

ら2割弱少ないものの、328例の症例登録が完了した。全症例の調査が完了していないため、遺伝子多型と他の臨床データのマッチングができない状況で、全症例の予備的解析のみ行ったが、単施設パイロット研究での結果の再現性や、季節変動についての興味深い結果などが伺われる結果であった。今後は、全症例の調査完了後、データマネジメントによるデータクリーニング、データ固定を経て、統計家による詳細な解析を実施する予定である。

E. 結論

様々な補助人材の支援を得つつ、多施設共同研究をほぼ満了することができた。データの信頼性を確保するため、データマネジメント活動を実施した上で、詳細な解析を行う予定であるが、これまでに報告されたことのない、ビタミンK摂取量の季節変動のワルファリンの効果に与える影響など、新しい知見が得られる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

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
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

—細菌由来ビタミンK エポキシド還元酵素 VKOR 様遺伝子
ワルファリンによる殺菌に関して—

研究分担者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター研究所分子病態部 部長
研究協力者 喜多 俊行 国立循環器病研究センター研究所分子病態部 博士研究員

研究要旨：ビタミンK エポキシド還元酵素 (VKOR) は、ビタミンK エポキシドをヒドロキシキノン型のビタミンK へと還元する酵素であり、血液凝固因子の生合成の過程で生じるエポキシド型のビタミンK への再生に必須である。VKOR は、哺乳動物細胞に広く存在するが、細菌にも存在することが知られている。細菌ではタンパク質のSS結合の形成に関わる。細菌はDsbA-DsbB系でSS結合を形成する細菌と、DsbA-VKOR系でSS結合を形成する細菌に分かれる。DsbA-VKOR系でSS結合を形成する細菌の成育は、ワルファリンで阻害される可能性がある。そこで、本研究では、VKOR のホモログを持つ細菌をアミノ酸配列データベースでサーチした。また、DsbA-VKOR系を持つ細菌の成育が、ワルファリンにより阻害されるかに関して文献の調査を行った。

A. 研究目的

細菌のVKORホモログは細菌が分泌するタンパク質のジスルフィド結合(SS結合)の形成に関わることが最近の研究で明らかになってきた。大腸菌ではジスルフィド結合の形成は、2つのエンベロプタンパク質DsbAとDsbBで行われる。DsbAはチオレドキシン様タンパク質でジスルフィド結合形成を直接触媒する。DsbBはDsbAから膜結合キノンへ電子を受け渡し、DsbAを活性型である酸化型に維持する働きを持つ。大腸菌とは異なり、DsbB遺伝子を持たない細菌が存在する。DsbB遺伝子を持たない細菌は、DsbBの代わりにVKOR様遺伝子を持つ。結核菌はVKOR様遺伝子を持ち、このVKORは大腸菌のDsbB

の機能を持つことが示された(1)。シアノバクテリアのVKOR様遺伝子も、大腸菌のDsbBの機能を持つことが示されている(2)。そこで、本研究では、VKOR様遺伝子を持つ細菌を、アミノ酸配列データベースでサーチした。また、DsbA-VKOR系を持つ細菌の成育が、ワルファリンにより阻害されるかに関して文献の調査を行った。

B. 研究方法

VKOR様遺伝子を持つ細菌は、ヒトVKORC1のアミノ酸配列163残基をBLAST (Basic Local Alignment Search Tool、Protein Blast、Data Base: Non-redundant protein sequences、Organism:

Eukaryotes を exclude、Max target sequences: 1000、他は標準仕様)で検索した(2011年3月1日現在)。そして、最も相同性の高かった放線菌の一種である *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 の VKOR で、再度、相同性検索を行った。

DsbA-VKOR 系を持つ細菌の育成が、ワルファリンにより阻害される文献調査は、PubMed をキーワードとして「VKOR, bacteria」、もしくは「VKOR, warfarin, bacteria」で検索することにより行った。

(倫理面への配慮)

本研究は文献調査研究であり、ヒト由来試料などを用いる研究ではない。

C. 研究結果

Saccharopolyspora erythraea VKOR のアミノ酸配列をもとに VKOR 様遺伝子を持つ細菌をサーチし、102 残基 (*Saccharopolyspora erythraea* VKOR の 75%に相当) 以上で、30%以上の相同性を示す(既に VKOR として報告されているものは除かない)細菌を表1に示した。

Mycobacterium, *Streptomyces*, *Acidobacterium*, *Bifidobacterium* などの136の細菌が VKOR 様遺伝子を持つことが判明した。

キーワード「VKOR, bacteria」の検索結果を表2に示した。7つの論文が検索された。キーワード「VKOR, warfarin, bacteria」の検索結果を表3に示した。2つの論文が検索され、いずれも「VKOR, bacteria」での検索に入っている論文であった。

2つの論文のうち、一つはグラム陰性

酸素産生光合成細菌であるラン藻のシネコッカス属 (*Synechococcus* sp.) の VKOR の立体構造を決定した論文であった。ラン藻の VKOR の立体構造は、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た

(3)。ラン藻の 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ンに渡す酵素であると理解された。

もう一つの論文は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の VKOR ホモログに関するものであった。この VKOR ホモログタンパク質はジスルフィド結合を持つ鞭毛タンパク質フラジェリン P-ring タンパク質の形成に必須であるが、ワルファリンは P-ring タンパク質の形成を阻害した。また、結核菌 VKOR 遺伝子の欠失は菌の育成不全を起こすことが示された。この論文では、著者らは細菌の VKOR ホモログは菌の育成を止める薬剤の標的になる可能性に言及している。

D. 考察

文献では、多岐にわたった多くの好気性細菌、すなわち、全てのシアノバクテリア(藍色細菌)、幾種類かの actinobacteria、デルタとイプシロンプロテオバクテリア、スピロヘータが、VKOR 様遺伝子産物でタンパク質のジスルフィド結合を形成するといわれていた(4)が、今回の VKOR アミノ酸配列のサーチにより、その一部を実証することができた。

文献調査から、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の VKOR ホモログタンパク質はジスルフィド結合を持つタンパク質

の形成に必須であり、ワルファリンはそのタンパク質の形成を阻害し、結核菌 VKOR 遺伝子の欠失は菌の成育不全を起こすとの報告があった。

E. 結論

VKOR のホモログを持つ細菌をアミノ酸配列データベースでサーチし、44 種の VKOR 様遺伝子を見いだした。結核菌は DsbA-VKOR 系でタンパク質のジスルフィド結合を形成し、ワルファリンにより細菌の成育が阻害されるとの報告がなされていた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Mitsuguro, T. Sakata, A. Okamoto, S. Kameda, Y. Kokubo, Y. Tsutsumi, M. Sano, T. Miyata: Usefulness of antithrombin deficiency phenotypes for risk assessment of venous thromboembolism: type I deficiency as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Int J Hematol*, 92(3), 468-473, 2010.

2. 学会発表

1) 光黒真菜、阪田敏幸、岡本章、亀田幸花、小久保喜弘、塘義明、佐野道孝、宮田敏行。先天性アンチトロンビン欠乏症での血栓発症における活性、抗原量測定の有用性。第 15 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会。吹田市, 2010.

2) 光黒真菜、阪田敏幸、岡本章、亀田幸

花、小久保喜弘、塘義明、佐野道孝、宮田敏行。アンチトロンビン欠乏症の活性/抗原量比によるフェノタイプ分類と静脈血栓症リスク。第 57 回日本臨床検査医学会学術集会。東京都, 2010.

3) Tong Yin, Toshiyuki Miyata, Pharmacogenetics of warfarin. The 6th Aian Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis. Bali, Indonesia, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. VKOR 様タンパク質を持つ細菌 (別紙)

表 2 : キーワード「VKOR, bacteria」での検索結果

1: Wang X, Dutton RJ, Beckwith J, Boyd D. Membrane Topology and Mutational Analysis of Mycobacterium tuberculosis VKOR, a Protein Involved in Disulfide Bond Formation and a Homologue of Human Vitamin K Epoxide Reductase. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Feb 18. [Epub ahead of print].

2: Schulman S, Wang B, Li W, Rapoport TA. Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 24;107(34):15027-32.

3: Greer FR. Vitamin K the

basics—what's new? Early Hum Dev. 2010 Jul;86 Suppl 1:43-7. Review.

4: Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, Rapoport TA. Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. Nature. 2010 Jan 28;463(7280):507-12.

5: Dutton RJ, Wayman A, Wei JR, Rubin EJ, Beckwith J, Boyd D. Inhibition of bacterial disulfide bond formation by the anticoagulant warfarin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 5;107(1):297-301.

6: Oldenburg J, Bevans CG, Müller CR, Watzka M. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. Antioxid Redox Signal. 2006 Mar-Apr;8(3-4):347-53. Review.

7: Goodstadt L, Ponting CP. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. Trends Biochem Sci. 2004 Jun;29(6):289-92.

表3 : キーワード「VKOR, warfarin, bacteria」での検索結果

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 Jan 28;463(7280):507-12.

2: Dutton RJ, Wayman A, Wei JR, Rubin EJ, Beckwith J, Boyd D. Inhibition of bacterial disulfide bond formation by the anticoagulant warfarin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 5;107(1):297-301.

表1. VKOR様タンパク質を持つ細菌

Protein	Bacteria	Identities
1 hypothetical protein AM1_2935	Acaryochloris marina	32/127 (26%)
2 Vitamin K epoxide reductase	Acidimicrobium ferrooxidans	32/100 (32%)
3 vitamin K epoxide reductase	Acidothermus cellulolyticus	37/102 (37%)
4 integral membrane protein	Actinomyces coleocanis	41/126 (33%)
5 hypothetical protein ACTODO_01297	Actinomyces odontolyticus	42/116 (37%)
6 vitamin K epoxide reductase family protein	Actinomyces sp.	50/130 (39%)
7 possible integral membrane protein	Actinomyces urogenitalis	51/127 (41%)
8 vitamin K epoxide reductase	Actinomyces viscosus	51/130 (40%)
9 vitamin K epoxide reductase	Actinosynnema mirum	80/121 (67%)
10 vitamin K epoxide reductase	Aeromicrobium marinum	58/122 (48%)
11 hypothetical protein APE_2462.1	Aeropyrum pernix	35/129 (28%)
12 Vitamin K epoxide reductase	Arcanobacterium haemolyticum	46/134 (35%)
13 hypothetical protein AARI_18210	Arthrobacter arilaitensis	67/135 (50%)
14 putative integral membrane protein	Arthrobacter aurescens	69/131 (53%)
15 Vitamin K epoxide reductase	Arthrobacter chlorophenolicus	68/134 (51%)
16 putative membrane protein	Arthrobacter phenanthrenivorans	69/131 (53%)
17 vitamin K epoxide reductase	Arthrobacter sp.	72/130 (56%)
18 Vitamin K epoxide reductase	Arthrospira maxima	28/107 (27%)
19 vitamin K epoxide reductase	Arthrospira platensis	37/143 (26%)
20 Vitamin K epoxide reductase	Beutenbergia cavernae	58/120 (49%)
21 hypothetical protein BAD_1166	Bifidobacterium adolescentis	46/138 (34%)
22 hypothetical protein BIFANG_02448	Bifidobacterium angulatum	43/121 (36%)
23 conserved hypothetical transmembrane protein	Bifidobacterium animalis	46/138 (34%)
24 hypothetical protein BBPR_0467	Bifidobacterium bifidum	40/119 (34%)
25 hypothetical protein BIFBRE_03586	Bifidobacterium breve	43/132 (33%)
26 hypothetical protein BIFCAT_00391	Bifidobacterium catenulatum	47/138 (35%)
27 vitamin K epoxide reductase family	Bifidobacterium dentium	49/138 (36%)
28 hypothetical protein BIFGAL_02796	Bifidobacterium gallicum	43/138 (32%)
29 Vitamin K epoxide reductase	Bifidobacterium longum	46/138 (34%)
30 hypothetical protein BIFPSEUDO_03097	Bifidobacterium pseudocatenulatum	48/138 (35%)
31 vitamin K epoxide reductase	Bifidobacterium sp.	47/138 (35%)
32 predicted membrane protein	Brachybacterium faecium	51/121 (43%)
33 vitamin K epoxide reductase	Brevibacterium linens	78/132 (60%)
34 vitamin K epoxide reductase	Brevibacterium mcbrellneri	59/134 (45%)
35 Vitamin K epoxide reductase	Candidatus Micrarchaeum acidiphilum	26/90 (29%)
36 Vitamin K epoxide reductase	Cellulomonas flavigena	56/127 (45%)
37 hypothetical protein CMM_1486	Clavibacter michiganensis	67/120 (56%)
38 Vitamin K epoxide reductase	Conexibacter woesei	73/133 (55%)
39 membrane protein	Corynebacterium efficiens	65/117 (56%)
40 hypothetical protein cgR_0923	Corynebacterium glutamicum	65/131 (50%)
41 vitamin K epoxide reductase	Corynebacterium jeikeium	65/134 (49%)
42 integral membrane protein	Corynebacterium lipophiloflavum	58/129 (45%)
43 hypothetical protein CresD4_01435	Corynebacterium resistens	59/134 (45%)
44 hypothetical protein cur_1488	Corynebacterium urealyticum	66/134 (50%)
45 hypothetical protein CvarD4_12746	Corynebacterium variabile	59/127 (47%)
46 Vitamin K epoxide reductase	Cyanotheca sp.	37/124 (30%)
47 vitamin K epoxide reductase	Desulfococcus oleovorans	17/67 (26%)
48 Vitamin K epoxide reductase	Dietzia cinnamea	69/134 (52%)
49 vitamin K epoxide reductase family protein	Gardnerella vaginalis	43/127 (34%)
50 Vitamin K epoxide reductase	Gordonia bronchialis	78/131 (60%)
51 integral membrane protein	Gordonia westfalica	67/121 (56%)
52 gamma-glutamyltranspeptidase	Herbaspirillum seropedicae	37/120 (31%)
53 hypothetical protein BIFADO_02303	ifidobacterium adolescentis	46/138 (34%)
54 Vitamin K epoxide reductase	Intrasporangium calvum	29/95 (31%)
55 probable conserved integral membrane protein	Janibacter sp.	80/131 (62%)
56 Vitamin K epoxide reductase	Jonesia denitrificans	44/119 (37%)
57 vitamin K epoxide reductase	Kineococcus radiotolerans	78/134 (59%)
58 hypothetical protein KSE_11300	Kitasatospora setae	73/122 (60%)
59 hypothetical protein KRH_11270	Kocuria rhizophila	59/122 (49%)
60 Vitamin K epoxide reductase	Kribbella flavida	77/132 (59%)
61 hypothetical protein Ksed_25850	Kytococcus sedentarius	77/128 (61%)
62 integral membrane protein	Leifsonia xyli	51/131 (39%)
63 hypothetical protein L8106_18621	Lyngbya sp.	30/102 (30%)
64 COG4243: Predicted membrane protein	Magnetospirillum magnetotacticum	47/104 (46%)
65 integral membrane protein	marine actinobacterium	59/128 (47%)
66 vitamin K epoxide reductase	Metallosphaera sedula	30/94 (32%)
67 putative integral membrane protein	Microbacterium arborescens	57/128 (45%)