

# ゲノム多型の解析を中心とする血栓性疾患の発症に関わる遺伝的要因の解明

●鈴木 宏治<sup>1)</sup> ◆林 辰弥<sup>1)</sup> ◆和田 英夫<sup>2)</sup>

1) 三重大学大学院医学系研究科病態解明医学講座 分子病態学分野 2) 同臨床検査医学分野

## ＜研究の目的と進め方＞

本研究では、各種血栓性疾患患者について、欧米人で指摘されている血液凝固関連因子の量的異常や機能異常の有無、及び血栓性疾患の発症に関係すると考えられる遺伝子群の塩基変異やゲノム多型を解析し、モンゴル系人種に固有な血栓性遺伝性素因を解明すると共に、各種遺伝子導入マウス及び遺伝子欠損マウスについてその病態を解析することにより、血栓塞栓性疾患の発症に関わる遺伝的要因を解明する。こうした知見に基づき、今後の血栓性疾患に対する個々の患者に最適な治療法と予防法の選択、いわゆる「テーラーメイド医療」の実現に向けた基盤的研究を行う。

## ＜研究開始時の研究計画＞

これまでの研究により、血栓塞栓性疾患の発症には、遺伝子異常やゲノム多型に起因する因子欠損症や因子増多症、機能異常症などの遺伝的要因が複雑に関わることが示唆されている。そこで本研究では、以下の実験計画を立案した。

- (1) 日本人の血栓症患者における血栓性疾患関連遺伝子の解析：臨床医の協力の下に、脳血栓症、冠動脈血栓症、術後静脈血栓症、肺塞栓症を来した日本人患者の血漿と白血球を採集し、各因子の活性を測定する。異常な因子について必要な領域の塩基配列を決定し、変異部位を解明する。また、各因子のSNPと血栓塞栓性疾患の発症頻度、重症度、発症部位などとの関係を調査し、欧米白人で報告されているものとの関係を比較検討する。
- (2) 血栓性素因として未同定の抗血栓関連因子の機能解析と遺伝子変異、ゲノム多型の解析：トロンボモジュリン (TM) 及び血管内皮細胞プロテインCレセプター (EPCR) について、血栓症患者の血漿と白血球を用いて、各因子の血栓性素因としての分子病態学的意義を明確化する。特に機能異常因子遺伝子について、変異部位とSNPの解析を行い、血栓性疾患に至る分子機構を明らかにする。
- (3) 遺伝子導入動物及び遺伝子欠損動物を用いた解析：病態生理的意義が不明な凝固関連因子の機能を解明するため、PCI遺伝子過剰発現マウス、EPCR欠損マウス、アデノシン欠損マウスなどの病態解析を行い、血栓塞栓性疾患の発症に関わる遺伝的要因を解明する。

## ＜研究期間の成果＞

研究期間内に、各種血栓性疾患患者の血漿中のAPC-PCI複合体が増加すること、心筋梗塞患者のPCI濃度が著しく増加することなどを見出した。続いて、各種冠動脈疾患患者について、TM及びEPCRのゲノム多型、変異プライマーを用いたPCR-RFLP解析法及びPCR-ダイレクトシーケンス法を用いて検討した。その結果、TM遺伝子については、日本人の冠動脈疾患患者において、遺伝子の転写調節領域中に位置するG-33A多型を見出した。一方、日本人の冠動脈疾患患者において、EPCR遺伝子の第4エクソン上にA4678G(Ser219Gly)多型を見出した。しかし、欧米人患者で報告されているEPCR遺伝子の第3エクソン中の23塩基の挿入変異は、今回検討した日本人には認められなかった。

他方、血漿PCIの病態との関係を解明する目的で作製したヒトPCI遺伝子発現マウスの表現型を解析した結果、ヒトPCI遺伝子発現マウスは血栓及び炎症亢進傾向を示すことから、PCIが生理的に向凝固及び炎症促進因子として機能することが示唆された。

## ＜国内外での成果の位置づけ＞

本研究では、世界に先駆けて心筋梗塞患者で血漿中のAPC-PCI複合体濃度が増加することを認めたが、患者のTM及びEPCR遺伝子多型頻度は、正常人に比較して高頻度であるといった結果は得られなかった。また、PCI遺伝子発現マウスを用いた解析から、PCIが生理的に向血栓性及び炎症促進因子として機能することをはじめて明らかにした。

## ＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

本研究では、日本人における冠動脈疾患に関わる血管内皮細胞上の抗血栓性因子であるTM及びEPCR遺伝子多型の同定を試みたが、その多型が、冠動脈疾患患者のみならず、正常人にも同じ頻度でみられたため、冠動脈疾患と多型との関連性を証明することができなかった。また、今後は因子内の多型と生物活性、発症頻度との関係を詳細に検討する必要がある。

## ＜今後の課題＞

今回、冠動脈疾患患者に絞り、TM及びEPCRの遺伝子多型の解析を試みたが、今後、深部静脈血栓症患者についてもそれらの遺伝子多型に関して同様に検討を行うと共に、正常人については適切な母集団の選択が必要である。

## ＜研究期間の全成果公表リスト＞

- 1) 論文／プロシーディング (査読付きのものに限る)
  1. Watanabe, R., Wada, H., Mori, Y., Nakasaki, T., Sawa, H., Gabazza, E.C., Hayashi, T., Nishioka, J., Suzuki, K., Shiku, H. and Nobori, T. Plasma level of activated protein C-protein C inhibitor complex in patients with hypercoagulable state. *Am. J. Hematol.* 65(1),35-40(2000).
  2. Tsuneyoshi, N., Fukudome, K., Ye, X., Horiguchi, S., Matsuzaki, M., Sano, M., Suzuki, K. and Kimoto, M. Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines. *Thromb. Haemost.* 85(2),356-361(2001).
  3. Hayashi, T., Nishioka, J., Kamada, H., Asanuma, K., Kondo, H., Gabazza, E.C., Ido, M. and Suzuki, K. Characterization of a novel human protein C inhibitor (PCI) gene transgenic mouse useful for studying the role of PCI in physiological and pathological conditions. *J. Thromb. Haemost.* 2(6), 949-961(2004).
- 2) データベース／ソフトウェア
  - 特に無し
- 3) 特許など
  - 特に無し
- 4) その他顕著なもの、
  - 特に無し