

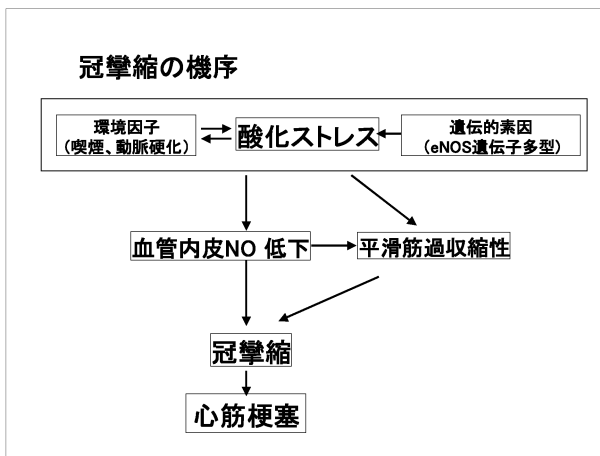
# 酸化ストレス関連分子の遺伝子多型を基盤とする冠攣縮の病態解明と診断・治療法の開発

●久木山 清貴 ◆川端 健一 ◆齊藤 幸生 ◆藤岡 大佑

山梨大学大学院医学工学総合研究部内科学講座第二教室

## ＜研究の目的と進め方＞

酸化ストレスに対する防御システムに重要である還元型グルタチオン（GSH）産生の律速酵素であるγ-Glutamate-cysteine ligase（GCL）に関して、この遺伝子多型を基盤として冠動脈攣縮（冠攣縮）の発症・病態の機序解明とともに本症の新しい診断・治療法の開発を行う。GCL遺伝子多型に関しては我々によって見出された直後で未だ詳細には解析されておらず、本研究にて解析する。



## ＜研究開始時の研究計画＞

- (1) GCL遺伝子多型の同遺伝子機能に及ぼす影響とその機序の解明。
- (2) GCL遺伝子多型が冠攣縮の発症および病態と関連することを示す。
- (3) GCL遺伝子多型の冠攣縮の疾患感受性と臨床的表現型に与える影響を検討する。

## ＜研究期間の成果＞

- (1) GCL遺伝子多型の同遺伝子機能に及ぼす影響とその機序

GCL調節サブユニット（GCL modifier subunit; GCLM）遺伝子の5'非翻訳領域の遺伝子多型を検索した結果、-588C/Tと-23G/Tの2つの完全にリンクした遺伝子多型を発見した。

Luciferase reporter gene assayにより遺伝子多型がプロモーター活性に及ぼす影響を検討した。その結果、酸化ストレスに暴露させるとプロモーター活性は増加したが、-588C/T遺伝子多型は増加の程度に影響を与え、TアレルでCアレルの40～50%と低下していた。2つの遺伝子多型のうち、-588C/T遺伝子多型が機能的遺伝子多型であった。さらに、ヒト末梢血より分離した単球のGCLM mRNA発現は、酸化ストレス刺激により増加したが、その増加は、CC遺伝子型を有する細胞に比べCT遺伝子型を有する細胞で有意に減少していた。また、血漿GSHレベルを電気化学検出器を併用した高速液体クロマトグラフィにより測定した結果、CC遺伝子型グループに比べ

CT+TT遺伝子型グループで有意にGSHレベルが低下していることが明らかになった。

- (2) GCL遺伝子多型が冠攣縮の発症および病態との関連  
冠動脈造影にて診断された心筋梗塞患者429例とコントロール症例428例において、アレル頻度を検討した。その結果、-588T遺伝子多型がコントロール群より心筋梗塞群において有意に高頻度に認められた（CT+TT genotypes: 心筋梗塞群 31.5% versus コントロール群 19.2%,  $P < 0.001$ ）。ロジスティック重回帰分析にて-588T遺伝子多型は従来言われているような冠動脈危険因子と同様に独立した心筋梗塞の危険因子であった（odds ratio, 1.98; 95% confidence interval, 1.38 to 2.83;  $P < 0.001$ ）。

-588T遺伝子多型の頻度の心筋梗塞例と対照例における比較検討

	Control subjects (n=428)	Patients with myocardial infarction (n=429)	OR (95% CI)	P
-588C/T, -23G/T				
GCLM/TT-TT	2/428 (0.5%)	16/429 (3.7%)	-	-
GCLM/CT-GT	80/428 (18.7%)	119/429 (27.8%)	-	-
GCLM/CC-GG	346/428 (80.8%)	294/429 (68.5%)	-	-
-588T allele vs C allele	-	-	1.96 (1.41-2.65)	<0.001
-588TT and CT vs CC	-	-	1.94 (1.47-2.61)	<0.001
-588TT vs CT and CC	-	-	8.25 (1.89-36.11)	<0.001

-588T遺伝子多型の心筋梗塞の危険因子として検討 -ロジスティック重回帰分析

Variables	beta	SEM	P	OR (95% CI)
-588T polymorphism	0.68	0.18	<0.001	1.98 (1.38-2.83)
Sex (men)	1.06	0.19	<0.001	2.89 (1.99-4.22)
Age (>70 y.o.)	0.77	0.17	<0.001	2.15 (1.55-3.00)
Hypercholesterolemia	0.74	0.18	<0.001	2.09 (1.48-2.96)
Diabetes mellitus	0.63	0.18	<0.001	1.88 (1.32-2.68)
Hypertention	0.51	0.16	0.002	1.66 (1.21-2.28)
Cigarette smoking	0.31	0.18	0.088	1.37 (0.96-1.96)
Body mass index	0.04	0.19	0.832	1.04 (0.72-1.51)
Constant	-1.95	0.22	<0.001	-

-588T polymorphism: -588TT and -588CT combined

そこでGCLM遺伝子多型と血管内皮NOとの関連を検討した。冠動脈造影において-588T遺伝子多型はアセチルコリン（ACh）冠動脈注入に対する冠動脈径は有意に減少し、冠血流の増加は減弱した。さらにACh投与後にNO合成阻害薬を冠動脈注入すると野生型ではAChの反応がNitric Oxide Synthase（NOS）阻害剤であるNG-monomethyl L-arginine（L-NMMA）によりブロックされるが-588T遺伝子多型ではその反応は認めなかった。これらから、-588T遺伝子多型は冠動脈内皮のNO合成と遊離が低下しており、その結果内皮機能が低下していることが示唆された。

- (3) GCL遺伝子多型の冠攣縮の疾患感受性と臨床的表現型に与える影響の検討

### 1) 冠動脈トーンに対する喫煙の影響：

冠動脈内アセチルコリン注入により太い部分の冠動脈は、非喫煙者においては全体としてやや拡張傾向を示したが、喫煙者では収縮した。硝酸イソソルバイドによる血管内皮非依存性の冠動脈拡張反応は喫煙者と非喫煙者で同等であった。また、アセチルコリンは冠血流量を全例において増加させたが、その程度は喫煙者に比べて非喫煙者では低下していた。L-NMMAにより全例において冠動脈は収縮したが、喫煙者においては非喫煙者に比

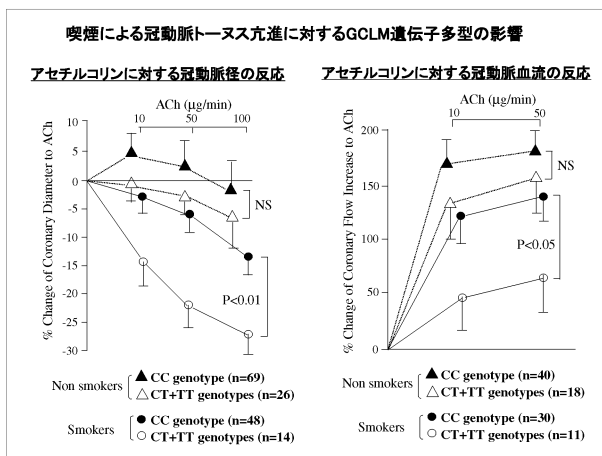
べて冠動脈収縮の程度が小さかった。

### 2) 冠動脈トーンに対するGCLM遺伝子多型の影響：

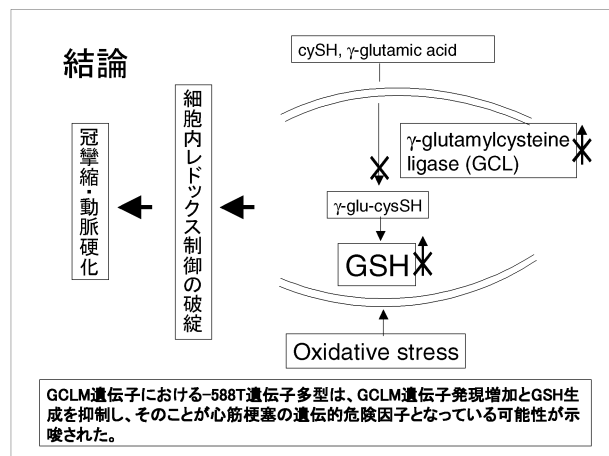
冠動脈内アセチルコリン注入により太い部分の冠動脈はGCLM遺伝子多型 (-588C/T) では強く収縮し、冠血流量の増加もTアレルを有しない症例に比べると少なかった。硝酸イソソルバイドによる太い部分の冠動脈の内皮非依存性拡張反応はTアレルを有する症例とそうでない症例で同等であった。L-NMMAにより全例において冠動脈は収縮したが、GCLM遺伝子多型を有する症例においてはそうでない症例に比べて冠動脈収縮の程度が小さかった。

### 3) 喫煙による冠動脈トーン亢進へのGCLM遺伝子多型の影響：

GCLM遺伝子多型のTアレルを有する喫煙者はTアレルを有しない喫煙者に比べて、アセチルコリンに対する太い部分の冠動脈の収縮反応が強く冠血流量増加反応は低下していた。非喫煙者においてはGCLM遺伝子多型の存在は冠動脈トーンには有意な影響を与えなかった。



今回の研究において、GCLM遺伝子における-588T遺伝子多型は、冠動脈の太い部分および抵抗血管レベルでの拡張反応を低下させることが明らかになった。硝酸イソソルバイドによる内皮非依存性拡張反応には影響を与えなかったことよりGCLM遺伝子多型は冠動脈内皮依存性拡張反応を抑制すると考えられる。さらに、GCLM遺伝子多型のTアレルを有する例でL-NMMAに対する収縮反応が減少していたことは、Tアレル例では冠動脈内皮NO活性が低下していることを示している。このように、GCLM遺伝子における-588T遺伝子多型は冠動脈内皮NOを低下させることによって、冠動脈の太い部分および抵抗血管レベルでの内皮依存性拡張反応を低下させていることが示唆された。GCLM遺伝子多型による冠動脈内皮依存性拡張反応の抑制効果は喫煙者において顕著に認められた。我々は喫煙者ではスーパーアニオン等の酸素ラジカルによる内皮NOの不活化で冠動脈トーンが亢進し冠攣縮の病因に深く関与していることを示し続けてきた。よって、GCLM遺伝子多型例では喫煙に由来する酸化ストレスに対する代償機転が働かないために細胞内レドックスバランスが破綻し、そのために酸素ラジカルによる内皮NOの不活化が亢進し冠動脈内皮依存性拡張反応の低下が生じたと考えられる。喫煙者においては、特にGCLM遺伝子多型を有する場合には冠攣縮に対する疾患感受性が高まっている可能性がある。



### <国内外での成果の位置づけ>

GSH周辺酵素群の遺伝子異常が冠動脈疾患の発症・病態に関与していることを国内外で初めて明らかにした。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

GCL遺伝子多型の臨床的表現型は虚血性心疾患発症例を対象とするため、その症例数が小規模に留まっている。

### <今後の課題>

GCL遺伝子多型をスクリーニングすることで、抗酸化剤によって心筋梗塞の再発予防が可能となる心筋梗塞例を識別し、酸化ストレス関連分子遺伝子多型に基づいた冠攣縮例を含む虚血性心疾患のオーダーメイド医療実践に繋げる。

### <研究期間の全成果公表リスト>

1. Nakamura T, Kodama Y, Takano H, Umetani K, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Obata JE, Ichigi Y, Mende A, Kugiyama K. Endothelial vasomotor dysfunction in the brachial artery is associated with late in-stent coronary restenosis, *J Am Coll Cardiol*, 46 (4), 648-655 (2005).
2. Nakamura T, Takano H, Umetani K, Kawabata K, Obata JE, Kitta Y, Kodama Y, Mende A, Ichigi Y, Fujioka D, Saito Y, Kugiyama K. Remnant lipoproteinemia is a risk factor for endothelial vasomotor dysfunction and coronary artery disease in metabolic syndrome, *Atherosclerosis*, 181 (2), 321-327, (2005).
3. Ichigi Y, Takano H, Umetani K, Kawabata K, Obata JE, Kitta Y, Kodama Y, Mende A, Nakamura T, Fujioka D, Saito Y, Kugiyama K. Increased ambulatory pulse pressure is a strong risk factor for coronary endothelial vasomotor dysfunction, *J Am Coll Cardiol*, 45 (9), 1461-1466, (2005).
4. Nakamura S, Sugiyama S, Fujioka D, Kawabata K, Ogawa H, Kugiyama K. Polymorphism in glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with impairment of nitric oxide-mediated coronary vasomotor function, *Circulation*, 108 (12), 1425-1427, (2003).
5. Koide S, Kugiyama K, Sugiyama S, Nakamura S, Fukushima H, Honda O, Yoshimura M, Ogawa H. Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol*, 41 (4), 539-545, (2003).