Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Serotonin-2A receptor gene polymorphisms are associated with Serotonin-induced platelet aggregation

清水，政克

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2004-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2971
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002971

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 121 】

氏　　名・（本　籍）	清水　政克	（　兵庫県　）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博い第１５８１号	
学位授与の　要　件	学位規則第４条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成１６年３月３１日	

【 学位論文題目 】

Serotonin-2A receptor gene polymorphhisms are associated with serotonin-induced platelet aggregation
（セロトニン２Ａ 受容体遺伝子多型はセロトニンによる血小板凝集と関連する）

審　査　委　員

主 査　教　授　熊谷　俊一
教　授　西尾　久英
教　授　大北　　裕

〔緒言〕

活性化した血小板から放出されたセロトニン（5HT）はその特異的な受容体を介して，特に心血管系において種々の異なる生理作用を引き起こす．これら 5HT 受容体はその構造や特徴から $5HT_1$ から $5HT_7$ までの 7 つのクラスに分けられている．それらのうちで特に $5HT_2$ 受容体はその機能に関してよく知られており，血小板の $5HT_2$ 受容体の活性化は血小板凝集を引き起こすことが分かっている．

近年の分子生物学の進歩により $5HT_2$ 受容体は 3 つのサブタイプ（$5HT_{2A}$, $5HT_{2B}$, $5HT_{2C}$）に分類され，ヒトの血小板には $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子が発現していることが明らかとなった．$5HT_{2A}$ 受容体遺伝子（13q14-q21）には 2 つの遺伝子多型（exon1 の T102C と promoter 領域の-1438A/G）が存在することが知られており，我々は $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型の T102 ホモ接合型（TT 型）が非致死性急性心筋梗塞（AMI）の独立した危険因子であることを既に報告した．この報告は，T102C 遺伝子多型がアミノ酸配列を変化させないにも関わらず $5HT_{2A}$ 受容体の機能に影響している可能性を示唆している．また，この遺伝子多型がどこか他の場所の機能的遺伝子多型と連鎖不均衡にある可能性も指摘されており，今までに T102C 遺伝子多型が promoter 領域の-1438A/G 遺伝子多型と非常に強い連鎖不均衡にあることが示されている．これらの報告は T102C 遺伝子多型及び-1438A/G 遺伝子多型が，両者もしくは単独で，$5HT_{2A}$ 受容体の機能に影響していることを強く示唆している．

一方，血小板機能を評価することは臨床上非常に有用である．しかしながら 5HT によって惹起される血小板凝集は非常に弱く可逆的であるため，古典的な透過光（optical density；OD）法を用いた血小板凝集計では定量評価できなかった．近年の技術的進歩により開発されたレーザー散乱光（laser-light scattering；LS）法を用いた血小板凝集計は非常に鋭敏であり，5HT のような弱い agonist による血小板小凝集の形成を定量的に評価することができる．近年，血小板凝集が起こる過程において，小凝集塊を経て中凝集塊や大凝集塊が起こることが示されており，血小板凝集の初期段階である小凝集を評価することがより重要であると考えられている．

本研究の目的は，日本人健常者における $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型と 5HT による血小板凝集との関連の検討を行うことである．

〔対象〕

44 人の非喫煙健常者（男性 35 名，女性 9 名，平均年齢 26.5±1.6 歳）を対象として本研究を行った．全ての対象者には特記すべき既往はなく，本研究前最低 4 週間は各種薬物の服用を禁止された．また，採血前 24 時間はアルコール及びコーヒーの摂取が制限された．全ての対象者から採血と遺伝子解析に関する同意文書を得た．

〔方法〕

1．採血

採血は血小板機能の日内変動や食事による影響を避けるため，空腹状態で午前 8 時から 10 時の間に行った．また女性健常者においては，月経期間中は採血を行わないようにした．駆血帯を使用せず 21G の針で採血を施行し，4.5ml の血液を 3.13%の sodium citrate を含んだチューブに採取した．

血液サンプルは常温で 150G，10 分間遠心分離され platelet-rich plasma（PRP）を得た．残った血液サンプルは platelet-poor plasma（PPP）を得るため，更に常温で 350G，10 分間遠心分離された．PPP は脂質，血糖，炎症マーカー等の生化学的分析と血小板凝集計のキャリブレーションに用いられた．また，PRP 中の 5HT 濃度（n=44）と PPP 中の 5HT 濃度（n=30）も検討した．

2．$5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型の解析

$5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型の T102C 及び-1438A/G の解析は，白血球から分離した genomic DNA を用いて PCR-RFLP 法で行った．また，$5HT_{2A}$ 受容体遺伝子の exon3 の C1354T（His452Tyr）遺伝子多型に関しても解析を行った．この遺伝子多型は，血小板における 5HT による Ca^{2+} 動態に影響を与えることが既に報告されている．

3．血小板凝集計

血小板凝集は LS 法を用いて血小板小凝集塊を測定することの血小板凝集計 PA-200（Kowa, Tokyo, Japan）を使用して行った．一般的に，血小板小凝集塊（大きさ：9-25μm）は約 70-1400 個の血小板からなり，中凝集塊（25-50μm）は約 1000-11000 個，大凝集塊（50-70μm）は約 11000-31000 個の血小板からなると考えられている．

血小板凝集の惹起には 5HT（0.3, 1.0μM）及び（ADP 0.1, 0.3μM）を用い，血小板凝集能の評価は小凝集塊の peak を測定した．全ての測定は自然凝集を避けるため採血後 3 時間以内に行った．また，19 名の対象者においては $5HT_{2A}$ 受容体拮抗薬である ketanserin を用いて高濃度の 5HT（10μM）による血小板凝集を検討した．

4．統計学的検討

各数値は平均±標準誤差で示した．統計処理は遺伝子型，allele 頻度の比較については χ^2 検定，2 群間の数値比較は unpaired student's t 検定を行った．いずれも $p<0.05$ を有意差の判定とした．

〔結果〕

1．$5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型の分布

T102C 及び-1438A/G の遺伝子多型において，T allele 頻度及び A allele 頻度はそれぞれ 0.65，0.67 であった．これは今までの日本人での報告と合致しており，Hardy-Weinberg 平衡を満たしていた．また，これまでの報告と同様に健常者において T102C と-1438A/G 遺伝子多型は有意に連鎖不均衡を示していた（χ^2=80，df=4，$p<0.0001$）．C1354T 遺伝子多型に関しては，本研究の対象者では rare allele は認められなかった．

2．対象者背景

各々の遺伝子多型ごとに性別，年齢，body mass index，血圧，脂質，血糖，5HT 濃度，炎症マーカー（fibrinogen，CRP，SAA）等の対象者背景を比較検討した．全ての血液検査値は正常範囲内であり，-1438A/G 遺伝子多型間の総コレステロール値を除いて各群間で差を認めなかった．-1438A/G 遺伝子多型においては AG+GG 群の総コレステロール値

が AA 群に比し有意に高かった（AA vs. AG+GG; 153.8±4.5mg/dl vs. 169.1±4.9mg/dl, $p<0.05$）が，LDL 値には差を認めなかった（AA vs. AG+GG; 83.7±4.4mg/dl vs. 97.1±5.1mg/dl）．また，PPP 及び PRP 中の 5HT 濃度についても各群間で差を認めなかった．

3．5HT 及び ADP による血小板凝集

1.0μM 以下の 5HT では血小板小凝集しか惹起されなかった．しかし，高濃度の 5HT（10μM）では小凝集だけでなく中凝集及び大凝集も惹起された．10μM の 5HT による血小板凝集は ketanserin で完全に阻害されなかった．これは，10μM の 5HT では凝集した血小板から 5HT 以外の内因性 agonist が放出されているためと考えられた．また，ADP においては 1.0μM 以上で大凝集が惹起された．

4．$5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型と血小板凝集との関連

T102C 遺伝子多型において，TT 型では他の遺伝子型に比べて 1.0μM の 5HT による血小板小凝集が有意に亢進していた（TT vs. TC+CC; 121.6±12.9×10^3 vs. 81.2±9.2×10^3, $p<0.05$）．0.3μM の 5HT による血小板小凝集でも有意ではないが同様の傾向が認められた（TT vs. TC+CC; 28.0±6.8×10^3 vs. 15.3±3.3×10^3, $p=0.06$）．一方，0.1 及び 0.3μM の ADP による血小板小凝集については二群間で差は認められなかった．

-1438A/G 遺伝子多型においては，0.3 及び 1.0μM の 5HT どちらにおいても AA 型で他の遺伝子型に比し有意に血小板小凝集が亢進していた（AA vs. AG+GG; 5HT 0.3 μM: 28.2±6.3×10^3 vs. 14.2±3.2×10^3, $p<0.05$, 5HT 1.0 μM: 119.3±12.2×10^3 vs. 79.7±9.5×10^3, $p<0.05$）．しかし，0.1 及び 0.3μM の ADP による血小板小凝集について差は認められなかった．

〔考察〕

本研究で使用された LS 法を用いた血小板凝集計は近年，Ozaki らによって開発された．このシステムは，古典的な OD 法では測定できなかった血小板凝集の早期に形成される小凝集塊を計測することができ，5HT のような弱い agonist による血小板小凝集を評価するのに非常に有用である．さらに，thrombin などの agonist によって惹起される血小板凝集は小凝集を経て，中凝集や大凝集を引き起こす．すなわち，血小板小凝集塊形成の亢進は血小板の機能亢進状態を意味している．本研究で我々は $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子の T102C 及び-1438A/G 遺伝子多型が 5HT によって惹起された血小板小凝集塊と関連していることを示した．

最近，Kusumi らは日本人健常者において-1438A/G 遺伝子多型と 5HT による血小板内 Ca^{2+}動態との関連を検討し，有意な相関を認めなかったと報告した．この報告は本研究の結果とは乖離しているが，我々は血小板小凝集に注目するために 0.3 及び 1.0μM という低濃度の 5HT による血小板凝集を検討したのに対して，Kusumi らは 10μM の 5HT で血小板反応を検討しており，このことが乖離の一因であると考える．一方，Qi らは血小板凝集と血小板内 Ca^{2+}動態との間に乖離があることを既に報告している．我々の検討では，10μM の 5HT による血小板凝集では小凝集だけでなく中凝集及び大凝集も惹起され，ketanserin によっても完全には抑制されなかった．このことは 10μM の 5HT によって ADP, ATP，5HT，epinephrin，norepinephrine などの血小板内の内因性 agonists が放出されているためと考えられる．高濃度の 5HT 刺激では放出された agonists によって二次的に Ca^{2+} 動態が修飾されている可能性がある．また，血小板細胞膜にある $5HT_{2A}$ 受容体は Ca^{2+}/calmodulin-dependent myosin light chain（MLC）kinase を介して MLC のリン酸化を引き起こすが，最近では thromboxane A2，thrombin，ADP，collagen-related peptide，plasmin，epinephrine，5HT 等の各種 agonist による MLC のリン酸化において，もう一つの系，すなわち Ca^{2+}-independent-Rho-kinase の関与が示されている．従って，5HT による血小板凝集と Ca^{2+}動態との乖離は血小板内の Rho-kinase の活性化による可能性もあると考えられる．

我々は T102C 遺伝子多型の TT 型が非致死性 AMI の発症と関連していることを既に報告したが，TT 型では 5HT に対する血小板の反応性が亢進しており，AMI の発症に影響を与えていると推察している．T102C 遺伝子多型は受容体蛋白のアミノ酸配列を変えないため，血小板凝集に直接関連するような受容体の機能や発現に影響しているとは考えにくい．さらに，T102C と-1438A/G 遺伝子多型は連鎖不均衡を示していたが，T102C でなく-1438A/G promoter 遺伝子多型が $5HT_{2A}$ 受容体の転写に影響し，5HT に対する血小板の反応性を調節している可能性も考えられる．

今後の研究課題として，これら 2 つの遺伝子多型が血小板の $5HT_{2A}$ 受容体蛋白のレベルや濃度に影響するかどうかを細胞分子生物学的に検討する必要がある．

本研究の結論として，日本人の健常者において $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子の T102C 遺伝子多型及び-1438A/G 遺伝子多型と 5HT による血小板凝集能とが関連していることが明らかとなった．

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1575 号	氏 名	清水 政克
論文題目	Serotonin-2A receptor gene polymorphisms are associated with serotonin-induced platelet aggregation セロトニン 2A 受容体遺伝子多型はセロトニンによる血小板凝集と関連する		
審査委員	主 査 熊谷俊一 副 査 西尾久英 副 査 大北裕		
審査修了日	平成 16 年 2 月 27 日		

（要旨は 1,000 字～2,000 字程度）

〔緒言〕

活性化した血小板から放出されたセロトニン（5HT）はその特異的な受容体を介して，特に心血管系において種々の異なる生理作用を引き起こす．これら 5HT 受容体はその構造や特徴から $5HT_1$ から $5HT_7$ までの 7 つのクラスに分けられている．それらのうちで特に $5HT_2$ 受容体はその機能に関してよく知られており，血小板の $5HT_2$ 受容体の活性化は血小板凝集を引き起こすことが分かっている．

近年の分子生物学の進歩により $5HT_2$ 受容体は 3 つのサブタイプ（$5HT_{2A}$，$5HT_{2B}$，$5HT_{2C}$）に分類され，ヒトの血小板には $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子が発現していることが明らかとなった．$5HT_{2A}$ 受容体遺伝子（13q14-q21）には 2 つの遺伝子多型（exon1 の T102C と promoter 領域の-1438A/G）が存在することが知られており，我々は $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型の T102 ホモ接合型（TT 型）が非致死性急性心筋梗塞（AMI）の独立した危険因子であることを既に報告した．この報告は，T102C 遺伝子多型がアミノ酸配列を変化させないにも関わらず $5HT_{2A}$ 受容体の機能に影響している可能性を示唆している．また，この遺伝子多型がどこか他の場所の機能的遺伝子多型と連鎖不均衡にある可能性も指摘されており，今までに T102C 遺伝子多型が promoter 領域の-1438A/G 遺伝子多型と非常に強い連鎖不均衡にあることが示されている．これらの報告は T102C 遺伝子多型及び-1438A/G 遺伝子多型が，両者もしくは単独で，$5HT_{2A}$ 受容体の機能に影響していることを強く示唆している．

一方，血小板機能を評価することは臨床上非常に有用である．しかしながら 5HT によって惹起される血小板凝集は非常に弱く可逆的であるため，古典的な透過光（optical density；OD）法を用いた血小板凝集計では定量評価できなかった．近年の技術的進歩により開発されたレーザー散乱光（laser-light scattering；LS）法を用いた血小板凝集計は非常に鋭敏であり，5HT のような弱い agonist による血小板小凝集の形成を定量的に評価することができる．近年，血小板凝集が起こる過程において，小凝集塊を経て中凝集塊や大凝集塊が起こることが示されており，血小板凝集の初期段階である小凝集を評価することがより重要であると考えられている．

本研究の目的は，日本人健常者における $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型と 5HT による血小板凝集との関連の検討を行うことである．

〔対象及び方法〕

44 人の非喫煙健常者（男性 35 名，女性 9 名，平均年齢 26.5±1.6 歳）を対象として本研究を行った．採血は血小板機能の日内変動や食事による影響を避けるため，空腹状態で午前 8 時から 10 時の間に行った．

血小板凝集は LS 法を用いて血小板小凝集塊を測定することの血小板凝集計 PA-200（Kowa, Tokyo, Japan）を使用して行った．血小板凝集の惹起には 5HT（0.3, 1.0μM）及び（ADP 0.1, 0.3μM）を用い，血小板凝集能の評価は小凝集塊の peak を測定した．全ての測定は自然凝集を避けるため採血後 3 時間以内に行った．

〔結果〕

T102C 及び-1438A/G の遺伝子多型において，T allele 頻度及び A allele 頻度はそれぞれ 0.65, 0.67 であった．これは今までの日本人での報告と合致しており，Hardy-Weinberg 平衡を満たしていた．また，これまでの報告と同様に健常者において T102C と-1438A/G 遺伝子多型は有意に連鎖不均衡

を示していた（χ^2=80, *df*=4, p<0.0001）.

T102C 遺伝子多型において，TT 型では他の遺伝子型に比べて 1.0μM の 5HT による血小板小凝集が有意に亢進していた（TT vs. TC+CC; 121.6±12.9×10^3 vs. 81.2±9.2×10^3, p<0.05）. 0.3μM の 5HT による血小板小凝集でも有意ではないが同様の傾向が認められた（TT vs. TC+CC; 28.0±6.8×10^3 vs. 15.3±3.3×10^3, p=0.06）. 一方，0.1 及び 0.3μM の ADP による血小板小凝集については二群間で差は認められなかった.

-1438A/G 遺伝子多型においては，0.3 及び 1.0μM の 5HT どちらにおいても AA 型で他の遺伝子型に比し有意に血小板小凝集が亢進していた（AA vs. AG+GG; 5HT 0.3 μM: 28.2±6.3×10^3 vs. 14.2±3.2×10^3, p<0.05, 5HT 1.0 μM: 119.3±12.2×10^3 vs. 79.7±9.5×10^3, p<0.05）. しかし，0.1 及び 0.3μM の ADP による血小板小凝集について差は認められなかった.

〔考察〕

本研究で使用された LS 法を用いた血小板凝集計は近年，Ozaki らによって開発された．このシステムは，古典的な OD 法では測定できなかった血小板凝集の早期に形成される小凝集塊を計測することができ，5HT のような弱い agonist による血小板小凝集を評価するのに非常に有用である．さらに，thrombin などの agonist によって惹起される血小板凝集は小凝集を経て，中凝集や大凝集を引き起こす．すなわち，血小板小凝集塊形成の亢進は血小板の機能亢進状態を意味している．本研究で我々は $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子の T102C 及び-1438A/G 遺伝子多型が 5HT によって惹起された血小板小凝集塊と関連していることを示した.

我々は T102C 遺伝子多型の TT 型が非致死性 AMI の発症と関連していることを既に報告したが，TT 型では 5HT に対する血小板の反応性が亢進しており，AMI の発症に影響を与えていると推察している．T102C 遺伝子多型は受容体蛋白のアミノ酸配列を変えないため，血小板凝集に直接関連するような受容体の機能や発現に影響しているとは考えにくい．さらに，T102C と-1438A/G 遺伝子多型は連鎖不均衡を示していたが，T102C でなく-1438A/G promoter 遺伝子多型が $5HT_{2A}$ 受容体の転写に影響し，5HT に対する血小板の反応性を調節している可能性も考えられる.

今後の研究課題として，これら 2 つの遺伝子多型が血小板の $5HT_{2A}$ 受容体蛋白のレベルや濃度に影響するかどうかを細胞分子生物学的に検討する必要がある.

本研究は，血小板における $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型について，その血小板凝集能に対する影響を研究したものであるが，従来ほとんど行われなかった $5HT_{2A}$ 受容体遺伝子多型の機能的意義について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める．よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める.

最終試験の要旨

受付番号	甲第 1575 号　氏名 清水 政克
審査委員	主査 熊谷俊一 副査 西尾久英 副査 大北裕
試問実施日	平成 16 年 2 月 29 日

（試問の方法、質問及び解答の要旨）

学科目について

3 委員から以下の項目について、口頭による試問が行われた。

西尾委員
1) 本論文で用いている laser-light scattering(LS)法を用いた血小板凝集計は、方法論として確立されたものか？
2) ADP による血小板凝集においても、5HT2A 受容体遺伝子に基づいた血小板凝集能に差があるように見えるが、その点は如何か？
3) 2 つの 5HT2A 受容体遺伝子多型は血小板の 5HT2A 受容体の density に影響しているのか？

大北委員
1) Serotonin と急性冠症候群との関連
2) LS における血小板小凝集塊
3) ADP 凝集との違い、その意味

熊谷委員
1) 多型性と 5-HT2A ﾚｾﾌﾟﾀｰ発現量との関連は証明されているか。
2) ｾﾛﾄﾆﾝによる血小板凝集機構を説明せよ。
3) ｾﾛﾄﾆﾝによる血小板凝集は、実際の心筋梗塞の発現にどの程度関わっていると考えられるか。

結論の要旨

上記の問題に対して、明確な解答が得られたので、合格と判定した。