

## 動脈硬化・高血圧関連遺伝子群の解明

●三木哲郎<sup>1)</sup> ◆小原克彦<sup>1)</sup> ◆名倉 潤<sup>1)</sup> ◆田原康玄<sup>2)</sup>

1) 愛媛大学医学部老年医学講座 2) 愛媛大学医学部環境遺伝学講座

### 〈研究の目的と進め方〉

ヒトゲノム計画の進展によって、ゲノムの構造や多くの遺伝子が明らかになるとともに、多数の多型性マーカー（主に一塩基対置換；single nucleotide polymorphism (SNP)）が同定されてきた。これらの成果は、高血圧や動脈硬化など、生活習慣病に関連する未知の遺伝子群を同定する上で有用なアイテムである。そこで本研究では、①ゲノム網羅的な候補遺伝子アプローチから疾患感受性SNPをスクリーニングし、得られたSNPについて、②11,000人を超える大規模かつ臨床データの整った集団サンプルを用いて有意性を検証することで、動脈硬化ならびに高血圧関連遺伝子群を解明することを目的とした。その一方で、動脈硬化や高血圧の臨床・機能的側面から、既にいくつかの候補遺伝子が報告されている。これら候補遺伝子についても、当該集団サンプルを用いて有意性の再検証を行った。

多くの生活習慣病は、環境要因と遺伝要因が相互に影響して発症する。しかし、従来の疾患感受性遺伝子解析研究では、環境要因と遺伝要因との相互作用について、殆ど検討されてこなかった。本研究では、高血圧・動脈硬化に対する遺伝的要因の関与を、特に環境因子や他の危険因子との相互作用も含めて検討した。

### 〈研究開始時の研究計画〉

#### ①大規模集団サンプルの収集・構築

統計学的なパワーを上げる、あるいは解析結果の再現性を確認する目的で、臨床情報の整った大規模集団サンプルの構築を行う。研究代表者・分担研究者独自のサンプリングに加え、他の研究グループとも共同することで、サンプル規模の拡大を目指す。

#### ②ケース/コントロールサンプルの収集

候補遺伝子をスクリーニングするためのケース（高血圧）/コントロール（正常血圧）サンプルを収集する。研究代表者・分担研究者独自のサンプリングに加え、他の研究グループとも共同することで、サンプル規模の拡大を目指す。

#### ③ハイスループットの遺伝子解析システムの構築

多数の遺伝子を大規模サンプルで解析するために、ハイスループットの遺伝子解析システムを構築・運用する。

#### ④ゲノム網羅的な候補遺伝子のスクリーニング

主にシグナル伝達系に属する候補遺伝子について、ケース/コントロールサンプルを用いた、網羅的なスクリーニングを行う。

#### ⑤遺伝-環境相互作用の検証

従来より高血圧・動脈硬化との相関が報告されている遺伝子について、環境因子との交絡に着目して再検討を行った。

#### ⑥大規模集団サンプルによるメタアナリシス

上記スクリーニングで得られた遺伝子、ならびに従来より高血圧・動脈硬化との関連が報告されている遺伝子について、大規模集団サンプルを用いたメタアナリシスにより、その有意性を検証する。

### 〈研究期間の成果〉

#### ①大規模集団サンプルの収集・構築

愛媛県下の2つのコホートからサンプリングを行った（図1）。コホートAは職域を対象としたものであり、約800例を収集した。対象者の臨床情報は、職域健診の値を利用するとともに、独自の臨床検査も行った。コホートBは、一般地域を対象としたものであり、約2900例を収集した。対象者の臨床情報は、住民健診の値を利用するとともに、独自の臨床検査も行った。

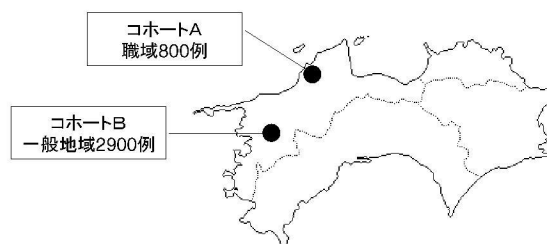


図1 愛媛県でサンプリングを行ったコホート

上記に加え、東北大学・今井潤教授および大阪大学・荻原俊男教授（大迫コホート1600例）、横浜市立大学・梅村 敏教授（横浜職域コホート2300例）、滋賀医科大学・上島弘嗣教授（信楽・高島コホート4000例）との共同研究により、図2に示すような12,000人からなる大規模集団サンプルを構築した。



図2 本研究を通じて構築した大規模集団サンプル

当該大規模サンプルの平均年齢は56±14歳であり、男女がほぼ同数であった（男性52%）。年齢分布は図3に示した通りであった。収縮期血圧140 mmHg以上、かつ/または拡張期血圧90 mmHg以上、かつ/または降圧薬服用者を高血圧者と定義すると、その頻度は28.1%であった。その他の臨床情報は、表1に示した。

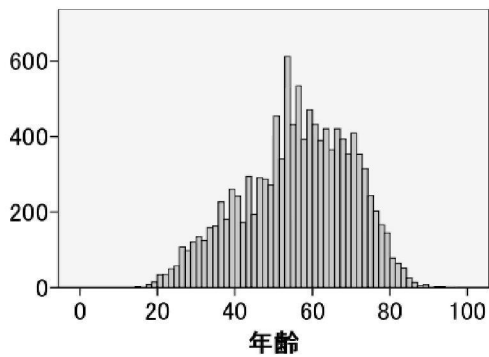


図2 大規模集団サンプルの年齢分布

表1 大規模集団サンプルの臨床背景

年齢 (歳)	56±14
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23±3
収縮期血圧 (mmHg)	131±20
拡張期血圧 (mmHg)	78±12
総コレステロール (mg/dl)	201±35
HDLコレステロール (mg/dl)	59±15
中性脂肪 (mg/dl)	120±83
血糖 (mg/dl)	103±28

DNAの枯渇を防ぐため、全てのサンプルは、DOP-PCR法 (degenerate oligonucleotide-primed) により全ゲノム増幅を行ってから解析に用いている。

### ② ケース/コントロールサンプルの収集

候補遺伝子をスクリーニングするためのケース (高血圧) /コントロール (正常血圧) サンプルを収集した。収集は、千葉大学・羽田明教授、日本大学・相馬正義講師、大阪大学・荻原俊男教授、広島放射線影響研究所・高橋規郎部長との共同研究により行い、約700例ずつのケース/コントロールサンプルを収集した。サンプルの収集にあたり、高血圧者は、“収縮期血圧160以上、拡張期血圧90以上、あるいは降圧薬服用中”と定義した。正常血圧者は、“収縮期血120未満かつ拡張期血圧80未満かつ非服薬者”と定義した。高血圧患者群では、約2/3が降圧薬を服用していた。2群間の比較では、年齢とBMIに有意差が認められた。対象者の臨床情報を表2に示した。

表2 ケース/コントロールサンプルの臨床背景

	高血圧群 (758)	正常血圧群 (726)
男性 (%)	74.4	75.8
年齢 (歳)	59.0±11.0	62.8±9.4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.6±3.0	22.7±2.9
収縮期血圧 (mmHg)	163.5±24.6	115.9±12.0
拡張期血圧 (mmHg)	100.3±15.7	72.0±7.6
降圧薬服用者 (%)	65.8	

DNAの枯渇を防ぐため、全てのサンプルは、DOP-PCR法 (degenerate oligonucleotide-primed) により全ゲノム増幅を行ってから解析に用いている。

### ③ ハイスループットの遺伝子解析システムの構築

多数の遺伝子を大規模サンプルで解析するために、ハイスループットの遺伝子解析システムを構築した。DNAサンプルは96個単位でパッケージ化し、速やかに解析に供することが出来るようにした。SNPのタイピングにはTaqManプローブ法を導入した。試薬およびDNAのハンドリングを96個単位で行うことにより、1反応サイクルが4時間程度で可能である。通常の作業では、1日あたり12,000タイピングが可能である。1タイピングに必要なDNA量は約1 ng、単価は約40円と、現在の技術レベルを鑑みると、極めて高い水準にあるといえる。なお、本システムに用いた機器は以下の通りである。

表3 ハイスループットの遺伝子解析システムの構成

試料ハンドリング	
	Biomeck FX(96 連チップ)×1台*1
	Biomeck 2000(8連チップ)×1台*1
PCR	
	GeneAmp9700(384 well 2枚)×10台*2
	GeneAmp9700(96 well 1枚)×6台*2
検出	
	ABI Prism 7900HT×1台*2

\*1 ベックマンコールター社製

\*2 アプライドバイオシステムズ社製

解析結果はシームレスにデータベースに格納でき、別に登録した臨床情報と併せて管理されている。データベースはローカルエリアネットワーク経由でブラウザにより閲覧・利用可能であるため利便性が高い。

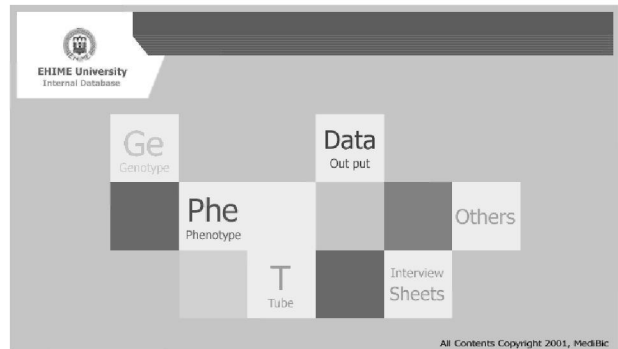


図3 データベースのスタートメニュー

全ての臨床情報は、無作為に発生させた匿名化コードによりデータベースに格納し、運用されている。

④ゲノム網羅的候補遺伝子のスクリーニング

主にシグナル伝達系に属する候補遺伝子について、ケース/コントロールサンプルを用いた、網羅的なスクリーニングを行った。

具体的には、生化学的・生物学的見地から、血圧・高血圧に関連しうる遺伝子群を、主にシグナル伝達系の構成要素を中心に選定し、J SNPのデータベースから1遺伝子につき、1個のSNPを選択して解析した。SNP はプロモーター領域やアミノ酸置換を伴うものを優先的に選択した。また、出来るだけマイナーアレル頻度の高いSNPを選択した。最終的に307個のSNPを解析した。

表4 候補遺伝子の選択基準

1. 生化学・生物学的見地から血圧、高血圧に関連しうる遺伝子を全ゲノム的に抽出（シグナル伝達系）
2. それぞれの遺伝子につき、J SNP データベースを参照し、1個のSNPを選択
3. プロモーター領域に存在、あるいはアミノ酸置換を伴うSNPを優先的に選択
4. それ以外はマイナーアレル頻度の最も高いSNPを選択

表5 解析した候補SNP

Gene	SNP (IMS-JST)	Gene	SNP (IMS-JST)
ABCC6	IMS-JST033046	TRAK-M	IMS-JST138737
ACAT2	IMS-JST073862	IRS2	IMS-JST040478
ACCN1	IMS-JST000969	ITGA9	IMS-JST005307
ADAM12	IMS-JST026647	KCNA10	IMS-JST100506
ADAMTS2	IMS-JST060379	KCNA5	IMS-JST033871
ADORA1	IMS-JST120952	KCNAB1	IMS-JST042027
ADPRT	IMS-JST028055	KCNAB2	IMS-JST099685
ADRA1A	IMS-JST144274	KCNB1	IMS-JST015996
AEBP1	IMS-JST010809	KCNC4	IMS-JST123102
AGTRL1	IMS-JST031818	KCND3	IMS-JST072087
AKR1B10	IMS-JST088884	KCNG1	IMS-JST034636
AKR1C2	IMS-JST072266	KCNH2	IMS-JST134886
AKR1D1	IMS-JST064573	KCNIP1	IMS-JST044775
ALDH1B1	IMS-JST009830	KCNIP2	IMS-JST137579
APOER2	IMS-JST052287	KCNJ1	IMS-JST091785
AQP8	IMS-JST038811	KCNJ13*	IMS-JST047026
AQP9	IMS-JST028289	KCNJ15	IMS-JST098460
ARHA	IMS-JST093901	KCNJ16	IMS-JST113888
ARHC	IMS-JST027240	KCNK10*	IMS-JST074492
ARHD	IMS-JST031581	KCNK16*	IMS-JST088414
ARHE	IMS-JST108553	KCNK5*	IMS-JST088411
ARHGAP8	IMS-JST011122	KCNK9*	IMS-JST136173
ARHGDI3	IMS-JST100036	KCNMA1	IMS-JST043157
ARHGEF10	IMS-JST089805	KCNMB1*	IMS-JST006474
ARHGEF10	IMS-JST089795	KCNMB4	IMS-JST138777
ARHGEF11	IMS-JST071304	KCNN1	IMS-JST026510
ARHGEF4	IMS-JST050511	KCNN3	IMS-JST065895
ARHGEF5	IMS-JST011642	KCNQ3	IMS-JST003459
ATP10C	IMS-JST080237	KCNQ4	IMS-JST122515
ATP10D	IMS-JST101451	KIAA0792	IMS-JST045360
ATP12A	IMS-JST006992	KLK15	IMS-JST106617
ATP1B2	IMS-JST003139	KRTHA2	IMS-JST007093
ATP2A1	IMS-JST006763	LASP1	IMS-JST012740
ATP2A3	IMS-JST096058	LHX2	IMS-JST002426
ATP2B1	IMS-JST005743	MAP3K4	IMS-JST050769
ATP2B2	IMS-JST002799	MCLC	IMS-JST065080
ATP2C1	IMS-JST030375	MEOX2	IMS-JST135473
ATP4A	IMS-JST097811	MMP3	IMS-JST112201
ATP6V0A1	IMS-JST057776	MPP2	IMS-JST113850
ATP6V1D	IMS-JST113191	MTHFD1	IMS-JST030217
BAT3	IMS-JST047123	MTRR	IMS-JST038793

Gene	SNP (IMS-JST)	Gene	SNP (IMS-JST)
BCAR1	IMS-JST094882	MYBPC1	IMS-JST013448
BDKRB1	IMS-JST006388	MYBPH	IMS-JST023474
CABP5	IMS-JST097233	MYH13	IMS-JST074649
CACNA1A*	IMS-JST002061	MYO1D	IMS-JST024934
CACNA1C	IMS-JST010016	NBC/HNBC1	IMS-JST026381
CACNA1D*	IMS-JST005535	NCOR2	IMS-JST074242
CACNA1E*	IMS-JST047317	NDUFV2	IMS-JST072515
CACNA1S	IMS-JST106930	NF1	IMS-JST036252
CACNA2D2*	IMS-JST017440	NOS1	IMS-JST044454
CACNB3	IMS-JST005533	NPHS2	IMS-JST070547
CACNB4	IMS-JST020761	NR1I2	IMS-JST073395
CACNG4	IMS-JST142169	NR2E3	IMS-JST140766
CACNG5	IMS-JST037289	P2RX4	IMS-JST103166
CALCR	IMS-JST057821	P2RY2	IMS-JST186182
CAMK1G	IMS-JST004248	PAPPA	IMS-JST146352
CAPN11	IMS-JST110497	PCNA_PAFAH	IMS-JST069103
CAPON	IMS-JST103318	PSCSK1	IMS-JST116709
CARPX	IMS-JST003026	PFD4	IMS-JST144406
CASP8	IMS-JST124663	PIK3R3	IMS-JST071592
CASR	IMS-JST163599	PIN	IMS-JST112794
CAST	IMS-JST017227	PLA2G2D	IMS-JST070389
CD244	IMS-JST106307	PPOX_PPO	IMS-JST057294
CDH17	IMS-JST063530	PPP1R1B	IMS-JST118226
CHGA	IMS-JST113148	PRKAG2	IMS-JST012798
CHRNA2	IMS-JST045927	PRKAR1A	IMS-JST037136
CHRNA2	IMS-JST029067	PRKCQ	IMS-JST151269
CLCA1	IMS-JST046987	PRKWNK1	IMS-JST058090
CLCA3	IMS-JST045742	PSCD3	IMS-JST101982
CLCNKA	IMS-JST052374	PSTPIP2	IMS-JST072667
CLDN16	IMS-JST129402	PTGER2	IMS-JST093690
CLIC1	IMS-JST046987	PTGES	IMS-JST059288
CLIC3	IMS-JST045741	PTGS1	IMS-JST023574
CLIC5**	IMS-JST087960	PTHR1	IMS-JST014214
CLIC6	IMS-JST005161	PTHR2	IMS-JST062845
CNGA3*	IMS-JST107924	PTK2B	IMS-JST013583
CNGB1	IMS-JST059857	PTPRJ	IMS-JST065702
CNTNAP1	IMS-JST044713	PTPRT	IMS-JST098084
COL18A1	IMS-JST016806	RAC2	IMS-JST033746
COL4A1	IMS-JST062253	RASGRP3	IMS-JST026463
COL9A1	IMS-JST051278	RET	IMS-JST003781
CPT2	IMS-JST071163	RGS1	IMS-JST178880
CPVL	IMS-JST001917	RGS19IP1	IMS-JST176092
CUL5	IMS-JST138216	RGS2	IMS-JST122001
CYP17	IMS-JST006036	RGS20	IMS-JST177226
DEF4A	IMS-JST111419	RGS5	IMS-JST123214
DLG4	IMS-JST142411	SCN4A	IMS-JST005682
DLG5	IMS-JST025916	SERPINA6	IMS-JST030091
DLGAP1	IMS-JST012607	SERPINB8	IMS-JST187929
DLGAP2	IMS-JST058196	SLC10A2	IMS-JST112912
DRD2	IMS-JST003331	SLC12A2	IMS-JST101638
E2IG3	IMS-JST040761	SLC13A1	IMS-JST135319
ECE2	IMS-JST067678	SLC14A1	IMS-JST114095
EDH17B2	IMS-JST057083	SLC15A1	IMS-JST051839
EDN3	IMS-JST022605	SLC17A1	IMS-JST069840
EHF	IMS-JST190858	SLC18A2	IMS-JST032531
ELN	IMS-JST110830	SLC21A11	IMS-JST036866
EPHX2	IMS-JST064974	SLC21A6	IMS-JST043319
ERCC1	IMS-JST054062	SLC22A7	IMS-JST065519
EXOSC3	IMS-JST050780	SLC23A1	IMS-JST072071
F5	IMS-JST104788	SLC24A2	IMS-JST090295
FGF1	IMS-JST060073	SLC24A3	IMS-JST189457
FGF2	IMS-JST115385	SLC25A13	IMS-JST057752
FGF3	IMS-JST099352	SLC25A15	IMS-JST051384
FRAG	IMS-JST026319	SLC26A8	IMS-JST049852
FREB	IMS-JST071831	SLC26A9	IMS-JST031464
FTHFD	IMS-JST127621	SLC28A1	IMS-JST014123
GJB5	IMS-JST071341	SLC2A1	IMS-JST122610
GMEB2	IMS-JST114685	SLC2A11	IMS-JST016987

Gene	SNP (IMS-JST)	Gene	SNP (IMS-JST)
GNA14	IMS-JST030745	SLC2A9	IMS-JST073713
GNA15	IMS-JST002046	SLC4A2	IMS-JST060780
GNAI2	IMS-JST017424	SLC6A11	IMS-JST061798
GNAI3	IMS-JST057219	SLC6A13	IMS-JST041731
GNAO1	IMS-JST147251	SLC6A3	IMS-JST109604
GNAT2	IMS-JST007183	SLC6A4	IMS-JST152491
GNAZ	IMS-JST020292	SLC6A5	IMS-JST073021
GNB1	IMS-JST068248	SLC6A7	IMS-JST109459
GNB5	IMS-JST152195	SLC7A4	IMS-JST002752
GNG13	IMS-JST068234	SLC7A8	IMS-JST016333
GNGT2	IMS-JST046244	SRA1	IMS-JST060946
GP6	IMS-JST061075	SRD5A1	IMS-JST066746
GPR37_1	IMS-JST089141	SRGAP3	IMS-JST044937
GPRK2L	IMS-JST007252	SUR	IMS-JST001081
GPRK6	IMS-JST038677	SYNE-2	IMS-JST052241
GRAF	IMS-JST024450	TACR3	IMS-JST087312
GUCA1C	IMS-JST149758	TAPBP	IMS-JST007643
GUCA2A	IMS-JST107272	TCF2	IMS-JST096152
GUCY1B2	IMS-JST147180	TG	IMS-JST047350
HAPT_HP	IMS-JST090094	TGFB1	IMS-JST013663
HCN4	IMS-JST094752	TH/INS	IMS-JST005746
HD_IT15	IMS-JST007212	TNF	IMS-JST005889
HLA-DMB	IMS-JST007088	TNFRSF10B	IMS-JST028971
HNFB4G	IMS-JST067948	TNFRSF7	IMS-JST008349
HOXD11	IMS-JST002918	TPO	IMS-JST005932
HPGD	IMS-JST109411	TR/CF2R	IMS-JST155510
HSD17B3	IMS-JST178931	TRAF3	IMS-JST068913
HSD17B4	IMS-JST003418	TRAP1	IMS-JST013770
HT002	IMS-JST029152	TRAP100	IMS-JST078976
HTR1B	IMS-JST099808	TRAP95	IMS-JST013549
HTR1E	IMS-JST116983	TRHDE	IMS-JST138758
HTR3B	IMS-JST072837	TRPC3	IMS-JST164243
HTR5A	IMS-JST013852	TRPM5	IMS-JST001000
ICAM3	IMS-JST061162	TRPM6	IMS-JST070421
IFNGR2	IMS-JST005184	TSHR	IMS-JST002603
IGF1R	IMS-JST094493	UCP2	IMS-JST003515
IGF2	IMS-JST010910	UCP3	IMS-JST003219
IGF2AS	IMS-JST092201	VDAC1	IMS-JST001945
IL12RB1	IMS-JST063134	VEGFA	IMS-JST030632
IL15RA	IMS-JST050218	VEGFC	IMS-JST130738
IL1B	IMS-JST017197	VIP	IMS-JST096791
IL1R1	IMS-JST037791	VIPR2	IMS-JST007173
IL1RAP	IMS-JST129384	VRP	IMS-JST084836
IL1RL1	IMS-JST085631	VWF	IMS-JST010173
IL1RN	IMS-JST006488		

ケース・コントロールでの解析・比較から、優性モデル、劣性モデル、アレル頻度のいずれかでp値が0.05未満を示したのは38 SNP (14.2%)であった。表6に、解析したSNPのグルーピングと、それぞれの陽性率を示した。今回の検討では、チャンネルや酵素、受容体に比し、キャリアーやGタンパク群で高い陽性率を示した。特に、機能的に関連性が考えられるGタンパク質群と、Gタンパクシグナル調節タンパク(GRS)群での陽性率は、他の陽性率に比して有意に高値であった。

表6 解析したSNPの集計と陽性率

遺伝子群	陽性	解析	陽性率
	SNP数	SNP数	
酵素	10	71	14.1
ATPase	4	12	33.3
kinase	2	12	16.7
Hcy	0	3	0
Metalloproteinase	0	3	0
guanylate cyclase	1	3	33.3
NO synthase	0	3	0

チャンネル	7	55	12.7
K channel	4	27	14.8
Ca channel	2	10	20.0
Cl channel	0	8	0
レセプター	3	36	8.3
serotonin	0	4	0
thyroid	0	3	0
cholinergic	0	2	0
solute carriers	5	31	16.1
Na related	1	8	12.5
neurotransmitter	0	6	0
glucose	1	3	33.3
Gタンパク質	5	27	18.5
a subunit	2	7	28.6
RGS	3	5	60.0
rho	1	9	11.1
ras	0	4	0
growth factor	1	13	7.7
VEGF	0	3	0
FGF	1	3	33.3
IGF	0	3	0
Cytokine	0	12	0
IL1	0	6	0
TNF	0	3	0
結合タンパク	0	9	0
コラーゲン	1	4	25.0
凝固因子	0	4	0
接着分子	0	3	0
HLA	1	2	50.0
その他	4	39	10.3
総計	38	307	12.4

ケース/コントロールでの解析において、陽性になったSNPのうち、Gタンパク質とRGS関連のSNPについて、遺伝子多型頻度(表7)とオッズ比(表8)を示した。このうち、#1、#3、#5の3つのSNPが、優性モデルあるいは劣性モデルで有意差を示した。

表7 Gタンパク質関連の陽性SNPと遺伝子多型頻度

	ケース			コントロール		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB
Gタンパク質						
#1	177	375	187	132	350	228
#2	105	351	283	122	347	241
Gタンパクシグナル調節タンパク						
#3	140	341	255	135	365	208
#4	102	306	291	122	299	242
#5	93	346	298	115	316	268

これら有意性を示したSNPについて、大規模集団サンプルによる検証を行った。SNP単独での相関に加え、遺伝-遺伝相互作用についても併せて検討した。

表8 Gタンパク質関連陽性SNPの統計量

	アレル		優性		劣性		多型
	odds	p	odds	p	odds	p	p
Gタンパク質							
#1	1.278	0.001	1.379	0.013	1.396	0.004	0.004
#2	0.858	0.044	0.828	0.085	0.798	0.12	0.13
Gタンパクシグナル調節タンパク							
#3	0.898	0.15	0.785	0.032	0.997	0.982	0.077
#4	0.828	0.017	0.806	0.053	0.758	0.059	0.066
#5	0.881	0.101	1.092	0.417	1.364	0.04	0.118

大規模集団サンプルから、高血圧者（収縮期血圧 140 mmHg 以上、かつ/または拡張期血圧 90 mmHg 以上、かつ/または降圧薬服用者）、および正常血圧者（降圧薬非服用、かつ収縮血圧 140 mmHg 未満、かつ拡張期血圧 90 mmHg 未満、かつ心血管合併症を有さない 45 歳以上）を抽出し、ケース/コントロールでの検討で有意性を示した #1, #3, #5 の 3 つの SNP について、その有意性を検証した。対象者の臨床背景を表 9 に、解析結果を表 10, 11 に示した。その結果、3 つの SNP のうち、#1 と #3 が単純な比較で有意性を示した。

表9 検証に用いた高血圧/正常血圧サンプルの臨床背景

	高血圧群 (3844)	正常血圧群 (3214)	p
男性 (%)	47.3	48.6	0.270
年齢 (歳)	62±11	58±9	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24±3	23±3	<0.001
収縮期血圧 (mmHg)	148±16	122±11	-
拡張期血圧 (mmHg)	87±11	74±8	-
降圧薬服用 (%)	46.7		
総コレステロール (mg/dl)	204±34	203±34	0.960
HDL コレステロール (mg/dl)	59±16	60±16	0.004
中性脂肪 (mg/dl)	135±193	117±73	<0.001
血糖 (mg/dl)	109±33	104±29	<0.001
現喫煙者 (%)	34.6	34.9	0.830
脳卒中既往 (%)	4	0	
心疾患既往 (%)	9.3	0	

表10 陽性SNPの集団サンプルでの検証結果(遺伝子多型頻度)

	ケース			コントロール		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB
#1	867	1806	1171	703	1620	891
#3	681	1828	1335	556	1621	1037
#5	546	1847	1451	499	1465	1250

遺伝-遺伝相互作用は、多因子次元縮小法 (MDR; multifactor dimensionality reduction) により検討した。一般にケース/コントロール研究における遺伝-遺伝相互作用は、それぞれの遺伝子の相加あるいは相乗効果からの有意な隔たりと定義されるが、今回の結果の様に、遺伝子のもつオッズ比が 1.1 程度の場合には、この方法論で遺伝子間の相互作用を検証することは困難である

ことが多い。MDR 法は、Ritchie らにより、開発された方法で、これまで多くの研究で遺伝-遺伝子相互作用を明らかにするために使用されてきた (表 12)。MDR では、①全体のデータの 9/10 を用いて因子の選択と組み合わせを全て行い、②それぞれのモデルにおいて高リスク多型と低リスク多型の 2 つの組み合わせによる次元縮小を行い、③そのモデルの適合度を残りの 1/10 のデータを用いて算出することで最も誤差の少ないモデルを選択する。このプロセスを 10 回繰り返し、その交差妥当性からモデルの検定を行う方法である (図 4)。

表11 陽性SNPの集団サンプルでの検証結果(統計量)

	アレル		優性		劣性		多型
	odds	p	odds	p	odds	p	p
#1	0.98	0.22	0.876	0.012	1.04	0.49	0.011
#3	0.98	0.22	0.90	0.029	1.03	0.65	0.043
#5	1.00	0.91	1.050	0.32	0.90	0.12	0.085

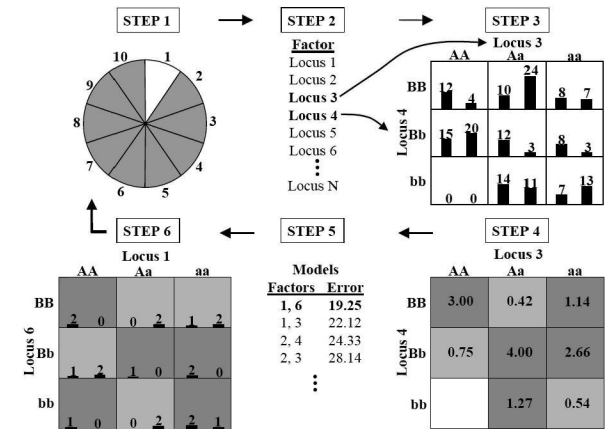


図4 MDR法の概念図

表12 MDR法に関する参考文献

JAMA	291, 1642-3 (2004).
Trends in Genetics	20, 640-7 (2004).
Expert Review of Molecular Diagnos	4, 795-803 (2004).
BioEssays	26, 170-9 (2004).
Nutrition	20, 69-73 (2004).
Human Heredity	56, 73-82 (2003).
Annals of Medicine	34, 88-95 (2002).
Human Heredity	57, 28-38 (2004).
In Silico Biology	4, 0016 (2004).
BMC Bioinformatics	5, 49 (2004).
Genetic Epidemiology	24, 150-157 (2003).
Bioinformatics	19, 376-382 (2003).
American Journal of Human Genetics	69, 138-147 (2001).
Diabetologia	47, 549-54 (2004)
Circulation	109, 1640-46 (2004).

MDR により得られた結果を表 13 に示した。2 遺伝子と 3 遺伝子モデルのうち、予測精度は 2 遺伝子モデルで高く、この SNP 間に相互作用が存在すると判断した。

表 13 MDR 法による解析結果

	Training accuracy	Testing accuracy	p
2 遺伝子モデル (#1+#3)	0.520	0.520	0.0215
3 遺伝子モデル (#1+#3+#5)	0.519	0.515	0.3438

MDR 法により決定された 2 遺伝子相互作用モデルを図 5 に示した。左下 (白) が低リスク多型、それ以外 (グレー) が高リスク多型を示し、各群の高血圧/正常血圧者数を棒グラフで示した。このモデルで、高リスク多型のオッズ比は、1.07 (p=0.0031) であり、各遺伝子単独での検討結果より、p 値は 1 桁小さくなった。

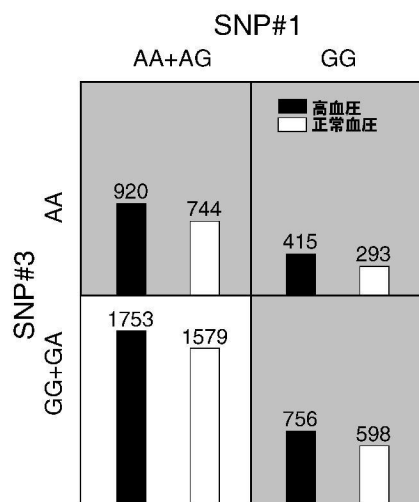


図 4 MDR 法での解析結果

MDR で得られたモデルに従って血圧値との関連を検討した結果を表 14、表 15 に示した。全例を対象とした検討では有意差は認められなかったが、降圧薬非服用者に限定した検討では 2 遺伝子モデルの高リスク多型において、有意な収縮期血圧の高値を認めた。一方、それぞれの遺伝子多型、あるいは MDR の 3 遺伝子モデルでは、血圧値に有意差は認められなかった。

表 14 MDR 法の 2 遺伝子モデルと血圧の相関 (全例)

	低リスク多型	高リスク多型	p
n	(4230)	(4735)	
収縮期血圧 (mmHg)	132±19	132±19	0.224
拡張期血圧 (mmHg)	79±12	79±12	0.605

表 15 MDR 法の 2 遺伝子モデルと血圧の相関 (降圧薬非服用者)

	低リスク多型	高リスク多型	p
n	(3406)	(3766)	
収縮期血圧 (mmHg)	128±18	129±18	0.0285
拡張期血圧 (mmHg)	78±11	78±11	0.452

上記の有意 SNP #1 と、別に有意性を示した 2 つの SNP (#6 と #7) について、それらの組合せと血圧との関連を大規模集団サンプルを用いて検討した。

3 つの遺伝子について、そのリスク多型の集積と、各群における対象者数を表 16 に示した。

表 16 リスク多型の集積と対象者数

	リスク多型の集積数				計
	0	1	2	3	
人数	2793	5127	2088	181	10189
(%)	(27.4)	(50.3)	(20.5)	(1.8)	(100.0)

年齢や性別などの交絡因子を調整した上での、これらリスク多型の集積と高血圧 (収縮期血圧 140 mmHg 以上、かつ/または拡張期血圧 90 mmHg 以上、かつ/または降圧薬服用者) との関連をロジスティック回帰分析によるメタアナリシスで検討した (表 17)。その結果、リスク多型がない場合に比して、リスク多型 3 つの集積者では、高血圧に対するオッズ比が 1.55 であった。

表 19 リスク多型の集積と高血圧

	集積数 1		集積数 2		集積数 3	
	p	オッズ	p	オッズ	p	オッズ
性別	0.000	0.768	0.011	0.795	0.117	0.831
年齢	0.000	1.084	0.000	1.082	0.000	1.086
BMI	0.000	1.179	0.000	1.196	0.000	1.218
喫煙	0.839	1.015	0.516	0.941	0.279	0.877
総コレステロール	0.758	1.000	0.573	1.001	0.539	0.999
HDL コレステロール	0.000	1.014	0.000	1.017	0.000	1.019
中性脂肪	0.000	1.003	0.000	1.003	0.000	1.003
血糖	0.000	1.005	0.000	1.006	0.000	1.007
リスク多型	0.012	1.160	0.000	1.387	0.022	1.551

リスク多型の集積と、交絡因子の調整済み平均値との相関を図 5 に示した。3 つのリスク多型が集積した場合、リスク多型のないコントロール群と比し、調整済み収縮期血圧で 3 mmHg の有意な上昇を認めた。

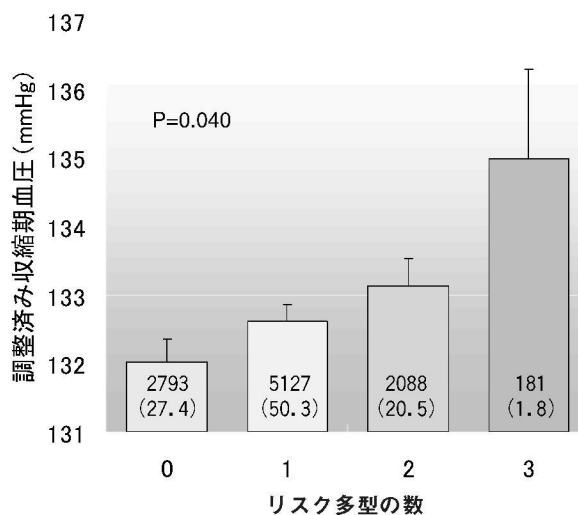


図 5 リスク多型の集積と調整済み収縮期血圧平均値

スクリーニングで有意性を示したSNPについて、より有意性の強いSNP、あるいは機能性SNPを特定する目的で、周辺領域のファインマッピングを行った。具体的には有意性を示したSNPを中心とし、その周辺約±50Kbpにおいて5-10Kbp毎にマーカーSNPを設定して有意性を検討した。

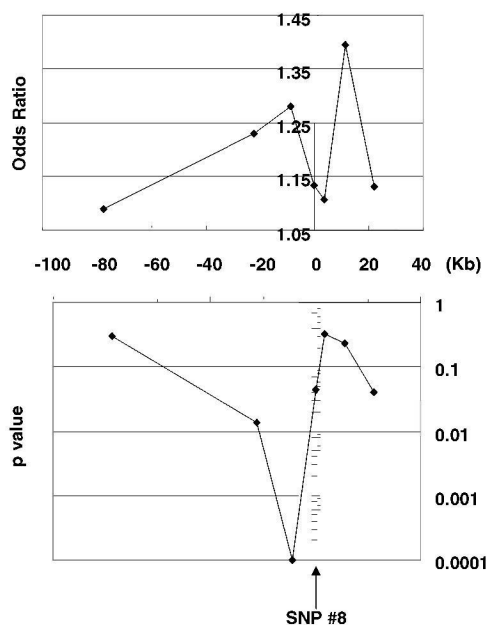


図6 有意SNP #8の周辺領域の探索

ファインマッピングの一例を図6に示した。1次スクリーニングで有意性を示したSNP #8を中心とした検討から、約5000bp上流に強い相関を示すSNP #9を同定した。

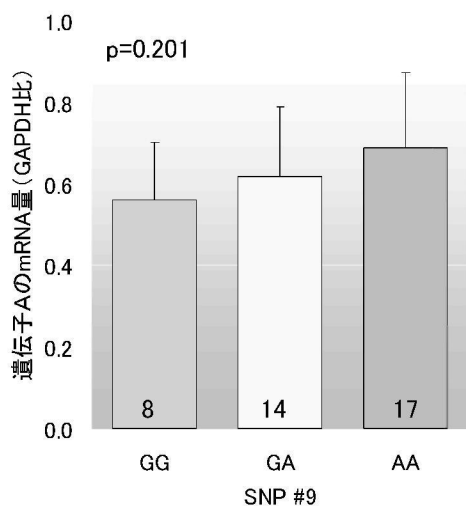


図7 リンパ球における遺伝子Aの発現量とSNP #9の相関

これらSNPが位置する遺伝子Aについて、不死化リンパ球でのmRNAの発現量と当該SNPとの関連をリアルタイムPCR法により検討した(図7)。対象は、愛媛県下のコホートAから無作為に抽出した39例とした。その結果、対象者数が少ないため有意水準を満たさなかったが、SNP #9が当該遺伝子のmRNAの発現と相関する可能性が示唆された。

### ⑤ 遺伝-環境相互作用の検証

従来より高血圧・動脈硬化との相関が報告されている遺伝子について、環境因子との交絡に着目して再検討を行った。

Gタンパク質αサブユニット遺伝子(GNAS1)のT393C多型と高血圧との関連について、愛媛県下のコホートAを対象に検討した(成果発表リスト; 30114154)。対象者の臨床背景を表20に示した。

表20 対象者の臨床背景

	正常血圧者 (1609)	高血圧者 (699)	
性別(男/女)	1385/224	622/77	NS
年齢(歳)	51±8	55±6	0.0001
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23±3	24±3	0.0001
収縮期血圧(mmHg)	124±10	151±10.1	0.0001
拡張期血圧(mmHg)	72±6	88±6	0.0001
総コレステロール(mg/dL)	197±31	203±32	0.0001
HDLコレステロール(mg/dL)	60±13	61±14	NS
中性脂肪(mg/dL)	130±74	157±85	0.0001
喫煙(重喫煙/非重喫煙)	461/1148	173/526	NS

GNAS1 遺伝子 T393C 多型と高血圧との関連を表21に示した。その結果、アレル頻度の比較で有意差が認められ、Tアレルが高血圧のリスクであることが示された。この相関は、対象者を喫煙の程度で層別化した場合により顕著であり(表22)、当該遺伝子多型と高血圧との相関には、喫煙の交絡があることが示唆された。

表21 GNAS1 遺伝子 T393C 多型と高血圧との関連

	正常血圧	高血圧	p
GNAS1 genotypes			
TT	500 (31%)	238 (34%)	
TC	776 (48%)	342 (49%)	
CC	333 (21%)	119 (17%)	0.094
GNAS1 alleles			
T	1776 (55%)	818 (59%)	
C	1442 (45%)	580 (41%)	0.036

表22 GNAS1 遺伝子 T393C 多型と高血圧との関連(喫煙との交絡)

	正常血圧	高血圧	p	オッズ
非重喫煙者				
TT+TC	899 (77%)	445 (85%)		
CC	249 (23%)	81 (15%)	0.0028	1.52
重喫煙者				
TT+TC	377 (82%)	135 (78%)		
CC	84 (18%)	38 (22%)	0.29	0.79

エンドセリン1 (ET1) 遺伝子のK198N多型と高血圧との関連について、愛媛県下のコホートAと、兵庫県下の人間ドック受診者とを対象に検討した(成果発表リスト:301141557)。その結果、K198N多型と血圧とに直接の相関は認められなかった(表23)。BMI 25kg/m<sup>2</sup>を基準とした場合の肥満度別の検討(表24, 25)でも、K198N多型と血圧には有意な相関は認められなかった。

表23 ET1 遺伝子K198N多型と血圧との相関

	GG (1704)	GT (1229)	TT (269)	p
性別(男性%)	85.9	84.8	83.6	0.32
年齢(歳)	53±0.2	52±0.2	52±0.5	0.059
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23±0.1	23±0.1	23±0.2	0.21
SBP(mmHg)	130±0.4	130±0.5	127±1	0.87
DBP(mmHg)	77±0.3	77±0.3	76±0.6	0.93
総コレステロール(mg/dl)	199±0.9	198±0.9	198±1.9	0.43
HDLコレステロール(mg/dl)	59±0.3	59±0.4	60±0.9	0.78
中性脂肪(mg/dL)	137±2.2	136±2.3	126±4.3	0.52

表24 ET1 遺伝子K198N多型と血圧との相関(非肥満群)

	GG (1265)	GT (1002)	TT (211)	p
正常体重群				
SBP(mmHg)	128±0.5	128±0.5	125±1.1	0.97
DBP(mmHg)	75±0.3	76±0.3	74±0.7	0.77

表25 ET1 遺伝子K198N多型と血圧との相関(肥満群)

	GG (439)	GT (297)	TT (58)	p
肥満群				
SBP(mmHg)	136±0.7	138±0.9	136±1.9	0.18
DBP(mmHg)	81±0.5	82±0.6	80±1.2	0.48

しかしながら、高血圧/正常血圧を従属変数としたロジスティック回帰分析では、肥満と遺伝子多型とに相互作用が認められ、肥満者ではTアレルがリスクとなることが示された(図8)

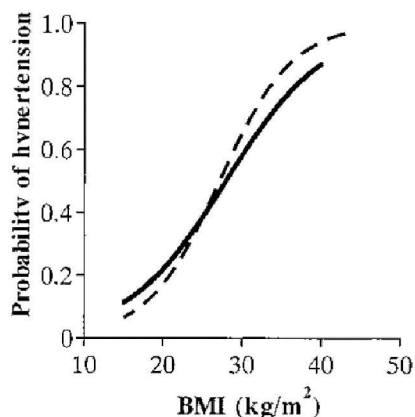


図8 高血圧に対するK198N多型とBMIとの相互作用

愛媛県島嶼部の一般地域住民205例を対象に、動脈硬化との相関が示唆されてきたアンジオテンシン変換酵素(ACE)遺伝子I/D多型、アンジオテンシン(AGT)遺伝子M235T多型、アンジオテンシンII 1型受容体(AT1R)遺伝子A1166C多型、アポリポタンパク質E(apoE)遺伝子多型と頸動脈超音波検査所見との関連を検討した(成果発表リスト:202201506)。その結果、いずれの遺伝子多型も単独では頸動脈内膜中膜複合体厚(IMT)、血管径、プラークスコアと関連しなかった(表26~表29)。

表26 ACE 遺伝子多型と頸動脈エコー所見との相関

ACE	II (83)	ID (95)	DD (27)
年齢(歳)	70±9	70±10	69±8
IMT(X10 <sup>-1</sup> mm)	7.9±1.2	8.0±1.4	8.1±1.4
血管内径(mm)	6.6±0.9	6.5±0.9	6.8±0.9
プラークスコア	0.12±0.4	0.20±0.5	0.15±0.4

表27 AGT 遺伝子多型と頸動脈エコー所見との相関

AGT	MM (10)	MT (69)	TT (126)
年齢(歳)	68±8	71±10	70±9
IMT(X10 <sup>-1</sup> mm)	7.7±1.5	8.0±1.3	8.0±1.3
血管内径(mm)	6.5±0.9	6.7±0.8	6.5±0.9
プラークスコア	0.40±1.0	0.13±0.4	0.16±0.5

表28 AT1R 遺伝子多型と頸動脈エコー所見との相関

AT1R	AA (183)	AC (19)	CC (3)
年齢(歳)	70±9	72±10	70±14
IMT(X10 <sup>-1</sup> mm)	8.0±1.3	8.0±1.4	8.0±1.5
血管内径(mm)	6.5±0.9	6.9±1.0	7.3±0.9*
プラークスコア	0.15±0.5	0.21±0.5	0.33±0.6

表29 ApoE 遺伝子多型と頸動脈エコー所見との相関

ApoE	E3/E3 137	E3/E2 27	E3/E4 38	E2/E4 3
年齢(歳)	70±10	72±9	69±8	65±7
IMT(X10 <sup>-1</sup> mm)	7.9±1.3	7.9±1.2	8.3±1.6	8.6±1.7
血管内径(mm)	6.6±0.9	6.3±0.9	6.7±1.0	7.1±0.5
プラークスコア	0.15±0.4	0.22±0.5	0.16±0.6	0.3±0.6

しかしながら、遺伝子多型別の重回帰分析では、IMTに対し多型特異的な相関が認められた。年齢とIMTとの相関は、アンジオテンシン変換酵素遺伝子のDアレル保有者のみで認められた。同様にSBPとIMTとの相関は、アンジオテンシンノーゲン遺伝子のTT型、アポリポタンパク質遺伝子のE4型でのみ認められた。そこでこれら相互作用項を変数に投入した一般線形分析を行ったところ、種々の交絡因子を調整した上で、これら相互作用はIMTの有意な説明変数となった(表29)。反面、これら4つの遺伝子多型の組合せと頸動脈超音波画像診断所見とは有意な相関は認められなかった。



表 30 IMT に対する一般線形分析

	F	p
年齢 (歳)	35.7	<0.0001
性別	2.81	0.095
収縮期血圧 (mmHg)	10.72	0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	14.92	<0.0001
総コレステロール (mg/dl)	1.83	0.18
血糖 (mg/dl)	2.14	0.15
ACE 遺伝子多型	3.48	0.064
AGT 遺伝子多型	7.03	0.009
ApoE 遺伝子多型	4.42	0.037
AT1R 遺伝子多型	0.09	0.77
交互作用		
年齢と ACE 遺伝子多型	4.40	0.037
収縮期血圧と AGT 遺伝子多型	7.61	0.006
BMI と ApoE 遺伝子多型	6.11	0.014

## ⑥大規模集団サンプルによるメタアナリシス

主に既知の高血圧・動脈硬化関連遺伝子について、大規模集団を用いたメタアナリシスから、その有意性を検証した。解析した SNP は表 31 に示した。

表 31 大規模集団サンプルで解析した SNP

遺伝子名	多型	rs 番号
ADRB2 アドレナリン $\beta$ 2 受容体	Gln27Glu	rs1042714
ADRB3 アドレナリン $\beta$ 3 受容体	Trp64Arg	rs4994
ADRB2 アドレナリン $\beta$ 3 受容体		rs1042713
GNAS Gタンパク質 $\alpha$ サブユニット	T393C	rs7121
AGT アンジオテンシノーゲン	M235T	rs699
EDN1 エンドセリン 1	K198N	rs5370
GNB3 Gタンパク質 $\beta$ サブユニット	C825T	rs5443
ADD1 $\alpha$ アデュシン	Gly460Trp	rs4961
BDKRB2 プラジキニン B 2 受容体	C-58T	rs1799722
SCNN1A 表皮型ナトリウムチャネル		rs3759324
DBH ドーパミン $\beta$ 水酸化酵素		rs1611115
LEPR レプチン受容体		rs1137100
ALDH2 アルデヒド脱水素酵素		rs671
CAT カタラーゼ		rs769214
ALAP 腫瘍壊死因子 $\alpha$		rs30187
CMA1 キマーゼ		rs1800875
ACE アンジオテンシン変換酵素	I/D	

高血圧者 (収縮期血圧 140 mmHg 以上、かつ/または拡張期血圧 90 mmHg 以上、かつ/または降圧薬服用者) を対象としたメタアナリシスから、種々の交絡因子を調整した上で、アンジオテンシン変換酵素の M235T 多型が、高血圧の有意な独立した説明変数であることが示された (表 32)。それ以外の遺伝子多型については、血圧/高血圧と直接的な相関は認められなかった。

表 32 アンジオテンシノーゲン M235T 多型と高血圧

	p 値	オッズ比
性別	0.000	0.75 (0.66 -0.86)
年齢 (歳)	0.000	1.08 (1.08 -1.09)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.000	1.18 (1.16 -1.20)
喫煙	0.143	0.91 (0.80 -1.03)
脳血管障害の既往	0.004	1.68 (1.18 -2.39)
心疾患の既往	0.000	1.50 (1.20 -1.86)
総コレステロール (mg/dl)	0.860	1.00 (1.00 -1.00)
HDL コレステロール (mg/dl)	0.000	1.02 (1.01 -1.02)
中性脂肪 (mg/dl)	0.000	1.00 (1.00 -1.00)
血糖 (mg/dl)	0.000	1.01 (1.00 -1.01)
遺伝子多型	0.028	1.12 (1.01 -1.25)

## &lt;国内外での成果の位置づけ&gt;

## a. サンプルの収集

国外では国単位でのサンプルの収集も行われている。本邦でもオーダーメイド医療実現化プロジェクトとして30万人規模のサンプル・バンキングが開始されたが、ケース/コントロールでのサンプリングのため、臨床情報が不足していることは否めない。そのような状況下で、本研究を通じて構築された大規模集団サンプルは、国内で最大規模であるばかりでなく、精緻な臨床情報を備えている点で、世界有数の集団サンプルといえる。

## b. 既知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析

最も広く行われている高血圧関連遺伝子の統計学的解析法は小規模な患者対照を用いた相関研究であるが、高血圧のように個々の関連遺伝子の影響力が弱い疾患では統計学的なパワーが不足する。また、今までに国内外で行われてきた高血圧の遺伝子解析では、交絡因子との相互作用はあまり考慮されておらず、本研究結果ほどの有意な結果も報告されていない。したがって、本研究は高血圧感受性遺伝子解析の最先端の成果であり、今後、世界中の大規模集団における replication が行われることが予想される。

## c. 未知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析

シグナル伝達系を中心に網羅的な感受性遺伝子解析を行った。従来の検討は、1つの遺伝子、あるいは1つの生物学的パスウェイ上の遺伝子群を対象としたものであり、本研究のような網羅的な検討はなされていない。スクリーニングで得られたSNPが、大規模集団サンプルを用いた解析でも有意性を示しており、高血圧感受性遺伝子解析における有用な成果といえる。今後、世界中の大規模集団における replication が行われることが期待される。

## &lt;達成できなかったこと、予想外の困難、その理由&gt;

研究開始当初は、倫理審査委員会の立ち上げや事務手続きのため、サンプル収集あるいは共同研究ベースでの集積開始が遅延した。SNPの解析はハイスループットが要求されるため、主にTaqMan法を用いて行っている。しかし、TaqMan法では解析できないSNPも少なからず存在するために他の方法論の導入が必要になる。反面、その経済負担が大きいため、解析SNPsの数の削減を余儀無くされている。現状で11,000検体を集積したが、予想以上に個々の

遺伝素因の影響が少なく、サンプル集団のさらなる大規模化が必要である。

#### <今後の課題>

- より多くのサンプル、表現型や交絡因子の情報収集が必要である。
- 種々のアプローチで得られた候補遺伝子多型について、大規模集団でレプリケーションを確認する必要がある。
- 今までに得られた成果および今後得られる成果を統合して、統計学的に複合遺伝子診断を行うための予測法を予備的に大規模集団において適用してその適合度を調べ、さらに精度を高めるための方法を探索する。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

1. 202201456 Uemura K, Kohara K, Nakura J, Miki T. Deletion polymorphism of ACE gene is associated with higher blood pressure after hospitalization in normotensive subjects. *Hypertens Res.* 2000;23:201-205.
2. 202201506 Tabara Y, Kohara K, Nakura J, Miki T. Risk factor-gene interaction in carotid atherosclerosis: effect of gene polymorphisms of renin-angiotensin system. *J Hum Genet.* 2001;46:278-84.
3. 202201512 Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T, Doi T, Tokunaga H, Konishi I. An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and common carotid atherosclerosis. *J Hum Genet.* 2001;46:506-10.
4. 202201521 Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, Miki T. Genotype-specific association between circulating soluble cellular adhesion molecules and carotid intima-media thickness in community residents: J-SHIP study. *Shimanami Health Promoting Program. Hypertens Res.* 2002;25:31-9.
5. 301141549 Abe M, Nakura J, Yamamoto M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Kohara K, Miki T. Association of GNAS1 gene variant with hypertension depending on smoking status. *Hypertension.* 2002;40:261-5.
6. 301141557 Jin JJ, Nakura J, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Kohara K, Miki T. Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension.* 2003;41:163-7.
7. 301141609 Tabara Y, Kohara K, Miki T. Polymorphisms of genes encoding components of the sympathetic nervous system but not the renin-angiotensin system as risk factors for orthostatic hypotension. *J Hypertens.* 2002;20:651-6.
8. 301141619 Tabara Y, Kohara K, Ohnishi M, Nakura J, Miki T. Gene for medical cost? *J Am Geriatr Soc.* 2002;50:775-6.
9. 301141630 Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T. An interaction between systolic blood pressure and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on carotid atherosclerosis. *Hypertens Res.* 2002;25:875-80.
10. 311070941 Jin JJ, Nakura J, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Chen Y, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Bo X, Kohara K,

Miki T. Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension. *Hypertens Res.* 2003;26:547-52.

11. 311070955 Wu Z, Nakura J, Abe M, Jin JJ, Yamamoto M, Chen Y, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Bo X, Kohara K, Miki T. 402242106 Genome-wide linkage disequilibrium mapping of hypertension in Japan. *Hypertens Res.* 2003;26:533-40.
12. 0402242106 Ogimoto A, Hamada M, Nakura J, Shigematsu Y, Hara Y, Ohtsuka T, Morishima A, Kimura A, Miki T, Hiwada K. 17-year follow-up study of a patient with obstructive hypertrophic cardiomyopathy with a deletion mutation in the cardiac myosin binding protein C gene. *Circ J.* 2004;68:174-7.
13. 404021015 Babaya N, Ikegami H, Fujisawa T, Nojima K, Itoi-Babaya M, Inoue K, Nakura J, Abe M, Yamamoto M, Jin JJ, Wu Z, Miki T, Fukuda M, Ogihara T. Association of I27L polymorphism of hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene with high-density lipoprotein cholesterol level. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2548-51.

##### 2) 特許

特許番号： 特願 2005-344267

発明の名称： 高血圧の遺伝子マーカー

特許権者： 国立大学法人愛媛大学・国立大学法人大阪大学・国立大学法人滋賀医科大学・国立大学法人千葉大学・学校法人日本大学・公立大学法人横浜市立大学

発明者： 三木哲郎・小原克彦・名倉 潤・田原康玄・荻原俊男・勝谷友宏・上島弘嗣・喜多義邦・中村保幸・羽田 明・相馬正義・中山智祥・梅村敏・平和伸仁・徳永勝士

登録年月日： 平成 17 年 11 月 29 日