

c GMP 関連遺伝子多型の検索とその機能解析 — 関連研究への応用 —

●中尾一和 ●井上元 ◆斎藤能彦 ◆伊藤裕

京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

＜研究の目的と進め方＞

ナトリウム利尿ペプチドは1984年に心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) が発見されて以来、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、と合計3種類のリガンドと ANP/BNP に親和性の高い受容体である guanylyl cyclase A (GC-A)、CNP に親和性の高い GC-B、およびこれらリガンドの代謝に関与しているとされるクリアランス受容体である C 型受容体が次々に発見され、ナトリウム利尿ペプチドシステムとして生体の循環調節に深く関わっていることが種々の研究結果から明らかにされてきた。我々の施設では ANP が発見されて以来、一貫してナトリウム利尿ペプチドシステムの生理的意義、あるいは病態生理的意義について検討を進めてきた。ナトリウム利尿ペプチド系の生体における作用は、利尿作用、ナトリウム利尿作用、血管拡張作用がその主な作用であると考えられてきたが、そのほかにアルドステロン分泌抑制作用、交感神経活性抑制作用、心筋細胞肥大抑制作用、平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖抑制作用などが明らかにされてきており、これら新たに明らかにされてきた作用の重要性の認識が日に日に高まっている。これらの作用は、多くの作用点においてレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の作用と拮抗していることが判明しているが、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系はいうまでもなく昇圧系の代表的なシステムであり、その点からも、ナトリウム利尿ペプチド系の血圧調節作用については強くそれが示唆されるわけである。最近、GC-Aノックアウトマウスでは食塩非感受性高血圧や著しい心室の肥大と線維化が認められること、さらにGC-A 遺伝子の発現量と血圧との間には gene-dose effect が認められるという結果が報告された。このことから本態性高血圧症や心肥大の発症・進展の抑制に、ナトリウム利尿ペプチド系が大きく関与していることが示唆される。

本研究の目的は、ヒトの血圧調節機構の分子メカニズムにおけるナトリウム利尿ペプチド系の寄与について検討することであった。ヒトにおける血圧調節機構については不明な点が多く、その分子メカニズムの解明は、将来に至っては高血圧発症の予防や新しい高血圧治療法の開発に繋がると考えられ、我が国でも死因の上位を占める心血管病の対策を立てる上で急がれる課題である。今回、具体的にはナトリウム利尿ペプチド系を構成する分子の遺伝子上の遺伝子多型を検索し、その機能解析を行い、さらには本態性高血圧症や心肥大との関連を追究するためにより有効な case-control study に応用することを目的としたが、その中でも上述の GC-A に注目して検討を進めた。またゲノム医学高血圧部会の一員として本態性高血圧症例遺伝子を収集することも目標の一つであった。

＜研究開始時の研究計画＞

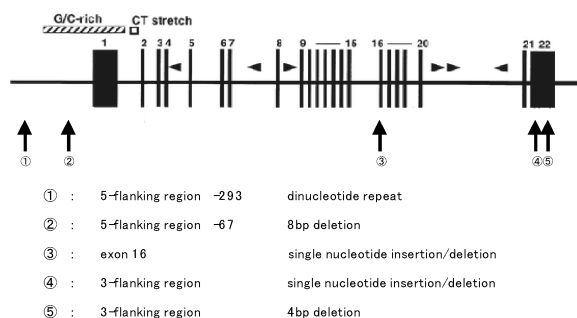
正常血圧と高血圧の受診者から同意の下で血液を採取、ゲノムを抽出して、GC-A 遺伝子のシーケンス解析を

行い、これまでに報告されていない遺伝子変異、あるいは遺伝子多型を同定する計画を立てた。さらに、新しく同定された遺伝子多型と高血圧との関係を case-control study で検討する計画で研究を開始した。

＜研究期間の成果＞

正常血圧群 180 名、高血圧群 189 名を解析した。血圧の平均値は正常群では 124/74、高血圧群では 162/93であった。ヒト GC-A 遺伝子多型と血圧との相関を検討する目的で、まず PCR direct sequence 法を用いてGC-A の遺伝子多型を検索した。

図 GC-A 遺伝子の構造と遺伝子多型の位置



GC-A 遺伝子は、ヒトでは第一染色体長腕約16 kbのゲノム領域をスパンする 22 の exon と 21 の intron より構成されているが、今回の検討で見いだした遺伝子多型 5 種類の位置のこれら exon-intron との関連を図に示す。これらの中で、今回は、①に示している GC-A 5' 隣接領域-300 bp に存在する CT 繰り返し配列の多型に注目してさらに検討を進めた。この部分に関しては日本大学の中山らから、CT の繰り返し回数に 10,11,12 の多型がある、しかしながら正常血圧群と高血圧群の間に差を認めない、という報告がある (Nakayama T et al. Am J Hypertens.1999 Nov;12:1144-8)。しかし、今回の我々の検討では新たな知見が得られた。すなわち CT 繰り返し回数に6回の多型があることが判明した。アレル頻度について解析した結果、このCT6のアレル頻度が高血圧群において正常血圧群よりも高いという結果が得られつつある。10, 11, 12 回の繰り返しに関してはそれらの間に血圧との関連は認めず、この点に関しては中山らの既報と一致する結果になりそうである。

＜国内外での成果の位置づけ＞

今回の検討の結果は、ナトリウム利尿ペプチド系がヒトにおける本態性高血圧症の成因に関与することを示す画期的な報告になるもので国内外における相応の反響が予想される。我々の検討と時期を同じくして、2003年、米国から、この CT の 6 回繰り返し配列に関する報告があった (Knowles JW et al., Hum Gene 2003;112:62-70)。この報告はヒトの GC-A promotor 領域に CT 繰り返しの 6, 10, 11 回の多型が見られた、というものが、我々の

検討結果と比較して注目される点が2点ある。一つは、この検討ではルシフェラーゼを用いたプロモーター解析が施行されているが、CT繰り返し配列が6回のプロモーターでは転写調節活性が亢進する、という結果だったことである。残念ながら血圧との関連が示されなかったが、CT6で転写活性が亢進しているならば、GC-Aの発現亢進、血圧低下というスキームとなり我々の解析した結果であるCT6は高血圧群で多いという所見と反対の方向性ということになる。二つ目はCT繰り返し配列の多型は-77 bpのG→A変異とリンクするという結果が示されたことである。二つ目の点については、我々も繰り返し配列は単なるマーカーで、他の部位とリンクしているのではないかと考えていたため、我々のサンプルでCT繰り返し配列より下流のシークエンスを検討してみると、CT6のゲノム全例で-77 bpのG→Aの変異が見られた。すなわちCT繰り返し配列は単なるマーカーで実際に機能を持つのは-77 bpではないかという可能性がでてきたのである。そこで、一つ目のCT6の方がプロモーター活性が高いという点とあわせて検討することを計画した。すなわち、実際に存在するプロモーター2種類と、それらの-77 bpの部分を入れ替えたmutantの合計4種類の配列を作成し、これらの転写活性について、human SMC、HeLa cell、mouse SMCにおけるレポーターアッセイを計画し、現在検討を進めているところである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

遺伝子サンプルの確保特に正常血圧群の遺伝子が集まりにくく、case-control studyの進行が遅れてしまい、反省点と考えている。症例数、正常血圧者数を当初の目標の300例まで収集することにつとめたが結果的には達成できなかった。

〈今後の課題〉

GC-A 遺伝子のシークエンス解析については、転写調節領域に於ける他の変異およびGC-Aのヒンジ部分を中心に新規遺伝子多型の存在について引き続き検索を行うことができれば、更なる成果も期待できるのではないかと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 主な Publication

1. Adachi Y, Saito Y, Nakao K, et al. Angiotensin II type 2 receptor deficiency exacerbates heart failure and reduces survival after acute myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2003 May 20;107(19):2406-8
2. Takahashi N, Saito Y, Nakao K, et al. Angiotensin II-induced ventricular hypertrophy and extracellular signal-regulated kinase activation are suppressed in mice overexpressing brain natriuretic peptide in circulation. *Hypertens Res*. 2003 Oct;26(10):847-53
3. Kuwahara K, Saito Y, Nakao K, et al. NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J*. 2003 Dec 1;22(23):6310-21.
4. Li Y, Kishimoto I, Saito Y, Nakao K, et al. Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase - A. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):951-8.
5. Kawakami R, Saito Y, Nakao K, et al. Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil

infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004 Nov;110:3306-12.

6. Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Tanimoto K, Nakagawa Y, Kawakami R, Nakanishi M, Yasuno S, Usami S, Yoshimura A, Nakao K. Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Jan; 38(1) 185-192
7. Nakanishi M, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Kawakami R, Nakagawa Y, Tanimoto K, Yasuno S, Usami S, Li Y, Adachi Y, Fukamizu A, Garbers DL, Nakao K. Related Articles, Links
Role of Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A in Myocardial Infarction Evaluated Using Genetically Engineered Mice. *Hypertension*. 2005 Aug;46(2):441-7