

## 本態性高血圧症の候補遺伝子多型とその機能解析 および中間型形質の同定

●相馬正義

日本大学医学部内科学講座腎臓内分泌内科部門

### 〈研究の目的と進め方〉

1. 本態性高血圧症 (EH) 患者における一酸化窒素(NO)、ナトリウム利尿ペプチド (NP)、ドーパミン (DA) およびプロスタノイド(PG)の産生、分泌、作用、代謝に関する遺伝子多型・変異を検出し、関連調査を行う。  
2. 遺伝子機能に影響を与えると予測される多型・変異について、転写・発現および蛋白機能について検証する。  
3. EHの中間型形質として、内皮依存性血管拡張反応、ANPまたはDA投与に対する降圧利尿反応、血中・尿中PG代謝物の測定を行い、遺伝子型との関連を明らかにする。

### 〈研究開始時の研究計画〉

本領域で行われている高血圧遺伝要因の解明方法は、SNPまたはマイクロサテライトを用いたラージスケールゲノムスキャンと候補遺伝子のSNPを用いた関連調査である。いずれもスクリーニングであり、この研究から出た結果は、他の集団での検証、遺伝子機能障害の証明およびEHにおける位置づけ(中間型の同定)が必要である。われわれはすでに4000例以上のサンプル収集と遺伝子機能解析技術を確認しており、本領域の目的の一つである高血圧病因遺伝子の同定を促進できるものと考えている。

本研究の特徴は、EH患者100名のゲノムDNAをSSCP法により解析し、比較的頻度の低い遺伝子多型を含めて検出することである。血圧維持機構には膨大な因子が関与している事より、遺伝子機能に影響する比較的まれな遺伝子多型が多くの遺伝子に存在し、これが高血圧症を発症させている可能性がある。すでに我々は、NP受容体およびProstacyclin合成酵素遺伝子において一部報告している(Lancet 349:1887, 1997, Circulation Research. 28;86(8):841, 2000, Biochem Biophys Res Commun 11;297(5):1135, 2002)。本研究により、少なくとも数%以上のEH患者の原因遺伝子が同定でき、EHの原因遺伝子別分類の端緒となる可能性がある。

現在、国内外において高血圧症疾患感受性遺伝子の同定に向かって、全ゲノムスキャン法または候補遺伝子アプローチ法を用いた関連調査が精力的に行われているが、矛盾する結果が多く、結論が得られていない。我々は、遺伝統計学的手法に限界があると考えており、むしろ遺伝子機能とその異常によって引き起こされる中間型形質に注目し、病態生理学的関連の深い系全体の遺伝子を詳細に検討する点に特徴がある。

### 獲得目標と研究計画

① 対象と検体収集：日本大学医学部付属板橋病院第二内科、循環器科、保健科および第二内科関連施設にて、健常者および本態性高血圧症 (EH) 患者より採血し、白血球よりゲノムDNAを抽出する。年間の目標症例数は各500例とする。  
② NO系、NP系、DA系およびPG系遺伝子の多型・変異の検出：EH患者100名のゲノムDNAを鋳型とし、各遺伝子の5'上流領域およびすべてのエキソンに対し、PCR-SSCP法を行い、遺伝子の多型・変異を検出する。検出した多型・変異についてTaqMan法を確立する。

③ 関連調査：②の結果に基づいて健常者約500名、EH患者約500名のゲノムDNAを用いて、各遺伝子の多型とEHについて関連調査を行う。

④ EHと有意な相関が認められた遺伝子の機能解析：多型そのものが遺伝子機能に影響しないと考えられる場合にはさらに近傍をシーケンシングし検索する。多型が遺伝子機能に影響する可能性がある場合は、転写活性の測定、発現実験および遺伝子導入法等により遺伝子の機能異常を証明する。

⑤ ゲノタイプ別EHの病態：関連調査結果および遺伝子機能解析結果から病因となる遺伝子異常もつ症例について、基本的な臨床所見に加え、血管内皮依存性血管拡張反応、血中ANP, BNPの測定、ANP負荷試験、ドーパミン負荷試験または尿中PG代謝物の測定などを行い、遺伝子機能異常を反映する病態を明らかにする。

### 〈研究期間の成果〉

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1.Sato M, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K. Dopamine D1 Receptor Gene Polymorphism is Associated with Essential Hypertension. Hypertension 36(2):183-186, 2000.8
- 2.Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Uwabo J, Sato M, Izumi Y, Saito S, Honye J, Kanmatsuse K, Ozawa Y. A C2077T polymorphism of the type B human natriuretic peptide receptor gene is not associated with myocardial infarction. Med Sci Monit 6(6): 1053-1055, 2000.12
- 3.Nakayama T, Soma M, Rehemudula D, Takahashi Y, Tobe H, Satoh M, Uwabo J, Kunimoto M, Kanmatsuse K. Association of 5' upstream promoter region of prostacyclin synthase gene variant with cerebral infarction. Am J Hypertens 13(12):1263-7, 2000.12
- 4.Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Rehemudula D, Tobe H, Sato M, Uwabo J, Kunimoto M, Izumi Y, Kanmatsuse K. Polymorphism of the promoter region of prostacyclin synthase gene is not related to essential hypertension. Am J Hypertens. 14(5 Pt 1):409-11, 2001.5
- 5.Nakayama T, Soma M, Rahmutula D, Ozawa Y, Kanmatsuse K. Isolation of the 5'-flanking region of genes by thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction. Med Sci Monit. 7(3):345-9, 2001.5
- 6.Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, Sato M, Izumi Y, Kanmatsuse K, Ozawa Y. Systematic screening of type B human natriuretic peptide receptor gene polymorphisms and association with essential hypertension. J Hum Hypertens 15(7):471-4, 2001.7
- 7.Soma M, Nakayama T, Rahmutula D, Uwabo J, Sato Mikano, Kunimoto M, Aoi N, Kosuge K and Kanmatsuse

- K. Ser9Gly Polymorphism in the Dopamine D3 Receptor Gene is not Associated with Essential Hypertension in the Japanese. *Med Sci Monit.* 8;CR1-4, 2002.1
- 8.Nakayama T, Soma M, Rahmutula D, Tobe H, Sato M, Uwabo J, Aoi N, Kosuge K, Kunimoto M, Kanmatsuse K, Kokubun S: Association study between a novel single nucleotide polymorphism of the promoter region of the prostacyclin synthase gene and essential hypertension. *Hypertens Res.* 2002 Jan;25(1):65-8.
- 9.Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, Kosuge K, Aoi N, Izumi Yoichi, Kanmatsuse K and Ozawa Y: Structure and Polymorphisms of the Human Natriuretic Peptide Receptor C Gene. *Endocrine* 2002 17(2):85-90.
- 10.Nakayama T, Soma M, Saito S, Honye J, Yajima J, Rahmutula D, Kaneko Y, Sato M, Uwabo J, Aoi N, Kosuge K, Kunimoto M, Kanmatsuse K, Kokubun S. Association of a novel single nucleotide polymorphism of the prostacyclin synthase gene with myocardial infarction. *Am Heart J* 2002 May;143(5):797-801
- 11.Nakayama T, Soma M, Mizutani Y, Xinjuan Xu, Honye J, Kaneko Y, Rahmutula D, Aoi N, Kosuge K, Saito S, Kanmatsuse K, Kokubun S. A novel missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene: Possible association with essential hypertension. *Hypertens Res.* 2002 May;25(3):395-401.
- 12.Nakayama T, Soma M, Watanabe Y, Hasimu B, Sato M, Aoi N, Kosuge K, Kanmatsuse K, Kokubun S, Marrow J, Oates J. Splicing mutation of the prostacyclin synthase gene in a family associated with hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Oct 11;297(5):1135-1139
- 13.Hasimu B, Nakayama T, Mizutani Y, Izumi Y, Asai S, Soma M, Kokubun S, Ozawa Y. Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. *Hypertension* 2003 Feb; 41(2):308-12
- 14.Nakayama T, Soma M, Watanabe Y, Hasimu B, Kanmatsuse K, Kokubun S, Morrow JD, Oates JA. Splicing mutation of the prostacyclin synthase gene in a family associated with hypertension. *Adv Exp Med Biol* 2003;525:165-8
- 15.Hasimu B, Nakayama T, Mizutani Y, Izumi Y, Asai S, Soma M, Kokubun S, Ozawa Y. A novel variable number of tandem repeat polymorphism of the renin gene and essential hypertension. *Hypertens Res.* 2003 Jun;26(6):473-7.
- 16.Nakayama T, Soma M, Haketa A, Aoi N, Kosuge K, Sato M, Kanmatsuse K, Kokubun S. Haplotype analysis of the prostacyclin synthase gene and essential hypertension. *Hypertens Res.* 2003 Jul;26(7):553-7
- 17.Nakayama T, Soma M, Kanmatsuse K, Kokubun S. The microsatellite alleles on chromosome 1 associated with essential hypertension and blood pressure levels. *J Hum Hypertens.* 2004 Jun 10 doi:10.1038/sj.jhh.1001740
- 18.Haketa A, Soma M, Nakayama T, Sato M, Kosuge K, Aoi N, Matsumoto K. Two medium-chain acyl-coenzyme A synthetase genes, SAH and MACS1, are associated with plasma high-density lipoprotein cholesterol levels, but they are not associated with essential hypertension. *J Hypertens.* 2004 Oct;22(10):1903-7.
- 19.Nakayama T, Soma M, Sato N, Haketa A, Kosuge K, Aoi N, Sato M, Izumi Y, Matsumoto K, Kanmatsuse K, Kokubun S. An association study in essential hypertension using functional polymorphisms in lymphotoxin-alpha gene. *Am J Hypertens.* 2004 Nov;17(11 Pt 1):1045-9.
- 20.Aoi N, Soma M, Nakayama T, Rahmutula D, Kosuge K, Izumi Y, Matsumoto K. Variable number of tandem repeat of the 5'-flanking region of type-C human natriuretic peptide receptor gene influences blood pressure levels in obesity-associated hypertension. *Hypertens Res.* 2004 Oct;27(10):711-6.
- 21.Sano M, Kuroi N, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Soma M, Kokubun S. Association study of calcitonin-receptor-like receptor gene in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2005 Mar;18(3):403-8.
- 22.Kobayashi Y, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kokubun S, Soma M. Haplotype-based case-control study revealing an association between the adrenomedullin gene and proteinuria in subjects with essential hypertension. *Hypertens Res.* 2005 Mar;28(3):229-36.
- 23.Nakayama T, Asai S, Sato N, Soma M. Genotype and Haplotype Association Study of the STRK1 Region on 5q12 Among Japanese. A Case-Control Study. *Stroke.* 2006, In press