



国立医薬品食品  
衛生研究所  
医療機器部  
第三室  
室長  
博士(理学)  
澤田 留美

1989年 お茶の水女子大学家政学部  
食物学科卒業  
1991年 同大学院修士課程修了  
1991年 日本ロシユ(株)  
1997年 お茶の水女子大学大学院  
博士課程修了  
1997年 同大学研究機関研究員  
1999年 日本学術振興会特別研究員  
2002年 お茶の水女子大学助手  
2003年 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部研究員  
2004年 同主任研究官  
2009年 同第四室 室長  
2010年 現職

## 人工心臓弁の機能不全発症に関わる遺伝子多型の探索

### はじめに

心臓弁膜症とは心臓の弁の働きが損なわれる病気の総称であり、心臓病の大きな原因の一つである。主な症状としては、血液の通り道が狭くなる狭窄症と弁の閉じ方が不完全なために血液の逆流が起こる閉鎖不全症の2つが挙げられる。心臓弁膜症のほとんどは、4つある心臓弁のうちの大動脈弁と僧帽弁に起こるといわれ、特に大動脈弁狭窄症は心臓弁膜症の中でも病状の進行が早く突然死にいたるリスクも高い。現在、治療として人工心臓弁置換手術が行われている。臨床的に用いられている人工弁は、大きく分けて機械弁と異種生体弁がある。機械弁は耐久性が高いが抗血栓性に大きな問題があり、一方生体弁は抗血栓性は高いものの耐久性が低く使用時の患者の年齢を選ぶ。また、世界でインプラントされている弁は約60%が機械弁であるといわれている一方で、わが国における人工弁の利用は一説では約80%が機械弁であるとも言われ比較的多く使用されている。

一方、大動脈弁の置換術後における人工弁機能不全は、患者の生命を危機に曝す重大な問題である。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために置換手術後は生涯にわたり抗血液凝固薬及び抗血小板凝集薬服用が必要となるが、薬の作用には個人差もあり血栓が形成された場合には急速な人工心臓弁機能不全を招く恐れがある。機械弁の機能不全の主な原因としては、

血栓形成に加え、パンヌス(心臓弁の周辺に発育する線維性の自己組織)形成が考えられる。パンヌスの形成についてはそのメカニズムは未だ明らかにされていないが、異物に対する生体反応等に個人差がある可能性も否定できない。

血栓形成に対する抗血液凝固療法については、日本人は欧米人と比較すると弱い抗凝固療法でも有効である事がわかっているため、わが国のガイドラインは欧米に比べるとやや緩めに設定されており、その感受性に人種差があると考えられている。抗凝固療法の基本的薬剤であるワーファリンの使用量に関する日本人の遺伝子多型の研究はこれまでも数多くなされているが、心臓弁膜症手術における抗凝固療法に関する遺伝子多型の検討報告はほとんどなされていない。また、人工心臓弁機能不全のもう一つの原因と考えられるパンヌス形成に関してはその形成メカニズム自体が不明である。そこで本研究では、人工心臓弁(機械弁)を体に埋植した際の血栓やパンヌスの形成の原因となり得る遺伝子多型を探索することを目的とし、日本人の人工心臓弁(機械弁)使用者の中で弁の機能不全が認められる患者および不具合が認められない患者の血液を用いて SNP タイピングを行い、両者を比較検討した。

## 研究方法

### 1. 血液採取

血液検体は、久留米大学医学部外科学講座において人工心臓弁置換手術を過去に施された患者のうち、人工心臓弁の機能不全が認められる患者および人工弁の不具合が今のところ認められない患者からそれぞれ定期検診時に得られた。採血(各 8.5mL)は、PAXgene Blood DNA Tubes(QIAGEN)を用いた。これらは全て、患者の自由意志に基づくインフォームド・コンセントが得られた患者より提供されたものである。

### 2. DNA 抽出

QIAamp Blood Mini KIT(QIAGEN)を用いて、採取された血液より DNA を抽出した。

### 3. SNP タイピング

#### 1) ターゲット遺伝子の選定

血栓形成の原因となり得る遺伝子多型を探索するための SNP タイピングのターゲット遺伝子として、まず抗血液凝固薬であるワーファリンの薬効に関連する遺伝子である SERPINE1 [serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1; PAI-1]、CYP2C9 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9)、プロトロンビン、凝固因子第 7、凝固因子第 9、凝固因子第 10、GGCX (γ-グルタミルカルボキシラーゼ) の 7 遺伝子について着目し、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に計 23SNPs を選定した。さらに生体における免疫系、創傷治療や発癌など様々な環境下で重要な役割を果たしている TGF  $\beta$  に着目して TGF  $\beta$  とそのレセプターについて SNP を検索した。TGF  $\beta$  1 は日本人における SNP の報告があったもの、TGF  $\beta$  レセプター I (TGF  $\beta$  RI) 及び TGF  $\beta$  レセプター II (TGF  $\beta$  RII) は日本人における報告はなかったため他人種での報告による SNP のうちコーディング領域でアミノ酸変異の伴

うものを中心に選択した。また、GGCX と同じ 2 番染色体上にあり、裏表の位置関係(ただし場所は重なっていない)にある VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8) にも着目した。上記の 4 遺伝子について計 6SNPs を選択し、総計 29SNPs (表1) についてタイピングを行った。

## 2) SNP タイピング方法

まず、ターゲットの SNP を挟む 200~400bp 程度の増幅産物を得るために PCR を行った。次に、得られた PCR 産物を Template として用いて Typing PCR を行った。PCR の酵素は、Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega) を用いた。電気泳動にてバンドの有無を確認して判定した。プライマー設計及び PCR 条件設定は株式会社イムノダイアグノスティックラボラトリーにて行われた。

## 4. 有意差検定

Fisher の正確確率検定 (Fisher's exact test) により両側検定を行った。

表 1. ターゲットとした SNP

Gene	JSNP	dbSNP(rs)	Location	
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST005633	rs11178	3'UTR	c.1570C>T
	IMS-JST058119	rs6092	CDS (Ala/Thr)	c.43G>A
	IMS-JST058120	rs6090	CDS (Ile/Val)	c.49G>A
	IMS-JST005631	rs2070682	INTRON	c.700+1921C>T
	IMS-JST005632	rs2070683	INTRON	c.1087+859T>A
CYP2C9	IMS-JST052819	rs2298037	INTRON	c.1149+147C>T
CYP2C9 *3		rs1057910	CDS (Ile/Leu)	c.1075A>C
CYP2C9 *13		rs72558187	CDS (Leu/Pro)	c.269T>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST005890	rs2070850	INTRON	c.240+83T>C
	IMS-JST005891	rs2070851	INTRON	c.316+2125C>T
	IMS-JST005892	rs2070852	INTRON	c.422+90G>C
	IMS-JST005893	rs5896	CDS (Met/Thr)	c.494T>C
	IMS-JST031911	rs2282686	INTRON	c.1472+251C>T
	IMS-JST031912	rs2282687	INTRON	c.1654+290C>T
F7	IMS-JST017150	rs6042	CDS-synonymous	c.525C>T
F9	IMS-JST178462	rs3817939	INTRON	c.88+75A>G
F10	IMS-JST069694	rs5960	CDS-synonymous	c.792T>C
	IMS-JST103451	rs3211719	INTRON	c.70+270A>G
	IMS-JST117973	rs2026160	INTRON	c.256+98A>C
	IMS-JST119689	rs3211736	INTRON	c.231+64C>T
	IMS-JST152051	rs3838839	INTRON	c.502+2115^2116
	IMS-JST190984	rs3829391	INTRON	c.502+2531A>G
GGCX	IMS-JST006491	rs2028898	INTRON	c.2084+408C>T
VAMP8	IMS-JST041766	rs12888	CDS-synonymous	c.201A>G
	IMS-JST085287	rs3731828	CDS-synonymous	c.138C>T
TGF β1	IMS-JST096736	rs1800470	CDS-synonymous	c.29C>T
TGF βRI		rs7861780	CDS-synonymous	c.1125A>C
TGF βRII		rs1050833	CDS(Glu/Val)	c.946A>T
		rs3209742	CDS(Ala/Val)	c.1606T>C

## 研究結果及び考察

人工心臓弁の機能不全を未然に防ぐ方法の確立を目指して、血栓形成やパルプ形成の原因となり得る遺伝子多型の探索を行った。人工心臓弁を現在使用している患者の血液を用いて、抗血液凝固薬として人工弁置換術後服用するワーファリンの薬効関連遺伝子や、生体における免疫系、創傷治療や発癌など様々な環境下で重要な役割を果たしている TGF $\beta$  やそのレセプターなど 11 遺伝子を対象とし、計 29SNPs を選択しタイピングを行った。

人工心臓弁の機能不全が認められる患者 15 名 (全例パルプによる機能不全の疑い。うち 2 例は血栓も併発。)及び人工弁の不具合が今のところ認められない患者 11 名由来の DNA を用いた SNP タイピングの結果を表 2 に示した。また、対照として既に得られている健常な日本人 (100 名)の血液由来の DNA を用いて検討した結果と比較した。用いた DNA は、PSC (ファルマスニップ コンソーシアム)によって樹立された PSC 細胞株から調製された DNA で、男性 50 名 (平均年齢 52.3  $\pm$  8.1 才)女性 50 名 (平均年齢 52.4  $\pm$  8.1 才)由来である。表 3 に、健常人と人工心臓弁使用者のアレル頻度をまとめ比較したところ、血液凝固因子第 10 (F10)の SNP: rs3211736 で、人工心臓弁の機能不全の有無間での有意なアレル頻度の差が認められた。

F10はビタミンK依存性凝固因子の一つであり、肝臓で生成される際にビタミンKを必要とする。抗血液凝固薬であるワーファリンの作用はビタミンKの働きを抑える事で発揮されるため、F10はワーファリンの薬効に関連する遺伝子と考えられる。今回検討した人工心臓弁の機能不全が認められる患者は全てその原因がパルプ形成によるものであると考えられるため、この結果から、F10の SNP : rs3211736 (INTRON, c.231+64C>T)がパルプ形成の有無に関与する可能性が示唆された。ただし、現段階では患者の検体数が合計 26 と少ないため、今後さらに検体数を増やしていく事でより正確な遺伝子多型の検討が出来るものと考え、現在も SNP タイピングを続けている。

人工心臓弁の機能不全の有無や原因によってアレルの頻度に有意な差が出てくる SNP が今後さらに特定できれば、血栓形成やパルプ形成による人工心臓弁機能不全の原因となり得る遺伝的背景を探る手がかりとなるであろう。また、機械弁と生体弁の選択や抗血液凝固療法の程度の決定にも利用できる事が期待される。

## 謝辞

本研究を助成して頂きましたサッポロ生物科学振興財団ならびに助成候補者としてご推薦下さいました富永典子先生に心より感謝申し上げます。また、血液検体作製にご協力頂きました久留米大学医学部外科学講座の諸先生方に心より御礼申し上げます。



表3. 健常人と人工心臓弁使用者のアレル頻度

Gene	SERPINE1 (PAI-1)									
	rs11178		rs6092		rs6090		rs2070682		rs2070683	
	C	T	G	A	G	A	C	T	T	A
Healthy volunteers n=100	0.545	0.455	0.925	0.075	0.995	0.005	0.545	0.455	0.545	0.455
Patients n=26	0.635	0.365	0.923	0.077	1	0	0.635	0.365	0.635	0.365
adverse events n=15	0.633	0.367	0.933	0.067	1	0	0.633	0.367	0.633	0.367
no adverse events n=11	0.636	0.364	0.909	0.091	1	0	0.636	0.364	0.636	0.364

Gene	F2 (prothrombin)											
	rs2070850		rs2070851		rs2070852		rs5896		rs2282686		rs2282687	
	T	C	C	T	G	C	T	C	C	T	C	T
Healthy volunteers n=100	0.56	0.44	0.58	0.42	0.635	0.365	0.58	0.42	0.635	0.365	0.58	0.42
Patients n=26	0.596	0.404	0.654	0.346	0.692	0.308	0.654	0.346	0.692	0.346	0.635	0.365
adverse events n=15	0.633	0.367	0.7	0.3	0.733	0.267	0.7	0.3	0.733	0.267	0.7	0.3
no adverse events n=11	0.545	0.455	0.591	0.409	0.636	0.364	0.591	0.409	0.636	0.364	0.545	0.455

Gene	CYP2C9		CYP2C9*3		CYP2C9*13		F7		F9		GGCX	
	rs2298037		rs1057910		rs72558187		rs6042		rs3817939		rs2028898	
	C	T	A	C	T	C	C	T	A	G	C	T
Healthy volunteers n=100	0.705	0.295	0.99	0.01	0.99	0.01	0.915	0.085	0.89	0.11	0.685	0.315
Patients n=26	0.615	0.385	0.981	0.019	1	0	0.942	0.058	0.885	0.115	0.769	0.231
adverse events n=15	0.667	0.333	1	0	1	0	0.9	0.1	0.9	0.1	0.8	0.2
no adverse events n=11	0.545	0.455	0.955	0.045	1	0	1	0	0.864	0.136	0.727	0.273

Gene	F10											
	rs5960		rs3211719		rs2026160		rs3211736		rs3838839		rs3829391	
	T	C	A	G	A	C	C	T	-	T	A	G
Healthy volunteers n=100	0.59	0.41	0.675	0.325	0.905	0.095	0.62	0.38	1	0	1	0
Patients n=26	0.519	0.481	0.615	0.385	0.846	0.154	0.615	0.385	1	0	1	0
adverse events n=15	0.533	0.467	0.6	0.4	0.867	0.133	0.467	0.533	1	0	1	0
no adverse events n=11	0.5	0.5	0.636	0.364	0.818	0.182	0.818	0.182	1	0	1	0

\*

Gene	VAMP8				TGFβ1		TGFβRI		TGFβRII		TGFβRII	
	rs12888		rs3731828		rs1800470		rs7861780		rs3209742		rs1050833	
	A	G	C	T	T	C	A	C	A	T	T	C
Healthy volunteers n=100	0.605	0.395	0.68	0.32	0.535	0.465	1	0	1	0	1	0
Patients n=26	0.577	0.423	0.769	0.231	0.423	0.577	1	0	1	0	1	0
adverse events n=15	0.633	0.367	0.8	0.2	0.4	0.6	1	0	1	0	1	0
no adverse events n=11	0.5	0.5	0.727	0.273	0.455	0.545	1	0	1	0	1	0

p\* < 0.05

