

## 循環器疾患関連遺伝子の解明

●木村 彰方<sup>1,2)</sup> ◆吉田 雅幸<sup>3)</sup> ◆赤井 潤<sup>1)</sup> ◆和泉 徹<sup>4)</sup> ◆安波 道郎<sup>2)</sup>

1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 2) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所  
3) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 4) 北里大学医学部

### 〈研究の目的と進め方〉

心筋梗塞や高血圧性心筋症を含む循環器系疾患は、我が国における3大死因のひとつであり、悪性新生物に次ぐ第2位に位置する。このため循環器疾患の危険因子を同定し、その知見に基づいて早期治療、薬剤選択、発症予防などの方法を策定することは、21世紀の医学における最大の研究課題のひとつである。多くの循環器疾患は生活習慣病とされるが、その危険因子については、これまでに主に疫学的手法により環境要因面での解明がなされて来た。しかしながら、同じ環境要因に曝されても疾患の発症に至る者は一部であり、その病態にも多様性が存在する。従ってそこには遺伝要因が関与すると考えられるが、これまでの遺伝要因面での解析は限られたものに過ぎず、その全貌の解明が急務である。

そこで、本研究では、循環器疾患（心筋梗塞、高血圧性心筋症、特発性心筋症、特発性不整脈、難治性動脈炎など）を対象として、その病因や病態発現に關与する遺伝要因（遺伝的多型あるいはゲノム多様性）を同定し、さらに同定された疾患関連多型の機能的意義を解明することを目的とする。具体的には、候補遺伝子解析に加えて、網羅的なマイクロサテライト多型解析や発現解析を行うが、心筋梗塞や難治性動脈炎では、候補遺伝子解析と網羅的マイクロサテライト多型解析を行い、多型頻度の患者・健常者比較検討から疾患関連遺伝子座のマッピングを行う。一方、高血圧性心筋症では、候補遺伝子を探索するために動物モデルを用いた発現解析を行う。具体的には、Dahl食塩負荷（DSS）ラットにおける心肥大期および心不全初期の心臓で発現変化する遺伝子群を特定し、そのヒトオルソログを候補遺伝子として、ヒト疾患に關連するゲノム多様性の解析を行う。またこれらの方法で同定される多型について機能的変化を検討する。さらに特発性心筋症では既知の疾患関連遺伝子との機能連関を指標とした候補遺伝子選択を行うとともに、心筋症モデル動物における心筋サルコメアの形態ならびに機能の変化を解析する。

ロサテライト多型を検索し、これを用いて心筋梗塞との相関を検討する。一方、プールDNA法を用いて、網羅的にマイクロサテライト多型のアリル頻度分布を患者群と健常者群で比較することにより、疾患関連遺伝子領域のマッピングを行う。

2) 高血圧性心筋症：食塩負荷DSSラットより心肥大初期および心不全初期に心筋サンプルを収集し、それぞれの間での遺伝子発現プロファイルの変化を検討する。発現の変化が示された遺伝子についてRT-PCR法による発現変化を確認し、これまでに心肥大あるいは心不全との関連が示唆されていなかった既知および未知の遺伝子について、そのヒトオルソログ遺伝子の解析を行う。一方、心筋に特異的に発現する筋型ミオシンフォスファターゼ抑制サブユニットM21の機能解析を行うとともに、M21を高発現するトランスジェニックマウスを作製し、心筋における形態変化と遺伝子発現パターンの変化を検討する。

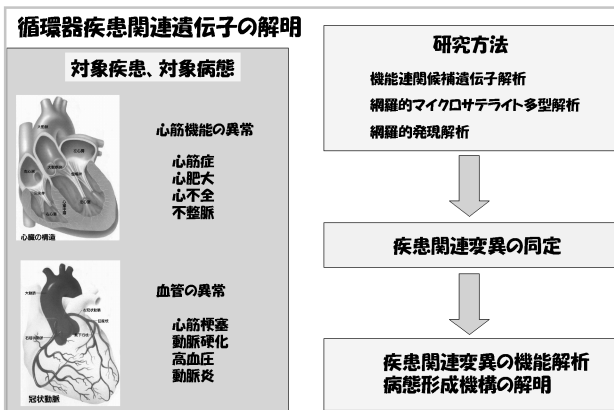
3) 特発性心筋症：特発性心筋症は、主に肥大型心筋症と拡張型心筋症の2つの臨床病型に分類される。いずれの心筋症とも家系内発症が知られており、それらは遺伝子変異に起因する。これまでの解析により、肥大型心筋症ではサルコメア収縮要素の変異、拡張型心筋症ではサルコレンマ構成要素の変異が病因になることが明らかになっているが、大多数の患者ではその病因は不明である。そこで、これまでの解析で変異が特定されていない患者集団を対象として、心筋に強く発現する遺伝子や既知の原因遺伝子との機能連関を指標として選択した候補遺伝子について、その変異ないし多型を検索する。疾患関連変異が見出された場合には、その機能変化を解析する。

4) 難治性不整脈：高血圧の合併症として心肥大や心不全が生じるが、これらはまた不整脈の誘引ともなる。不整脈の発症には種々の心筋チャンネル遺伝子が関与していることが明らかになっているが、わが国の症例における個々の心筋チャンネル変異の体系的な解析はない。そこで、家族性ならびに孤発性の不整脈患者について既知の不整脈原因遺伝子の解析を行う。また、それらに変異のない集団で心筋に発現する他のチャンネル遺伝子を候補として変異を検索し、さらに変異の機能解析を実施することで、新たな不整脈関連遺伝子を同定する。

5) 難治性動脈炎：高安病の疾患感受性と關連するHLA領域を詳細に解析することで感受性遺伝子座をマッピングし、同領域内の候補遺伝子についてのSNP多型検索と疾患との相関解析を行う。一方、Buerger病についても同様にHLA領域内の詳細な解析から、感受性遺伝子座をマッピングする。これらの方法によって疾患との相関を認めた遺伝子については多型の機能解析を行う。

### 〈研究期間の成果〉

- 1) 心筋梗塞
  - 1-1) 候補遺伝子アプローチによる心筋梗塞関連遺伝子の同定
    - 国内外において心筋梗塞ないし冠動脈疾患と關連する



### 〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 心筋梗塞：候補遺伝子のSNP多型やその周辺のマイク

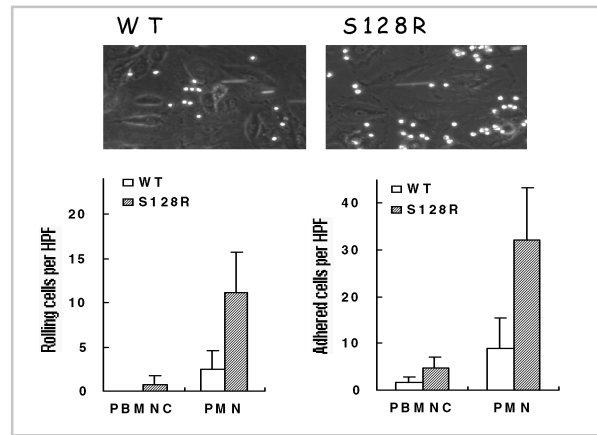
ことが報告された種々の遺伝子多型 (E-selectin, ACE, eNOS,  $\beta$  fibrinogen, GPIIIa, HUMPONA, MTHFR, PAF-AH, TGF  $\beta$  1, CYP11B2, LTA, PECAM1, CD14のそれぞれの多型) について、患者—対照比較研究を行った。その結果、E-selectin Ser128Arg多型のArg型陽性 (0.126 vs 0.067, OR=2.0, p=0.039)、CD14 C-159T多型のTT型 (0.353 vs 0.245, R=1.7, p=0.027)、およびPECAM1 Asn563Ser多型とGly670Arg多型 (互いに強い連鎖不平衡にある) のSer/Ser型 (0.334 vs 0.234, OR=1.6, p=0.040) とArg/Arg型 (0.324 vs 0.230, OR=1.6, p=0.048) で関連を認めた。このうち、PECAM1多型との関連は男性、冠動脈硬化が強い多枝病変群でより強く関連した。これに対して、E-selectin多型、CD14多型との関連は女性でより強い関連を示した。(業績8, 18, 19)

Association of Genetic Markers with Myocardial Infarction in the Screening Test							
Gene	polymorphism	marker	freq. In patients#1	freq. In controls#2	OR	p	95%CI
E-selectin	Ser128Arg	128Arg allele positivity	0.126	0.067	2.00	0.039	1.04-3.85
ACE	IVS16 Del vs Ins	DD genotype	0.147	0.124	1.22	ns	0.66-2.25
eNOS	prom -922 A to G	-922 G allele positivity	0.215	0.210	1.03	ns	0.57-1.87
eNOS	IVS4 4a/4b	4a/4a genotype	0.000	0.021	-	ns	-
eNOS	Glu298Asp	298Asp allele positivity	0.169	0.146	1.19	ns	0.63-2.27
$\beta$ fibrinogen	prom -453 G to A	-453 G allele positivity	0.725	0.707	1.10	ns	0.67-1.80
$\beta$ fibrinogen	Arg448Lys	448Lys allele positivity	0.279	0.291	0.94	ns	0.58-1.56
$\beta$ fibrinogen	3' region BcII +/-	BcII (-) allele positivity	0.256	0.272	0.92	ns	0.55-1.54
GPIIIa	Leu53Pro	33Pro allele positivity	0.000	0.000	-	ns	-
HUMPONA	Arg192Gln	192Gln allele positivity	0.910	0.876	0.92	ns	0.49-1.73
MTHFR	Ala667Val	667Val allele positivity	0.630	0.630	1.00	ns	-
MTHFR	Ala667Val	667Val/Val genotype	0.111	0.148	0.72	ns	0.37-1.40
PAF-AH	Val279Phe	279Phe allele positivity	0.375	0.345	1.14	ns	0.77-1.70
PAF-AH	Val279Phe	279Phe/Val genotype	0.044	0.032	1.40	ns	0.53-3.71
TGF $\beta$ 1	Leu10Pro	10Leu allele positivity	0.720	0.754	0.84	ns	0.52-1.35
TGF $\beta$ 1	Leu10Pro	10Leu/Leu genotype	0.169	0.193	0.85	ns	0.49-1.48
TGF $\beta$ 1	Leu10Pro	10Leu/Pro genotype	0.552	0.562	0.96	ns	0.63-1.47
TGF $\beta$ 1	Arg25Pro	25Pro allele positivity	0.000	0.000	-	ns	-
CYP11B2	prom -344 T to C	-344 C genotype	0.507	0.469	1.17	ns	0.77-1.78
CYP11B2	prom -344 T to C	-344 C/C genotype	0.096	0.104	0.91	ns	0.45-1.85
PECAM1	Val129Leu	129Leu/Leu genotype	0.257	0.192	1.46	ns	0.88-2.42
PECAM1	Asn563Ser	563Ser/Ser genotype	0.234	0.231	1.02	ns	0.61-1.69
PECAM1	Gly670Arg	670Arg/Arg genotype	0.324	0.230	1.60	0.048	1.00-2.57
connexin 37	Pro319Ser	319Ser allele positivity	0.845	0.764	1.67	ns	0.74-3.20
p22phox	C242T	242T allele positivity	0.233	0.228	1.03	ns	0.53-2.00
LTA	introni A252G	G6 genotype	0.165	0.149	1.13	ns	0.68-2.38
CD14	prom -260 C to T	-260T genotype	0.353	0.245	1.69	0.027	1.06-2.68

#1: number of tested patients was 136  
#2: numbers of tested controls were from 200 to 235 (depending on loci)

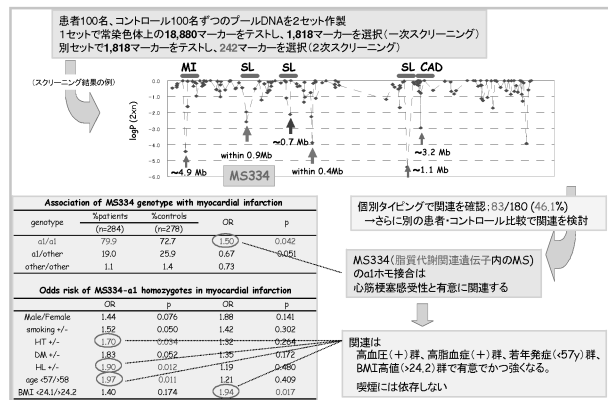
さらに、網羅的SNP解析や大規模候補遺伝子解析から日本人心筋梗塞との関連が報告されたLTA (A252G) 多型、Cx37 (C1019T) 多型、p22phox (C242T) 多型について関連解析を行った。LTA多型については、心筋梗塞のリスクと報告されたGG型頻度は、患者 (n=537) で15.1%、コントロール (n=683) で14.9%であり、全く関連を認めなかった (p=0.94)。また、韓国人集団についての解析を行ったところ、患者 (n=483) で20.7%、コントロール (n=157) で19.5%であり、やはり関連は認められなかった (p=0.74)。しかしながら、患者群を罹患動脈数で分類すると、0枝、1枝、2枝、3枝罹患群におけるGG型頻度は、それぞれ日本人患者では9.1%, 11.7%, 17.2%, 20.2%、韓国人患者では8.3%, 15.4%, 29.8%, 32.9%と罹患動脈が増えるにつれて有意な相違が存在した (日本人ではp=0.017、韓国人ではp=0.0011)。このことは、LTA多型は、心筋梗塞と関連するのではなく、冠動脈硬化症の重症度と関連することを強く示唆する。一方、Cx37の1019T陽性者頻度は、患者 (n=508) で32.5%、コントロール (n=572) で26.2%と弱い関連 (OR=1.35, p=0.024) が確認された。それに対して、p22phox 242T陽性者頻度は患者 (n=482) で17.8%、コントロール (n=603) で19.3%であり、有意な関連は確認されなかった (OR=0.91, p=0.58)。

一方、心筋梗塞関連多型であるE-selectin Ser128Argの機能解析を行った。128Ser型、128Arg型それぞれのE-セレクチン遺伝子を血管内皮細胞に導入し、リンパ球や顆粒球の接着能を検討したところ、心筋梗塞に関連する128Arg型は白血球接着能の高いことが判明した。また、血管内皮細胞側のシグナル伝達系分子を検討したところ、128Arg型ではMAPキナーゼ系の活性化が亢進していた。(業績19)



## 1-2) 網羅的マイクロサテライト (MS) 解析による心筋梗塞関連遺伝子の同定

多因子疾患の関連遺伝子を同定する手法には、候補遺伝子解析と、それと相補的な手法としてMSマーカーを用いた関連解析がある。我々はHLA領域内の約20種のMSマーカーを用いた解析により、慢性関節リウマチおよび高動脈炎などの疾患感受性領域の詳細なマッピングを行い、これらの疾患にTNF-MICA間にマップされる遺伝子、特にIKBL遺伝子が疾患発症に関連することを示した (業績1,6,17)。



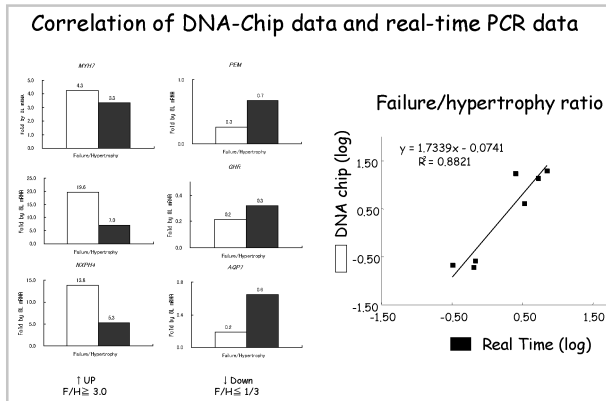
そこで、網羅的なMS関連解析を用いた心筋梗塞感受性遺伝子マッピングを行った。まず、心筋梗塞患者100名、一般健常者集団 (コントロール) 100名からなるそれぞれのプールDNAを対象として、常染色体上にマップされる18,880のMSマーカーについて多型パターンを検討した。その結果、個々の多型ピークの2x2比較あるいはピーク全体の2xm比較のいずれかで有意 (p<0.05) な編差を認めたMSマーカーを1,818選択した。ついで、これらのMSマーカーについて、別の患者100名、コントロール100名からなるプールDNAを用いた解析を行い、有意な編差を示す242のMSマーカーを選択した。さらに、これらについて再度のプールDNA解析を実施し、207のMSマーカーで有意な編差を確認した。これらのうち1Mb以内に2個以上のMSがマップされるローカスは20あり、うち6ローカスは連鎖解析で心筋梗塞原因遺伝子座の候補とされているローカスの近傍にあった。そこで、プールDNA解析に用いた患者、コントロールからランダムに192名ずつを選択し、これらのMSマーカーについての個別タイピングによる関連確認を実施し、83のマーカーで有意な関連を確認した。さらに、そのうち28マーカーについて別の患者、コントロールそれぞれ90-190名の個別タイピングを実施したところ、5マーカーで関連が再確認された。これらの5座位はいずれも従来の候補遺伝子アプローチで示さ

れた心筋梗塞関連遺伝子が存在する領域とは異なっており、新規の心筋梗塞感受性遺伝子領域であると考えられた。マイクロサテライト自体は単なる遺伝マーカーとも考えられるが、繰り返し数の違いによってトポロジカルな構造変化が生じ、このため転写活性がアレルごとに違う場合があることがコラーゲン遺伝子の転写制御領域のマイクロサテライトについて示された（業績2）。一方、我々の実施したスクリーニング手法と個別タイピングによる関連確認手法は、OR=2.5程度以上の危険率を与える心筋梗塞関連遺伝子のうち約50%を検出出来る研究デザインに基づくものであるが、本研究の結果から、そのような心筋梗塞関連遺伝子座は全体で15-20個程度存在することが示唆された。

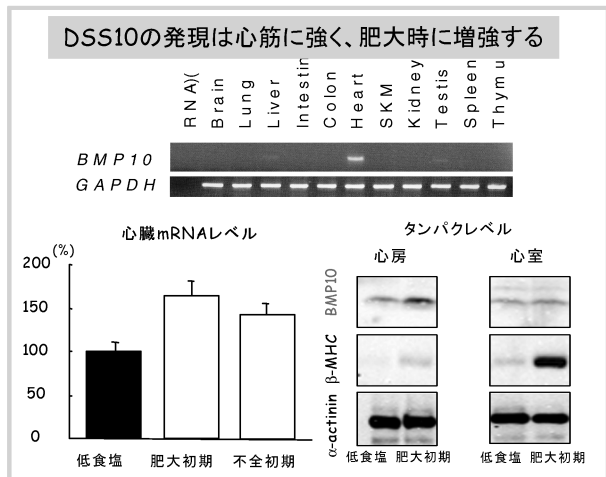
## 2) 高血圧性心筋症

2-1) Dahl食塩感受性高血圧 (Dahl salt sensitive hypertensive, DSS) ラットの心筋における遺伝子発現変化の網羅的解析

生後6週目より高食塩食で飼育したDSSラットについて

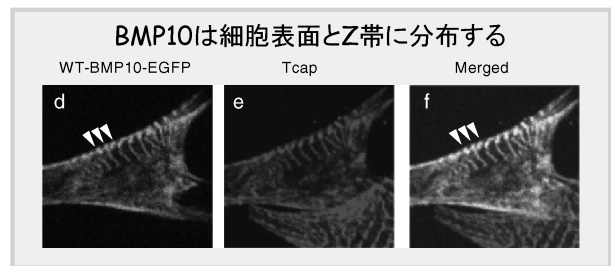


て経時的に心筋の肥大を検討したところ、8週より軽度の心肥大を呈し、11週で求心性肥大の極期に達し、その後12週から遠心性心拡大を来し、15週以降に心不全死した。そこで、8週（心肥大前期、8H）と12週（心不全前期、12H）の心筋を採取し、低食塩で飼育した8週DSSラット（8L）をコントロールとして、DNA-Chipを用いた遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。約8,800遺伝子についての解析から、心肥大期から心不全期に至る間に2倍以上発現が変化する遺伝子（873種）を同定した。ついでこれらのうち既知の遺伝子でないものを中心に、92遺伝子について定量的RT-PCR法を用いて発現変化を検討したところ、DNA-Chipデータと定量的RT-PCRデ

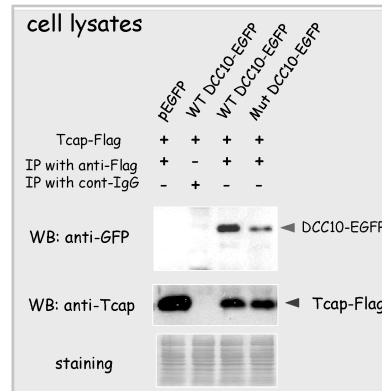


ータはよく相関した。そこで、心不全初期の発現変化が確認され、かつ心筋を中心とした特異な発現パターンを示す遺伝子のうち3種についてさらに詳細な解析を行った。うち1種のDSS-10遺伝子（仮称）は増殖因子様の構造であり、その発現は心肥大期（165%）、心不全期（135%）に増強するものであった。

ついで、これらの高血圧性心筋症関連候補遺伝子について、ヒトオルソログのゲノム構造を決定し、ヒト集団における多型を検討した。その結果、JSNPデータベースにない多数の多型を見出したが、DSS-10遺伝子に見出された変異（Thr326Ile）は進化上よく保存されたアミノ酸の置換を伴うミスセンス変異であった。そこで連続剖検例約1400名について解析したところ、この変異の頻度は高血圧のみの集団（n=616）に1名（0.16%）、高血圧も心筋症もない集団（n=766）に1名（0.13%）ときわめて稀であることが判明した。このことは、この変異が高血圧性拡張型心筋症と有意に関連することを強く示唆した。

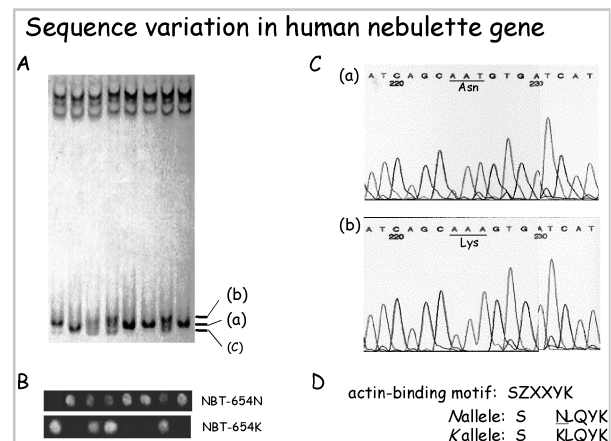


ついで、DSS-10の機能を検証するために単クローン抗体を作製し、これを用いた免疫組織染色を行ったところ、DSS-10は心筋細胞膜表面とZ帯に分布することが判明した。また、GFP標識DSS-10をラット心筋細胞に強制発現すると、細胞膜表面とZ帯に分布することが確認された。一方、酵母2ハイブリッド法を用いて検討したところ、DSS-10はTcapに結合し、変異によって結合性が約半分に低下した。さらにTcapとの結合性、変異による結合性の低下はpull-down法によっても確認された。

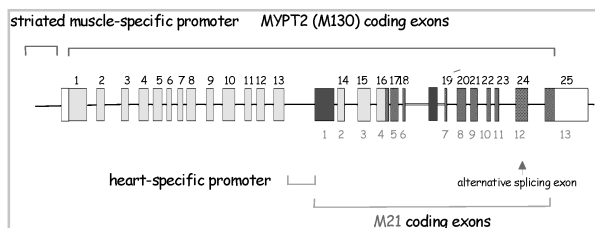


ついで、DSS-10の機能を検証するために単クローン抗体を作製し、これを用いた免疫組織染色を行ったところ、DSS-10は心筋細胞膜表面とZ帯に分布することが判明した。また、GFP標識DSS-10をラット心筋細胞に強制発現すると、細胞膜表面とZ帯に分布することが確認された。一方、酵母2ハイブリッド法を用いて検討したところ、DSS-10はTcapに結合し、変異によって結合性が約半分に低下した。さらにTcapとの結合性、変異による結合性の低下はpull-down法によっても確認された。

## 2-2) ミオシン脱リン酸化酵素サブユニットM21の解析



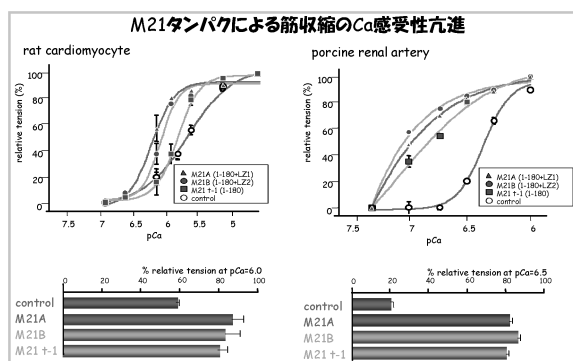
心筋疾患に関連する候補遺伝子を探索する目的で、Bodymapを利用した解析ならびに心筋と骨格筋との subtraction解析によって心筋に強く発現する新規遺伝子を多数同定し、それぞれの機能ないし多型を検討した(業績3,5,12)。特に、心筋特異的に発現する遺伝子として単離したネブリン様遺伝子(ネブレット)ならびに平滑筋ミオシン脱リン酸化酵素スモールサブユニットM20様遺伝子(M21)について詳細な解析を行った。



ネブレット多型を検討したところ、アクチン結合ドメイン内に荷電変化を伴う多型(Asn654Lys)を見出した。また、Lys/Lys型は孤発性拡張型心筋症と有意に関連した(7.6% vs 1.2%, OR=6.3, p=0.002, 業績3)。

一方、M21は心筋特異的ミオシン脱リン酸化酵素スモールサブユニットとして単離されたが、ゲノム構造の解析から、これが骨格筋型ミオシン脱リン酸化酵素ラージサブユニットM130遺伝子(MYPT2)内の心筋特異的プロモーターからの転写産物であることが判明した。

また、M21リコンビナントタンパクを用いた機能解析から、M21は心筋収縮のCa感受性を亢進させること、その作用はM21とM110との結合に依存することが明らかとなった(業績4)。



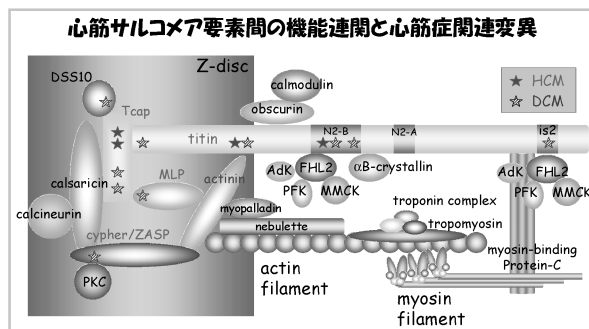
さらにM21を高発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。3系統のトランスジェニックマウスが得られたが、うち1系統で生後20週に心肥大を生じていることを見出した。

### 3) 特発性心筋症

#### 3-1) 機能連関を指標にした心筋症原因遺伝子の探索

高血圧性心筋症は高血圧に続発して心肥大や心拡大・心不全を発症するが、高血圧などの誘引なく心肥大は心拡大を来す疾患が特発性心筋症である。特発性心筋症には主に心肥大を主徴とする肥大型心筋症(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)と、心拡大を主徴とする拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy, DCM)がある。HCMとDCMはいずれも一部は家族性に発症(家族性心筋症)することから連鎖解析や候補遺伝子アプローチが行われ、それぞれで複数の原因遺伝子や疾患関連遺伝子が明らかにされている。前項に述べたように、本研究でも心筋特異的に発現する新規遺伝子の解析から、孤発性DCMとネブレット多型との関連を明らかにした。また、既知の原因遺伝子内の変異を検出し、変異と臨床病態との関連を

検討した(業績13,22,24)。それとは別に、これまでに明らかとなった原因遺伝子との機能的な連関を指標として原因候補遺伝子を選択し、既知の原因遺伝子に変異が見出されないHCMないしDCM患者を対象に疾患関連変異を検索した。その結果、HCM関連遺伝子として、カベオリン3(CAV3)およびテレットニン/Tcap(TCAP)の遺伝子変異を同定した(業績20,30)。一方、DCM関連遺伝子として、タイチン(TTN)、筋LIMタンパク(MLP)、テレットニン/Tcap(TCAP)、サイファー/ZASP(LDB3)の遺伝子変異を同定した(業績9,14,21,30)。これらのうち、TcapはタイチンおよびMLPと結合し、サイファーはカルサルチンを介してTcapと、アクチニンを介してタイチンと結合することから、機能連関を指標に心筋症の原因遺伝子の候補として選択したものである。

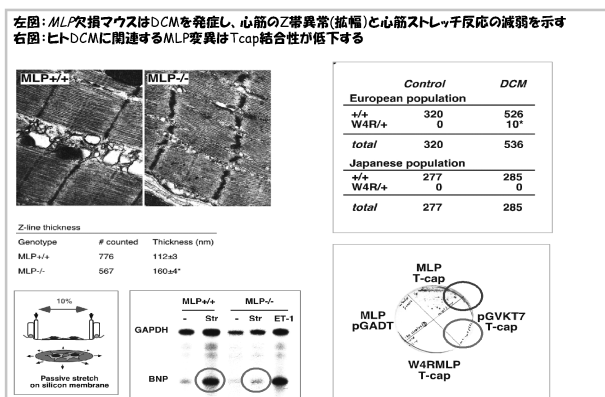


#### 3-2) 肥大型心筋症関連変異による機能変化

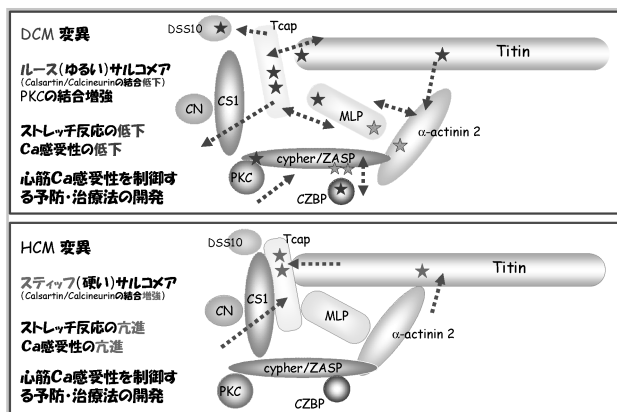
我々を含めたこれまでの研究によってHCM関連変異としてミオシン重鎖、トロポニンT、ミオシン結合タンパクCを中心に多数のサルコメア構成要素変異が特定されている。最近、それらの変異の機能変化が検討され、その多くで心筋収縮のCa感受性が亢進することが報告されている。Ca感受性の亢進とは、比較的低いCa濃度でも心筋収縮が生じること、すなわち弛緩障害を来すことに繋がる。本研究において、HCM関連変異として特定したCAV3変異の機能変化を検討したところ、変異タンパクは細胞内輸送障害のため細胞内貯留を来し細胞表面への発現性が低下することが判明した。このような細胞内輸送障害は筋ジストロフィー関連CAV変異でも報告されているが、HCM関連変異の場合には筋ジストロフィー関連変異より機能異常の程度が小さかった。細胞表面でのカベオリン発現はエンドセリンなどによる心肥大効果を抑制することが報告されているため、細胞表面発現の低下が心肥大の原因あることが示唆された(業績20)。一方、HCM関連変異として特定した2種のTCAP変異について酵母2ハイブリッド法およびpull-down法を用いた検討から、いずれもTcapとカルサルチンおよびタイチンとの結合性を増強すること明らかとなった(業績30)。このことはHCM関連TCAP変異がZ帯構成要素間の結合性増強、つまりstiff sarcomereを来すことを示唆する。従来、筋のストレッチおよびpassive tensionの増加によって筋収縮のCa感受性が亢進することが知られているが、これらの所見を総合するとZ帯要素変異によるstiff sarcomereはCa感受性の亢進をもたらすと推定され、サルコメア構成要素自体の異常と同じ機能変化を生じることが強く示唆された。

#### 3-3) 拡張型心筋症関連変異による機能変化

本研究で特定したDCM関連変異の機能変化を生化学的に検討した。Z帯内でTcapあるいはアクチニンに結合するドメイン内のDCM関連TTN変異は、それぞれTcapあ



るいはアクチニンとの結合性を減弱した(業績9)。また、DCM関連MLP変異はTcapとの結合性が減弱した(業績14)。さらに、DCM関連TCAP変異は、MLPのみならずカルサルチンやタイチンへの結合性が減弱した(業績30)。これらの知見は、前述のHCM関連変異とは逆の機能変化であり、loose sarcomereをもたらすことが示唆された。さらに、MLP欠損マウスはDCMを発症するが、このマウスにおいてDCM発症前からZ帯の伸展、ストレッチ反応の低下が認められたことから、DCMの病因としてストレッチ反応の消失が示唆された(業績14)。



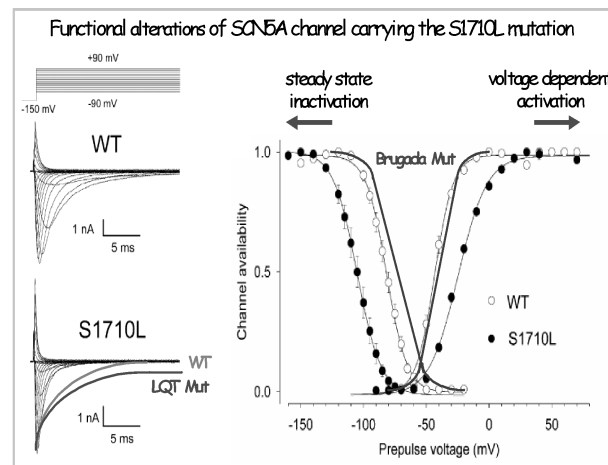
一方、前述の筋ストレッチおよびpassive tensionと筋収縮のCa感受性との関連を考慮すると、DCM関連変異はCa感受性の低下を来すことが強く示唆される。最近、DCM関連のトロポニンT変異によってCa感受性が低下することが報告されているが、本研究の成果と合致する所見である。一方、サイファー/ZASP変異はPKC結合ドメインに存在し、これがPKC結合性を亢進することを明らかにした。DCM関連Tcap変異はカルサルチン結合性の減弱をもたらすが、カルサルチンは脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの担体であることから、Z帯におけるタンパクリン酸化がDCM発症、ひいてはストレッチ反応に関わることが示唆された。

#### 4) 難治性不整脈

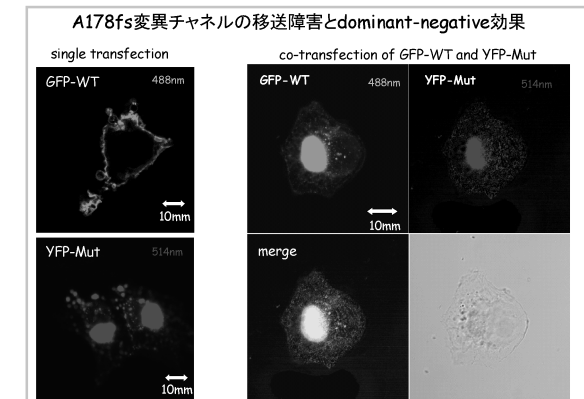
##### 4-1) 不整脈関連変異の特定と機能障害の検討

難治性不整脈である特発性心室細動 (idiopathic ventricular fibrillation, IVF)、QT延長症候群 (long QT syndrome, LQT)、Brugada syndrome, BrS)、カテコラミン誘発性心室頻拍 (catecholamine induced ventricular tachycardia, CPVT) などの症例を対象として、心筋チャネル遺伝子の変異ないし多型を検索し、疾患関連変異が見出された場合には電気生理学的に機能変化を検討した。その結果、BrS様の心電図変化を伴わないIVF症例にSCN5A変異 (Ser1710Leu) を見出した。この変異はLQT型変異とは異なりチャネル閉鎖が早く生じること、BrS

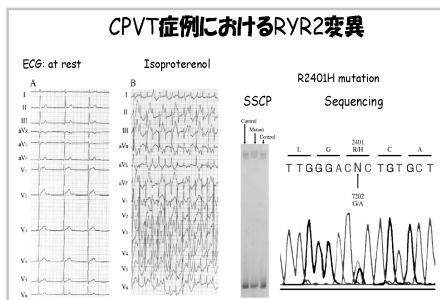
型変異とは異なり不活性化カーブが脱分極側にシフトし、電位依存性活性化カーブが過分極側にシフトする特徴的な機能変化を示した。また、これらの変異チャネルを発現する細胞を用いて、抗不整脈剤の作用機序を検討した(業績10,27)。



一方、LQT症例にKCNQ1あるいはKCNH2変異を同定し、動物細胞に正常ないし変異チャネル遺伝子をトランスフェクションして機能解析を行った。特記すべきこと



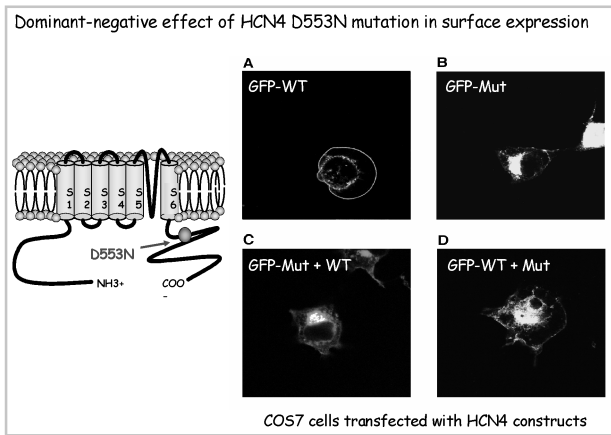
として、KCNH2チャネルのC末の短い欠失によってチャネルの細胞内輸送障害が生じること、すなわちC末端に細胞内輸送シグナルが存在することを明らかにした(業績29)ことが挙げられる。また、KCNQ1変異のtruncationによって細部内輸送が障害されることを初めて示した(業績28)。



これとは別に、CPVT症例に多数のR240H変異を見出したが、その多くはFKBP12.6結合ドメインに存在した。

##### 4-2) 新規の心室性不整脈原因遺伝子の同定

上記の解析で変異が見出されない症例を対象として、その他の心筋チャネル遺伝子の変異を検索した。まず、種々のチャネル遺伝子についてヒト心臓組織における発現性を検討したところ、ペースメーカーチャネルであるHCN4が、刺激伝導系的心筋細胞のみならず心室筋細胞でも発現することを見出した。ついで変異検索の結果、LQT表現型を示した心室性不整脈症例に家系内でLQT表現型と連鎖して遺伝する変異を同定した。機能解析を行

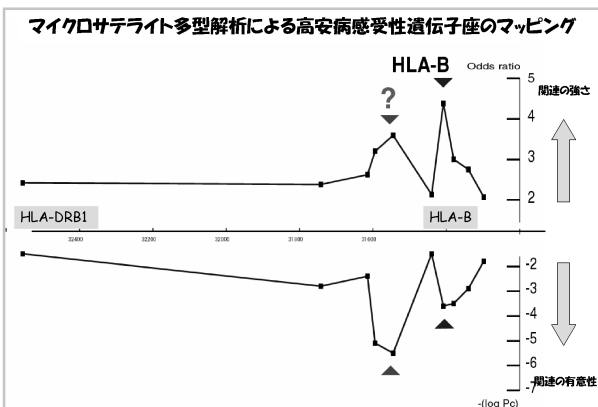


ったところ、この変異はチャネル分子の細胞内輸送障害を来すことでチャネル機能を欠損するものであった(業績25,33)。なお、HCN4機能欠損変異症例は脈拍異常を伴わないことから、HCN4の機能欠損はヘテロ接合体ではペースメーカー機能を障害しないと考えられた。

### 5) 難治性動脈炎

#### 5-1) 高安動脈炎感受性遺伝子の同定

高安動脈炎(高安病)は大動脈の閉塞性炎症を来す



HLA-B近傍には2つの独立した高安病感受性遺伝子が存在する

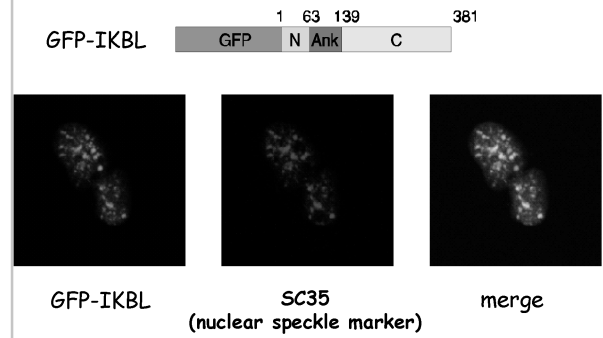
SNP	TNFα (119)	CL-2A (238)	MICA (A6)	MIB (326)	CL-4-1 (217)	B (*B201)	CL-2-5 (208)	RR
B52 haplotype	+	+	+	+	+	+	+	2.67 (p<0.001)
	+	+	+	+	+	-	-	2.22 (p<ns)
	-	-	+	+	+	+	+	1.09 (p<ns)
B51 haplotype	+	+	+	-	-	-	- (B51)	1.09 (p<ns)
B44 haplotype	-	-	+	+	+	-	- (B44)	0.97 (p<ns)
B39 haplotype	TNFα (119)	CL-2A (238)	MICA (A6)	MIB (332)	CL-4-1 (225)	B (*B302)	CL-2-5 (196)	
	+	+	+	+	+	+	+	4.96 (p<0.013)
	-	-	+	+	+	+	+	2.20 (p<ns)

linked to both B52 and B39      linked to B52 or B39

疾患であり従来HLAとの関連が報告されている疾患である。本研究ではHLA領域内のマイクロサテライトマーカーを用いた解析から、本症の疾患感受性遺伝子がHLA領域内の2箇所存在すること、うち1種はHLA-Bであるが、もう一種はTNF-MIC領域にマップされることを明らかにした。ついでTNF-MIC領域内の遺伝子の多型解析を行った結果、IKBL遺伝子多型が高安病感受性と強く関連することが明らかとなった(業績1)。

また、同一領域には、慢性関節リウマチ感受性遺伝子、若年性糖尿病感受性遺伝子、慢性血栓塞栓性肺高血圧症感受性遺伝子がマップされ、それらの疾患もIKBL遺伝子

## IKBLの核スペckルへの局在



多型と強く関連した(業績6,16,17,23,31,32)。なお、この領域にはMIC遺伝子がマップされていることから、その多型を詳細に解析した(業績7)が、高安病との関連は弱いものであった。さらに、HLA領域多型と免疫応答制御との関連やHLA領域以外の疾患関連遺伝子探索(業績4,11,15)を行うとともに、機能が不明なIKBL遺伝子の機能解析を実施した。その結果、IKBL遺伝子産物は核スペckルに分布すること、Ikappa-B活性はないこと、また転写促進活性のないことを明らかにした。さらに、酵母2ハイブリッド系を用いてIKBLに結合するタンパクをスクリーニングした結果、核内因子が結合することが判明した。

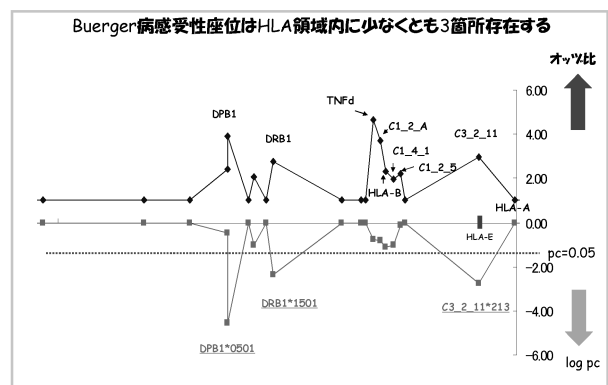
#### 5-2) バージャー病感受性遺伝子の同定

バージャー病は中小動脈の血栓性閉塞を来す疾患であり、高安病と同様にHLAとの関連が報告されている。我々も日本人患者においてB54およびDRB1\*1501頻度が高いことを報告していたが、本研究においてDPB1\*0501との強い関連を見出した。さらに、HLA領域内のマイクロサテライトマーカー多型を検討することで、HLA領域内に少なくとも3箇所(DPB1, DRB1およびC3β2β11付近)の感受性遺伝子が存在することが判明した。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

#### 1) 心筋梗塞

心筋梗塞は典型的な生活習慣病であるが、その発症には遺伝的な要因が深く関わることから、国内外において候補遺伝子アプローチや網羅的SNP解析による疾患関連



遺伝子の同定が進められている。本研究においても候補遺伝子アプローチによって複数の新規心筋梗塞関連遺伝子を同定し、E-selectin多型については多型による機能変化を明らかにした。一方、網羅的SNP解析から日本人における心筋梗塞関連遺伝子として報告されたLTAおよびLGALS2については、いずれも本研究で対象とした患者—対照各500-600名程度の比較では関連を確認出来なかつ



た。我々とは別のグループが日本人患者一対照各2,000名程度の比較を行い、LTA多型と心筋梗塞との関連を確認出来なかったと報告している。このことは、これらの遺伝子多型の心筋梗塞発症への寄与度が小さいことを強く示唆する。なお、本研究でLTA多型は心筋梗塞自体ではなく、冠動脈硬化の重症度と関連することが示されたが、このような解析は病態データベースを構築したことで初めて可能となったものである。さらに、我々は網羅的マイクロサテライト解析による心筋梗塞感受性座位のマッピングを進め、少なくとも5座位を同定した。このようなアプローチは世界的にも類を見ないユニークなものであり、網羅的SNP解析や候補遺伝子アプローチと相補的な研究手法として評価されている。なお、これらの5座位のうち2座位は家系を用いた連鎖解析によって冠動脈硬化症との関連が示唆される領域の近傍にあった。

### 2) 高血圧性心筋症

高血圧性心筋症の発症に関わる遺伝子を同定する試みは大動脈結さつや食塩負荷などの動物モデルを用いた網羅的発現解析を中心に行われている。我々も食塩負荷高血圧ラットモデルを用いた解析によって、高血圧性心肥大や高血圧性心拡大に関わる遺伝子を見出した。さらに我々は、それらの遺伝子のうち、機能が不明で心筋に特に強く発現するものを中心に、ヒトにおける遺伝多型の検索を行い、結果として、心筋の増殖や肥大に関わると考えられる因子に多型があること、この多型が高血圧性心筋症と関連すること、多型存在下に心肥大が促進することを明らかにした。このような発現解析と多型解析を組み合わせたアプローチは国内外で行われていず、きわめて独創的なものである。

### 3) 特発性心筋症

特発性心筋症は高血圧などの明らかな誘因がなく心肥大や心拡大・心不全を来たす疾患であり、現時点では心臓移植しか根治療法がない難治性心不全を来たす疾患である。我々は特発性心筋症の原因遺伝子解明研究では世界のトップクラスにあり、本研究においても、肥大型心筋症では2種、拡張型心筋症では4種の新規原因遺伝子を特定した。本研究期間中に我々以外の世界中の研究者によって同定された新規原因遺伝子は肥大型心筋症で1種、拡張型心筋症で3種に過ぎないことから、本研究の成果は世界的な着目をあびている。また、我々はZ帯構成要素を中心とした心筋症関連変異の機能変化を解析することにより、肥大型心筋症はstiff sarcomere、拡張型心筋症はloose sarcomere病であるとの新たな概念を提唱した。このことは肥大型心筋症関連変異の共通機能変化として心筋収縮のCa感受性亢進、拡張型心筋症関連変異の共通機能変化としてCa感受性の低下があることを意味し、心筋症の治療戦略として心筋収縮のCa感受性制御に着目すべきであることを示した。本研究はゲノム解析の成果から、心筋症病態形成の共通メカニズムを解明し、さらに治療薬のターゲットを示したものとして、国内外できわめて高く評価されている。

### 4) 難治性不整脈

本研究において難治性不整脈の原因となる病因変異を多数同定し、その機能解析を行った。このような解析は国内外で実施されているが、わが国の症例での体系的解析は本研究が初めてである。また、本研究において、新規の心室性不整脈原因遺伝子としてHCN4変異を特定した。HCN4チャンネルは従来ペースメーカー機能しかないと考えられていたが、我々の研究により、ヒトではHCN4が心室筋でも発現することが明らかとなり、さらにその機能欠損変異が洞調律異常ではなく、心室性不整

脈と関連することが判明した。このことは、不整脈発生機構の解明とは別に、HCN4遺伝子の新たな機能を示すものであり、国内外で高い評価を受けている。

### 5) 難治性動脈炎

難治性動脈炎、ことに高安動脈炎はわが国で最初に報告された疾患であり、わが国を含むアジアに特徴的な難治疾患である。このため、わが国が先陣をきってその病因と病態の解明に取り組むべき疾患であると言える。本研究では、感受性遺伝子が存在すると考えられていたHLA領域について、多数のマイクロサテライトマーカーを用いた詳細な解析を実施することで、HLA領域内に複数の感受性遺伝子が存在することを解明し、さらに感受性遺伝子としてIKBL遺伝子多型の関与を明らかにした。IKBL遺伝子は高安動脈炎のみならず、慢性関節リウマチ、若年性糖尿病などの典型的な臓器特異的自己免疫疾患の感受性遺伝子でもあることが本研究で明らかとなった。このことは、マイクロサテライトを用いた感受性遺伝子探索が有用な研究手法であることを示すと同時に、HLA領域の新たな機能をも解明するものである。さらに、HLA領域について、マイクロサテライト多型とSNPを組み合わせた詳細な連鎖不平衡データを得ることで、組換えのホットスポットの存在やハプロタイプごとに連鎖不平衡ブロックの長さが異なるなどのこの領域の特徴が解明された。このことは、人類遺伝学的な解析においても有用な基礎データとなるものであり、他研究領域への波及効果は大きいものである。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

#### 1) 心筋梗塞

網羅的マイクロサテライト解析による心筋梗塞関連遺伝子座の同定に関しては、プール法によるスクリーニングで関連を見出したマーカーの個別タイピングを進め、さらに別の患者一コントロール集団での関連再確認を実施した。本研究では患者一対照各100名ずつの比較を2回繰り返し、さらに200名ずつの比較で関連確認を行うこととしたが、これはオッズ比が2.5を越えるようなリスクを与える遺伝子座とD' =0.9にある遺伝マーカーの約50%を検出する研究デザインであるが、約50の関連候補遺伝子座についての再確認が完了出来なかった。これは予想外に多数の候補遺伝子座位が選択されたためである。また、関連を再確認することで5座位を同定した。うち2座位はマイクロサテライトマーカーが遺伝子内にあったため原因候補遺伝子として検討できたが、他の3座位では領域内にある疾患関連遺伝子の特定には至らなかった。これは、関連が確認された領域のすぐ近傍に遺伝子がマップされていないためであり、比較的広範囲に渡っての新規マイクロサテライトマーカーの設定とマッピング作業が必要であった。

#### 2) 高血圧性心筋症

当初の予定通りに解析が進行し、高血圧性心筋症関連遺伝子と考えられるDSS-10を特定した。また、機能解析を行うことでDSS-10変異による高血圧性心筋症の発症メカニズムとして、DSS-10分子のZ帯分布異常の関与が示唆された。一方、M21の機能が心筋収縮のCa感受性を亢進させること、その高発現で心肥大を生じることをin vivoで証明したが、その詳細なメカニズムの解析には至らなかった。これはM21トランスジェニックマウスに突然死が頻発するためであった。

#### 3) 特発性心筋症

概ね当初の予定通りに研究が進展し、世界に先駆けて多数の新規心筋症関連遺伝子を特定できた。しかしなが

ら、特発性心筋症の病因は予想以上に多種多様であったため、ことに拡張型心筋症では患者の半数以上で病因変異が特定されていない。また、肥大型心筋症の1多発家系の解析を進行したが、既知の原因遺伝子座、本研究で解明した原因遺伝子座のいずれとも連鎖しないことが判明しており、さらに新たな原因遺伝子座の特定が急がれる。

#### 4) 難治性不整脈

多数の難治性不整脈患者について病因変異を特定し、変異の機能変化を解明できた。また、新規の心室性不整脈原因遺伝子としてHCN4変異を特定し、その機能変化を世界に先駆けて解明できた。しかしながら、HCN4変異による心室性不整脈発症機構については不明な点が残された。これは、HCN4遺伝子に変異を有する症例が1家系に限られたことであり、さらに多数の心室性不整脈患者集団の解析が必要である。一方、ことにBrSやIVF患者では心筋チャンネル変異が見出される頻度は約10%程度であり、多くの症例で疾患関連遺伝子が不明のまま残された。

#### 5) 難治性動脈炎

高安病、バージャー病ともHLA領域内の疾患感受性遺伝子を特定出来たが、IKBL遺伝子の機能は不明なままであり、このため疾患関連多型による機能変化の全貌の解明には至らなかった。さらに、疾患関連HLA分子が提示する抗原ペプチドの特定は困難であり。これらの疾患の初期は内科的治療が可能であるため初期病変試料を得ることが極めて困難なことによるが、このことは想定外ではなく、内科的治療が進んだ現状では必然的なことであると言える。

### 〈今後の課題〉

#### 1) 心筋梗塞

網羅的マイクロサテライト解析によって心筋梗塞関連遺伝子座の候補が明らかになったため、さらに個別タイプピングを進めて関連を再確認することが必要である。また、個々の座位につちえ詳細なマイクロサテライトマップピングを進めるとともに、座位内の候補遺伝子についての多型解析を進め、心筋梗塞関連遺伝子の候補を選択することが急務である。さらにそれらの疾患関連多型の機能変化を証明することにより、それぞれの責任遺伝子と心筋梗塞発症への寄与度を解明しなければならない。一方、責任遺伝子多型が特定された場合には、他民族、他人種を対象とした関連解析を行い、疾患関連遺伝子として確立することが必要である。また、高血圧、高脂血症、糖尿病、喫煙などのいわゆる冠動脈リスクファクターと、疾患関連多型との交絡作用の解析を行うことで、リスク評価の指標として有用な多型を同定すべきである。

#### 2) 高血圧性心筋症

高血圧性心筋症に関わるDSS-10分子の機能変化によっていかなる心筋機能が障害されるかを解明することが必要である。また、本研究成果に基づいた治療法の開発が急がれる。さらに、DSS-10変異は高血圧性心筋症患者のごく一部に認められるのみであるため、他の疾患関連遺伝子の解明が必要である。本研究ではDSSラット心筋で心肥大、心拡大に伴って発現が変化する遺伝子のうち、心筋にほぼ特異的に発現し、かつ機能が未知の遺伝子を中心に解析を進めたが、発現の組織特異性が心筋以外にもあるものや、一定の機能が知られている遺伝子を対象とした解析も必要である。

#### 3) 特発性心筋症

本研究によって多数の新規原因遺伝子が明らかになっ

たが、依然原因不明の患者が多数存在するため、さらに新たな原因遺伝子を解明しなければならない。そのためには、本研究で進めた機能連関を指標にした候補遺伝子選択が有効である。一方、これまでに明らかになった原因遺伝子とその変異による機能変化の共通経路として、肥大型心筋症では心筋収縮のCa感受性の亢進、拡張型心筋症では逆にCa感受性の低下が示唆される。このことから、Ca感受性制御に着目した治療法、予防法の開発を行うことが必要である。そのためには心筋収縮のCa感受性を規定する因子(群)の同定が必要であるが、すでに我々はミオシン脱リン酸化酵素によるCa感受性制御に着目した解析を進行している。ことに、M21トランスジェニックマウスは人為的にCa感受性を亢進させることで心肥大をもたらすin vivo実験系として有用である。一方、本研究によって心筋症の病態形成機構にストレッチ反応異常が関わるということが明らかになったが、その詳細な分子機構については不明な点が残されている。ことに、Z帯構成要素のリン酸化制御がストレッチ反応に関与することが示唆されるため、そのターゲットの特定が必要である。

#### 4) 難治性不整脈

本研究によって難治性不整脈の一部で原因遺伝子変異と機能変化が解明されたが、大半の患者は変異が見出されない。従って、新たな原因遺伝子の探索が必要である。また、HCN4変異による心室性不整脈の発生機序については不明な点が残されているため、機能異常の全貌の解明が急がれる。さらに、本研究によって、チャンネル分子の細胞内輸送障害が不整脈発症に深く関わるということが明らかとなった。ことにKCNH2チャンネルのC末が細胞内輸送に関わることを本研究において世界で初めて明らかにしたため、このドメインに結合するタンパクの同定が必要である。また、細胞内輸送障害を来たす変異チャンネルの多くは、細胞表面に発現すれば正常と変わらない機能を発揮し得るため、輸送障害の解除に着目した治療法、予防法の開発を行わなければならない。

#### 5) 難治性動脈炎

高安病、バージャー病ともHLA領域内の疾患関連遺伝子の機能変化と病態形成機序の解明が必要である。また、IKBL遺伝子は種々の臓器特異的自己免疫疾患の感受性遺伝子であると考えられるが、その機能は依然不明である。本研究でIKBLが核内に分布すること、核内である種の転写関連因子と結合することが判明したため、これを手がかりとしてIKBLの機能を解明することが必要である。これとは別に、HLA領域以外の疾患関連遺伝子を同定しなければならない。これらの難治性動脈炎の病因解明は動脈硬化の発生機序の解明にも繋がるため、環境要因ことに外因の特定が急がれる。最近これらの難治性動脈炎の発症に組織内細菌感染症の関与が示唆されているため、その観点からのアプローチが急務である。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

#### 1) 原著論文

1.0110292016

Kimura A, Ota M, Katsuyama Y, Ohbuchi N, Takahashi M, Kobayashi Y, Inoko H, Numano F: Mapping of the HLA-linked genes controlling the susceptibility to Takayasu's arteritis. *Int J Cardiol*, 75: 105-110 (2000)

2.0110292017

Akai J, Kimura A, Hata R: Analysis of the topological properties of the two dinucleotide repeat regions that enhance the transcriptional activity of the human type 1



- collagen  $\alpha 2$  chain (COL1A2) gene promoter. *Connective Tissue*, 32: 259-265 (2000)
- 3.0110292019  
Arimura T, Nakamura T, Hiroi S, Satoh M, Takahashi M, Ohbuchi N, Ueda K, Nouchi T, Yamaguchi N, Akai J, Matsumori A, Sasayama S, Kimura A: Characterization of human nebulin gene: A polymorphism in an actin-binding motif is associated with non-familial idiopathic dilated cardiomyopathy. *Hum Genet*, 107: 440-451 (2000)
- 4.0110292118  
Takahashi M, Hashimoto H, Akizuki M, Sasazuki T, Nishikimi N, Ouchi H, Kobayashi Y, Numano F, Kimura A: Lack of association between the Met196Arg polymorphism in the TNFR2 gene and autoimmune diseases accompanied by vasculitis including SLE in Japanese. *Tissue Antigens*, 57: 66-69 (2001)
- 5.0110292120  
Arimura T, Suematsu N, Zhou YB, Nishimura J, Satoh S, Takeshita A, Kanaide H, Kimura A: Identification, characterization and functional analysis of heart-specific myosin light chain phosphatase small subunit. *J Biol Chem.*, 276: 6073-6082 (2001)
- 6.0110292121  
Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Itoh K, Sasazuki T, Inoko H: A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is located within a 70 kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics*, 71: 263-270 (2001)
- 7.0110292122  
Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A: Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift deletion in exon 4. *Tissue Antigens*, 57: 520-535 (2001)
- 8.0201222217  
Sasaoka T, Kimura A, Hohta S, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T: Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene, Asn563Ser and Gly670Arg, are associated with myocardial infarction in Japanese. *Ann NY Acad Sci*, 947: 259-269 (2001)
- 9.0202262038  
Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, Koga Y, Arimura T, Ueda K, Hohta S, Nouchi T, Takahashi M, Hiroe M, Marumo F, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A: Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 291: 385-393 (2002)
- 10.0202262103  
Shirai N, Makita N, Sasaki K, Yokoi H, Sakuma I, Sakurada H, Akai J, Kimura A, Hiraoka M, Kitabatake A: A mutant cardiac sodium channel with multiple biophysical defects associated with overlapping clinical features of Brugada syndrome and cardiac conduction disease. *Cardiovasc Res*, 53: 348-354 (2002)
- 11.0301071457  
Sakaguchi M, Nakayama T, Kaku H, Taniguchi K, Saito S, Kimura A, Inoue S: Analysis of HLA in children with gelatin allergy. *Tissue Antigens*, 59: 412-416 (2002)
- 12.0301071502  
Harada H, Kimura A, Fukino K, Yasunaga S, Nishi H, Emi M: Genomic structure and eight novel exonic polymorphisms of the human N-cadherin gene. *J Hum Genet*, 47: 330-332 (2002)
- 13.0301071508  
Kuroda N, Ohnishi Y, Kimura A, Yokoyama M: Clinical significance of T-wave alternans in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J*, 66: 457-462 (2002)
- 14.0301071516  
Knöll R, Hoshijima M, Hoffmann HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang M-L, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork J, Jeffrey H, Omens J, Andrew D, McCulloch A, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schulthess HP, Chien KR: The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111: 943-955 (2002)
- 15.0301071517  
Hori H, Hattori S, Inouye S, Kimura A, Irie S, Miyazawa H, Sakaguchi M: Analysis of the major epitope of the  $\alpha 2$  chain of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 110: 652-658 (2002)
- 16.0303192239  
Shao W, Yasunami M, Takahashi M, Shibata H, Hamaguchi K, Sakata T, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Kimura A: Analysis of HLA-B polymorphism in insulin dependent diabetes mellitus in Japanese. *MHC*, 9: 163-169 (2003)
- 17.0303192240  
Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H: Identification of IkBL as the second MHC-linked susceptibility locus for Rheumatoid Arthritis. *Am J Hum Genet*, 72: 303-312 (2003)
- 18.0402242056  
Hohda S, Kimura A, Sasaoka T, Hayashi T, Ueda K, Yasunami M, Okabe M, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T: Association study of the CD14 polymorphism with myocardial infarction in Japanese populations. *Jpn Heart J*, 44: 613-622 (2003)
- 19.0402242059  
Yoshida M, Takano Y, Sasaoka T, Izumi T, Kimura A: E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under physiological flow conditions. *Arter Thrombo Vasc Biol*, 23: 783-788 (2003)
- 20.0402242101  
Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Shibata H, Hohda S, Takahashi M, Hori H, Koga Y, Oka N, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A: Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 313: 178-184 (2004)
- 21.0402242104  
Arimura T, Hayashi T, Terada H, Lee SY, Zhou Q, Takahashi M, Ueda K, Nouchi T, Hohda S, Sibutani M, Hirose M, Chen J, Park JE, Yasunami M, Hayashi H, Kimura A: A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to

- protein kinase C. *J Biol Chem*, 279: 6746-6752 (2004)  
22.0402242106  
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*, 68: 174-177 (2004)
- 23.0402251945  
Yamashita T, Hamaguchi K, Kusuda Y, Kimura A, Sakata T, Yoshimatsu H: IKBL promoter polymorphism is strongly associated with resistance to type 1 diabetes in Japanese. *Tissue Antigens*, 63: 223-230 (2004)
- 24.0501111206  
Komamura K, Iwai N, Kokame K, Yasumura Y, Kim J, Yamagishi M, Morisaki T, Kimura A, Tomoike H, Kitakaze M, Miyatake K: The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet*, 49: 129-133 (2004)
- 25.0501111209  
Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesata Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M, Kimura A: Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem*, 279: 27194-27198 (2004)
- 26.0501111211  
Hamaguchi K, Kimura A, Kusuda Y, Yamashita T, Yasunami M, Takahashi M, Abe N, Yoshimatsu H: Clinical and genetic characteristics of GAD-antibody positive patients initially diagnosed as having type 2 diabetes. *Diabet. Res. Clin. Pract.* 2004; 66: 163-171.
- 27.0501111213  
Sasaki K, Makita N, Sunami A, Sakurada H, Shirai N, Yokoi H, Kimura A, Tohse N, Hiraoka M, Kitabatake A: Unexpected mexiletine responses of a mutant cardiac Na<sup>+</sup> channel implicate the selectivity filter as a structural determinant of antiarrhythmic drug access. *Mol Pharmacol*, 66: 330-336 (2004)
- 28.0501111216  
Aizawa Y, Ueda K, Wu LM, Inagaki N, Hayashi T, Takahashi M, Ohta M, Kawano S, Hirano Y, Yasunami M, Aizawa Y, Kimura A, Hiraoka M: Truncated KCNQ1 mutant, A178fs/105, forms hetero-multimer channel with wild-type causing a dominant-negative suppression due to trafficking. *FEBS Lett*, 574: 145-150 (2004)
- 29.0501111218  
Sasano T, Ueda K, Oriabe M, Hirano Y, Kawano S, Yasunami M, Isobe M, Kimura A, Hiraoka M: Novel C-terminus frameshift mutation, 1122fs/147, of HERG in LQT2: additional amino acids generated by frameshift cause accelerated inactivation. *J Mol Cell Cardiol*, 37: 1205-1211 (2004)
- 30.0501111221  
Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H, Koga Y, Nakamura H, Matsuzaki M, Cho BY, Bae SW, You CW, Han KH, Park JE, Kn?ll R, Hoshijima M, Chien KR, Kimura A: TCAP mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am. Col*  
*Cardiol*, 44: 2192-2201 (2004)  
31.0502181108  
Tanabe N, Kimura A, Amano S, Okada O, Kasahara Y, Tatsumi K, Takahashi M, Shibata H, Yasunami M, Kuriyama T: Association of clinical features with HLA in chronic pulmonary thromboembolism in Japan. *Eur Resp J*, 25: 131-138 (2005)
- 2) データベース ; 該当なし
- 3) 特許出願など
32. 木村彰方他「I型糖尿病の検査方法」(特願2001-306868)平成13年10月2日出願(国際特許出願、国際公開番号:WO03/31652)
33. 木村彰方他「変異型HCN4遺伝子」(特願2003-050469)平成15年2月27日出願