

高血圧発症関連遺伝子群の解明

●羽田 明¹⁾ ●蒔田芳男²⁾ ●菊池健次郎²⁾ ●井ノ上逸朗³⁾ ●島本和明⁴⁾ ●藤原拓也⁵⁾ ●梅村 敏⁶⁾
 ●杉山卓郎⁷⁾ ●江藤胤尚⁸⁾ ●塩飽邦憲⁹⁾ ●並河 徹⁹⁾ ●高橋規郎¹⁰⁾

1) 千葉大学大学院医学研究院 2) 旭川医科大学 3) 東京大学医科学研究所 4) 札幌医科大学 5) 岩手医科大学
 6) 横浜市立大学 7) 朝日生命成人病研究所 8) 宮崎大学 9) 島根大学 10) 放射線影響研究所 (広島)

＜研究の目的と進め方＞

本研究の目的はヒト集団を利用して代表的な生活習慣病のひとつである本態性高血圧の発症関連遺伝子および疾患に関連するSNPsを同定する事である。最終的には、個々人のデジタル化した遺伝素因、環境要因、生活習慣を入力することにより、将来の健康状態を予測し、健康を維持するあるいは増進するオーダーメイド個別健康管理システムの開発をめざす。

これまで、本態性高血圧の発症関連遺伝子に関する研究は多い。集団を使った症例対照研究が中心であるが、必ずしも他の集団で結果が再現されているわけではない。その中でこれまで、異なる人種でも結果が再現されたものにアンジオテンシノーゲン (AGT) 遺伝子がある。これは候補遺伝子アプローチによる白人集団の罹患同胞対法で関与が示され、遺伝子内SNPsによる症例対照研究で日本人でも関与が認められたものである。

本研究ではAGT以外の発症関連遺伝子を明らかにするために、候補遺伝子アプローチとゲノムワイドスクリーニングを同時に行う方法を採用した。研究の大前提は質の高いヒト集団の多数検体収集である。そこで、全国規模の循環器内科専門医の協力を得て、検体収集システムを構築することを最初の目標とした。本プロジェクト開始と前後して、ヒトゲノム解析研究の指針が出されたので、その指針に適合する形での収集システムとした。

ゲノムワイドスクリーニングでは、本プロジェクト内で高血圧部会をたちあげ、そこに参加する形で貢献する事にした。ゲノムワイドスクリーニングとして、ゲノムワイドSNPs関連解析と全ゲノムマイクロサテライト関連解析である。具体的な参加方法は症例提供である。

一方、多数の候補遺伝子をスクリーニングする、候補遺伝子アプローチにより、関連遺伝子を解明する手法を我々の研究グループでおこなうことにした。候補遺伝子は、食塩感受性遺伝子が候補遺伝子となりうることから、高塩分食投与群と低塩分食投与群のマウスを、6ヶ月程度の長期にわたり飼育し、腎臓の発現が変化する遺伝子をDNAチップにより網羅的探索で見つけ出すことを試み、結果を参考に候補遺伝子を選んだ。それ以外に、これまでの報告から文献の検索をおこない、候補遺伝子を選択した。選んだ候補遺伝子を構築されつつある日本人SNPデータベース (J-SNP) の情報を基に、ハプロタイプで関連を探索していく方法を採用した。他の高血圧グループとも共同して個々の遺伝子の関与を検討する。

＜研究開始時の研究計画＞

研究開始時の研究計画を以下の項目ごとに記載する。

- ① 全国レベルの大規模症例収集
- ② ゲノムDNAの増幅
- ③ 候補遺伝子の選択
- ④ 候補遺伝子のハプロタイプ解析
- ⑤ 候補遺伝子の関連解析
- ⑥ 多型頻度の地域比較

①全国レベルの症例収集に関して

高血圧症例1000例以上、正常対照1000例以上を全国の共同研究者の協力を得て収集し、遺伝性の強いと考えられる厳選した症例、対照各200例を選ぶ。

正確な臨床情報が把握できる協力者の試料を集めるため、本態性高血圧症例の収集は、循環器内科医を中心に依頼することにする。その為に循環器内科医所属施設を訪問して協力を要請する。協力が得られた施設に関して、研究に関する生命倫理申請書の準備、症例の選択基準、検体採取方法などの説明し、収集体制を整える。正常対照例は主に住民健診で収集する。

本態性高血圧の診断基準は以下のとおりである。

- ア) 収縮期血圧 140mmHg and/or
 イ) 拡張期血圧 90mmHg以上

除外項目は

- 二次性高血圧
- 65歳以上の発症
- 高血圧発症前の糖尿病、腎障害 (高血圧発症後の糖尿病、腎障害は含む)

収集した臨床情報、生活習慣情報は以下のとおりである。

- 性
- 年齢
- 身長および体重
- 高血圧あるいは脳卒中の家族歴
- 発症年齢
- 治療開始年齢
- 現在の治療 (各薬剤療法を中心に)
- 喫煙、飲酒
- 検査データ (総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、血漿クレアチニン、尿酸、 γ GTP、タンパク尿の有無、HbA1c)
- 循環器合併症の有無 (脳血管疾患、心疾患、糖尿病性腎症、血管病、進行した高血圧網膜症、心肥大)
- その他の疾患の有無
- その他の治療薬

②ゲノムDNAの増幅

特に住民健診で収集する試料は量が限られているため、遺伝子タイピングをしていく上で枯渇が心配となる。そこで、報告のあるDOP-PCR法を参考にして、増幅条件を検討し、通常のタイピングは増幅したDNAで解析をおこなうことにする。

③候補遺伝子の選択

塩分負荷の効果を顕著にするために、AGT遺伝子改変マウスを用いる。North Carolina大学、Oliver Smithies教授の研究室で作成された、AGT遺伝子のコピー数を増やしたマウスと欠損したマウスの供与を受ける。掛け合わせにより、コピー数がそれぞれ4個、3個、2個 (野生

型)、1個のマウスを得る。食塩負荷は飼料中の塩分濃度で調整する。通常の飼料中塩分濃度は0.8%であるが、低食塩飼料として0.3%、高塩分飼料として8%を飼料会社に特注し準備する。負荷期間は本態性高血圧が慢性疾患であることを考え、6ヶ月間とした。血圧測定はtail cuff法で実施する。6ヶ月齢で腎臓を取り出し、RNAを抽出する。コピー数と飼料のいくつかの組合せでRNA発現量の増減をDNAマイクロアレイで解析し、塩分負荷により発現の増加した遺伝子、減少した遺伝子から候補遺伝子を抽出する。抽出した遺伝子のヒトホモログをヒト塩分感受性本態性高血圧に關与する候補遺伝子とした。

また、これまで多くの遺伝子が、高血圧発症遺伝子として報告されてきている。AGT遺伝子以外の再現性ははっきりしない。これまで関連を報告されている遺伝子のうち、腎で発現し、電解質、水分調節に關与する遺伝子群を中心に、関連の可能性が高いと思われる遺伝子を本研究の対象とする。マウスの実験から得られた候補遺伝子と併せて、100個以上の選出を計画する。

④ハプロタイプ解析

候補遺伝子の解析は、各遺伝子のハプロタイプ関連解析でおこなうことを基本戦略とする。その為に、候補遺伝子のSNP登録データを、日本人SNPデータベースであるJ-SNPを中心に情報を得て解析をおこなう。具体的には以下の手順でおこなう。

- 1) 選択した候補遺伝子ごとに7-10個のSNPをデータベースより抽出する。
- 2) 選んだSNPsの日本人での頻度と連鎖不平衡の状況を見るため、16人(32 allele)の日本人DNAを鋳型として塩基配列を決定する。
- 3) 解析によりハプロタイプ構築に適したSNPを3-4個選ぶ。この際、以下の3つの基準を満たした場合、ハプロタイプ構築完了とする。
 - ア) マイナーアレル頻度 10%以上、
 - イ) SNPs間の連鎖不平衡 $r^2 < 0.5$ 、
 - ウ) 最多ハプロタイプ頻度 60%以下。

⑤候補遺伝子の関連解析

各SNPとハプロタイプの関連解析をおこなうために、SNPタイピングをおこなった。Pyrosequence法を中心的な手法として、上記収集検体から以下の基準を満たした症例と対照、200例ずつを対象としてタイピングする。

高血圧症例の選択基準

- ア) 男性
- イ) 第一度近親に高血圧の家族歴がある
- ウ) 60歳以前に発症
- エ) BMIが25以下

正常血圧対照

- ア) 男性
- イ) 50歳以上
- ウ) BMIが22以上

本研究は、新たな高血圧候補遺伝子を見つけ出すことが最大の目標であるので、対照群の年齢、BMIは高血圧症例群とは同一にせず、年齢が高く、肥満傾向であっても発症していない群とした。性別は更年期に血圧が一定しない例もある女性を除いて男性のみとした。

結果の解析はSNPAllyze Proソフトウェア(ダイナコム)を使用する。

⑥多型頻度の地域比較

日本人は均一な集団で、人種のるつぼであるアメリカ

合衆国よりも、生活習慣病の発症関連遺伝子を明らかにするうえで有利であると考えられる。しかし、多型頻度に日本においても地域差がある可能性を検証するべきであると考え、全国規模で収集した検体を使って、マイクロサテライト、SNPsの多型頻度における地域差を検証する。

以上が我々のグループ内で進める候補遺伝子アプローチの概略であるが、その他にゲノムワイドスクリーニングのための検体を我々が収集した検体から提供する事にする。

〈研究期間の成果〉

①全国レベルの症例収集に関して

循環器内科外来を中心にした症例収集に加え、地域及び職域の疫学集団を対象に検体を収集した。内科外来では旭川、札幌、岩手、東京、横浜、島根、宮崎、沖縄の大学および病院のご協力を得た。また、地域集団では、道東B町、函館、島根、広島、熊本の市町村、健診団体のご協力を得た。その結果、最終的には高血圧症例約1600検体、地域、職域集団からは2200検体を得た。後者の集団内には本態性高血圧も含んでいる。

この集団から関連解析をおこなうため、当初計画での選択基準で、症例、対照、各200例を抽出した。

②ゲノムDNAの増幅

上記抽出したDNAを使って、タイピングをおこなうことにしたが、一部のDNAは少量で、大規模なスクリーニングをすると枯渇する可能性が高かった。そこで、ゲノムDNAの増幅を試みた。試みた方法はDOP-PCR法で、以下の実験手法で条件検討をおこなった。

反応液の組成

- Primer: 5'-CCGACTGAGNNNNNNATGTGG-3'
- Reaction mixture
 - ▶ 200ng template DNA
 - ▶ 4 μ M primer
 - ▶ 250 μ M dNTPs
 - ▶ 1XPCR buffer
 - ▶ 2.5 units Taq (TAKARA) /in 50 μ l reaction

反応条件

- 94度 30秒→30度2分→68度7分 10サイクル
- 94度 30秒→60度2分→68度7分 25サイクル

希釈実験とタイピング実験での有用性

- 開始時点でDNA濃度は4.0ng/ μ lであるが、増幅後、40倍希釈、すなわち0.1ng/ μ lまでDNA塩基配列決定に使うことができた。しかし安定したPCR可能な希釈レベルは10倍程度、増幅開始時点でのDNAレベルは0.4ng/ μ lであった。SNPタイピングに使うには全く問題なく、本研究の大規模タイピングには使用可能であることがわかった。
- マイクロサテライトDNAのタイピングにも使用可能かどうかを検討した。その結果、本来の増幅バンド前後のバンドが増える傾向にあったが通常のタイピングには使用可能である場合が多かった。しかし、厳密な実験にはやはり、信頼性に劣ることがわかった。

以上の実験結果から、本研究のタイピング実験にはDOP-PCRによるDNA増幅検体を使用することにした。

③候補遺伝子の選択

長期にわたる塩分負荷により、マウス腎臓で発現が変

化した遺伝子のうち、候補となりうると判断したのは以下の遺伝子である。

発現が増加した遺伝子

- syntaxin binding protein 1
- insulin-like growth factor binding protein 5
- CD36 antigen
- FXYP domain-containing ion transport regulator 2
- Ttk protein kinase
- death-associated kinase 3
- tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)
- claudin 4
- carbonic anhydrase 4

発現が減少した遺伝子

- steroidogenic acute regulatory protein
- kallikrein 26
- thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)
- solute carrier family 12, member 1
- villin 2
- angiopoietin-like 2
- cytochrome P450, 2b19
- epidermal growth factor
- guanine nucleotide binding protein (G protein) , gamma transducing activity polypeptide 2
- heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD)
- hepatoma-derived growth factor, related protein 3
- hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1
- latent transforming growth factor beta binding protein 2
- leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
- molybdenum cofactor synthesis 2
- nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage
- placental growth factor
- platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
- proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1
- serine/threonine kinase 19
- solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters) , member 2
- solute carrier family 26, member 4
- tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18
- tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
- WW domain binding protein 1

これらのマウス遺伝子のヒトホモログを検索した。その結果、ヒトホモログが存在しない遺伝子もあり、リストから除いた。

次に、文献上、興味深い遺伝子、腎臓で発現がある遺伝子を中心にリストに加え、最終的に121個の遺伝子を候補とした。候補とした遺伝子は以下のとおりである。

1. WNK lysine deficient protein kinase 1
2. WNK lysine deficient protein kinase 4
3. TNF superfamily member 11b
4. aromatic L-amino acid decarboxylase
5. dopamin receptor D1
6. dopamin receptor D1B

7. Dopamine-beta-hydroxylase
8. Dopamine receptor D3
9. aquaporin-2 (collecting duct)
10. aquaporin-1 (proximal)
11. aquaporin-3 (collecting duct)
12. aquaporin-4 (medullary collecting duct)
13. aquaporin-6 (podocyte)
14. Adducin-1, alpha
15. Adducin-2, beta
16. Adrenomedullin
17. solute carrier family 16, member 1
18. SOLUTE CARRIER FAMILY 16, MEMBER 7
19. SOLUTE CARRIER FAMILY 21, MEMBER 3 (OATP)
20. Solute carrier family 12 member 1
21. Solute carrier family 12 sodium/potassium/chloride transporters)
22. HUT2
23. Solute carrier family 18 (vesicular monoamine) , member 1
24. Solute carrier family 19 (folate transporter) , member 2
25. Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter) ,member 2
26. Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocytemembrane protein band 3, Diego blood group)
27. Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin) ,member 2
28. Solute carrier family 8, member 1 (sodium-calcium exchanger-1)
29. Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger) , isoform 1 (antiporter, Na+/H+, amiloride sensitive)
30. Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger) , isoform 3
31. Sodium channel, nonvoltage-gated 1, alpha
32. Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta
33. Sodium channel, voltage-gated, type I, delta polypeptide
34. Sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma
35. ATPase, Na+K+ transporting, alpha-1 polypeptide
36. Angiotensin converting enzyme 2
37. Chloride channel-5
38. Chloride channel, kidney, B
39. Glycogen synthase
40. glycogen synthase 2
41. Kininogen
42. Kallikrein 1
43. Kallistatin
44. beta-2-adrenergic receptor
45. Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1
46. Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11
47. Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6
48. Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1
49. Nephren
50. Nephrocystin
51. Natriuretic peptide precursor B

52. Natriuretic peptide precursor C
53. Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A
54. Natriuretic peptide receptor C
55. SAPK/ERK kinase-1
56. syntaxin binding protein 1
57. insulin-like growth factor binding protein 5
58. CD36 antigen
59. cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 1
60. FXFD domain-containing ion transport regulator 2
61. death-associated kinase 3
62. ribosomal protein S4, X-linked
63. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)
64. claudin 4
65. carbonic anhydrase 4
66. ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) , subunit 1
67. Ttk protein kinase
68. synuclein, alpha
69. glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)
70. gap junction membrane channel protein beta 2
71. granzyme B
72. calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase
73. phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent
74. vascular endothelial growth factor C
75. prostaglandin E receptor EP4 subtype
76. parvalbumin
77. nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6
78. vaccinia related kinase 1
79. serine/threonine kinase 6
80. kit ligand
81. SFFV proviral integration 1
82. calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit
83. carbonic anhydrase 3
84. fatty acid binding protein 4, adipocyte
85. uncoupling protein, mitochondrial
86. splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SRp40, HRS)
87. steroidogenic acute regulatory protein
88. kallikrein 26
89. thyroid hormone responsive SPOT14 homolog
90. angiotensin-like 2
91. calpain 10
92. CD97 antigen
93. CDC-like kinase
94. cytochrome P450, 2b19
95. guanine nucleotide binding protein (G protein) , gamma transducing activity polypeptide 2
96. heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD)
97. hepatoma-derived growth factor, related protein 3
98. hyaluronidase 1
99. hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1
100. kinesin family member 21B
101. latent transforming growth factor beta binding protein 2
102. leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
103. maternally expressed gene 3
104. molybdenum cofactor synthesis 2
105. nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage
106. placental growth factor

107. platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
108. preproacrosin
109. proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1
110. protein C receptor, endothelial
111. serine/threonine kinase 19
112. solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters) , member 2
113. solute carrier family 22 (organic cation transporter) , member 1-like
114. solute carrier family 26, member 4
115. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18
116. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
117. vesicle-associated membrane protein 3
118. villin 2
119. WW domain binding protein 1
120. receptor (calcitonin) activity modifying protein 2
121. estrogen receptor 2 (ER beta)

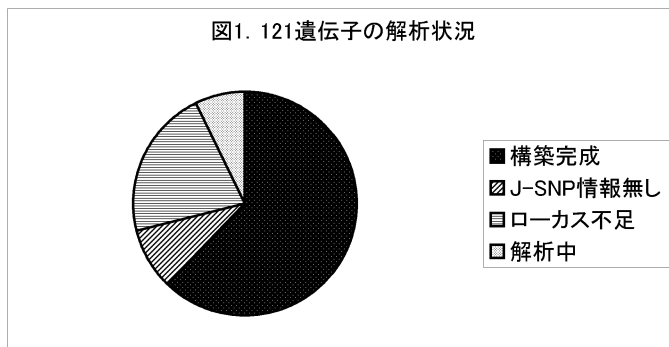
④ハプロタイプ解析

選択した121個の遺伝子に関して、JSNPを中心とするデータベースより、遺伝子近傍のSNPを選び出した。しかし、データベースにSNPの登録がない遺伝子、あっても登録SNP数が少ないもの、良好な塩基配列結果が得られない遺伝子があり、全てに関して解析できたわけではない。

次のステップであるハプロタイプ関連解析まで進むことができたのは121遺伝子中73個であった。8個についてはSNPがデータベースにあり、タイピングができたものの、ハプロタイプ構築基準である、ア) マイナーアレル頻度 10%以上、イ) SNPs間の連鎖不平衡 $r^2 < 0.5$ 、ウ) 最多ハプロタイプ頻度 60%以下、を満たすことができなかった。すなわち、マイナーアレル頻度が5%以下であった、連鎖が強すぎて、ハプロタイプ構築に役に立たなかったなどである。その他の遺伝子の大部分はデータベースに登録されたSNPsの数が少ない、または全く登録が無かったことで、ハプロタイプ構築ができなかった。図1は内訳をグラフ表示にしたものである。

以上のデータから、ハプロタイプ関連解析を、発症関連遺伝子の戦略として使う場合、この時点では60パーセント程度の遺伝子しか、対象にならないことがわかった。

図1. 121遺伝子の解析状況



しかし、現在のようにHapMapプロジェクトが終了し、多くのSNPおよび連鎖不平衡マップ情報が得られる状態であれば、JSNP情報無しやローカス不足部分に大幅な改

善が見込まれると思われる。

以後の解析はハプロタイプ構築が完了した73遺伝子の
みについておこなった。

1. platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
2. parvalbumin
3. steroidogenic acute regulatory protein
4. preproacrosin
5. aquaporin-1 (proximal)
6. aquaporin-3 (collecting duct)
7. aquaporin-4 (medullary collecting duct)
8. Dopamine-beta-hydroxylase
9. Glycogen synthase
10. latent transforming growth factor beta binding protein 2
11. Sodium channel, voltage-gated, type I, delta polypeptide
12. Solute carrier family 8, member 1 (sodium-calcium exchanger-1)
13. Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3
14. Ttk protein kinase
15. syntaxin binding protein 1
16. protein kinase, lysine-deficient 1
17. CD97 antigen
18. FXFD domain-containing ion transport regulator 2
19. villin 2
20. Adducin-1, alpha
21. Adducin-2, beta
22. calpain 10
23. Kallistatin
24. Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1
25. Ttk protein kinase
26. insulin-like growth factor binding protein 5
27. Nephrocystin
28. Sodium channel, nonvoltage-gated 1, alpha
29. Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta
30. Solute carrier family 12 sodium/potassium/chloride transporters)
31. Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
32. Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2
33. calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit
34. maternally expressed gene 3
35. WW domain binding protein 1
36. nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6
37. placental growth factor
38. granzyme B
39. serine/threonine kinase 19
40. serine/threonine kinase 6
41. solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1-like
42. Sodium channel, nonvoltage-gated 1, alpha
43. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
44. vascular endothelial growth factor C
45. angiotensin-like 2
46. ATPase, H⁺ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), subunit 1

47. CDC-like kinase
48. guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 2
49. protein C receptor, endothelial
50. thyroid hormone responsive SPOT14 homolog
51. WNK lysine deficient protein kinase 4
52. aquaporin-2 (collecting duct)
53. beta-2-adrenergic receptor
54. catalase
55. CD36 antigen
56. Kallikrein 1
57. Sodium channel, voltage-gated, type I, delta polypeptide
58. Natriuretic peptide receptor C
59. Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1
60. nitric oxide synthase 3
61. estrogen receptor 2 (ER beta)
62. carbonic anhydrase 3
63. estrogen receptor 2
64. hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1
65. heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD)
66. solute carrier family 26, member 4
67. vesicle-associated membrane protein 3
68. Chloride channel, kidney, B
69. Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6
70. Kininogen
71. Solute carrier family 12 member 1
72. Solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1
73. kit ligand

⑤候補遺伝子の関連解析

ハプロタイプ構築が完成したもののから、順次、パイロシークエンスおよびシークエンシングによりタイピングを進めた。その後、東京大学徳永研でタイピング支援チームが整備された事により、高血圧部会として以後の大規模タイピングはすべて東大でおこなわれた。

タイピング対象検体として、我々からは3回に分けて提供した。1回目は症例、対照、各192例、2回目は横浜市立大からの症例66例、対照110例、3回目は広島放射線影響研究所から症例169例、対照193例である。その他、他の高血圧グループのうち、愛媛大学から、集団1として症例146例、対照136例、集団2として、対照153例、対照170例、大阪大学の症例238例、対照189例、日本大学の症例159例、対照153例である。当初の解析は、後から追加したため、まだ、タイピングが終了していない横浜市大、広島放影研からの検体を除いた、症例888例、対照840例でおこなった。

73遺伝子のうち、高血圧発症との関連がほぼ否定された遺伝子は40種類であった。SNP単独でもハプロタイプ関連解析でも有意にはならなかった事がその根拠である。タイピングしたSNPが少ない、あるいは5%水準では有意ではないが、完全には否定できない遺伝子は17種類であったが、これらは陰性として処理した。残りの16遺伝子はSNP単独、ハプロタイプ単独、あるいは双方で有意となった。しかし、多重比較の補正をおこなうと陰性となる遺伝子も含まれている。

高血圧部会で収集した検体は、集団によって対象が異なる。我々の提出した検体は全国から収集し、前述の選

択基準で抽出したので、男性のみである。他の集団では愛媛集団2のように職域で収集したもの、地域集団、広島のコホート集団など性、地域、年齢も様々である。得られた臨床情報も均一ではないので、性および地域の要因を入れて結果を見直すことにした。すなわち個々のハプロタイプ関連解析を、全体、男性のみ、女性のみ、対照群および症例群における地域差および性差の有無、性差ごとの対照、症例群の地域差などを検討した。

解析対象は73遺伝子のうち、2個以上のSNPsタイプピングデータが利用できる、言い換えればハプロタイプ関連解析ができる69遺伝子である。ハプロタイプ関連解析には、contingency table法とhaplotype inference法がある。一般に、contingency table法では、結果が陽性になる事が多いので、まず前者で解析し、可能性があるものをhaplotype inference法による解析に回すことにした。これは後者が解析に時間がかかるためである。ハプロタイプは利用できるSNPs全部を使って組むことにした。複数のLDブロックにまたがっている場合、結果がfalse negativeになる可能性は否定できないが、スクリーニングであるのでやむを得ないと判断した。

contingency table法の解析の結果、permutation p valueが0.05以下となったものをpositiveとすると、全体でpositiveになったものは合計12遺伝子、男性および女性でpositiveになったのは、それぞれ12個と23個であった。全体と男性でpositiveになったものは9個、全体と女性でpositiveになったものは5個、全てでpositiveになったのは3個であった。

この結果から、性差の存在が示唆されたため、対照群および症例群でハプロタイプ頻度の性差を調べた。その結果、対照群で性差があったもの ($P < 0.05$) は16遺伝子、症例群で性差があったものは12遺伝子であることがわかった。

次にcontingency table法でpositiveである可能性のあるものを大きめにピックアップし、46遺伝子に関して、haplotype inference法でハプロタイプ関連解析をおこなった。その結果、全体でpositiveになったものは6遺伝子、男性でpositiveになったものは5遺伝子、女性では4遺伝子であった。全体および男性でpositiveになったのは4遺伝子、全体と女性では1遺伝子、3者ともpositiveになったのは1遺伝子であった。いずれかでpositiveになったものは合計10遺伝子である。

今後この10遺伝子を中心に詳細な解析を進める計画である。現在、取り組んでいるのは3遺伝子であるが、いずれも、高血圧で多いハプロタイプと正常血圧で多いハプロタイプがある。例えば、Bi遺伝子において、表1のハプロタイプ「1000」は高血圧の疾患ハプロタイプ、「0100」は正常血圧のハプロタイプと考えられる。最初に取り組んだ2遺伝子では、高血圧に多いハプロタイプの症例8人、正常血圧に多いハプロタイプの対照8人において、その遺伝子領域の全シーケンスをおこない、A遺伝子は9.9 kbの遺伝子領域に新たに32個、B遺伝子は47kbの領域に146個のSNPを見いだした(表2)。B遺伝子では、イントロン3の5'側にLDブロックの境目があることがわかった。そこでこのブロックに存在する36SNPsをタイプピングし、どのSNPが疾患発症に関与しているのか明らかにしたい。また、高血圧の疾患ハプロタイプの機能解析のため、ゲルシフトアッセイによる可能性のあるSNPに結合する因子の解析、コンストラクトを作成後、ルシフェラーゼアッセイによるプロモーター、エンハンサーなどの解析を進めている。

3番目の遺伝子に関しては、そのリガンドとなる遺伝

子との相互作用を考え、両遺伝子の解析を進めている。

⑥多型頻度の地域比較

今回のプロジェクトでは全国的なネットワークで検体を収集してきた。高血圧部会が結成され、検体をもちより大量タイプピングをおこなってきたが、その前にも我々自身で集めた検体で多型頻度の地域差を調べてみた。使用した検体は、熊本、島根、北海道の3地域である。SNPsとマイクロサテライトの両多型を調べたところ、ほとんど同頻度の多型がある一方、明らかに有意な頻度差が存在する多型があった(図3~図5)。Biallelic多型としてAGT遺伝子のM235T多型とACE遺伝子のI/D多型を調べたが、いずれの地域でも有意な差はなかった(図4)。しかし、3種類のマイクロサテライト多型のうち、OPG遺伝子近傍の多型では明らかに地域差があることがわかった。

その為、高血圧部会での解析結果でも地域差を調べた。前の項で述べたハプロタイプ頻度の解析でおこなった。Contingency table法の解析結果では、対照群全体で $p < 0.05$ を有意とすると69遺伝子中16遺伝子、症例群全体では21遺伝子に有意差があるとの結果となった。 $P < 0.001$ を有意としても対照群で6遺伝子、症例群で3遺伝子に地域差が認められる。この有意差が何を意味するのか、単なるサンプルバイアスなのか、あるいは実際の集団に差があるのかは今回の結果だけでははっきり言うことはできない。今後の検討課題であろう。今回のプロジェクトでも症例群と対照群は必ずしも同じ地域の集団ではない。有意差が地域差によって出てくることもあり得るので、今後の検討課題であると思われる。

高血圧部会としてSNPsおよびマイクロサテライト多型のゲノムワイドスクリーニングに参加したが、有望な領域の検出には至らなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本態性高血圧の発症関連遺伝子同定は世界中で難航している。いまだにアンジオテンシノーゲン遺伝子に続く多くの集団で確認された遺伝子が見つからない。米国では大規模な本態性高血圧の罹患同胞対解析が進められたが、結局、新しい遺伝子の同定には至らなかった。原因のひとつとして、集団の肥満の頻度が高すぎる事が考えられる。疫学的にも、肥満と飲酒は高血圧発症の大きな危険要因であることが知られている。

我々はこのプロジェクトを始めるにあたって、日本人集団は米国ほど肥満の頻度が高くなく、肥満による高血圧発症関連遺伝子解明へ影響は少ないので、有利であろうと考えた。今回の臨床検体として、本研究の様な厳しい基準で選んだ報告は国際的にも少ない。その為、本研究で、ある程度以上の強さを持つ遺伝子であれば、検出できることが期待される。また、その有効性はさておき、ハプロタイプ関連解析を主要な戦略としておこなった研究は少ない。今回の研究で、感受性遺伝子として可能性があると考えられる10遺伝子のうち、本物があることを期待して解析を進めていきたい。

アイスランドのdeCode社の連鎖解析による高血圧発症関連遺伝子の領域特定が感受性遺伝子単離につながる期待が持てるかも知れない。いずれにしても、本態性高血圧に遺伝要因が関与していることは間違いないが、あまりにも多くの遺伝子が関与しているので、現在のような血圧だけの枠組みで症例を収集していたのでは遺伝子にたどり着くのは難しいのかもしれない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本プロジェクトの開始時は、ヒト検体収集の為の「ヒトゲノム解析研究の倫理指針」が実施された直後であった。しかし、その内容に沿った倫理申請書をどの様に記載するのがよいか、研究に協力していただく参加者の方から、どの様な手順でインフォームド・コンセントを得れば良いのかなど、ほとんど何も決まっていなかったため、手探りの状態であった。また、各施設の倫理委員会も未整備のところが多く、委員の経験も少なかった。その為、本研究のような多施設共同研究での検体収集は始めるまで多大な時間が必要であり、目標を達成するのはかなりの努力を要した。その割には、多くの研究者の協力により、検体収集は順調に進んだと評価している。

この5年間のタイピング技術の進歩も大きかった。協力者から得られる血液の量は限られている一方、タイピングに要するDNAの量は現在よりもはるかに多かった。その為、収集した検体を使って、目的を達成するためには、遺伝子増幅をすることが必要不可欠であった。そこで、DOP-PCR法の検討を要したわけだが、マイクロサテライトタイピングには問題が残るものの、SNPタイピングには十分使用可能であることを明らかにしたことは大きかった。高血圧部会の共同研究でも我々のプロトコルに従って、増幅したDNAで大規模タイピングをおこなった。現在では頬粘膜擦過標本、爪などでも大規模タイピングが可能となっている。

関連解析に使用する集団によって、当初の予想よりも多型頻度に大きな違いが存在することがわかった。今回は性差と地域差を検証した。性差に関しては、現在も残っている候補遺伝子の中にも、女性のみで有意さがある遺伝子がある。男性と女性で高血圧発症の主要なメカニズムがあることは十分、想定できることである。疾患感受性遺伝子を探す上では、性をわけて探索することが重要であると思われる。もう一つの地域差は解析検体が母集団を代表しているとすれば、かなり深刻である。すなわち全国的に収集する多施設共同研究は成り立たないことになる。これまではタイピング機関の制度による可能性が高いと考えていたが、今回は東大で一括してタイピングしているので、タイピング精度によるとは考えにくい。サンプリングバイアスであるとするれば、どの様な方法があるのか、検討を要する課題である。

〈今後の課題〉

候補遺伝子の選択のひとつの手段として、マウスの塩分負荷による腎臓での発現が変化する遺伝子を候補として考えた。この戦略が本当に有効な戦略かどうかは不明である。そもそも本態性高血圧のプライマリーな臓器が腎臓であるという証拠もそれ程多くない。また、腎臓全体の発現よりも尿細管などの局所に関与する遺伝子に関与している可能性の方が高い。しかし、開始時点ではひとつの戦略として妥当だったのではないかと思う。最後に残っている10遺伝子から、この実験由来の候補遺伝子が生き残れば有効であったことになる。文献からの候補遺伝子抽出も多くは腎臓で発現している遺伝子を中心におこなった。その妥当性も今後の評価を待ちたい。

ハプロタイプ関連解析により、候補遺伝子を絞り込むという戦略をとった。しかし、当初設定した候補遺伝子のSNP情報は多くはなかった。幸い、日本人のSNPデータベース (J-SNP) はNCBIのデータベースよりもはるかに信頼性が高く、しかも日本人のデータベースということで、有用なものが多かった。しかし、当初は情報がない、あるいは少ない遺伝子が多く、この時点で、検証で

きないまま捨ててしまった遺伝子も数多くある。また、遺伝子により連鎖不平衡の状況もさまざまであることは、今では常識であるが、解析を始めた時点ではほとんど知見がなかった。ハプロタイプ構築完了とした基準も根拠があったわけではない。また、どのSNPを使ったハプロタイプ関連解析であれば、原因となるSNPにたどり着けるか、われわれもAGTでシミュレーションをしようとしてみたが、知見が少なすぎ無謀だとの結論に達した。HapMapのデータが使える今、検証してみるのも意味があるかも知れない。いずれにしても120以上の候補遺伝子から始めたが、スクリーニングとはいえ脱落が多く、戦略の妥当性は検証すべきであろう。

当初はハプロタイプ関連解析の方が、個々のSNP関連解析よりも原因となるSNPを見つけ出すには有用であろうとの仮定に基づいて、進めてきた。果たしてこの仮定は本当だろうか？ 今回の試行錯誤を振り返ってみて、必ずしも正しいとは限らないように思う。個々の有意なSNPを手がかりとしてハプロタイプを組み、その関連解析をしても、結局なら得るものがないことも良く経験する。多因子疾患の疾患関連遺伝子がどの様な多型により差が生じるのかまだわかっていないのが現実であろう。少なくとも単一遺伝子病の様に、エクソン部のアミノ酸置換を伴う塩基置換で話が済むのとは訳が違うことは明らかである。これまでの糖尿病などの知見からも、イントロンなどの塩基置換が原因となっていることが多いと思われる。これまでの発症にいたる遺伝子変異では明らかでなかったメカニズムが隠れているのかも知れない。このあたりを明らかにしていく必要があると思う。

多くの情報がHapMapデータベースで得られる。これにより疾患感受性遺伝子解明の戦略も新たな段階に入ったと思われる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel J-M, Inoue I. Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in Two populations. *Am J Hum Genet* 70:108-123, 2002
2. Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Hirayama E, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K. A1166C variant of angiotensinogen II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet*, 49, 182-186, 2004
3. Ohmori H, Ando Y, Makita Y, Onouchi Y, Nakajima T, Saraiva MJM, Terazaki H, Suhr O, Sobue G, Nakamura M, Yamaizumi M, Munar-Ques M, Inoue I, Uchino M, Hata A. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Med Genet*, 41, e51, 2004
4. 303221310 Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Chiba S, Ohtani K, Suzuki Y, Wakamiya N, Hata A. Haplotype analysis of human collectin placenta 1 (hCH-P1) gene. *J Hum Genet*, 48, 82-85, 2003
5. Ohta K, Kobashi G, Hata A, Yamada H, Minamikata H, Fujimoto S, Kondo K, Tamashiro H. Association between a variant of the glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) and hypertension in pregnancy

- in Japanese: Interaction with parity, age, and genetic factors. *Semin Thromb Hemost* 29, 653-659, 2003
6. 303221305 Kobashi G, Hata A, Shido K, Ohta K, Yamada H, Fujimoto S. The M235T variant of the angiotensinogen gene and the body mass index are useful markers for prevention of hypertension in pregnancy: a tree-based analysis of gene-environmental interaction. *Semin Thromb Hemost* 28, 501-506, 2002
 7. 303221259 Kobashi G, Ohta K, Hata A, Shido K, Yamada H, Fujimoto S. An association between maternal smoking and preeclampsia in Japanese women. *Semin Thromb Hemost* 28, 507-510, 2002
 8. 303221254 Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet*, 47, 400-406, 2002
 9. 303221245 Nakamura T, Saionji K, Hiejima Y, Hirayama H, Tago K, Takano H, Tajiri M, Hayashi K, Kawabata M, Funamizu M, Makita Y, Hata A. Methylene-tetra-hydro-folate reductase genotype, vitamin B12 and folate influence plasma homocysteine in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 39, 1032-1039, 2002
 10. 303221305 Kobashi G, Shido K, Hata A, Yamada H, Hirayama Kato E, Kanamori M, Fujimoto S, Kondo K. Multivariate analysis of genetic and acquired factors; T235 variant of the angiotensinogen gene is a potent independent risk factor for preeclampsia. *Semin Thromb Hemost* 27, 143-147, 2001
 11. Yabe I, Sasaki H, Yamashita I, Tashiro K, Takei A, Suzuki Y, Kida H, Takiyama Y, Nishizawa M, Hokezu Y, Nagamatsu K, Oda T, Ohnishi A, Inoue I, Hata A. Predisposing chromosome of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) in Japanese. *J Med Genet* 38, 328-333, 2001
 12. Arima T, Drewell RA, Armery KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, Surani MA. A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* 10, 1475-1484, 2001

表 1. B 遺伝子のハプロタイプ解析

Haplotype	HT	NT	Chi2	p	permutation p
0000	0.15	0.14	0.27	0.60	0.65
1000	0.18	0.13	13.23	0.00	0.00
0100	0.10	0.13	5.76	0.02	0.04
0010	0.17	0.17	0.08	0.77	0.82
1010	0.06	0.08	4.46	0.03	0.09
0110	0.09	0.10	0.43	0.51	0.59
0001	0.06	0.07	0.40	0.53	0.61
1001	0.08	0.08	0.28	0.60	0.67
0101	0.11	0.10	0.48	0.49	0.55

表 2. B 遺伝子の SNP 探索

Location	SNP
5'-upstream	10
intron1	35
intron2	5
intron3	26
intron4	26
intron5	7
intron6	3
intron7	2
intron8	8
exon9	1
intron9	1
exon10	1
intron10	2
intron11	2
exon12	1
intron12	7
intron13	1

図 2. B 遺伝子の構造

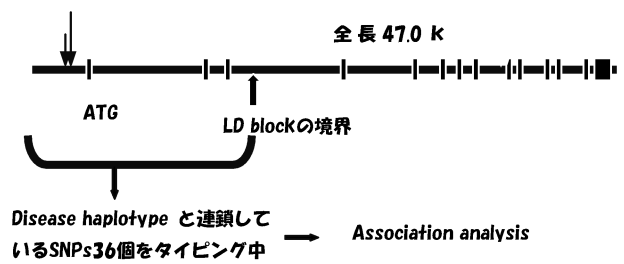


図 3. ヒト多型頻度の地域差

ヒト多型頻度の地域差		
対象集団		
—	北海道B町	315人
—	島根	174人
—	熊本	111人
遺伝子多型		
—	SNPs	Angiotensinogen(AGT)
—	deletion	AngiotensinII converting enzyme(ACE)
—	microsatellite:	D13S158, D6S257, OPG

図 4. Biallelic 多型の地域差 (AGT)

	genic				genotypic							
	M		T		MM		MT		TT		total	
Hokkaido	112	18%	506	82%	618	5	2%	102	33%	202	65%	309
Shimane	48	16%	248	84%	296	0	0%	48	32%	100	68%	148
Kumamoto	43	20%	173	80%	216	5	5%	33	31%	70	65%	108
total	203		927		1130	10		183		372		565

図 5. Biallelic 多型の地域差(ACE)

	genic				genotypic							
	I		D		II		ID		DD		total	
Hokkaido	375	63%	221	37%	596	123	41%	129	43%	46	15%	298
Shimane	162	57%	124	43%	286	50	35%	62	43%	31	22%	143
Kumamoto	129	73%	73	36%	202	40	40%	49	49%	12	12%	101
total	666		418		1084	213		240		89		542

図 6. マイクロサテライト多型の地域差

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	30	合計
D13S158	北海道	6	180	99	45	229	42	20	8	1	0						630
	島根	0	119	50	29	110	19	11	3	2	1						344
	熊本	0	59	41	21	70	21	5	3	2	1						223
	合計	6	358	190	95	409	82	36	14	5	2						
		p=0.163															
D6S257	北海道	16	26	12	15	36	72	98	106	92	73	41	21	6	0		614
	島根	14	15	9	3	19	42	72	50	40	36	21	14	2	1		338
	熊本	7	12	4	10	5	18	46	44	28	26	11	2	1	0		214
	合計	37	53	25	28	60	132	216	200	160	135	73	37	9	1		
		p=0.0947															
OPG	北海道	3	123	187	140	46	121	6	1	1							628
	島根	0	73	77	67	42	78	8	1	0							346
	熊本	0	58	48	55	12	44	5	0	0							222
	合計	3	254	312	262	100	243	19	2	1							
		p=0.0075															